

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03038

研究課題名(和文) 病原体とその媒介者を標的としたマツ材線虫病の防除 - 昆虫病原性線虫の共生細菌の利用

研究課題名(英文) Control of both the pathogen and the vector in pine wilt disease by the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes

研究代表者

前原 紀敏 (Maehara, Noritoshi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：20343808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：化学殺虫剤の予防散布に代わるマツ材線虫病の新たな防除技術を開発するために、マツノマダラカミキリ(病原体マツノザイセンチュウの媒介者)に殺虫活性を示す昆虫病原性線虫の主要な共生細菌2種を検出し、Photorhabdus属とPseudomonas属の細菌であると同定した。この細菌2種は単独で経口感染によりマツノマダラカミキリに殺虫活性を、また共存実験によりマツノザイセンチュウに殺線虫活性を示した。このことより、この2種の細菌は、昆虫病原性線虫の共生細菌を「予防散布」に用いた、マツノザイセンチュウとマツノマダラカミキリの両方を標的とする新たな防除技術の開発に向けて、有望な防除素材になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、昆虫病原性線虫は特異性の高い細菌1種と絶対的共生関係を持ち、その細菌単独では殺虫活性を示さないとされてきたが、今回線虫1種から主要な共生細菌を2種検出するとともに、それぞれが単独で経口感染による殺虫活性を有することを解明し、昆虫病原性線虫と共生細菌の関係における学術的な新知見を得た。また、得られた細菌2種が殺虫、殺線虫活性に加え、当初の計画にはなかった殺菌活性も併せ持つことを解明できたので、今後はマツ材線虫病の病原体とその媒介者だけでなく、それ以外の多様な生物群(昆虫・線虫・菌類)の新たな防除技術の開発にも活かしていく。

研究成果の概要(英文)：To develop microbial control of pine wilt disease instead of preventive sprays of chemical insecticides against *Monochamus alternatus*, the vector of the pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*, we detected two species of symbiotic bacteria of an entomopathogenic nematode that had a strong insecticidal effect on *M. alternatus*, and molecularly identified these bacteria as the genera *Photorhabdus* and *Pseudomonas*. Each of these bacteria showed an insecticidal effect on *M. alternatus* by peroral infection and a nematocidal effect on *B. xylophilus* by a coexistence experiment. This result indicates that these bacteria can be used as agents for microbial control of both *B. xylophilus* and *M. alternatus* by spraying them preventively.

研究分野：森林微生物生態学

キーワード：マツノマダラカミキリ マツノザイセンチュウ 微生物的防除 昆虫病原性線虫 共生細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病はマツ類樹木の伝染病であり、日本だけでなく東アジアやポルトガルでも深刻な被害を引き起こしている。病原体マツノザイセンチュウは媒介者マツノマダラカミキリによって枯死木から健全木へと運ばれ、本病を伝染する。本病の防除は、発病前に行う「予防」と発病・枯死後に行う「駆除」からなるが、環境や健康に対する影響を懸念する声を考慮して、あらかじめ健全木の枝に化学殺虫剤をまいておく予防散布を中止する自治体が増えている。防除の両輪のうち「予防」が欠けることにより、被害の抑制が困難になっている。環境への負荷の少ない防除法を開発するために、研究代表者の研究 (Maehara et al. 2006 *Nematology* 8, 59-67; Maehara 2008 *Biol Control* 44, 61-66) を含めて様々な生物的防除技術の開発が試みられ、マツノマダラカミキリの昆虫病原糸状菌を用いた製剤「バイオリサ・マダラ」が研究代表者や研究分担者(高務)を含むチームにより実用化された (Maehara et al. 2007 *J Econ Entomol* 100, 49-53; Takatsuka 2007 *Appl Entomol Zool* 42, 619-628)。しかし、これは「駆除」に使う製剤であり、「予防」に使える製剤は海外を含めて開発できていない。その理由は、予防用の化学殺虫剤に匹敵する即効性のある天敵生物をこれまで見つけられなかったからである。

昆虫病原性線虫は昆虫体内に侵入後、共生細菌を放出する。そして、その細菌の殺虫活性により昆虫は死亡する。従来の研究では昆虫病原性線虫は特異性の高い細菌 1 種と相互依存的な共生関係 (絶対的共生関係) を持つとされてきた。線虫は共生細菌の運搬・外的環境からの保護を担い、共生細菌は昆虫を殺し、死亡虫体内で自らが線虫の餌になることで線虫の増殖環境を整える。このように共生細菌は線虫によって昆虫の体内に運ばれて殺虫活性を示すため、ごく一部の例外を除き、細菌単独での経口感染能力はないとされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫病原性線虫の共生細菌を「予防散布」に用いた、マツ材線虫病の病原体マツノザイセンチュウとその媒介者マツノマダラカミキリの両方を標的とする新たな防除技術の開発を目的とする。具体的には、(1) マツノマダラカミキリに殺虫活性を示す昆虫病原性線虫を探索する。(2) 昆虫病原性線虫の共生細菌を分離・同定し、マツノマダラカミキリに対する共生細菌の殺虫活性を解明する。(3) マツノザイセンチュウに対する共生細菌の殺虫活性を解明する。(4) マツノザイセンチュウを保持したマツノマダラカミキリのマツを枯らす能力に対する共生細菌の抑制効果を評価し、新たな防除技術の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) マツノマダラカミキリに殺虫活性を示す昆虫病原性線虫の探索

東北地方各地に設定しているマツ林試験地等から土壌を採取した。その土壌サンプル表面にマツノマダラカミキリ幼虫を置いて、幼虫に感染できる昆虫病原性線虫を収集し、形態およびゲノム情報に基づいた分類により同定した。得られた昆虫病原性線虫のマツノマダラカミキリ幼虫および成虫に対する殺虫活性を接種試験により調べ、活性の強い線虫を選抜した。

(2) 昆虫病原性線虫の共生細菌の検出・同定

(1) で選抜した昆虫病原性線虫、その線虫に感染し死亡したマツノマダラカミキリ幼虫、および対照としての健全な幼虫の細菌叢をアンプリコンシーケンス解析により調べた。得られた細菌叢を基に、マツノマダラカミキリ幼虫に殺虫活性を持つ主要な共生細菌を特定・分離し、形態およびゲノム情報に基づいた分類により同定した。

(3) マツノマダラカミキリに対する共生細菌の殺虫活性の解明

経口感染試験により、マツノマダラカミキリ幼虫および成虫に対する共生細菌の殺虫活性を調べた。

(4) 共生細菌の殺虫物質の解明

予備的なゲノム解析 (ドラフト配列) により、殺虫性のタンパク質や二次代謝産物をコードする遺伝子や遺伝子クラスターを調べた。

(5) マツノザイセンチュウに対する共生細菌の殺虫活性の解明

予備的な共存実験により、マツノザイセンチュウに対する共生細菌の殺虫活性を調べた。

(6) マツノザイセンチュウを保持したマツノマダラカミキリ成虫のマツを枯らす能力に対する共生細菌の抑制効果の評価

(3) ~ (5) の結果より、共生細菌が、マツノマダラカミキリ成虫を殺し、またその成虫の摂食痕を通じたマツノザイセンチュウの樹体への侵入を防いでマツを守るための防除素材となりうるかどうかを評価した。

4. 研究成果

(1) マツノマダラカミキリに殺虫活性を示す昆虫病原性線虫の探索

岩手県のマツ林試験地および熊本県のスギ林の土壌からマツノマダラカミキリ幼虫に感染できる昆虫病原性線虫を1種ずつ収集した。前者を *Heterorhabditis megidis*、後者を *Oscieius* 属線虫と同定した後、培養・保存方法を確立した。このうち殺虫活性がより強いと予想された *H. megidis* につき接種試験を行ったところ、マツノマダラカミキリ幼虫を早いと3日程度で、また線虫が1、2頭侵入するだけでも殺せることが分かり、幼虫に対する病原力の強さが明らかになった(図1)。また、死亡した幼虫は赤色を呈した(図2)。併せて、マツノマダラカミキリ成虫にも殺虫活性があることを確認した上で、この線虫を選抜した。

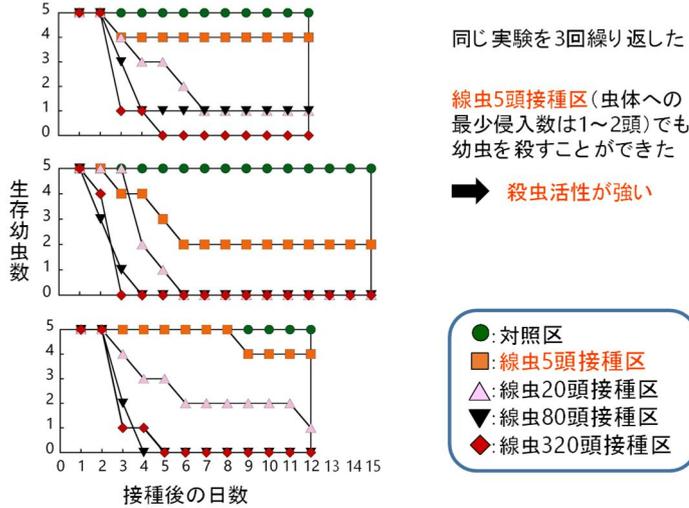


図2. 昆虫病原性線虫の感染により死亡したマツノマダラカミキリ幼虫

図1. 昆虫病原性線虫のマツノマダラカミキリ幼虫に対する接種実験

(2) 昆虫病原性線虫の共生細菌の検出・同定

(1)で選抜した昆虫病原性線虫 *H. megidis*、その線虫の感染により死亡したマツノマダラカミキリ幼虫、及びマツノマダラカミキリ健全幼虫の細菌叢をアンプリコンシーケンス解析により調べたところ、前2者で細菌叢の重なりが大きく、その中に昆虫病原性線虫の共生細菌が含まれると考えられた(図3)。そこから主要な2種を選抜・分離し、形態およびゲノム情報に基づいた分類により、*Photorhabdus* 属と *Pseudomonas* 属の細菌であると同定した。従来の研究では昆虫病原性線虫は特異性の高い細菌1種と相互依存的な共生関係(絶対的共生関係)を持つとされてきたが、近年、昆虫病原性線虫が複数種の細菌を持つ例が海外で報告され、本研究でも線虫1種から、これまでも共生細菌とされてきた *Photorhabdus* 属細菌に加え、新たに *Pseudomonas* 属細菌を検出した。

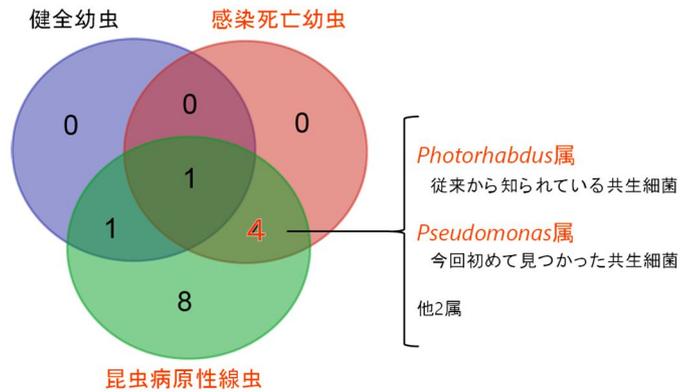


図3. 昆虫病原性線虫、線虫の感染により死亡したマツノマダラカミキリ幼虫、マツノマダラカミキリ健全幼虫の細菌叢(属レベル)の重なり

(3) マツノマダラカミキリに対する共生細菌の殺虫活性の解明

経口感染実験により、細菌2種が単独でマツノマダラカミキリの幼虫と成虫に殺虫活性を示した(図4)。従来の研究では、共生細菌は昆虫病原性線虫に昆虫の血体腔に運ばれて初めて殺虫活性を示すと言われていたが、今回、共生細菌2種が単独で経口感染による殺虫活性を示すことを明らかにした。また、*Photorhabdus* 属細菌の感染により死亡したマツノマダラカミキリ幼虫は赤色を呈したため、昆虫病原性線虫の感染により死亡した幼虫が赤くなるのは *Photorhabdus* 属細菌のせいであることが分かった。



図4. 昆虫病原性線虫の共生細菌の経口感染により死亡したマツノマダラカミキリ成虫

(4) 共生細菌の殺虫物質の解明

予備的なゲノム解析(ドラフト配列)により、細菌2種ともに複数の殺虫性のタンパク質や二次代謝産物をコードする遺伝子や遺伝子クラスターを保持していることを明らかにした。

(5) マツノザイセンチュウに対する共生細菌の殺線虫活性の解明

予備的な共存実験により、細菌2種がマツノザイセンチュウに殺線虫活性を示した。

(6) マツノザイセンチュウを保持したマツノマダラカミキリ成虫のマツを枯らす能力に対する共生細菌の抑制効果の評価

(3)~(5)の結果より、細菌2種が、マツノマダラカミキリ成虫を殺し、またその成虫の摂食痕を通じたマツノザイセンチュウの樹体への侵入を防いでマツを守るための防除素材となり、現行の防除法である化学殺虫剤の予防散布の代わりに使える可能性を秘めているといえる。

(7) 当初予期していなかった新たな知見

計画にはなかったが、細菌2種がマツノザイセンチュウの餌になる青変菌に対する殺菌活性(図5)および殺菌性のタンパク質や二次代謝産物をコードする遺伝子や遺伝子クラスターを有することを解明し、両細菌の樹木病原菌防除への応用の可能性を示した。

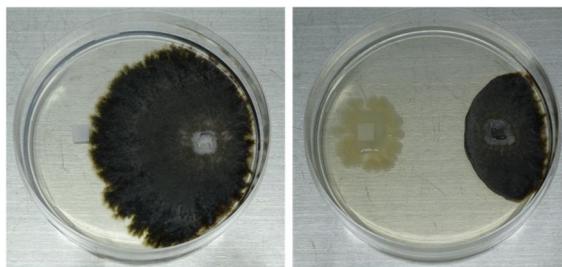


図5. 昆虫病原性線虫の共生細菌の殺菌活性実験における青変菌のみの対照区(左)と、細菌と青変菌の対峙培養(右)

(8) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

殺虫、殺線虫および殺菌活性を併せ持つ細菌2種を得ることができ、当初の目的である昆虫病原性線虫の共生細菌を「予防散布」に用いた、マツ材線虫病の病原体マツノザイセンチュウとその媒介者マツノマダラカミキリの両方を標的とする新たな防除技術の開発はもちろんのこと、それ以外の多様な生物群(昆虫・線虫・菌類)の新たな防除技術の開発にもこの2種の細菌を使うことができる。

従来、昆虫病原性線虫は特異性の高い細菌1種と絶対的共生関係を持ち、その細菌単独では殺虫活性を示さないとされてきたが、今回線虫1種から主要な共生細菌を2種検出するとともに、それぞれが単独で経口感染による殺虫活性を有することを解明し、昆虫病原性線虫と共生細菌の関係における学術的な新知見を得た。

(9) 今後の展望

殺虫、殺線虫および殺菌活性を併せ持つ、昆虫病原性線虫の共生細菌2種を得ることができたので、今後はマツ材線虫病だけでなく多様な生物群(昆虫・線虫・菌類)を対象にした新たな防除技術の開発研究を、後継の科研費「マツ枯れから侵入種・樹木病害・農業線虫まで：昆虫病原性線虫の共生細菌による防除」(23H02264, 2023~2025年度)で推進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ozawa Sota, Maehara Noritoshi, Takatsuka Jun, Aikawa Takuya, Nakamura Katsunori	4. 巻 58
2. 論文標題 Insecticidal effect of the entomopathogenic nematode <i>Heterorhabditis megidis</i> (Nematoda: Heterorhabditidae) baited from the soil on the larvae of <i>Monochamus alternatus</i> (Coleoptera: Cerambycidae)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 197 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-023-00820-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maehara Noritoshi, Aikawa Takuya, Kanzaki Natsumi, Nakamura Katsunori	4. 巻 24
2. 論文標題 Transfer of four isolates of <i>Bursaphelenchus doui</i> into <i>Monochamus alternatus</i> and potential vector switching of the?nematode	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 855 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maehara Noritoshi, Kanzaki Natsumi, Aikawa Takuya, Nakamura Katsunori	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential vector switching in the evolution of <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> group nematodes (Nematoda: Aphelenchoididae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 14320 ~ 14329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.7033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤壮太、前原紀敏、高務淳、相川拓也、中村克典
2. 発表標題 昆虫病原性線虫 <i>H. megidis</i> S0z01株のマツノマダラカミキリ殺虫活性評価
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤壮太、前原紀敏、高務淳、相川拓也、中村克典
2. 発表標題 土壌由来の昆虫病原性線虫のマツノマダラカミキリ幼虫に対する殺虫効果
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>前原紀敏(2023)天敵微生物を利用した防除技術開発のこれまでとこれから. 樹木医学研究 27 (印刷中)</p> <p>研究業績アーカイブ https://www.researchgate.net/profile/Noritoshi_Maehara</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 克典 (Nakamura Katsunori) (40343785)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	高務 淳 (Takatsuka Jun) (80399378)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	小澤 壮太 (Ozawa Sota) (10753139)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・研究員 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------