

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：94201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21323

研究課題名（和文）共生微生物を利用した生物農薬の機能強化技術

研究課題名（英文）Functional enhancement technology for a biological control agent using artificial symbiotic system

研究代表者

森 光太郎（MORI, Kotaro）

石原産業株式会社 中央研究所・生物科学研究室・グループリーダー

研究者番号：40344840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究はミヤコカブリダニに微生物を人為的に共生させる系の構築を目的の一つとしている。この構築に際し、そもそもミヤコカブリダニがどのような共生微生物叢を持っているかは非常に有用な情報であるため、次世代シーケンサーを使って16S rRNA遺伝子配列を解析して微生物叢の推定を行った。その結果、雌成虫と卵で微生物叢が有意に異なることが示唆された。微生物種の解析からもこれは支持された。また、卵に特異的に見られる分類群や個体群に関係なく雌成虫と卵に共通で見られる微生物種も見出された。人為共生の方法構築のため、モデルとして蛍光ビーズや大腸菌を吸汁させるシステムと観察系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、今後普及が進むと考えられる生物農薬の性能を強化してより使いやすくする技術の基礎となるものである。得られた結果の一つであるミヤコカブリダニの微生物叢の親子間や個体群間比較データや微生物の取り込ませ方はその基盤となる情報や技術で、有用である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to construct a system that allows microorganisms to coexist artificially with the phytoseiid mite. The results suggested that the microbiota of adult females and eggs are different. However, some microbial species were commonly found both in adult females and eggs. We constructed the observation method of phytoseiid mites that ingest fluorescence beads or Escherichia coli.

研究分野：植物保護

キーワード：生物的防除 生物農薬 天敵農薬 ミヤコカブリダニ 共生微生物 16S rRNAメタゲノム解析 人工共生

1. 研究開始当初の背景

化学農薬による環境負荷に対する低減の要請，害虫の化学農薬に対する感受性低下を背景に，生産者の総合的病害虫管理（IPM）技術への需要は今後ますますのびていくものと考えられる．IPMの基盤技術である生物農薬については，施設野菜における天敵の利用技術が長く研究され，実用化されてきた．世界的に見れば，最初の生物的防除が行われてから約130年が経過している（van Lenteren BioControl 57:1-20, 2012）．しかしながら生物農薬は，化学農薬と比べて防除成功率が振れやすく，使い方に習熟が必要であり，世界的にも農家への普及率は数%から10%程度である．この理由として変動の激しい圃場環境で天敵を圃場に定着させるのが難しいこと，天敵と併用できる農薬（天敵のターゲットではない病害虫防除のため農薬が併用されることが多い）に限られることなどの問題がある．申請者は現職にて10年間にわたり，生物農薬の事業化に携わった．その過程で全ての農家が，タイミングを選ばずに放飼，定着させることができ，化学農薬のように効き目がシャープな生物農薬を開発したいと考えてきた．このためには生物農薬（微生物，昆虫，ダニ）のゲノム情報に基づいて改良する基礎研究が必要である．

2. 研究の目的

本研究は生物農薬の主要な有効成分である天敵カブリダニを人為的に操作して機能強化する試みのひとつである．昆虫，ダニ類に見られる共生微生物は寄主の形質（性，殺虫剤抵抗性など）を変化させている．この現象を逆手に取って，有用形質を持たせた微生物を天敵に人為的に共生化させ，所期した形質を天敵に付与する新技術の確立をめざす．異なる有用形質を有する複数の微生物系統を構築・保管しておき，用途に合わせて共生化し，形質転換することを意図する．つまり，有用形質を持つ微生物をカートリッジ化してオーダーメイドで生物農薬を作ろうという試みである．他の天敵にも転用可能なコンセプトで，新しい分野・技術の創出になると考える．

本研究では上記目的を達成する基礎として，1．カブリダニの持つ微生物叢の解明を行う．また，2．微生物をカブリダニに取り込ませる技術の構築する．

3. 研究の方法

1. カブリダニの持つ微生物叢の解明

16rRNAのアンプリコン解析を行った．

2. 微生物をカブリダニに取り込ませる技術

サイズの異なる蛍光ビーズを取り込ませる実験系を構築した．

蛍光ビーズの方法を応用して大腸菌を取り込ませる実験系を構築した．

4. 研究成果

次世代シーケンスによりカブリダニから抽出したDNAに含まれる微生物由来の16S rRNA遺伝子配列を解析して微生物叢の推定を行った．まずカブリダニ微生物叢のDNAを抽出する方法を検討した．虫体の破碎方法や条件，虫体破碎後のDNA抽出方法，16S rRNA配列増幅方法を確立した．確立した方法にて調製したDNAサンプルをアンプリコンシーケンスに供試した．供試したのは，ミヤコカブリダニのメス成虫と同卵から抽出したDNAである．解析の結果，メス成虫には62，卵には100のOTUが検出された．すなわち，本種は生活史を通じてバクテリアを共生させていると推察された．Jaccard指数はメス成虫と卵が0.571で，比較として用いた別種（スワルスキーカブリダニのメス成虫）との値（メス同士：0.854，卵とスワルスキーカブリダニ：0.878）よりも類似性が高かった．ミヤコカブリダニのメス成虫と卵で確認されたOTUのうち80%を占める3種類のOTUは共通であった．

国内で採集したミヤコカブリダニの複数個体群間および親子間（雌成虫と卵）の微生物叢の比較を行った．その結果，各比較についてα多様性については有意な差は認められなかったが，β多様性については，個体群ごとにクラスターが形成されること，また，雌成虫と卵でもクラスターが形成される結果となった．すなわち，これらの単位で微生物叢が有意に異なることが示唆された．微生物種の解析からもこれは支持された．また，卵に特異的に見られる分類群や個体群に関係なく雌成虫と卵に共通で見られる微生物種も見出された．

虫体の部位ごとに細菌叢に違いがあるかどうかを調べることを試みた．人為共生化させるベクターの選択にこの情報は有用である．カブリダニは微小なため，解剖して部位ごとにサンプルを分けるのが難しい．そこでカブリダニ体表洗浄処理の有無，飢餓処理の有無での細菌叢の違いや糞に見られる細菌叢を比較解析した．その結果，上記処理による細菌叢のOTU数（40から60）や分類群構成割合に大きな違いはなかった．すなわち部位ごとに細菌叢に大きな違いはないと考えられた．

次に，抗生物質処理を施したカブリダニの細菌叢を解析した．抗生物質処理すると，検出されるOTU数は減少し，その細菌叢の多様度も低下した．今回は抗生物質処理時間を24時間としたが，処理時間を増加した場合に細菌叢がどのように変化するか，また宿主であるカブリダニに

どのような変化が起こるかを調べて、細菌叢の機能も調べる必要がある。

カブリダニの微生物叢から培養可能な微生物を分離することを試みた。上記のように体表洗浄処理、飢餓処理を施した雌成虫を破碎して細菌用の寒天培地に塗りつけ、培養後に出現したコロニーを回収して 16S rRNA アンプリコン解析に供した。他にカブリダニを歩かせた寒天培地上に出現したコロニーやカブリダニの糞自体からも DNA を抽出して解析した。その結果、検出された OTU 数は 10 から 15 程度で多様度も小さかった。具体的には *Serratia* 属、*Staphylococcus* 属などが検出された。これらは処理間、糞内の構成ともよく似ていた。

カブリダニに微生物を取り込ませる手法の検討を行った。微生物の代わりにサイズの異なる蛍光ビーズを用いて吸汁方法を試した。直径 50nm ビーズ液滴に蜂蜜をまぜて供試すると、ビーズを取り込むことが蛍光顕微鏡観察によって確認できた。そこで微生物を供試可能でより効率的な吸汁系の構築を試みた。プラスチックシャーレを用いた吸汁系を作成したが取り込み効率が悪かったため、改良を行った。次にミヤコカブリダニが餌として利用するハダニに蛍光ビーズを吸汁させ、そのハダニをミヤコカブリダニに捕食させる方法を試した。その結果、50nm ビーズをハダニは取り込み、さらにそのハダニを捕食したミヤコカブリダニも高い確率で大量のビーズを取り込んでいることが観察された。さらに直径 750nm ビーズについても同じ方法で試したところ、確率は下がるがハダニの取り込みが観察され、50nm ビーズよりも少量ではあるが、750nm ビーズを取り込んでいるミヤコカブリダニを観察することができた。ハダニやミヤコカブリダニの系統を変えても同様の結果が得られた。さらに大きなビーズ（直径 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m）でもこの方法を試したところ、ハダニは 1 μ m ビーズを非常に低頻度ながら取り込むことがわかったが、ミヤコカブリダニが吸汁するかは今のところ不明である。今後はこの取り込み率を高める工夫（吸汁の環境条件、個体条件）を引き続き行う。また、実際の微生物（大腸菌等）を用いた吸汁系の改良も引き続き進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 吉村忠浩・森光太郎・岸本英成・外山晶敏・宮崎仁実・五十嵐清晃	4. 巻 66
2. 論文標題 ミヤコカブリダニ（ダニ目：カブリダニ科）に対する各種薬剤の影響―直接散布と残効性評価を組み合わせた総合評価	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本応用動物昆虫学会誌	6. 最初と最後の頁 31-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1303/jjaez.2022.31	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 Yuya Mikawa, Mineaki Aizawa, Kotaro Mori, Masatoshi Toyama, Shoji Sonoda	4. 巻 27
2. 論文標題 Molecular verification of commercialized Neoseiulus californicus (McGregor) settlement before spider mite appearance in a Japanese pear orchard	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Systematic and Applied Acarology	6. 最初と最後の頁 2403-2413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11158/saa.27.12.3	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 森光太郎	4. 巻 77
2. 論文標題 石原産業の生物農薬開発の取り組み	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物防除部会ニュース	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 森光太郎	4. 巻 56
2. 論文標題 生物農薬の機能強化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 39-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 山口晃一・森光太郎	4. 巻 75
2. 論文標題 ミヤコカブリダニと併用する気門封鎖剤の散布間隔と併用効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物防疫	6. 最初と最後の頁 269-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田直樹・新井優香・鈴木伽奈・片岡孝介・由良敬・白藤（梅宮）梨可・Nourelidin Abuelfadl Ghazy・森光太郎・刑部正博・鈴木丈詞
2. 発表標題 ミヤコカブリダニのゲノム全塩基配列解読と飢餓応答因子のマルチオミクス解析
3. 学会等名 第31回日本ダニ学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nourelidin A. Ghazy, Kotaro Mori, Takeshi Suzuki
2. 発表標題 Factors affecting Neoseiulus californicus releases from a sachet-like container
3. 学会等名 第31回日本ダニ学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森光太郎
2. 発表標題 石原産業の生物農薬開発の取り組み
3. 学会等名 東京農業大学 総合研究所研究会 生物的防除部会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1．発表者名 森光太郎・Ghazy, Nouredin
2．発表標題 ミヤコカブリダニの共生微生物叢の解析
3．学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 Nouredin Ghazy・Naoki Takeda・Masanobu Yamamoto・Yasser Mohammad・Kotaro Mori・Takeshi Suzuki
2．発表標題 Host plants and locomotion speed in phytoseiid mites
3．学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 山口晃一・吉村忠浩・三溝啓太・山中英・森光太郎
2．発表標題 ミヤコバンカーのナシにおける設置方法と土着カブリダニの発生活長から見たハダニ防除効果
3．学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 山口晃一・森光太郎
2．発表標題 ミヤコカブリダニの上手な使い方～飽差と絶対湿度の影響の検証～
3．学会等名 第30回天敵利用研究会沖縄大会
4．発表年 2021年

1．発表者名 大朝真喜子・徳永英行・向井敏正・森光太郎
2．発表標題 アスバラガスでのミヤコパンカー利用によるハダニ防除～愛媛県現地圃場での検証～
3．学会等名 第30回天敵利用研究会沖縄大会
4．発表年 2021年

1．発表者名 山口晃一・森光太郎
2．発表標題 スワルスキーカブリダニとミヤコカブリダニの孵化に及ぼす温度と湿度の影響
3．学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 森光太郎
2．発表標題 天敵ミヤコカブリダニの共生微生物叢：生物農薬の機能強化に向けて
3．学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 石川俊夫,山口晃一,森光太郎
2．発表標題 バラのミヤコパンカー®によるハダニ防除効果の数理生物学的解析
3．学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4．発表年 2021年

1．発表者名 大朝真喜子, 森光太郎, 中野昭雄
2．発表標題 スワルバンカー®の改良～新製剤の基本特性と現地試験での評価～
3．学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4．発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1．著者名 森光太郎（梅津憲治監修）	4．発行年 2023年
2．出版社 シーエムシー出版	5．総ページ数 550
3．書名 第12章 生物農薬の開発動向 1.生物農薬開発の全般的動向（「化学農薬・生物農薬・BSの創製研究」分担執筆）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

令和4年度民間部門農林水産研究開発功績者表彰農林水産技術会議会長賞民間企業部門、園芸研究功労賞受賞
<https://www.iskweb.co.jp/topics/2022/2861/>

6．研究組織			
<table><tr><td>氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）</td><td>所属研究機関・部局・職 （機関番号）</td><td>備考</td></tr></table>	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
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	

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
---------	---------