

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510121

研究課題名(和文)量子ビームを用いた新機能的昆虫病原糸状菌の創出

研究課題名(英文) Traits improvement by ion-beam and gamma-ray irradiation in entomopathogenic fungi

研究代表者

西東 力 (SAITO, Tsutomu)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40402234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫病原糸状菌(Isaria fumosorosea, Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliaeなど)は害虫の生物的防除法にとって有力な素材であるが、殺菌剤と併用しにくい、高温下では感染しにくいといった課題を抱えている。本研究では、量子ビーム(イオンビームおよびガンマ線)を用いた突然変異育種法によって、殺菌剤耐性変異体ならびに高温耐性変異体を創出した。量子ビームは、昆虫病原糸状菌の改良に利用できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Entomopathogenic fungi, such as Isaria fumosorosea, Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae, are important agents in IPM systems of insect pests, however they are not compatible with fungicides and high temperatures. This study indicated that ion-beam and gamma ray irradiation technology successfully produced fungicide resistant mutants and thermotolerant mutants. The technology has great potential as a tool to improve the traits of entomopathogenic fungi.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：昆虫病原糸状菌 イオンビーム ガンマ線 殺菌剤耐性 高温耐性 改良 突然変異

1. 研究開始当初の背景

昆虫に寄生するカビ（昆虫病原糸状菌）は環境への負荷が少ない防除素材として古くから期待されており、そのいくつかは生物農薬として市販されている。しかし、殺菌剤と併用しにくいこと、高温下では感染しにくいことなどから、使用場面は限定されている。こうした課題の抜本的な解決策のひとつは昆虫病原糸状菌の改良である。

2. 研究の目的

量子ビーム（イオンビーム、ガンマ線）を用いた突然変異育種技術によって、殺菌剤耐性と高温耐性を有する昆虫病原糸状菌変異体を創出し、その特性を明らかにする。本研究を通して、量子ビームは昆虫病原糸状菌の育種にも適用できることを世界に先駆けて示す。

3. 研究の方法

(1) 昆虫病原糸状菌として3菌種（*Isaria fumosorosea*、*Beauveria bassiana s.l.*、*Metarhizium anisopliae s.l.*）を供試した。

(2) イオンビームとガンマ線の照射は、日本原子力機構（高崎）が保有する装置で行った。

(3) 殺菌剤耐性変異体の選抜には市販のベノミル水和剤（成分50%）を用いた。

(4) 照射線量は、線量（イオンビーム：50～700 Gy、ガンマ線：30～3000 Gy）と分生子の生存率の関係から決定した。

(5) 殺菌剤耐性菌作出の実験には *I. fumosorosea* および *B. bassiana s.l.* を供試した。量子ビームを照射した分生子をベノミル添加培地（500 ppm）で培養し、発育したコロニーをベノミル耐性変異体として分離した。分離株は、ベノミルに対する耐性レベル（菌糸発育の EC₅₀ 値）を調査した。併せて、市販の他剤（チオファネートメチル、イプロジオン、ジエトフェンカーブ、クロロタロニル、トリフルミゾール：常用濃度）に対する耐性も調べた。さらに、殺菌剤耐性に関与している可能性のある遺伝子を解析した。

(6) 高温耐性変異体作出の実験には *M. anisopliae s.l.* の2菌株（Ac、Pa）を供試した。量子ビーム照射後の分生子を38℃で培養し、発育したコロニーを高温耐性変異体として分離した。分離株は、発育上限温度を調べるとともに、コクゾウムシ成虫に対する病原性を調べた。さらに、高温耐性に関与している可能性のある遺伝子を解析した。

4. 研究成果

(1) 突然変異を効率的に誘起する線量（生存率：1～10%）（Toyoshima *et al.*, 2012）に基づき、供試菌に対する最適な照射線量の範囲を決定した（*I. fumosorosea*：イオンビーム 100

～500 Gy、ガンマ線 400～1000 Gy、*B. bassiana s.l.*：イオンビーム 100～350 Gy、*M. anisopliae s.l.*：イオンビーム 100～500 Gy、ガンマ線 30～3000 Gy）。

(2) ベノミル耐性 *I. fumosorosea* 変異体は、イオンビーム照射（150 Gy、300 Gy）で2株（IB34、IB421）、ガンマ線照射（1000 Gy）で2株（GR5、GR22）、ガンマ線（200 Gy）とイオンビーム（500 Gy）の2段階照射で2株（GRIB8、GRIB9）が得られた。変異体のベノミルに対する EC₅₀ 値は親株の 742～>2000 倍を示し、高度の耐性を獲得していることがわかった（表1）。

表1 *I. fumosorosea* 変異体のベノミル耐性

菌株	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	耐性の倍率
親株	2.5	1
IB34	> 5000	> 2000
IB421	> 5000	> 2000
GR5	1854.5	742
GR22	> 5000	> 2000
GRIB8	> 5000	> 2000
GRIB9	> 5000	> 2000

(3) ベノミル耐性 *B. bassiana s.l.* 変異体はイオンビーム照射（150 Gy）で2株（BB22、BB24）が得られた。変異体のベノミルに対する EC₅₀ 値は親株の 573 倍と 713 倍を示し、高度の耐性を獲得していることがわかった（表2）。

表2 *B. bassiana s.l.* 変異体のベノミル耐性

菌株	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	耐性の倍率
親株	0.94	1
BB22	540	573
BB24	670	713

(4) ベノミル耐性変異体はいずれもチオファネートメチルに対する耐性も向上した。逆に、ジエトフェンカーブに対する耐性は低下した。これは、ベノミルがチオファネートメチルと正の交差抵抗性の関係に、ジエトフェンカーブとは負の交差抵抗性の関係にあるためと考えられた。

(5) ベノミル耐性変異体の β -tubulin 遺伝子を解析したところ、*I. fumosorosea* では変異が認められなかったが、*B. bassiana s.l.* ではコドン 198 のグルタミンがアラニンに置き換わっていた。*B. bassiana* では同様の報告があるが（Zou *et al.*, 2006）、置換されたアミノ酸に違いがあった。

(6) 高温耐性変異体は、親株 Ac から4株（イオンビーム：Ac-IB、ガンマ線：Ac-GR1、AcGR2、AcGR-3）、親株 Pa から1株（イオンビーム：Pa-IB）の計5株が得られた。これら変異体の

発育上限温度は親株より2~3℃高く、38℃においても発育した(表3)。高温条件下(30℃)における変異体の病原力を調べたところ、Ac-IBによる死亡率は親株Acのそれより有意に高く(図1)、高温の影響を受けにくいことがわかった。しかし、Ac由来の他の変異体による死亡率は親株のそれと同等であった。また、Pa-IBの病原力は親株と比べて大きく低下していた。いずれの変異体でも3つの遺伝子(neutral trehalase, β -tubulin、ATP-binding cassette transporter)に変異は認められなかった。

表3 高温域における *M. anisopliae s.l.* 変異体の発育(コロニー直径 mm)

菌株	温度(℃)				
	35	36	37	38	39
Ac(親株)	5.4	2.1	0	0	0
Ac-IB	12.2	4.9	1.0	0.7	0
Ac-GR1	11.0	6.8	3.2	1.7	0
Ac-GR2	10.8	6.1	3.1	2.3	0
Ac-GR3	11.7	5.6	2.9	2.3	0
Pa(親株)	3.0	0	0	0	0
Pa-IB	6.6	2.6	1.1	1.0	0

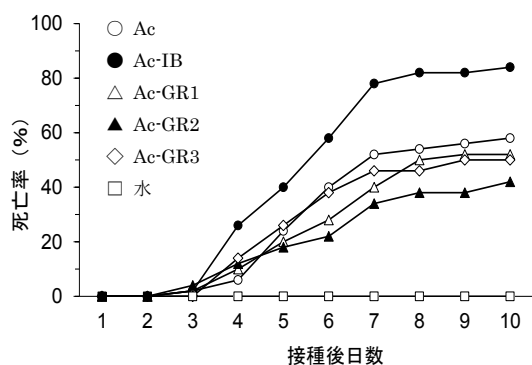


図1 高温耐性 *M. anisopliae s.l.* 変異体のコクゾウムシ成虫に対する病原性

(7) 医薬用物質(cordycepin)の生産能が高い昆虫病原糸状菌(*Cordyceps militaris*)を作出するためにイオンビームが用いられているものの(Das et al., 2008)、害虫防除を目的とした昆虫病原糸状菌の改良にイオンビームを用いた研究は前例がなく、本研究が初めてである。

(8) 量子ビームを用いた突然変異育種技術は、昆虫病原糸状菌の殺菌剤耐性や高温耐性ばかりでなく、他の形質の改良にも幅広く利用できると考えられる。ただし、目的以外の変異も生じることから、作出された変異体の性質を多面的かつ慎重に検討する必要がある。

<引用文献>

① Toyoshima, Y., Takahashi, A., Tanaka, H.,

Watanabe, J., Mogi, Y., Yamazaki, T., Hamada, R., Iwashita, K., Satoh, K., and Narumi, I., Lethal and mutagenic effects of ion beams and γ -rays in *Aspergillus oryzae*, *Mutation Research*, Vol. 740, 2012, 43–49.

② Zou, G., Ying, S. H., Shen, Z. C., and Feng, M. G., Multi-sited mutations of β -tubulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*, *Environmental Microbiology*, Vol. 8, 2006, 2096–2105.

③ Das, S. K., Masuda, M., Hatashita, M., Sakurai, A., and Sakakibara, M., A new approach for improving cordycepin productivity in surface liquid culture of *Cordyceps militaris* using high-energy ion beam irradiation, *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 47, 2008, 534–538.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

① Fitriana, Y., Shinohara, S., Satoh, K., Narumi, I., and Saito, T., Benomyl-resistant *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) mutants induced by ion beams, *Applied Entomology and Zoology*, 査読有, 2015, Vol. 50, 2015, 123–129. DOI: 10.1007/s13355-014-0314-7

② Fitriana, Y., Satoh, K., Narumi, I., and Saito, T., Ion-beam and gamma-ray irradiation induces thermotolerant mutants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Biocontrol Science and Technology*, 査読有, Vol. 24, 2014, 1052–1061. DOI: 10.1080/09583157.2014.918585

③ Shinohara, S., Fitriana, Y., Satoh, K., Narumi, I., and Saito, T., Enhanced fungicide resistance in *Isaria fumosorosea* following ionizing radiation-induced mutagenesis, *FEMS Microbiology Letters*, 査読有, Vol. 349, 2013, 54–60. DOI: 10.1111/1574-6968.12295

[学会発表](計1件)

① Fitriana, Y., Sato, K., Narumi, I., Tagami, Y., and Saito, T., Development of thermotolerant mutants of entomopathogenic fungi using ion beam irradiation, 応用動物昆虫学会第56回大会、近畿大学(大阪市東大阪)、2012年3月、講演要旨集、133頁。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西東 力 (SAITO, Tsutomu)
静岡大学・(連合) 農学研究科 (研究院)・
教授
研究者番号：40402234

(2) 研究分担者

鳴海 一成 (NARUMI, Issey)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・研
究主幹
研究者番号：90343920

佐藤 勝也 (SATO, Katsuya)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・研
究員
研究者番号：90370402

(3) 研究協力者

篠原 忍 (SHINOHARA, Shinobu)

FITRIANA, Yuyun