

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05649

研究課題名(和文) 枯草菌が生産する殺虫成分の構造と作用機構の解明

研究課題名(英文) Insecticidal factors produced by *Bacillus subtilis*

研究代表者

西脇 寿 (NISHIWAKI, HISASHI)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：30508784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：殺虫活性を示す枯草菌の培養上清から活性成分を精製し、アカイエカ幼虫に対して効果を発揮するタンパク質成分とイエバエ成虫に効果を発揮するペプチド成分を得ることができた。アカイエカに殺虫効果を発揮するタンパク質成分に関してMALDI-TOF MSによる解析を試み、reductaseなど数種の酵素が候補物質として考えられた。一方、LC-Q-TOF MSによる解析から、イエバエに殺虫効果を発揮したペプチドは3400 Daの質量をもつことが明らかとなった。トリプシン消化物のMSMS解析をすすめ、いくつかの消化ペプチドのアミノ酸配列を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、殺虫性枯草菌がタンパク質ならびにペプチド性の殺虫成分を生産することを明らかにすることができた。このうち、ペプチド性殺虫成分に関して、ラット赤血球に対する溶血活性が認められなかったことは、哺乳類に対して安全性が高いことを強く示唆する。また、このペプチドは熱には安定であったことから、将来商品化する際に加工しやすい可能性がある。

安全性の高い微生物農薬を提案できる可能性のある本研究の成果は、化学農薬による環境負荷を減らすことが期待でき、総合的病害虫管理(IPM)推進の手助けになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The insecticidal factors were isolated from the culture broth of the insecticidal *Bacillus subtilis*. SDS-PAGE analyses demonstrated that the insecticidal fractions included not only proteins (ca. 60 kDa) but also a peptide (3.4 kDa) showing the insecticidal activity against the larvae of mosquitoes *Culex pipiens* and the adults of houseflies *Musca domestica*, respectively. MALDI TOF MS analyses suggested that some enzymes including reductase should be the candidates as the insecticidal proteins against the mosquito larvae. On the other hand, the N terminus of the peptide with the molecular weight of 3.4 kDa was not able to be analyzed using the protein sequencer, suggesting that the peptide should be blocked at the N-terminus or cyclic.

研究分野：農薬科学

キーワード：枯草菌 殺虫活性 微生物農薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

化学合成農薬の使用による環境への負荷が問題視されて久しい。化学農薬だけに頼るのではなく、物理的および生物学的防除法なども駆使して病害虫を管理しようとする総合的病害虫管理(IPM)の考え方が推進されている中、生物農薬である天敵昆虫や微生物農薬の開発に興味もたれてきた。天敵昆虫は地域に生息する土着昆虫の活用などにより着実に増加してきているが、微生物農薬、その中でも本研究で着目する昆虫病原性細菌に関しては、様々な研究がすすめられてはいるものの、世界的な成功を収めている *Bacillus thuringiensis* (BT 剤) 以外はあまり目立って有効なものはない。しかも、この BT 剤に抵抗性を示す害虫の出現が問題になってきた。現在の農薬市場における生物農薬のシェアはほんの 1% 程度であり、ポスト BT 剤の候補となりうる新規昆虫病原性細菌の登場が望まれている。

その中、肉食性昆虫の消化管から数種の昆虫病原性細菌を単離し、そのうち数種の菌株が生産する殺虫成分の構造ならびに作用機構を明らかにしてきた。さらに、農業害虫であるハスモンヨトウに殺虫効果を示す細菌のひとつが、ひとに対する安全性が高い枯草菌であることを突き止めた。このような殺虫性細菌は将来の新規微生物農薬として開発されることが期待できるものの、その安全性を示すためには殺虫成分を明らかにして、作用機構に関する知見を得ることが必要となる。

2. 研究の目的

肉食性昆虫の消化管から単離した殺虫性枯草菌が生産する成分を明らかにする。タンパク質をコードする遺伝子配列を解明して組換え体タンパク質を作成し、活性発現機構に関する知見を得ることを目指す。さらに、益虫を含む種々の昆虫に対する殺虫活性を評価し、殺虫スペクトルを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 殺虫成分の精製

枯草菌 A1-3 株を pH 6 に調整した SCD 液体培地で振とう培養した後、遠心分離により菌体と上清に分画した。菌体の超音波破碎液と上清画分とをそれぞれアカイエカ幼虫ならびにイエバエ成虫に処理した。アカイエカ幼虫に対する殺虫効果を評価するためには、各画分の水溶液に虫体を投入して、24 時間経時的に症状を観察した。一方、イエバエ成虫に対する殺虫効果は、胸部背面より注射投与した後、アカイエカ幼虫と同様に症状を観察した。次に、認められた殺虫活性を指標にして、陰イオン交換、疎水性、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより殺虫成分を精製した。

(2) 殺虫成分の構造解析

精製により得られた画分に含まれている成分を SDS-PAGE で分析し、確認されたタンパク質由来のバンドを切りとってトリプシンなどの消化酵素で処理した後、MALDI-TOF MS ならびに LC/Q-TOF MS を用いて内部アミノ酸配列を解析した。また、プロテインシーケンサーによる N 末端配列の解析も並行してすすめた。さらに、ペプチド成分に関しては、酸で加水分解後、アミノ酸組成を解析した。

(3) 殺虫成分の作用機構の解明

アカイエカに効果を発揮する殺虫性タンパク質を処理したアカイエカの幼虫を経時的に顕微鏡下で観察した。一方、イエバエ成虫に即効的な致死症状を引き起こすペプチドの作用機構を調査するために、昆虫由来の細胞である Sf9 細胞に対する毒性を評価した。さらに、ラット赤血球に処理して、溶血活性の有無を評価した。

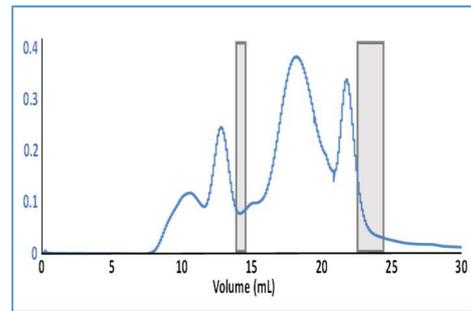
(4) 殺虫スペクトルの解析

ハスモンヨトウ幼虫に対して殺虫効果を示すことが明らかになっているが、ほかの害虫や益虫に殺虫症状を引き起こすか調査するために、ミカンキイロアザミウマ、ミカンハモグリガやニッポンクサカゲロウに処理して症状を観察した。

4. 研究成果

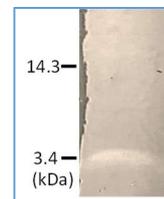
(1) 殺虫成分の精製

枯草菌 A1-3 株の培養液より調整した菌体破碎液と上清画分の両方に、アカイエカ幼虫ならびにイエバエ成虫に対する殺虫効果を確認した。なお、標準菌株を同条件で培養しても殺虫効果は認められなかった。次に、殺虫活性を指標にして、各種カラムクロマトグラフィーにより殺虫成分を精製したところ、60 kDa 付近のタンパク質性の物質がアカイエカ幼虫を 4-12 時間以内に麻痺させること、ならびに、低分子画分にイエバエ成虫を 10 分以内に即効的な殺虫効果を発揮する物質が含まれていることを明らかにした。また、アカイエカに効果を発揮する成分はイエバエには効果がなく、イエバエに効果を発揮する成分はアカイエカに効果を示さず、殺虫成分が複数含まれていることを明らかにすることができた。



(2) 殺虫成分の構造解析

精製により得られた画分に含まれている成分を SDS-PAGE で分析したところ、アカイエカに効果を示す画分には複数のバンドが認められたため、それぞれ切り取り MALDI TOF/TOF 解析を試みた。その結果、*reductase* などの酵素である可能性が示唆された。そこで、大腸菌を用いて候補物質であるタンパク質の組換え体を過剰発現させて活性を評価したが、殺虫効果は認められなかった。一方、イエバエに即効的に効果を発揮する成分には 3.4 kDa の物質が含まれていた (右図)。この成分の活性は 80 度の熱処理でも保持する一方で、トリプシンで消失した。N 末端配列の解析を試みたところ、結果を得ることができず、環状または N 末端が修飾されている可能性が示唆された。



(3) 殺虫成分の作用機構の解明

アカイエカに効果を発揮する殺虫性タンパク質を処理したアカイエカの幼虫を経時的に顕微鏡下で観察したところ、処理して 1 時間程度でアカイエカ幼虫体内の体液循環は認められるものの、体を動かすことができない症状を観察することができた。一方、イエバエ成虫に即効的な致死症状を引き起こすペプチドを Sf9 細胞に処理したところ、細胞溶解は認められなかった。イ

エバエ神経細胞に処理しても同様に細胞毒性は認められなかった。ラット赤血球に処理したところ、溶血活性は認められず、哺乳類に対して安全である可能性を示唆した。

(4) 殺虫スペクトルの解析

ミカンキイロアザミウマ、ミカンハモグリガやニッポンクサカゲロウに殺虫効果は認められなかった。

(5) 今後の展望

本研究により、殺虫性枯草菌がタンパク質性ならびにペプチド性の殺虫成分を生産することを明らかにすることができた。作用機構として、細胞毒性が認められなかったことから、即効的な症状は神経系や呼吸器系、または運動系に作用している可能性がある。今後、神経系に作用するかを確認するために、電気生理学実験用の装置を組み、確認することを目指す。

ペプチド性殺虫成分に溶血活性が認められなかったことは、ヒトに対して安全性が高いことを強く示唆する。また、このペプチドは熱には安定であったことから、将来商品化する際に加工しやすい可能性がある。

安全性の高い微生物農薬を提案できる可能性のある本研究の成果は、化学農薬による環境負荷を減らすことが期待でき、総合的病害虫管理(IPM)推進の手助けになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木翔太, 花崎健吾, 江川大智, 西脇寿
2. 発表標題 Bacillus subtilis が生産する殺虫成分の単離と構造解析
3. 学会等名 日本農薬学会第44回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川大智, 鈴木翔太, 西脇寿
2. 発表標題 枯草菌の生産する殺虫成分
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 西脇寿
2. 発表標題 新規昆虫制御剤の探索 ~ 化学農薬と微生物農薬 ~
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第31回若手研究者シンポジウム 第12回農芸化学未来開拓セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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