

機関番号：17201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580056

研究課題名 (和文) 高い殺虫活性を示す新規フォトラブドゥス属細菌の病原性因子と宿主応答

研究課題名 (英文) Pathogenicity of a novel virulent *Photorhabdus* bacterium and host responses against the bacterium

研究代表者

吉賀 豊司 (YOSHIGA TOYOSHI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：00312231

研究成果の概要 (和文)：

当研究室で見いだした昆虫病原性線虫の新規の *Photorhabdus* 属細菌分離株の病原性因子およびその感染による宿主昆虫の応答反応を解析した結果、強病原性分離株では脂肪分解酵素ならびにタンパク質分解酵素の活性が高く、そのため昆虫体内での高い定着能力が病原性の高い理由の一つと考えられた。また、その細菌分離株の感染によって宿主の摂食が低下することから、細菌は宿主の腸または神経系に影響を及ぼすことによって高い殺虫力を有することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Virulent factors of a novel *Photorhabdus* symbiotic bacterial isolate that was isolated from *Heterorhabditis* entomopathogenic nematode were analyzed. The bacterial isolate showed strong lipase and proteinase activities and propagated faster in the insect hemolymph than other *Photorhabdus* bacteria. After injection of the virulent *Photorhabdus* isolate into larvae, amount of artificial food fed by a larva and increase of larval weight were suppressed, which indicated the possibility that the virulent isolate affect insect gut or the insect nervous system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫病理

1. 研究開始当初の背景

土壌害虫に対する生物的防除資材として用いられる *Steinernema* 属および *Heterorhabditis* 属の昆虫病原性線虫はそれぞれ *Xenorhabdus* 属および *Photorhabdus* 属細菌と相互依存的共生関係をもつ。これまで

申請者は、線虫と細菌の共生関係およびその共進化・種分化の解明を試みるとともに昆虫病原性線虫の殺虫メカニズムを解明することで、昆虫病原性線虫の作出することも目的に研究を進めてきた。

昆虫病原性線虫の病原性は共生細菌に大

大きく依存する。殺虫活性の高い共生細菌株をえるため、線虫から共生細菌を単離・培養し、スクリーニングを行ったところ、既知のものに比べて極めて高い殺虫活性を示す分離株が得られた。その分離株の分子系統解析をしたところ、人間に日和見感染をする *P. asymbiotica* と同じクレードに属する新規 *Photobacterium* 属細菌であることが考えられた。本研究では、新規 *Photobacterium* 属細菌についてその殺虫活性に関する病原性因子および宿主昆虫の応答反応を解析し、強病原性を示す原因と宿主昆虫が死亡する過程を解明することを目的として研究を行った。

腸内細菌科に属する *Photobacterium* 属細菌はこれまで3種が報告されており、そのうち *P. luminescens* および *P. temperata* の2種が *Heterorhabditis* 属昆虫病原性線虫から単離されている。これまで強病原性を示す線虫の共生細菌をスクリーニングする過程で、既知の昆虫病原性線虫の共生細菌に比べて非常に高い殺虫活性を示す2つの分離株が得られた。その分離株の分子系統解析を行ったところ、いずれも上記の2種とは異なり、人間の傷口からのみ単離されてきた、人に日和見感染する *P. asymbiotica* と同じクレードに属するがそれらとは異なるサブクレードを形成する *Photobacterium* 属細菌であることが明らかになった (Kuwata et al., 2007)。

Photobacterium 属細菌の病原性因子については、これまで Tc タンパク質や Mcf タンパク質に殺虫活性があることが示されてきた (引用)。また、リパーゼやプロテアーゼはそれ自体には直接的な殺虫活性はないものの、病原性に関与するとの報告もある (引用)。一方、*Photobacterium* 属細菌の2種 (*P. luminescens*, *P. asymbiotica*) においてゲノム解析が行われ、共生や病原性に関与すると考えられる遺伝子の解析が進められている。このように *Photobacterium* 属細菌は様々な因子の複合的な要素が関与することによって昆虫が死亡することが次第に明らかになってきつつあるが、共生細菌によって宿主昆虫が死に至る過程についてはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

(1) 強病原性因子の解析

Photobacterium 属細菌は *Heterorhabditis* 属線虫によって昆虫の血体腔内に運ばれる。血体腔内に入った細菌が昆虫体内でいかに生体防御反応を回避・抑制し、増殖できるかは細菌の病原性を大きく左右する。そこで、共生細菌注入後の昆虫体内でのその共生細菌数の変化と死亡率との関係、細菌密度とその際に発現する病原因子について明らかにすることを目的とした。また、これまで病原性因子として報告のある遺伝子について、細菌

感染後の発現様相をあきらかにすることや、これらについて既知種との比較することによって強病原性を示す *Photobacterium* 属細菌の病原性の違いを解析する。

(2) 宿主昆虫の応答反応

昆虫病原性線虫による感染後、昆虫は共生細菌によって敗血症で死亡するとされる。これまで *Photobacterium* 属細菌から複数の殺虫タンパク質が報告されているが実際にどのように宿主昆虫が死亡するのかは未だに明らかになっていない。そこで、共生細菌の感染後に宿主昆虫の組織がどのような反応を示すかを明らかにするため、昆虫体内での細菌の増殖様相や病原性因子の発現様相をもとに共生細菌注入後の昆虫の主要な組織を取り出し、発現する遺伝子の変化を比較することで宿主昆虫の応答を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

Photobacterium 属細菌数の増殖速度の比較と昆虫体内での感染場所の特定

増殖力の比較は、LB 液体培地中で振とう培養 (25°C) して比較した。血体腔内に放出された細菌の生存力や増殖力、共生細菌密度と宿主の死亡率との関係を明らかにするため、昆虫体内への細菌注入後の細菌数の変化を定量的に調べた。強病原性細菌として当研究室で分離した系統 CbKj163 および OnIr4 (Kuwata et al., 2007) を用いた。供試昆虫として、これまでスクリーニングに用いてきたジャイアントミールワーム (以下ミールワームと省略) を用いた。当研究室で凍結保存してある両分離株を LB 液体培地中で培養し、生理食塩水で洗浄した後細菌数を調整後、マイクロシリンジを用いて昆虫体内に一定濃度の細菌懸濁液を 5 μ L 注入し、一定時間後にミールワームの体液を集め、希釈した体液を MacConkey 培地上へ塗布し、昆虫が死亡するまでの細菌数の変動を調べた。対照として、標準的な病原性を示す *P. temperate* It 系統を用いた。

昆虫体内での局在を明らかにするため、トランスポゾン・タギング法によって GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子を組み込んだ大腸菌と CbKj163 系統を接合させ、GFP 遺伝子を取り込んだ CbKj163 系統を作出し、昆虫体内へ注入することによってミールワームにおける細菌の感染場所を明らかにすることを試みた。

宿主昆虫への影響

宿主昆虫の体液タンパク質は、アワヨトウ 5 齢幼虫 0 日目に共生細菌を接種し、40 時間後に体液を取り出し、12%SDS-PAGE に供した。細菌感染が摂食量に及ぼす影響を明らかに

するため、接種前の個体の生体重および人工飼料の重さを測り、接種 40 時間後の幼虫の生体重ならびに残された人工飼料の重さを測定し、体重変化と摂食量を計算した。

神経系へ与える影響として、脳の生体アミンに注目し、Matsumoto et al. (2003)の方法に準じて電子化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフィーを使用した。アワヨトウ 5 齢幼虫およびジャイアントミールワームに *Photorhabdus* 属細菌を接種した後、経時的に解剖して脳を取り出し、脳内の生体アミンの検出を行った。

病原性に関する遺伝子として PKS 遺伝子に注目してクローニングを試みた。データベースにある *P. luminescence* の塩基配列をもとにプライマーを作成し、PCR を行った。また、他の細菌種との保存されているアミノ酸配列から縮合プライマーを作成し、PCR も行った。

4. 研究成果

細菌の生存力や増殖力について比較するため、まず当研究室で分離した強病原性系統 CbKj163 および OnIr40 と一般的な病原性系統 It を用いて、ジャイアントミールワームならびにアワヨトウの終齢幼虫に注入した際、いずれの強病原性系統も一般的な系統よりも 1/10,000 の濃度を注入した場合でも 100% の死亡率が見られた。アワヨトウの場合はいずれの細菌を注入した際も死亡率は高かったが、昆虫が死亡するまでの時間が強病原性の方が顕著に短かった。強病原性系統 CbKj163 と一般的な病原性系統 It について、細菌の増殖率の違いが昆虫体内での定着率や増殖率に関与していると考え、増殖速度を比較したところ、LB 液体培養中での増殖率は両者に違いが見られなかった。ジャイアントミールワームに細菌注入した場合、強病原性分離株では注入後の時間経過とともに体液の粘性が高まり 12 時間も経過すると体液を採取することが困難となること明らかとなったため、以降の実験にはアワヨトウの 5 齢幼虫に絞って実験を行った。LB 培地を用いて増殖させ、調整した菌体をアワヨトウに注入した際には LB 液体培地中とは異なり、病原性によって細菌数に大きな違いがみられ、強病原性の方が初期の増殖速度は速かった (図 1)。

その増殖速度の違いを解明するため、細菌の持つ溶血能力、脂質分解能力、タンパク質分解能力を比較した結果、いずれにおいても強病原性の方が優れていた。強病原性の持つこれらの高い酵素活性によって昆虫の生体防御反応に対応し、攻撃や排除を逃れることによって昆虫体内での定着並びに増殖能力が高くなり、強病原性につながる可能性が示唆

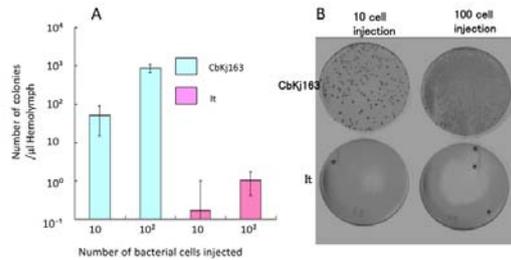


Fig. 1. Comparison of persistency of bacteria in the hemolymph of *Pseudaletia separata* 5th instar larvae. Twenty-four hours after bacterial inoculation, hemolymph was collected into saline and spread onto MacConkey agar plates. A, comparison of numbers of colonies in hemolymph. B, colonies on MacConkey agar plates. PBS, phosphate-buffered saline; CbKj163, high virulent isolate of *Photorhabdus asymbiotica*; It, moderate virulent isolate of *Photorhabdus temperata*.

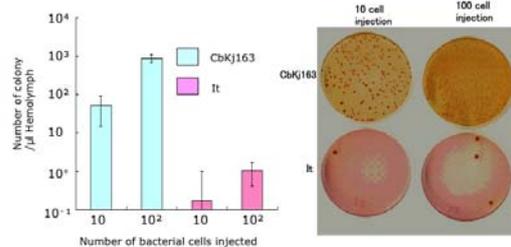


Fig. 1. Comparison of persistency of bacteria in the hemolymph of *Pseudaletia separata* 5th instars.

Photorhabdus 属細菌は昆虫の血体液内では、感染初期には主に昆虫体液の中で増殖することが知られている。そのため、体液の中で細菌が増殖する際に分泌する因子によって昆虫は死亡する可能性が高いことが考えられた。そこで細菌注入によってひん死状態になった昆虫から体液を取り出し、SDS-PAGEによって、細菌由来または細菌感染によって変化の生じる血しょう中のタンパク質の検出を試みた。細菌注入後、死亡するまでの間に、新たなタンパク質のバンドは検出されず、細菌由来と思われるタンパク質は得られなかった。そのため、宿主昆虫は微量で活性のあるタンパク質またはタンパク質以外の殺虫因子、または細菌が宿主昆虫の神経系などに直接感染し、死に至らしめる可能性が考えられた。

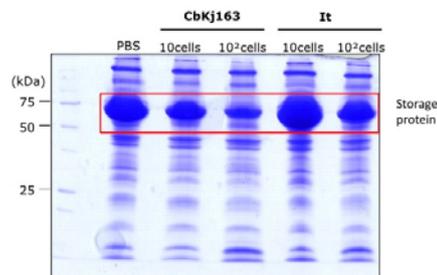


Fig. 2. Comparison of hemolymph proteins of *Pseudaletia separata* 5th instar larvae after injection. Forty hours after inoculation (5 μl/insect), hemolymph was collected and hemolymph proteins were separated by SDS-PAGE (12% gel) and were stained with CBB. Red box indicates the bands of storage protein. PBS, phosphate-buffered saline; CbKj163, high virulent isolate of *Photorhabdus asymbiotica*; It, moderate virulent isolate of *Photorhabdus temperata*.

昆虫体液中には細菌接種によってみられる

細菌のタンパク質や接種によって誘導される宿主昆虫のタンパク質は検出できなかったが、幼虫の主要なタンパク質である貯蔵タンパク質の量に大きな違いが見られ、強病原性株 CbKj163 を 1×10^2 細胞注入したアワヨトウ終齢幼虫は貯蔵タンパク質が対照区よりも少なかった (図 2)。人工飼料を用いてアワヨトウ幼虫の摂食量を比較した結果、CbKj163 を 1×10^2 細胞注入したものは対照区に比べて摂食量は約 2/3 で、体重の増加量も約 1/5 と非常に低かった (図 3)。以上のことから、細菌感染によって、宿主昆虫の腸または神経系の細胞に細菌が直接感染するか間接的に作用することで摂食が抑制されること、また、それによって昆虫は死亡することが示唆された。

そこで、神経系へ与える影響として脳内アミンの変化を調べたところ強病原性細菌の感染後には、脳内に未同定のアミン様物質が急激に出現し、それは別の強いストレス応答時にも検出されることが明らかとなった。また脳特異的ではなく、他の組織においても強いストレス条件下でそのアミン様物質が検出されることが明らかになった。しかし、その同定にはいたらなかった。また、そのような共生細菌の感染時ならびに強いストレス条件下での組織における構造上の違いを検出するには至らなかった。

本研究では病原性に関与すると考えられる遺伝子発現を明らかにするため、PKS 遺伝子のクローニングも試みたが、成功しなかった。人に日和見感染する *P. asymbiotica* では *P. luminescence* でみられる病原性に関与するとされる領域がないことが知られており、同亜種と考えられる本分離株でも同様の可能性がある。今後、この *Photorhabdus* 分離株のゲノムを解析していくことによって、新規の病原性因子の共通点および相違点

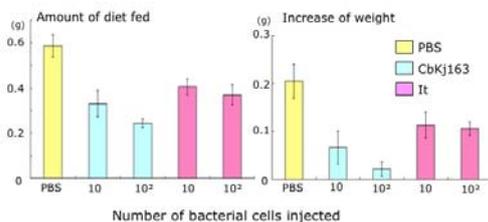


Fig. 3. Bacterial injection suppresses the feeding of *Pseudaletia separata* 5th instar larvae. Forty hours after inoculation (5 μ l/insect), increase of larval weight and amount of artificial diet fed by larva were measured. PBS, phosphate-buffered saline; CbKj163, high virulent isolate of *Photorhabdus asymbiotica*; It, moderate virulent isolate of *Photorhabdus temperata*.

を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 吉賀豊司. 昆虫病原性線虫/共生細菌感染に対する宿主の応答. 第 9 回昆虫病理研究会 (2010 年 9 月 25 日) 山梨県富士吉田市
- ② Kuwata, R., Yoshida, M. and Yoshiga, T. Isolation and characterization of *Photorhabdus asymbiotica* from *Heterorhabditis indica*. International symposium on the research and development of entomopathogenic nematodes. (2009 年 4 月 9 日) 中華人民共和国三亜市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉賀 豊司 (YOSHIGA TOYOSHI)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号：00312231

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：