

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24658073

研究課題名(和文) Lysinibacillus コレクションの整備と新規生物農薬の開発

研究課題名(英文) Establishment of Lysinibacillus collection and development of new microbial pesticides

研究代表者

小柳津 広志 (OYAIZU, Hiroshi)

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号：70177301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、昆虫死体から耐熱性を示すLysinibacillus様菌株を分離し半翅目に対して強い殺虫効果を示す菌株の結晶性タンパク質をスクリーニングした。各種の昆虫を約20000個体収集しBacillus属類縁細菌株約5000株を取得し、培養性状と顕微鏡観察によって、約2000株がLysinibacillus属近縁細菌として選別した。16S rRNA配列により最終的に約500株がLysinibacillus属に属した。Cryタンパク質のアミノ酸配列の分析を行ったが、使用したプライマーがほとんどの菌株で機能しなかった。分離された菌株は保存し、利活用を希望する研究者に譲渡する態勢を整えた。

研究成果の概要(英文)：In this study, microorganisms resistant to heat treatment at 90 were isolated from various kinds of dead insects collected in Japan. From the heat resistant bacteria Lysinibacillus-like bacteria which produce crystal proteins insecticidal to hemipteran were screened. Approximately five thousands heat resistant Bacillus-like bacteria were isolated from collected dead insects, and approximately five hundred Lysinibacillus-like bacteria were selected based on the 16S rRNA sequences. Characterization of crystal proteins were carried out by the sequencing of the amino acids. However, the various kinds of used primer sets did not work very well because of their genetic diversity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Lysinibacillus 殺虫性結晶性タンパク質 菌株コレクション

## 1. 研究開始当初の背景

*Bacillus* 属には昆虫に対して特異的に作用する毒素タンパク質を生産する種が知られている。*B. thuringiensis* は毒素産生菌として有名であり、米国モンサント社はこの毒素を利用して耐虫性のダイズ、トウモロコシ、ワタなどの組換え体品種を作出している。これらの作物では、耐虫性を付与されることにより大幅に収量が増加すると報告されている。また、耐虫性を付与することにより殺虫剤の使用量が減少し、環境負荷を低減させている。これまで組換え体として利用した場合、人体への影響はほとんど報告されていないが、鱗翅目昆虫を殺すことや野生種との交配による自然生態系への影響が懸念されている。また、*B. thuringiensis* の毒素タンパク質は効果を発揮する害虫の種類が限られ、鱗翅目以外の害虫に対して有効なタンパク質は開発されていない。さらに、*B. thuringiensis* は人畜に対して炭そ病を起こす *B. anthracis* および食中毒を起こす *B. cereus* とほぼ同種と考えられるほど近縁である。このため、化学農薬の代替農薬としてこの菌種の菌体を生きた状態で環境に放出することは問題となっている。以上のことから、農業目的でこのタンパク質を有効利用するには、新しい利用技術が実用化される必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では第一に *B. thuringiensis* とは全く系統の異なる *B. sphaericus* (*Lysinibacillus* 属に含まれている) を利用して人畜に対して無害で環境負荷が全くない生物農薬を開発することを目指す。さらに、殺虫効果を示すタンパク質をコードする遺伝子を各種の作物に導入すれば、これまで対策が立てられなかった害虫に有効な作物が作出できる。具体的には、鱗翅目以外の害虫が大きな問題となっているイネの耐虫性系統が作出できる。*B. sphaericus* 菌株の利用により化学農薬による環境負荷を低減させ、かつ、作物収量を上昇させることが可能となる。研究代表者は平成 21 年度より JICA の支援によって、鱗翅目以外の昆虫に対して強い殺虫効果を示す菌株のスクリーニングをアルメニア国 Afrikan

教授と共同で行ってきた。この結果、*Lysinibacillus sphaericus* 菌株に半翅目や双翅目に有効な結晶性タンパク質を生産するものがあることを明らかとした。しかしながら、これらの菌株はアルメニア国が保有するものであるため、生物多様性条約による制約によって自由に利用することができない。そこで、本研究では国内から *Lysinibacillus* 属菌株を多数収集して鱗翅目以外の害虫に有効な資材として開発し、遺伝子をイネに導入して耐虫性系統の作出を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 菌株の分離 死んだ昆虫は春から秋にかけて関東各地、静岡、富山などの各地から収集した。収集した昆虫は滅菌水を加えた乳鉢ですり潰して 90 15 分処理の後、直接または希釈して NB 寒天平板 (Difco のバクトペプトン 0.5%, イーストエキス 0.3%, 寒天 2%, pH 7.0) 塗布して分離した。分離した菌株はコロニー形状および顕微鏡観察により *Lysinibacillus* 様の菌株を選びだした。分離した菌株は NB 液体培地 (寒天を加えないもの) で培養し、50% になるようにグリセロールを加えて -80 で保存した。

(2) *Lysinibacillus* 様菌株の 16S rRNA 配列に基づく識別

培養性状および顕微鏡観察により *Lysinibacillus* 様と判断された菌株は、本研究で設計された *Lysinibacillus* を識別するプライマーで PCR 反応を行うことにより識別した。プライマー配列は *Bacillus thuringiensis* と *Lysinibacillus* 属を識別するものは以下のものである。

*Bacillus thuringiensis* プライマーセット  
5' GATTGAGAGCTTGCTCTGAAGAA 3'  
5' GTATTACCGCGCTGCTGG 3'

*Lysinibacillus* プライマーセット  
5' TCGGCTGTCGCTATAGGATG 3'  
5' GTATTACCGCGCTGCTGG 3'

(3) *Lysinibacillus* 様菌株の 16S rRNA 配列解読による系統解明

*Lysinibacillus* 様菌株を対象として、大腸菌の 16S rRNA のポジション 10~25 および 531~517 を用いて PCR で増幅を行い、ポジション 531~517 プライマーを用いてこの下流約 350 塩基を解読し、系統解析を行った。使用したプライマーは以下のものである。なお、系統解析は EzTaxon サイトで行った。

ポジション 10~25 プライマー

5' AGTTTGATCCTGGCTC 3'

ポジション 531~517 プライマー

5' ACCGCGGCTGCTGGC 3'

(4) *Lysinibacillus* 様菌株の結晶性タンパク質の多様性確認

(3)の実験で *Lysinibacillus* と判断された菌株を対象として、文献(引用文献 1~3)で報告されている Bt トキシン検出用の各種プライマー(cry1, cry2, cry3, cry4, cry5, cry7, cry8, cry9, cry10, cry11, cry12, cry14, cry19, cry21, cry27, cry39, cry44, cry1A, cry1B, cry1C, cry1D, cry1E, cry1F, cry1G, cry1A5, cry1Fb, cyt1, cyt2)を用いて検出を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 菌株の分離

双翅目、半翅目、鱗翅目昆虫を約 20000 個体収集し、80 10 分の耐熱性を示す *Bacillus* 属類縁細菌株約 5000 株を取得し、培養性状と顕微鏡観察によって、これらのうち約 2000 株が *Lysinibacillus* 属近縁細菌として選別した。図 1 のように *Bacillus* および *Lysinibacillus* 様菌株は菌体内に多くの顆粒状構造が観察される。

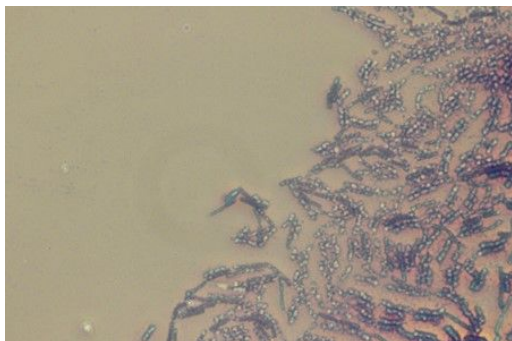
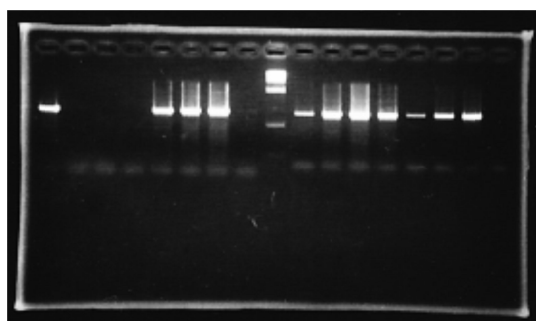


図 1 分離された菌株の特徴

##### (2) *Lysinibacillus* 様菌株の 16S rRNA 配列に基づく識別

*Bacillus* 属菌株と *Lysinibacillus* 様菌株は図 2 に示したように識別された。この図では菌株 27,112, 113 は *Bacillus thuringiensis* プライマーでは増幅バンドが見られず *Lysinibacillus* プライマーで増幅バンドが見られ、菌株 146, 148, 149 では *Bacillus thuringiensis* プライマーで強いバンドが見られ *Lysinibacillus* プライマーでは弱い増幅バンドが見られる。この 2 つのプライマーによる増幅で菌株 27 のようなバンドが見られた場合 *Lysinibacillus* 様菌株と判断した。培養性状と顕微鏡観察によって *Lysinibacillus* と識別された菌株約 2000 株のうち約 500 株が *Lysinibacillus* 様と同定された。選別された *Lysinibacillus* 様菌株の 16S rRNA 配列に基づく系統解析は図 3 に示した。菌株間には多様性があり、今後は多数の種に分類しなおす必要がある。



1 2 3 4 5 6 7 SM9 101112 131415

図 2 特異的プライマーによる *Lysinibacillus* 様菌株識別

SM はサイズマーカー、1~7 は *Bacillus thuringiensis* プライマー、9~15 は *Lysinibacillus* プライマー、1 は *Bacillus thuringiensis* コントロール株、9 は *Lysinibacillus* コントロール株、2&10; strain27, 3&11; strain112, 4&12; strain 113, 5&13; strain 146, 6&14; strain 148, 7&15; strain 149

(4) *Lysinibacillus* 様菌株の結晶性タンパク質の多様性確認

使用したほとんどのプライマーで *Lysinibacillus* 様菌株では増幅が確認されなかった。このことは、これまで作製されたプライマーが *Bacillus thuringiensis* の結晶性タンパク質に対して作製されたものであることが原因と考えられる。今後は *Lysinibacillus* 様菌株の遺伝子を分離、解読してプライマーを設計する必要がある。

(3) 研究協力者

秋本 由香 (AKIMOTO, Yuka)

#### 引用文献

- 1) Vidal-Quist JC, Castanera P, and Gonzalez-Cabrera J, Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from *Citrus orchards* in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*, J Microbiol Biotechnol 19: 749-759 (2009)
- 2) Saleem F and Shakoori AR, Characterization of cry24-type gene(s) from Pakistani isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to lepidopteran and dipteran insects, Pakistan J Zool, 42:181-193 (2010)
- 3) Valicente FH, de Toledo Picoli EA, de Vasconcelos MJV, Cameiro NP, Carneiro AA, Guimaraes CT, and Lana UG, Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* cry1 gene from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, Biological Control, 53:360-366 (2010)

#### 5. 発表論文等

現在のところ発表論文はない。

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳津 広志 (OYAIZU, Hiroshi)

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号 70177301

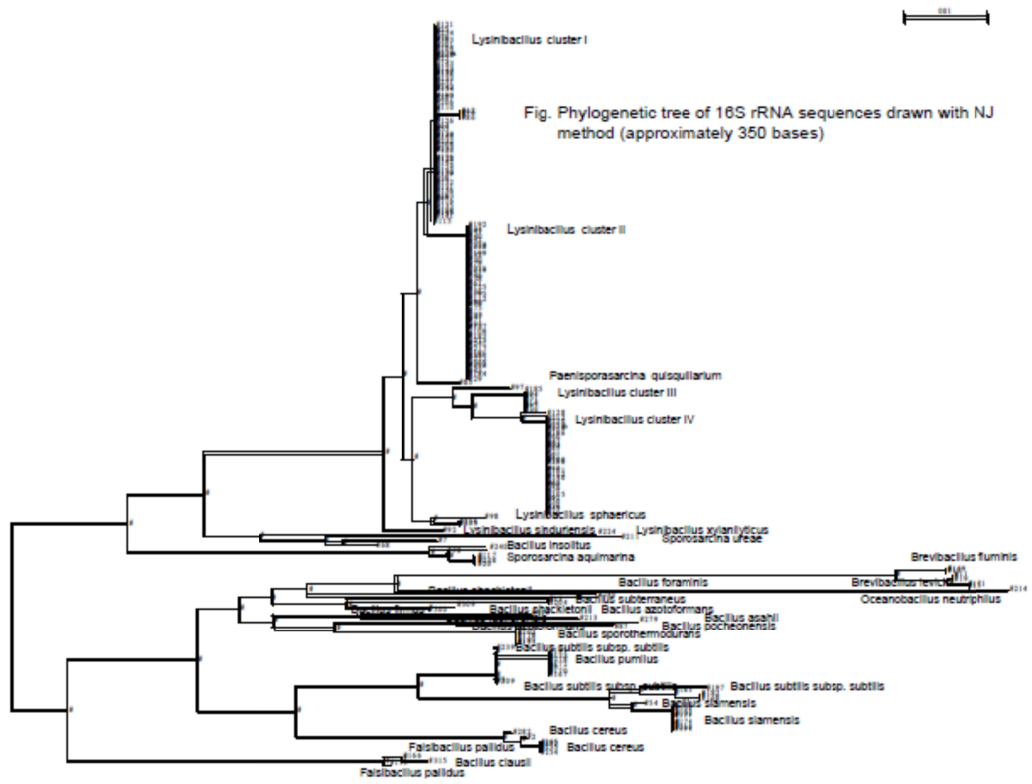


図3 分離された代表的な *Lysinibacillus* 菌株の 16S rRNA 配列に基づく系統解析