

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292208

研究課題名(和文)細菌の共生による害虫の農薬抵抗性化：農薬分解菌はどこから来て、どう選択されるのか

研究課題名(英文) Symbiotic bacteria-mediated insecticide resistance: ecology of fenitrothion degrading bacteria in agricultural field

研究代表者

早津 雅仁 (Hayatsu, Masahito)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70283348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、土壌細菌Burkholderia属の農薬分解菌が害虫カメムシの消化管に共生し、農薬抵抗性を与えることを見出した。この共生系成立過程を明らかにするために、分解菌の宿主外での分解菌の生態を調べた。

分解菌が共生したカンシャコバナナガカメムシが見つかった畑で、土壌や作物体にBurkholderia属と分解菌がどのように分布しているか解析し、分解菌は土壌や作物体を経由してカメムシへ感染することを示した。またフェニトロチオンの運用で土壌中では分解菌が出現・増加するが、その際はじめは分解菌が複数種現れるが、菌数増加とともに分解菌同士で競合が起こり多様性のバランスが崩れることが明らかとなった

研究成果の概要(英文)：Several Burkholderia strains which are capable of degrading an insecticide, fenitrothion, can establish specific and beneficial symbiosis with some genera of stinkbugs; thereby, making their host insects conferring fenitrothion-resistance to the host insects. The objective of this study was to understand the ecology of Burkholderia symbiotic degraders in a free-living environment. A field research was conducted in farmer's fields where stinkbugs (Cavelerius sp.) harboring degraders of Burkholderia species have been identified. The research confirmed that both plant and rhizosphere constitute the environmental reservoirs for stinkbug symbiotic degraders. Repeated applications of fenitrothion to soil can increase the numbers of degraders. The microcosm experiment with mathematical modeling showed the number of dominant species among the degraders declined with its density increase by fenitrothion applications, which can be explained according to the competitive exclusion principle.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：カメムシ フェニトロチオン 農薬分解 殺虫剤抵抗性

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、土壌の農薬分解能が高まり、農薬の効力が低下する現象に着目し研究を行った。その結果、土壌に有機リン系殺虫剤（フェントロチオン）を数回散布するだけで、分解菌数が急激に増加し、土壌の分解能が上昇することを示した。分離した分解菌はフェントロチオンを資化する能力を持っていた。また分解酵素系は複数のプラスミドと染色体上にコードされ、遺伝子の水平移動による分解能の獲得が推定された。分解菌の多様性を全国の土壌について調査し、高い分解能を有するものは *Burkholderia* 属細菌の一部のグループに限られことを突き止めた。

一方、ダイズの害虫ホソヘリカメムシの消化管には *Burkholderia* 属細菌の特定の分類群（SBE グループと名付けられている）のみが共生し、世代ごとにこの細菌を環境中から取り込むことが見出された。この共生細菌には、我々が分離したフェントロチオン分解菌（以降分解菌）と分類的に近いものが多数見出された。そこで共同研究を実施して共生菌と分解菌を比較したところ、共生菌はフェントロチオン分解能を持っていなかった。しかし分解菌をカメムシに取り込ませると消化管に定着し共生関係を形成した。そして驚くべきことに、このカメムシはフェントロチオンに対する抵抗性を獲得したのである（Kikuchi, Hayatsu ほか, PNAS(2012)）。この発見は害虫の形質の変化により農薬抵抗性が獲得されるとされてきた従来の見解に修正を加えるものである。

2. 研究の目的

我々はこれまでに野外（一般農家の畑）調査を実施し、サトウキビの害虫カンシャコバネナガカメムシが *Burkholderia* 属のフェントロチオン分解菌を消化管に共生させて、抵抗性を獲得していることを見出した。このカメムシの消化管から分離した分解菌はサトウキビ畑の土壌からも分離された。しかし土壌には他にも近縁な *Burkholderia* 属の分解菌が複数共存しており、共生した分解菌は必ずしも土壌中の分解菌の優占種とは限らなかった。さらに農薬散布の頻度や履歴によっても土壌中の *Burkholderia* 属分解菌の多様性や菌数は異なっており、カメムシに共生している分解菌も圃場によって異なっていた。加えて興味深いことに分解菌の多くは植物との緩い共生系を持つグループに属していた。以上から分解菌がカメムシと出会うまでには、分解菌の移動と何らかの選択が働いていると推定された。

以上から（1）農耕地生態系での *Burkholderia* 属細菌と分解菌の分布、（2）その増殖と群集構造の形成機構、（3）分解菌のカメムシへの選択と移動のメカニズム、

（4）共生成立に関与する分解菌の形質、を解析し分解菌とカメムシの共生関係の成立過程を明らかにすることを研究目的とする。期間内には（1）、（2）および（4）について検討した。

3. 研究の方法

以下の括弧内の数字は目的に挙げた各項目の数字に一致する。

（1）農耕地生態系での *Burkholderia* 属細菌と分解菌の分布

①農耕地土壌における *Burkholderia* 属細菌の多様性解析と菌数の把握

これまでに行った野外調査の際に回収した土壌を用いた。土壌から DNA を抽出した。*Burkholderia* 属に特異的なプライマーを設計して、これを用いて次世代シーケンサーによる大規模解析と定量 PCR を行った。これにより *Burkholderia* 属がどこにどれだけ存在するか把握し、かつその中に共生菌の占める割合が明らかになる。

②分解菌の農耕地生態系（土壌、作物、昆虫）における分布

野外調査を再度実施し、農耕地生態系の土壌と作物にも、カメムシから見つかった分解菌が存在しているか調べた。前回の野外調査で分解菌が見つかった畑のサトウキビとその周囲の土壌を回収した。作物体はミキサーにかけて液状にした。各試料から希釈平板法で分解菌を計数した。計数の際、寒天培地上に生育したコロニーをピックアップし純化した。純化した菌株を簡易的に分類するため、それぞれの細胞から DNA を抽出し、これを用いて 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った。

（2）分解菌の土壌における増殖と群集構造の形成機構

①土壌における分解菌の菌数増加とそれに伴う多様性変化の解析

土壌マイクロゾムを作成し、そこへフェントロチオンを定期的に散布した。定期的に土壌を採取し、*Burkholderia* 属を特異的に検出できる寒天培地を用いて希釈平板法で分解菌を計数した。計数の際には、寒天培地上に生育したコロニーを一定数ピックアップし純化した。純化した菌株を簡易的に分類するため、それぞれの細胞から DNA を抽出し、これを用いて 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った。

②分解菌のフェントロチオン分解能に関するカイネティクスの検討

8種類の分解菌からそれぞれ1株ずつ代表株を選んだ。それらの菌株に異なる濃度のフェントロチオンを与えてインキュベートし、酸素の消費量を測定した。この結果をもとに、各菌株のフェントロチオンに対する Km 値と

Vmax 値を算出した。

③ 土壤における分解菌の菌数増加とそれに伴う多様性変化のシミュレーション解析

上記①及び②の実験データをもとにシミュレーション解析を行い、分解菌集団が増加するときにはたらく相互作用を推定し生態学上の理論に結び付くか検討した。

(4) 共生成立に関与する分解菌の形質の解析

(2) -①の実験を行う際、分解菌に加えて非分解菌も分離した。それらの 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行い、各菌株を SBE グループとそれ以外の種に分けた。これらをかめムシに取り込ませ、共生が成立するか観察した。

4. 研究成果

以下の括弧内の数字は目的に挙げた各項目の数字に一致する。

(1) 農耕地生態系での Burkholderia 属細菌と分解菌の分布

① 農耕地土壤における Burkholderia 属細菌の多様性解析と菌数の把握

土壤から抽出した DNA を用いて Burkholderia 属の計数と多様性解析を行った。その結果、分解菌の存在量によらず、いずれの土壤にも土壤 1g あたり約 1000 万個体の Burkholderia 属が存在していることが分かった。またこの属の中で、かめムシに共生できる SBE グループは一定の割合を占めていたが、分解菌が検出されなかった土壤ではその割合が極端に低い例もあった。

② 分解菌の農耕地生態系(土壤、作物、昆虫)における分布

野外調査で回収した土壤、サトウキビ地上部、かめムシから希釈平板法で分解菌を分離した。その結果、いずれの試料からも分解菌が検出された。その数は土壤が最も多く、作物体地上部にはその 1/10~1/100 程度存在していた。次に検出した分解菌約 700 株を全て分離して多様性を解析した。すると、土壤には SBE グループとそれに含まれない種が多数存在していたが、作物体には SBE グループが多く存在しており SBE グループでない種は稀であることが分かった。さらには土壤やサトウキビに存在していた分解菌種をかめムシからも分離した。このことは土壤や作物体を經由して分解菌がかめムシに取り込まれていることを強く示唆している。これは言い換えれば、土壤と作物体がかめムシと共生できる分解菌のリザーバーとして機能していることを意味している。

(2) 分解菌の土壤における増殖と群集構造の形成機構

① 土壤における分解菌の菌数増加とそれに

伴う多様性変化の解析

フェニトロチオンを 2 週間毎に土壤に散布した。ここでは分解菌が増加するプロセスを調べたかったため、フェニトロチオンを散布したのち数日ごとに繰り返し土壤を回収し、分解菌数を計数した。その結果、分解菌数はフェニトロチオンを数回散布する間に土壤 1g あたり 100 万個体程度まで増加した。この増加過程で計数の際に検出した分解菌を純化し多様性を解析したところ、分解菌が検出され始めた当初は 8 種類の分解菌が現れたが、その後分解菌数が最大になると 1 種類のみが検出されるようになった。

② 分解菌のフェニトロチオン分解能に関するカイネティクスの検討

8 種の分解菌にフェニトロチオン分解能の違いなどがあるか調べた。その基準としてフェニトロチオンに対する Km 値と Vmax 値を求めたところ、8 種類の分解菌は異なる Km 値・Vmax 値を示した。以上から 8 種類の分解菌は同一の属であるけれどもその能力は個体によって違うことが分かった。

③ 土壤における分解菌の菌数増加とそれに伴う多様性変化のシミュレーション解析

フェニトロチオンの散布によって変動した分解菌の菌数と多様性は生態学の何らかの法則にのっとっているのではないかと考え、①の分解菌の菌数・多様性の結果と②で得られた分解菌の Km 値・Vmax 値を数理生態的計算式に当てはめ、土壤中での分解菌の群集構造変化をシミュレーション解析した。その結果、この「フェニトロチオンの散布に反応して起こる分解菌の群集構造の構築プロセス」は「競争排除則」に従っていることが見出された。

(4) 共生成立に関与する分解菌の形質の解析

SBE グループに含まれる分解菌あるいは非分解菌と、SBE グループ外の分解菌あるいは非分解菌をそれぞれかめムシに与えたところ、高い感染能力を示したのは分解能の有無によらず SBE グループの菌株であった。以上からかめムシへの共生にはフェニトロチオン分解能は関係しなかったことが示された。

(5) まとめ

以上から、かめムシに感染する前の分解菌の生態について以下のことが明らかとなった。

① Burkholderia 属およびかめムシに感染しやすい種 (SBE グループ) は普遍的に土壤に存在している。

② 野外で分解菌が実際にかめムシへ感染している。

③ 土壤と作物が分解菌のリザーバーとして機能している。

④ フェニトロチオンを繰り返し与えると分解菌は増加し多様性が変化するが、これは「競争排除則」に基づいている。

⑤分解能はカメムシへの共生能力には影響を及ぼさない。

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 6件)

- 1) Ohbayashi, T., Takeshita, K., Kitagawa, W., Nikoh, N., Koga, R., Meng, X-Y., Tago, K., Hori, T., Hayatsu, M., Asano, K., Kamagata, Y., Lee, B. L., Fukatsu, T., and Kikuchi, Y. 2015. Insect's intestinal organ for symbiont sorting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112, E5179-E5188.
- 2) Tago, K., Kikuchi, Y., Nakaoka, S., Katsuyama, C., and Hayatsu, M. 2015. Insecticide applications to soil contribute to the development of Burkholderia mediating insecticide resistance in stinkbugs. Mol. Ecol., 24, 3766-3778.
- 3) Tago, K., Okubo, T., Itoh, H., Kikuchi, Y., Hori, T., Sato, Y., Nagayama, A., Hayashi, K., Ikeda, S., and Hayatsu, M. 2015. Insecticide-degrading Burkholderia symbionts of stinkbug naturally occupy various ecological niches of sugarcane fields in a southeast island of Japan. Microb. Environ., 30, 29-36.
- 4) Tago, K., Itoh, H., Kikuchi, Y., Hori, T., Sato, Y., Nagayama, A., Okubo, T., Navarro, R., Aoyagi, T., Hayashi, K., and Hayatsu, M. 2014. A fine-scale phylogenetic analysis of free-living Burkholderia species in sugarcane field soil. Microb. Environ., 29, 434-437.
- 5) Tago, K., Okubo, T., Shimomura, Y., Kikuchi, Y., Hori, T., Nagayama, A., and Hayatsu, M. 2015. Environmental factors shaping the community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in sugarcane field soil. Microb. Environ., 30, 21-28.
- 6) Itoh, H., Navarro, R., Takeshita, K., Tago, K., Hayatsu, M., Hori, T., and Kikuchi, Y. 2014. Bacterial population succession and adaptation affected by insecticide application and soil spraying history. Front. Microbiol., 5, doi: 10.3389/fmicb.2014.00457

[学会発表] (計 12件)

- 1) 多胡香奈子、菊池義智、早津雅仁 (2015) 農地から分離した有機リン系農薬分解細菌の代謝に関する特徴と害虫への感染の可能性, 日本土壤肥料学会 講演要旨集 61, 35.
- 2) 多胡香奈子、大久保卓、伊藤英臣、菊池義智、堀知行、佐藤裕也、永山敦士、池田成

志、早津雅仁 (2015) カメムシに農薬抵抗性を与える有機リン系農薬分解菌 Burkholderia 属の農耕地生態系における多様性と分布, 日本土壤微生物学会大会 講演要旨集, 0-1.

- 3) 多胡香奈子、伊藤英臣、大久保卓、菊池義智、堀知行、佐藤裕也、永山敦士、Ronald Navarro、青柳智、早津雅仁 (2014) カメムシに農薬抵抗性を与える Burkholderia 属分解菌の土壌における生態, 環境微生物生態学系学会合同大会 2014 講演要旨集, 224.
- 4) 多胡香奈子、菊池義智、伊藤英臣、堀知行、佐藤裕也、永山敦士、中岡慎二、勝山千恵、早津雅仁 (2014) カメムシに農薬抵抗性を与える有機リン系農薬分解菌 Burkholderia 属の多様性と生態, 日本土壤肥料学会 講演要旨集, 60, 35.
- 5) Tago, K., Y. Kikuchi, S. Nakaoka, C. Katsuyama, M. Hayatsu (2014) Insecticide applications to soil contribute to development of Burkholderia mediating insecticide resistance in pest stinkbug, 15th International Symposium on Microbial Ecology ABSTRACT BOOK, PS24, 51.
- 6) Itoh, H., T. Aoyagi, R. Navarro, K. Takeshita, Y. Sato, K. Tago, M. Hayatsu, T. Hori, Y. Kikuchi (2014) Selective transmission of insecticide-degrading bacteria from ambient soils to the bean bug Riptortus pedestris, 15th International Symposium on Microbial Ecology ABSTRACT BOOK, PS12, 17.
- 7) 多胡香奈子、菊池義智、中岡慎治、勝山千恵、早津雅仁 (2013) カメムシに農薬抵抗性を与える有機リン系農薬分解菌の農薬散布土壌における多様性変動プロセスの解明, 第29回日本微生物生態学会大会 PROGRAM & ABSTRACTS, 86.
- 8) 青柳智、佐藤由也、伊藤英臣、多胡香奈子、早津雅仁、花田智、菊池義智、堀知行 (2013) 次世代シーケンサーの適用によるRNA-SIPの高感度化, 第29回日本微生物生態学会大会 PROGRAM & ABSTRACT, 133.
- 9) 佐藤由也, Ronald Navarro, 青柳智, 佐藤浩昭, 伊藤英臣, 多胡香奈子, 早津雅仁, 菊池義智, 堀知行 (2013) カメムシ共生細菌 Burkholderia sp. SFA1株の農薬分解機構, 第29回日本微生物生態学会大会 PROGRAM & ABSTRACT, 141.
- 10) 伊藤英臣, 青柳智, Ronald Navarro, 多胡香奈子, 早津雅仁, 堀知行, 菊池義智 (2013) カメムシが土壌から取りこむ農薬分解菌の招待: 農薬散布時に土壌で増える菌とカメムシに感染する菌の系統比較, 第29回日本微生物生態学会大会 PROGRAM & ABSTRACT, 142.
- 11) 早津雅仁, 多胡香奈子, 菊池義智, 堀知行, 永山敦士 (2013) 害虫カメムシに殺虫剤抵抗性を与える Burkholderia 属分解菌の農地土壌における生態, 日本土壤肥料

学会 講演要旨集, 59, 46.

12) 多胡香奈子 (2013) カメムシに農薬抵抗性を与える有機リン系農薬分解菌 Burkholderia 属の多様性と生態, 農環研 30 周年記念セミナー: 核酸から見えてきた農業に関わる微生物の生態と機能.

〔図書〕(計 0 件)

無し

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

無し

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)

無し

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

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早津 雅仁 (HAYATSU Masahito)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所

生物生態機能研究領域 上席研究員

研究者番号: 7 0 2 8 3 3 4 8

(2) 研究分担者

多胡 香奈子 (TAGO Kanako)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所

生物生態機能研究領域 主任研究員

研究者番号: 2 0 4 3 2 1 9 8

(3) 連携研究者

菊池 義智 (KIKUCHI Yoshitomo)

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 主任研究員

研究者番号: 3 0 5 7 1 8 6 4

堀 知行 (HORI Tomoyuki)

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 主任研究員

研究者番号: 2 0 5 0 9 5 3 3

石坂 真澄 (ISHIZAKA Masumi)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所

有機化学物質研究領域 主任研究員

研究者番号: 6 0 3 5 4 0 0 7