

昆虫病原性糸状菌の電気泳動的核型分析

京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科

清

みず
水

すすむ
進

現在、昆虫に病原性を示す糸状菌は表-1に示すとおり、多くの国において害虫防除に用いられている。我が国においても昆虫病原性糸状菌は1940年代にコガネムシ類あるいはカイコノウジバエの防除に用いられ、輝かしい成果を残している。また、最近ではキボシカミキリ、イネミズゾウムシの防除試験が行われ、その実用化への研究が着々と進められている。ところで、害虫防除に用いられる糸状菌の昆虫に対する病原力は種内においても著しく異なることが多く、有効な菌株の選抜が糸状菌による害虫防除の成否のカギを握っているといっても過言ではない。昆虫に対する病原力を支配する要因分析も数多く行われ、その要因の候補としてプロテアーゼ産生能、毒素あるいは発芽速度などが指摘されているが、いまだ不明の点が多い。

上述したように害虫防除への応用研究が盛んに行われる中でこれら糸状菌の遺伝学あるいは育種に関する研究も地道に行われてきた。しかし、有効な糸状菌の多くが不完全菌類に属すること、遺伝学的分析に利用できる突然変異株が少ないことなどにより、依然としてその遺伝学的情報は少ない。事実、それらのゲノムに関する情報では黒きょう病菌 (*Metarhizium anisopliae*) の染色体数が準有性生殖環と8種の突然変異株を用いて5本以上と推定されているのみである (MAGOON and MESSING-AL-AIDROOS, 1986)。最近になり同糸状菌の形質転換系あるいはパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法による染色体

DNAの分離などが報告されはじめ、徐々にそれらの分子生物学的研究も進みつつある (BERNIER et al., 1989; SHIMIZU et al., 1992)。染色体DNAがPFGEで分離できれば染色体数あるいはゲノムサイズはもとより染色体レベルでの遺伝子解析が可能になり、組換えDNA技術との組み合わせにより、遺伝子地図の作成あるいは有用遺伝子のクローニングなどにも利用できると思われる。また、病原力を左右する因子の解析にも利用できる可能性もある。そこで、PFGEによる昆虫病原性糸状菌の核型分析の現況と応用について紹介する。

パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法による核型分析

PFGE法は100~10000 Kbp (10 Mbp) のDNAが分離でき、DNA含量の少ない下等真核生物では染色体DNAをそのまま分けることが可能である。PFGEで分けられるDNAが別々の染色体に対応するということは、遺伝学的に解析の進んでいる酵母やアカパンカビの場合には疑いの余地はない。新しい微生物をPFGEで解析する場合にまず問題になるのは染色体サイズのDNAを壊さずアガロース内に調整することであるが、幸い多くの昆虫病原性糸状菌のプロトプラストの作製法は確立されているので、プロトプラストを精製後アガロース中で固化させる (清水・栗栖, 1988)。未精製プロトプラストを使用するとスメアの部分が多くなる傾向がある。その後、常法に従い0.5 M EDTA存在下で1% SDS及びプロテナーゼKを処理しサンプルを調整する。

現在まで様々なPFGE装置が開発されているが、ここではcounter-clamped homologous electric field (CHEF)を用いた例を紹介する。昆虫病原性糸状菌の染色体は酵母のそれよりかなり大きいので電気泳動条件は低い電圧 (40 V) で7~10日間の長い時間をかけ、アガロース濃度も0.6%と低くおさえパルスタイムも30~100分と長くする。

赤きょう病菌 (*Paecilomyces fumosoroseus*) と黒きょう病菌の泳動結果を表-2に示す (口絵写真参照)。サイズマーカーとして市販の *Schizosaccharomyces pombe* 及び *Saccharomyces cerevisiae* の染色体DNAを用いた。黒きょう病菌5株はそれぞれ7バンドに分離された。また、赤きょう病菌4株は6バンドに分離された。したがって、

表-1 主な昆虫病原糸状菌の市販製剤名

菌種名	製剤名	主な対象害虫
<i>Beauveria bassiana</i>	Boverin, Biotrol FBB	コロラドハムシ、イラクサギンウワバなど
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Metaquino, Bio 1020, Biotrol FMA	アワフキムシ、ヨコバイ類など
<i>Hirsutiella thompsonii</i>	Mycar	ミカンサビダニ
<i>Verticillium lecanii</i>	Vertalec, Mycotol, Microgermin	オンシツコナジラミ、アブラムシなど
<i>Aschersonia aleyrodinis</i>	Aseronija	ミカンコナジラミ

Electrophoretic Karyotyping of Insect Pathogenic Fungi.
By Susumu SHIMIZU

表-2 PFGE法による黒きょう病菌と赤きょう病菌の染色体DNAの大きさの推定

菌種名 バンドNo.	黒きょう病菌					赤きょう病菌			
	分離菌株					分離菌株			
	F1	F2	F3	F5	8556	F1	P1	522	8555
1	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.7	7.8	7.8	7.7
2	6.2	6.2	6.2	5.8	6.2	5.3	5.3	5.2	5.4
3	5.6	5.9	5.4	4.6	4.8	4.8	4.8	4.7	4.8
4	4.5	4.5	4.3	4.0	4.3	3.8	3.8	3.7	3.8
5	3.3	3.3	4.0	2.9	3.9	3.3	3.1	3.1	3.1
6	2.3	2.0	2.9	2.6	3.0	3.2	2.8	3.0	3.0
7	1.6	1.6	2.1	2.3	2.6				
合計	30.9	30.9	32.3	29.6	32.1	28.1	27.6	27.5	27.8

黒きょう病菌の染色体は7本、赤きょう病菌のそれは6本と推定される。表-3に著者らが推定した昆虫病原性糸状菌のゲノムサイズと染色体数ならびに遺伝学的研究の進んでいるほかの菌類のそれらを示した。ここで問題になるのは、サンプル内で分離されずに残っている巨大なDNAの存在であるが、黒きょう病菌、赤きょう病菌において泳動されないような巨大なDNAが存在する可能性は低いと思われる。表-3に示したように糸状菌のゲノムサイズは *Aspergillus nidulans*, *A. oryzae* 及びアカパンカビ (*Neurospora crassa*) でそれぞれ31, 33.5及び47 Mbpと報告されているが、その中でアカパンカビの値はサイズマーカーである *S. pombe* の染色体DNAの大きさを大きく見積って算出してあるので、実際にはこれよりかなり低い値になるものと思われる。これらの結果を踏まえると、かりに10 Mbp以上の染色体DNAが残っていたとするならば、いままで報告されている糸状菌ゲノムサイズの範中を大きく上回ることになるからである。

上述したように昆虫病原性糸状菌の染色体数及びゲノムサイズの推定はPFGEにより可能になったが、次に興味もたれるのは種内における染色体数ならびにそれらの大きさの変異である。表-2に示したように黒きょう病菌のゲノムサイズは5株でほぼ30±2 Mbpの範囲におさまるが、それぞれの染色体DNAの長さは著しく異なる。例えば第7染色体DNAの長さはF1, F2, F3, F5及び8556株でそれぞれ1.6, 1.6, 2.1, 2.3及び2.6 Mbpと推定される(表-2, 口絵参照)。ほかの染色体DNAバンドに関しても同様な現象が認められ、また黒きょう病菌と同様に宿主範囲の広い *Beauveria bassiana* においても染色体の長さの多型性が認められる。しかしながら比較的宿主範囲の狭い *Paecilomyces* 糸状菌(赤きょう病

表-3 昆虫病原性糸状菌とそのほかの糸状菌のゲノムサイズと染色体数

菌種名	PFGEで推定された		リンケージグループ数
	ゲノムサイズ	染色体数	
<i>B. bassiana</i>	28.4 (Mbp)	5~6	?
<i>P. fumosoroseus</i>	27.8	6	?
<i>P. farinosus</i>	28.9	6	?
<i>M. anisopliae</i>	30.1	7	5以上
<i>A. nidulans</i>	31	8	8
<i>A. oryzae</i>	33.5	8	?
<i>N. crassa</i>	47	7	7

菌及び *P. farinosus*) の電気泳動的核型はそれぞれの種内において酷似している。昆虫病原性糸状菌における研究例は少ないが、植物に病原性をもつ糸状菌の研究では電気泳動的核型の変動が大きい種はRFLPs (restriction fragment length polymorphisms) 分析においても変動が大きい (MacDONALD and MARTINEZ, 1991)。つまり、遺伝的変異幅が広いことを意味する。このことを昆虫病原性糸状菌にあてはめた場合、黒きょう病菌及び *B. bassiana* の染色体多型性とそれらの広い宿主域とは関連ありそうで、この点での今後の研究が期待される。

次に同じくらいの長さの染色体が同じ種類の遺伝情報を有するかどうか、アカパンカビのrDNAと β -tubulin遺伝子をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを赤きょう病菌、*P. farinosus* 及び *B. bassiana* で行った(口絵写真参照)。電気泳動核型が比較的類似している赤きょう病菌においてもrDNAならびに β -tubulin遺伝子のマップされる染色体は必ずしも同一ではない。すなわち、 β -tubulinがマップされる染色体はF1及び8556株では第1と第6染色体であるが、F1株では第1, 第3及び第6染色体にマップされる。また、rDNAがマップされる染色体はP1と8555株では第2染色体であるが、F1株においては第1及び第2染色体バンドにマップされる。

一方、電気泳動的核型の変異が大きい *B. bassiana* の各株にrDNAをマップした模式図を図-1に示す。この場合、rDNAがマップされる染色体DNAバンドは株ごとに極端に異なる。例えばF1株では第5バンドにマップされるのに対し8807株では第1バンドにマップされる。なお、*P. farinosus* の場合にはrDNA及び β -tubulin遺伝子がマップされる染色体の株間の相違は認められなかった。このことは、電気泳動的核型の類似している種においては同一遺伝子が同じくらいの大きさの染色体に必ずしもマップされるとは限らず、核型の変異の大きい種においては同一遺伝子が存在する染色体はかなり異な

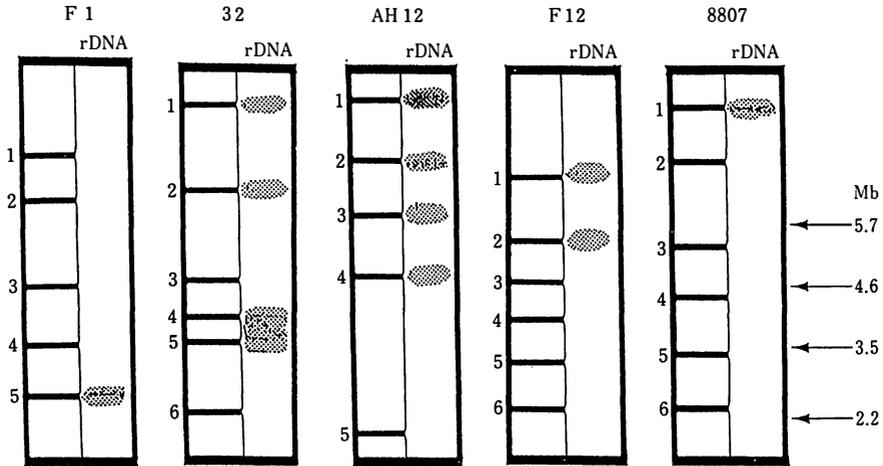


図-1 *B. bassiana* における rDNA の物理的マッピング

ることを意味する。ただし、*B. bassiana* の rDNA の塩基配列自身は種内においてかなり保存されているという報告がある。

今まで昆虫に病原性をもつ糸状菌の核型の変異幅が著しい例は報告されていないが、著者らの研究によれば黒きょう病菌及び *B. bassiana* の核型は分離株ごとに異なる。同じような現象は人間に病原性をもつ *Candida albicans* においても認められている。つまり、*C. albicans* でも分離株ごとに電気泳動的核型は異なり、さらにコロニー形態の変化を伴う自然突然変異株では染色体レベル(電気泳動的核型)の変化(再編成)が起こっていると報告されている(RUSTCHENKO-BULGAC, 1991)。しかも、株によってはコロニー形態の自然突然変異はかなりの確率(1.5%以上)で起こる。したがって、このような分離株においては染色体レベルで遺伝子の再編成がかなりの速度で起こっていることを意味し、同様なことが昆虫病原性糸状菌においても起こっている可能性がある。

黒きょう病菌と *B. bassiana* の分離株全体で見れば宿主域は広いが1株1株のある昆虫に対する病原性あるいは病原力をみた場合には株ごとに著しく異なる。一般的にはその糸状菌が分離された昆虫に対しては最も強い病原力が認められる。また、鱗翅目昆虫と鞘翅目昆虫から分離された *B. bassiana* の生化学的性状はそれぞれ異なることから、MUGNAI ら (1989) は宿主特異系統 (host specific strain) の存在を主張している。つまり、宿主昆虫域の広い黒きょう病菌ならびに *B. bassiana* においては宿主昆虫に適應する能力が高く、それと同時にその核型もある程度変化させていると考えられる。

ところで、*B. bassiana* はいくつもの種の集団とも考え

られるが、病原性に最も関係しているといわれているプロテアーゼは種内のどの菌株も血清学的には同一であり、*B. brongniartii* のある系統、黒きょう病菌、あるいは赤きょう病菌などのプロテアーゼとは異なることが判明している。また、ミトコンドリア (mt) DNA の変異幅もかなり大きいことがわかっているが、その分類にはより詳細な菌株比較が必要と思われる。

おわりに

昆虫病原性糸状菌においてははまだ遺伝子がクローン化されていないので、今すぐ遺伝子の連関をみたり遺伝子地図の作成には利用できないが、現段階でも電気泳動的核型分析は菌株の識別には有力な手法だと思われる。染色体上の広範囲に散在している遺伝子及び染色体の解析には PFGE の果たす役割は大きく、今後昆虫病原性糸状菌の分類ならびに育種にも利用される手法だとも考えられる。また、これら糸状菌は害虫の防除に有効であると同時に、寄主-寄生の共進化の問題に遺伝子の再編成という新しい研究課題を提供するかもしれない。

引用文献

- 1) BERNIER, L. et al. (1989): FEM Microbiology Letters 60, 261~266.
- 2) MACDONALD, B. A. and J. P. MARTINEZ (1991): Curr. Genet. 19, 265~271.
- 3) MAGOON, J. and K. MESSING-AL-AIDROOS. (1986): Can. G. Genet. Cytol. 28, 96~100
- 4) MUGNAI, L. et al. (1989): Mycol. Res. 92, 199~209.
- 5) RUSTCHENKO-BULGAC, E. P. (1991): J. Bacteriol. 173, 6586~6596.
- 6) SHIMIZU, S. et al. (1992): J. Invertebr. Pathol., 60, 185~187.
- 7) 清水 進・栗栖式彦 (1988): 日蚕雑 57: 81~82.