

天敵微生物の改変と利用

北海道大学農学部応用生命科学科 飯 塚 敏 彦

はじめに

近年の先進国型農業の目標は、環境に優しい持続的農業である。一般的な作物害虫の防除は、低コストの化学農薬の使用が中心であるが、作物栽培の場面場面では微生物農薬の使用も行われるようになってきた。例えば、ハウス内栽培作物の開花期の受粉にはマルハナバチの輸入によるといった使用例が多くなってきており、その際の害虫防除にはBT剤が使用されるケースがある。

BT剤は1965年以降アメリカ・カナダ・ヨーロッパ

を中心に使用が認められ市販されるようになった。対象はそ菜、森林害虫ならびに薬剤耐性を獲得した害虫を中心に使われてきた。日本では、1982年以来トアローCT剤ならびに各国からの輸入BT剤が小規模作物の害虫防除に使用されてきている。1980年代までは、人間や動物に無害で安全な微生物農薬といっても、そのコスト面では化学農薬と競争することが難しく、世界におけるマーケットも全使用農薬の1%程度で推移した(飯塚, 1990)。しかし、1985年以降、BT菌(*Bacillus thuringiensis*)の殺虫性結晶タンパク質(ICP)遺伝子の研究が

表-1 *Bacillus thuringiensis* 菌株の分類

H-ANTIGEN (H-抗原)	SEROVAR (血清型変異株)	H-ANTIGEN (H-抗原)	SEROVAR (血清型変異株)
1	thuringiensis	20 a, 20 b	yunnanensis
2	finitimus	20 a, 20 c	pondicheriensis
3 a, 3 c	alesti	21	colmeri
3 a, 3 b, 3 c	kurstaki	22	shandongiensis
3 a, 3 d	sumiyoshiensis	23	japonensis
3 a, 3 d, 3 e	fukuokaensis	24 a, 24 b	neoleonensis
4 a, 4 b	sotto	24 a, 24 c	novosibirsk
4 a, 4 c	kenyae	25	coreanensis
5 a, 5 b	galleriae	26	silo
5 a, 5 c	canadensis	27	mexicanensis
6	entomocidus	28 a, 28 b	monterrey
7	aizawai	28 a, 28 c	jegathesan
8 a, 8 b	morrisoni	29	amagiensis
8 a, 8 c	ostrinae	30	medellin
8 b, 8 d	nigeriensis	31	toguchini
9	tolworthi	32	cameroun
10 a, 10 b	darmstadiensis	33	leesis
10 a, 10 c	londrina	34	kondudian
11 a, 11 b	toumanoffi	35	seoulensis
11 a, 11 c	kyushuensis	36	malaysiensis
12	thompsoni	37	andalousiensis
13	pakistani	38	oswaldocruzi
14	israelensis	39	brasiliensis
15	dakota	40	huazhongensis
16	indiana	41	sooncheon
17	tohokuensis	42	jinghongensis
18 a, 18 b	kumamotoensis	43	guiyangensis
18 a, 18 c	yosoo	44	higo
19	tochigiensis	45	roskildiensis

急速に進展し、遺伝子改造 BT 剤の作成ならびに作物細胞でこの ICP 遺伝子を発現させて耐虫性作物作出が進むに従って BT 菌の新しい利用が注目されてきた。

I BT 菌の分類

殺虫性結晶タンパク質 (ICP) を産生する *Bacillus thuringiensis* (BT) は 1901 年日本の石渡繁胤博士によりカイコの卒倒病病原菌としてはじめて発見されて以来、現在まで各種性質をもった菌株が世界各地で死亡昆虫とか土壤中から分離され (IZUKA et al., 1995), その分類は鞭毛抗原に基づいて分類されるようになった。現在、45 の H-抗原が認められ、各菌株を serovar (血清型変異株) または subspecies (亜種) として記載されている (DELÉCLUSE et al., 1994)。その結果は表-1 に示した。しかし、この分類方法では同じ亜種の中にも殺虫活性の異なる菌株が存在することを正しく把握できない。このため、近年、各亜種に属する菌株が保有している ICP 遺伝子を同定する新しい方法が開発された (KALMAN et al., 1993; 浅野ら, 1993)。

II BT 菌の殺虫活性

BT 菌は土壌細菌で芽胞形成細菌であるが、芽胞を形成する際、結晶形態のタンパク質を産生する。亜種 *sotto* は典型的な菱形結晶を産生し (図-1)、亜種 *kurstaki* HD-1 は菱形結晶とサイコロ状結晶を同時に産生し (図-2)、亜種 *israelensis* は不定形結晶を産生する (図-3)。これら異なる結晶を産生する各菌株は対象昆虫を異にし殺

虫活性も異にする。

また、これら各種形態の結晶を食下した昆虫は、5 分後には腸管麻痺を起し、約 24 時間経過すると死亡に至る個体が出現する。これが一般的な中毒症状である。さらに、結晶形態を異にする菌株は、特異的な殺虫活性を示す。現在まで知られている対象昆虫は、鱗翅目 (ガとチョウの類)・双翅目 (カ)・鞘翅目 (甲虫類) であり、近年、線虫やダニにも活性を示す BT 菌の存在が発表された (KIM et al., 1995)。

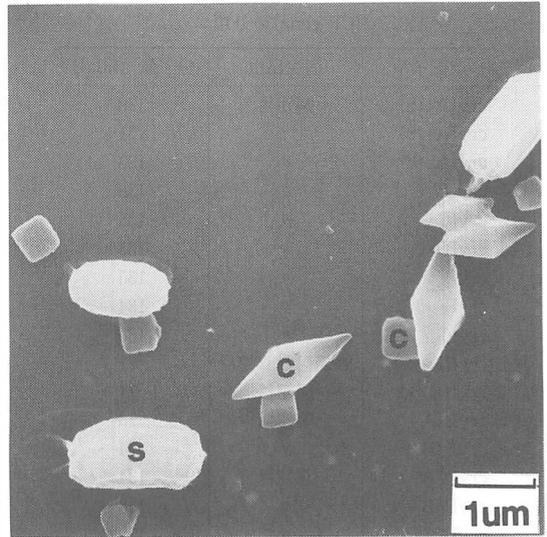


図-2 亜種 *kurstaki* HD-1 の 2 種の結晶 (C) と芽胞 (S)

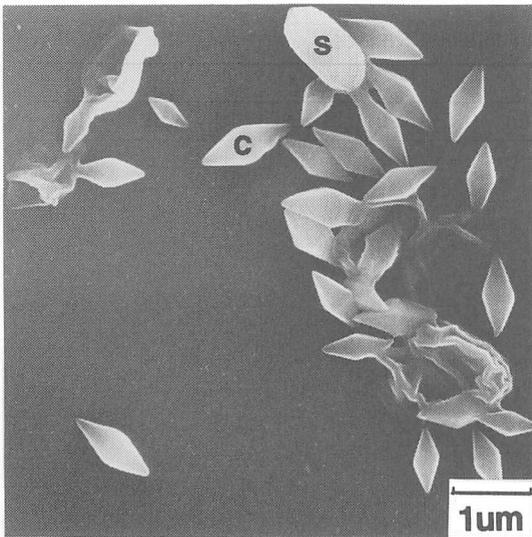


図-1 亜種 *sotto* の結晶 (C) と芽胞 (S)

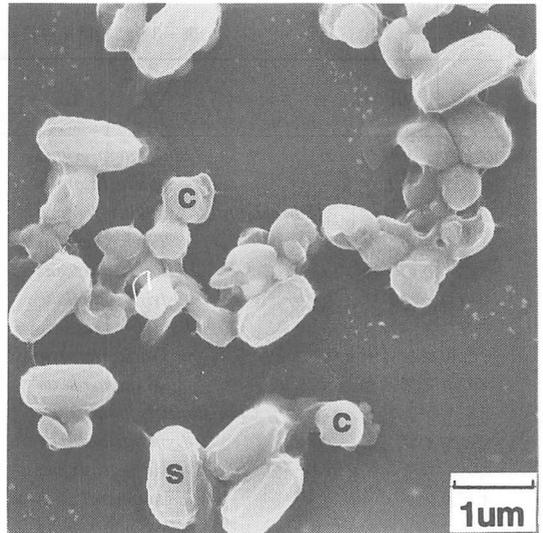


図-3 亜種 *israelensis* の結晶 (C) と芽胞 (S)

III BT 菌の ICP 遺伝子

BT 菌株が異なる昆虫種に特異的に殺虫活性を示すのは、BT 菌株が保有する ICP 遺伝子を異にするためである。塩基配列を異にする多くの ICP 遺伝子が報告されて以来 (SCHNEFF et al., 1985; SHIBANO et al., 1985), ICP の分類の必要が生じ、異なる対象昆虫による ICP の分類が行われた (HÖFTE and WHITELEY, 1989)。これを最近のデータも含めて表-2 に示した。

また、数種鱗翅目に対し、これら各 cry I に属する遺伝

表-2 *Bacillus thuringiensis* の殺虫性タンパク質遺伝子 (ICP gene) の分類

遺伝子型	宿主昆虫	分子量 (kDa)
cryIA (a)	鱗翅目	133
cryIA (b)	〃	131
cryIA (c)	〃	133
cryIB	〃	138
cryIC	〃	135
cryID	〃	133
cryIE	〃	133
cryIF	〃	134
cryIG	〃	130
cryIIA	鱗翅目と双翅目	71
cryIIB	鱗翅目	71
cryIIIA	鞘翅目	73
cryIIIB	〃	74
cryIVA	双翅目	134
cryIVB	〃	128
cryIVC	〃	78
cryIVD	〃	72

子の殺虫活性をまとめると、表-3 のようになる。すなわち、cry I A (a) はカイコ (*Bombyx mori*) に特異的に強い殺虫活性を、cry I A (c) はイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) に、また、cry IC はヨトウ (*Mamestra brassicae*) やハスモンヨトウ (*Spodoptera littoralis*) に活性を示すことが報告されている (Ge et al., 1989; YAMAMOTO and POWELL, 1993)。

IV ICP の発病機作

鱗翅目昆虫が ICP を食下すると、通常アルカリ性の消化液で分解されてプロトキシシン (130~135 kDa) となり、さらに消化液中のタンパク質分解酵素で分解され殺虫活性ペプチド (60~65 kDa) が出現し、昆虫の消化管細胞膜の受容体タンパク質と結合する (KNOWLES and ELLAR, 1986; YAMAMOTO and POWELL, 1993)。殺虫活性ペプチドは、領域 I・II・III から成り (Li et al., 1991)、領域 II の部分に β -sheet 構造を有する部分があり、この部分のアミノ酸の一部が受容体タンパク質と結合し細胞膜に孔を明け、浸透圧異常を起し細胞の崩壊をもたらす、という機作が受け入れられている。

V ICP 遺伝子改変による優良 BT 菌製剤の作成

上記のように ICP のアミノ酸配列の特徴とペプチド構造の解明が進んだ結果、殺虫性機作の解明も明らかにされてきた。このため、従来の BT 剤に新しく ICP 遺伝子を付加して殺虫活性を高める一方、対象害虫の範囲を広める BT 剤を作る試みが行われている。最近注目されている 3 例について紹介する。

表-3 鱗翅目昆虫に対する各種 cry I 遺伝子の殺虫活性

昆虫種名	学名	cry I タイプ							
		IA(a)	IA(b)	IA(c)	IB	IC	ID	IE	IF
シロイチモジヨトウ	<i>Spodoptera exigua</i>	±	±	-	-	+	+	±	+
ハスモンヨトウ	<i>Spodoptera littoralis</i>	-	-	-	-	+	-	+	
アトウスヤガ	<i>Ochropleura (= Actevia) fennica</i>	-	-	-	-	-	-	-	
イラクサギンウワバ	<i>Trichoplusia ni</i>	+	+	+	+	+	+	+	
タバコガの一種	<i>Heliothis virescens</i>	+	+	+	-	±	-	±	+
ヨーロッパアワノメイガ	<i>Ostrinia nubilalis</i>	+	+	+				+	+
ヨトウ	<i>Mamestra brassicae</i>	+	+	-	-	+	-	-	
オオモンシロチョウ	<i>Pieris brassicae</i>	+	+	+	+	+	-	-	
タバコスズメガ	<i>Manduca sexta</i>	+	+	+	-	+	+	+	
トウヒノシントメハマキ	<i>Choristoneura fumiferana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
マイマイガ	<i>Lymantria dispar</i>	+	+	±	-	±	+	-	+
ヒメシロモンドクガの一種	<i>Orgyia leucostigma</i>	+	+	±	-	+	±	-	+
オビカレハ	<i>Malacosoma disstria</i>	+	+	+	+	+	+	+	
カイコ	<i>Bombyx mori</i>	+	±	-	-	+	+	+	
コナガ	<i>Plutella xylostella</i>	+	+	+	+	+	-	-	

1 サントス アグロ社 (Sandoz Agro Inc., USA) による遺伝子改変 BT 剤

山本敬司博士のグループによる研究で、カリフォルニア州における重要作物ワタの害虫シロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*) を主な対象害虫に改変を試みられた BT 製剤である。

アメリカの農作物は、大規模化が行われているため、害虫による被害も大きい。特に、ワタとトウモロコシに対する害虫の被害が大きく、アメリカ全体のワタの害虫による被害は、カリフォルニア州では7,280万ドル、日本円で65億5千2百万円と計算されている。

ワタの害虫も cotton bollworm とよばれている *Heliothis zea* やタバコの害虫でもある *H. virescens* が知られている。このため、シロイチモジヨトウも含めて、これら鱗翅目害虫に効果的な殺虫活性を示す ICP 遺伝子である cry I C 遺伝子を従来の亜種 *kurstaki* 株に遺伝子導入することが行われた。BT 菌株に遺伝子を導入する際の一般的な方法は、CRICKMORE et al. (1990) によって試みられたようにプラスミドとして導入するのが普通であったが、KALMAN et al. (1995) はエレクトロポレーション法によって染色体 DNA に入れた。このため、従来の欠点であった遺伝子の脱落による殺虫性タンパク質産生の不安定化、ならびに培地に抗生物質を添加しておかなければならない高コスト化を改良した。

新しく作成された遺伝子改変 BT 剤は Bt 94 ならびに Bt 95 と名付けられ、殺虫性試験の結果も目的とした害虫のみならずコナガ (*Plutella xylostella*)、イラクサギンウワバ (*T. ni*) にも有効とされた。

何よりも注目されるのは、1993 年には連邦 EPA とミシシッピ州 EPA の許可を得てミシシッピ州で圃場試験が行われ、1994 年にはカリフォルニア州 EPA の許可を得て San Joaquin Valley にて圃場試験が行われたことである。カリフォルニア州では 1989 年オークランドの AGS 社によりオレンジなどの霜害防除のためアイスマイナス遺伝子改変をした *Pseudomonas* 菌をイチゴ圃場にテストしようとして自然保護団体の妨害を受け圃場試験ができなかった以来の出来事であり、遺伝子改変 BT 剤の使用が一般市民にも認知されてきた点でアメリカ中に注目されている。

2 エコジェン社 (Ecogen Inc.) による遺伝子改変 BT 剤 (CRYMAX WDG)

JOHNSON et al. (1995) は、本年 7 月にコーネル大学で行われた国際無脊椎動物病理学会例会で新 BT 剤 CRYMAX WDG について報告した。

宿主菌株は亜種 *kurstaki* (EG 7841) であり、異なる

cry I A (c) 2 遺伝子と cry II A を保有していたが、これに接合法 (transconjugation) を用いて、塩基配列の異なるもう一つの cry I A (c) と cry I C 遺伝子を導入し、新しく EG 4923 を作成した。この結果、イラクサギンウワバ (*T. ni*) ・シロイチモジヨトウ (*S. exigua*) ・コナガ (*P. xylostella*) ・モンシロチョウ (*Pieris rapae*) などにより強く殺虫活性を示す新製剤を得、農業登録を行った、としている。

3 チバガイギー社 (Ciba-Geigy Corp.) による遺伝子改変 BT 剤 (Able™)

Ciba Crop Protection の報告(1995)によると、従来の cry I A (a) ・ cry I A (b) ・ cry I A (c) ・ cry II A の遺伝子を有する亜種 *kurstaki* 株に新しく cry I E を導入し新製剤を作成し EPA に登録中であり商品名 WHIRL とする、とされている。しかし、殺虫活性などについてはまだ詳細に報告されていない。

VI 遺伝子改変耐虫性作物 (Transgenic plant)

BT 菌における ICP 遺伝子のクローニングと構造解析が 1985 年に初めて行われて以来 (SCHNEPP et al., 1985), すでに 50 以上の異なる ICP 遺伝子が報告されてきた。この結果、これらの遺伝子が示す殺虫活性についての情報も数多く得られている。

ICP 遺伝子の詳細が明らかになると、これら遺伝子を植物細胞において発現させ、化学殺虫剤を散布する必要のない耐虫性植物を作出する試みが行われ、1987 年タバコスズメガ (*Manduca sexta*) 耐性を獲得したタバコがはじめて報告された (VAECK et al., 1987)。

真核生物において BT 菌由来の ICP 遺伝子を効果的に発現させることは必ずしも簡単なことではない。殺虫効果をもった一定量が植物細胞で発現されるための工夫は、トウモロコシに症病をもたらす細菌 *Agrobacterium tumefaciens* のもつ Ti プラスミドに、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35 S プロモーターをつなぎ、その下流に ICP 遺伝子の殺虫活性領域 (約 65 kDa のトキシシン) を挿入し植物細胞にて発現させるもので、これらキメラ遺伝子にさらに別な植物遺伝子の一部を組み込んだりする工夫も行われるようになった。

すでに述べたように、アメリカにおける害虫の被害の大きい対象作物は、ワタとトウモロコシであるが、この他、ダイズ・コムギ・ソルガム・ピーナッツ・タバコ・パレイショなども対象とされて耐虫性植物作出が試みられている。1989 年経済新聞として著名なウォールストリートジャーナルで取り上げられた記事のまとめは、飯塚 (1989) によって行われたが、これを表-4 に示した。

表-4 遺伝子組み換え農作物が実験されている会社と場所

会社名	対象作物	実験場所
アグラシータス (Agracetus)	ワタ	ミシシッピ州
アグリジェネテック (Agrigenetics)	トマト	ウィスコンシン州
カルジーン (Calgene)	タバコ, トマト, ワタ	アリゾナ州, カリフォルニア州, ハワイ州, ミシシッピ州
クロープ ジェネテック (Crop Genetics)	トウモロコシ, イネ	メリーランド州, ネブラスカ州, ミネソタ州, イリノイ州
デュボン (Du Pont)	トマト, ワタ	デラウェア州, フロリダ州
モンサント (Monsant)	トマト, パレイショ, ワタ, ダイズ	イリノイ州, フロリダ州, カリフォルニア州, インディアナ州, アリゾナ州, アラバマ州, テネシー州
ローム・アンド・ハース (Rohm & Hass)	タバコ	ノースカロライナ州
サントス (Sandoz)	タバコ	ノースカロライナ州

1989年5月11日現在：USDA 提供のウォールスリートジャーナル紙記事から

タバコ細胞におけるより効果的な発現は BARTON et al. (1989) によって試みられ、タバコスズメガ (*M. sexta*) に対する有効性は明らかにされたが、タバコにおいて最も重要である葉の組織がダメージを受けることも認められ (BARTON and MILLER, 1993)、市場への利用は未だ実現されていない。

植物細胞における ICP 遺伝子の発現量の低さの問題は依然多くの研究者、会社によって研究が続けられ実用に耐えるように工夫されてきている。このため、現在、耐虫性植物として利用され得る種子の開発が進行してきている。

最近の情報として日本経済新聞 (1995年5月15日付け) は、「遺伝子組換えの耐害虫性イモ作付け」という記事を出し、連邦 EPA の許可を受け、アメリカ・モンサント社は、今秋収穫する種イモを農家に販売し、来秋にはコロラドポテトビートルに耐性のあるイモが商品として出回ることを報告した。

耐虫性作物の現状について、二つの例を取り上げてみる。

1 モンサント社 (Monsant Corp.) による耐虫性パレイショならびに耐虫性ワタの作出

モンサント社が開発した耐虫性パレイショは、ハムシ

の一種コロラドポテトビートル (*Lepitotarsa decemlineata*) からの食害を防ぐため、cryIII A 遺伝子をパレイショに組み込み耐虫性を獲得させたものである。実験的には防除効果が認められ、種イモにも遺伝子発現効果が認められたため、農家への販売も許可され、来秋には、この耐虫性パレイショが市販される、ということである。

また、耐虫性ワタは、*H. virescens* と *H. zea* の食害からワタを守るため、cry I A (c) 遺伝子がワタに組み込まれ、葉での発現効果が認められたことから、これもワタ種としての販売が予定されている。

2 ノースラップキング社 (Sandoz seeds), チバガイギー社 (Ciba-Geigy Corp.), マイコジェン社 (Mycogen Corp.) 3 社による耐虫性獲得トウモロコシ種子の販売

これら 3 社は、いずれもヨーロッパコーンボーラーとよばれている害虫 *Ostrinia nubilalis* の食害からトウモロコシを守るため、トウモロコシに cry I A (b) 遺伝子を導入し発現させたものであり、耐虫性効果も認められて 1996 年市販が予定されている。

これら改造 BT 剤ならびに耐虫性作物が比較的早くアメリカで市場に出回るようになってきている背景には、アメリカ国として、バイオ産業の面で世界のリーダー国となろうという政策を取っているためで、事実、環境に優しい農薬の登録には、審査順位をくり上げて行う、という大統領命令がある。

しかしながら、耐虫性作物作出のため BT 菌からの ICP 遺伝子を利用するためにはいくつかの問題点があり、これらの改良が行われているのが現状である。第 1 は技術的な問題であり、害虫が単一タンパク質で、しかも低濃度で継続的に与えられていると耐性を獲得する、という点であり、このための解決には複数の ICP 遺伝子を導入すとか、発現量を高めて低濃度による耐性獲得を防ぐ、といった改良が行われている。この他、高等植物細胞内では外来遺伝子発現を妨げることも認められるためその点の改良も行われている。第 2 はコスト面であり、耐虫性作物作出に要する費用である。この点は、化学農薬利用における散布用機器購入、労働力、燃料といった諸費用の総額と比べると問題にならない (BOULTER, 1993)、とされている。第 3 は、環境問題である。化学農薬は対象が他の動物にも及びかつ土壌中への蓄積も行われるのに対し、耐虫性植物の場合、単にこの作物を食下した昆虫にしか影響を及ぼさない点で環境に優しい、とされている。人類に対する健康の問題では、化学農薬は微量でも体内の蓄積があるのに対し、耐虫性作物の場合

導入発現されたものはタンパク質であるため、体内で分解され健康上問題はない、とされている。

ま と め

BT 菌が発見されてから約 100 年、また BT 菌の分子生物学的研究がはじまってから 15 年、今、農業への利用が新しい展開を見せようとしている。

BT 菌が保有する殺虫性タンパク質については、なぜ自然界でこの菌がこのような性質を獲得したのだろうか、という質問によくぶつかる。植物、特に樹木とそれに寄生する昆虫の相互依存の歴史は古い。現在、新しい BT 菌を分離しようとするとき、私達は大木の根元の土壌をサンプリングしたり、害虫が大発生している植物の下の土壌を採集して BT 菌の分離を行う。そこでは、昆虫が死亡する際、BT 菌が寄生しているとその体内で増殖し芽胞となって何年も腐葉土の下で息づいている、という想定のもとでの分離である。また、地温が高い亜熱帯地方の方が、北海道のどの地方よりも、数多く BT 菌が分離される現実もある。

このようにして私達は新しい遺伝子をもった BT 菌を分離して農業上の害虫防除を効果的に行おうとしている。遺伝子の改変についても、どの ICP 遺伝子のどの部分を変化させると活性を高めたり、対象昆虫を変えさせたり、またプロモーター領域を変化させることによって発現の増減を行い得るのかの情報が得られてきている。

植物にこのような遺伝子を入れても決して植物は恒常的に受け入れてくれない、という意見は植物育種に関係している先生方のはじめのころの意見でもあった。しかし、現在のバイオテクノロジー技術は長足の進歩を遂げている。問題があればその解決に努力し対応されてき

た。

日本の研究者は世界の現状を正しく認識し、決してマインナス思考で足踏みしてはならないと思う。

引用文献

- 1) 浅野眞一郎ら(1993): 応用動物昆虫学雑誌 38: 300~302.
- 2) BARTON, K. A. et al. (1989): Plant Physiol. 85: 1103~1109.
- 3) ——— and M. J. MILLER (1993): Transgenic Plants 1: 297~314.
- 4) BOULTER, D. (1993): Phytochem. 34: 1453~1466.
- 5) CRICKMORE, N. et al. (1990): Biochem. J. 270: 133~136.
- 6) DELÉCLUSE, A. et al. (1995): *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits 1: (in press)
- 7) GE, A. Z. et al. (1989): Pro. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4037~4041.
- 8) HÖFTE, H. and H. R. WHITELEY (1989): Microbiol. Rev. 53: 242~255.
- 9) 飯塚敏彦(1990): Bio Industry 7: 48~55.
- 10) IZUKA, T. et al. (1995): *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits 1: (in press)
- 11) JOHNSON, T. B. et al. (1995): *ibid.*
- 12) KALMAN, S. et al. (1993): Appl. Environ. Microbiol. 59: 1131~1137.
- 13) ——— et al. (1995): *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits 1: (in press)
- 14) KIM, L. et al. (1995): *ibid.*
- 15) KNOWLES, B. H. and D. J. Ellar (1986): J. Cell Sci. 83: 89~101.
- 16) LI, J. et al. (1991): Nature 353: 815~821.
- 17) SHIBANO, Y. et al. (1985): Gene 34: 245~251
- 18) SCHNEFF, H. E. et al. (1985): J. Bio. Chem. 260: 6264~6272.
- 19) VAECK, M. et al. (1987): Nature 328: 33~37.
- 20) YAMAMOTO, T. and G. K. POWELL (1993): In KIM L. (ed.) Advanced Engineered Pesticide, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 3~42.

主な次号予告

次 12 月号は下記原稿を掲載する予定です。

抵抗性品種の罹病化といもち病菌新レース発生の機構 生井恒雄
1994 年に西日本で多発生したオオタバコガとその加害作物 吉松慎一
北海道におけるジャガイモ半身萎ちょう病の発生状況と今後の研究課題 角野晶大
ゴルフ場の芝管理における病虫害診断エキスパートシステムの応用 星 岳彦・貫 和之・太田則夫
二酸化炭素くん蒸による貯蔵穀類の植物検疫消毒法

川上房男

連載：諸外国の植物検疫制度(5)——オーストラリアの植物検疫制度—— 塚本和彦・笹井 司
(リレー随筆) 産地の研究室から——地域ブランドを育てる/(3)大豆(丹羽黒) 福西 務
(植物防疫基礎講座)
ウンカ・ヨコバイ類に対する稲芽出しを用いた新しい簡易効力検定法 曾根信三郎
総目次——月別・項目別——

定期購読者以外のお申込みは至急前金にて本会へ
定価 1 部 800 円 送料 76 円