

氷核活性細菌による害虫防除

—昆虫腸内定着細菌の利用—

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 わたなべ 渡部 けんじ 賢司・佐藤 さとう まもる まもる 守

はじめに

耐寒性の昆虫は、糖、糖アルコール類を体内に蓄積し、一方では、腸内残留物などの氷結を促進するもの(氷核物質)を排泄して、越冬中の低温による凍結から逃れている。近年、脚光を浴びている氷核活性細菌を利用した害虫防除は氷核物質を昆虫の体内または表面に存在させ、昆虫の耐寒性獲得を妨害するという全く新しい害虫防除法である。

アメリカのLEEらのグループは代表的な氷核活性細菌である *Pseudomonas syringae* で処理した時の昆虫の耐寒性に関する研究を行っており、氷核活性細菌処理により、昆虫の耐寒性を著しく低下させることができるなど、害虫防除に利用可能であることを示した。しかし、氷核活性細菌処理による害虫防除の効果が継続しない等の問題点も指摘されていた。

ここでは、長期間、氷核活性細菌処理の効果を持続させるために、氷核活性細菌の中でも昆虫腸内に定着する細菌を利用した筆者らの新しい害虫防除法に関する研究を紹介する。

I 氷核活性細菌の利用

氷核活性細菌とは水が凍結するときの核(氷核)として働く細菌のことである。不純物を含まない水は通常 -20°C 以下でも凍結しないが、氷核活性細菌を含んだ水は $-2\sim-4^{\circ}\text{C}$ で凍結する。この細菌は最初に腐植葉から氷核となる能力(氷核活性能)を持つものとして発見され(MAKI et al., 1974)、現在では *Pseudomonas*, *Erwinia* (*Pantoea*), *Xanthomonas* 属細菌で氷核活性能を有する細菌が見つかっている。これらの細菌の多くが植物の葉面上で生存する細菌であったことから、その後、農作物への早霜や遅霜による霜害の原因として研究が進められた(LINDOW et al., 1983; 高橋, 1985)。これらの研究の中で氷核活性能は細胞膜に局在する氷核活性蛋白質によることがわかり、その遺伝子(氷核活性遺伝

子)が単離されている(GREEN and WARREN, 1985)。

一方、氷核活性細菌を有効利用する研究も行われ、加工食品、特に冷凍技術や濃縮技術の分野で実用化につながる成果が得られている(荒井, 1991; 高橋, 1987)。また、1988年のカルガリーオリンピックで、氷核活性細菌を造雪剤として利用したことは有名な話である。最近では、電力分野において氷核活性細菌の高い過冷却解除効果を蓄熱に利用することも検討されている(私信)。

近年、害虫防除の分野においても、氷核活性細菌の利用が提案されており、1990年頃には、欧米の研究グループにより、代表的な氷核活性細菌である *P. syringae* で処理することにより越冬昆虫を防除する方法が研究されてきた。例えば、テントウムシの一種(lady beetle, *Hippodamia convergens*)では氷核活性細菌の噴霧処理により、未処理区よりも 10°C 以上も高い温度で凍結することや、ある種の貯穀害虫では穀物に1,000 ppm程度の滅菌した氷核活性細菌の粉末を混合すると、 -5°C で約80%が死亡することが報告されている(Strong-GUNDERSON et al, 1990; FIELDS, 1993)。最近では、ジャガイモの重要害虫であるコロラドハムシの防除に氷核活性細菌を利用するプロジェクトが進められている。その他の昆虫における氷核活性細菌処理の試みについては本誌52巻8号(佐藤・渡部, 1998)をご参照いただきたい。以上のように、氷核活性細菌による害虫防除の研究が注目されつつあるが、氷核活性 *P. syringae* 処理による害虫防除の効果は処理してから約1週間程度しか継続しない等の問題点も指摘されていた。

II 昆虫腸内に定着する細菌

昆虫からは病原性または非病原性の多種の細菌が分離されている。筆者らはカイコやクワノメイガの幼虫腸内から細菌を分離したところ、腸内細菌科に属する *Erwinia herbicola* 群細菌や *Enterobacter cloacae* が多数分離され、優勢フローラを形成していた(TAKAHASHI et al., 1995; WATANABE and SATO, 1998 b)。これら分離細菌の昆虫腸内における定着、増殖能についてカイコ幼虫を用いて検討した(WATANABE et al., 1998; WATANABE and SATO, 1998 b)。5齢起蚕幼虫に経口接種したところ、時間経過と共に腸管および糞から分離され、腸内で定着、増殖することが明らかになった(図-1)。同様に、

Biological Control of Insect Pests by Gut-Colonizing Ice-Nucleation Active Bacteria. By Kenji WATANABE and Mamoru SATO

(キーワード: 害虫防除, 生物的防除, 氷核活性細菌, *Erwinia ananas*, *Enterobacter cloacae*, 腸内定着細菌, クワノメイガ)

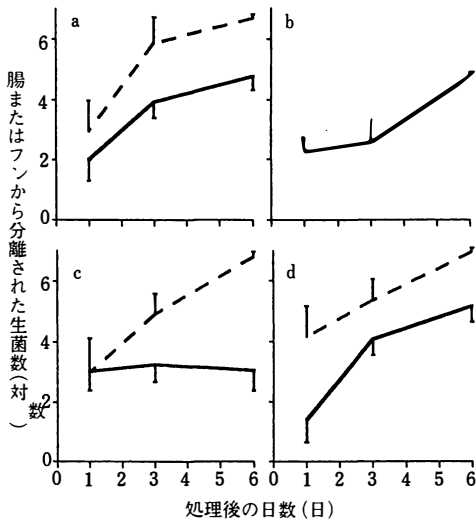


図-1 植物葉面および昆虫腸内から分離された *Erwinia herbicola*, *Enterobacter cloacae* のカイコ腸内での定着, 増殖

a: *Er. herbicola* (クワ由来), b: *Er. herbicola* (カイコ由来), c: *Ent. cloacae* (ラン由来), d: *Ent. cloacae* (カイコ由来).

実線は腸管, 破線は糞からの分離細菌数を示す。

クワ等植物由来の *Er. herbicola* 群細菌や *Ent. cloacae* もカイコ腸内で増殖することから, 自然界では細菌が葉面に付着した植物を幼虫が食べることにより, 細菌が腸内に入り, そこで増殖すると考えられた。一方, 葉面に生息する細菌として良く知られている *P. syringae* は経口接種しても腸内で増殖しなかった。これらの結果から, *Er. herbicola* 群細菌や *Ent. cloacae* は昆虫腸内で定着, 増殖する特性を有するが *P. syringae* にはその特性がないことが明らかになった。

Er. herbicola 群細菌とは近縁の細菌群の総称であるが, そのうち氷核活性能を有する菌株は氷核活性遺伝子や細菌学的性質の解析により, *Erwinia ananas* に属することが明らかになっている (WATANABE and SATO, 1998 a)。したがって, 氷核活性 *Er. ananas* は昆虫腸内に定着, 増殖可能な氷核活性細菌であると予想された。予備実験として, カイコ幼虫に経口接種したところ, 予想通り腸内で定着, 増殖した。一方, 氷核活性 *P. syringae* を与えた場合には, 幼虫の腸管から細菌が分離されなかった。

III 氷核活性 *Erwinia ananas* によるクワノメイガ幼虫の耐寒性の低下

クワノメイガはクワの葉を食害する多化性の害虫であり, 終令幼虫で越冬する。我々はクワノメイガ幼虫から

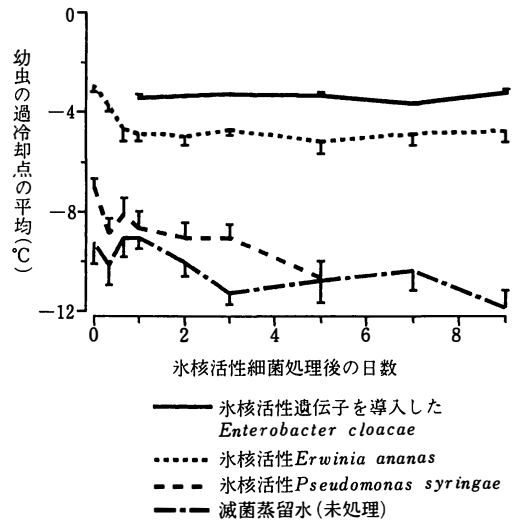


図-2 氷核活性細菌処理によるクワノメイガ幼虫の過冷却点

氷核活性 *Er. ananas* を分離しており, カイコ幼虫同様, 氷核活性 *Er. ananas* が腸内に定着, 増殖と考えられる。そこで, 越冬する前 (9月下旬~10月) の2~4令幼虫に各種氷核活性細菌を塗付したクワを2日間与え, その後の幼虫の耐寒性の変化と与えた氷核活性 *Er. ananas* の定着性について調べた (WATANABE and SATO, 1999)。耐寒性は過冷却点と -6°C における凍結死の割合を, 定着性は幼虫から分離される細菌数を指標にして評価した。

まず, 対照として滅菌蒸留水を与えたクワノメイガ幼虫の過冷却点の平均は処理後3日目 -11.3°C であった (図-2)。氷核活性 *Er. ananas* を与えたクワノメイガ幼虫の過冷却点の平均は -4.7°C であり, 滅菌蒸留水を与えた幼虫と比較して, 6.6°C 上昇した。この過冷却点の上昇は少なくとも9日目まで安定して維持された。一方, 氷核活性 *P. syringae* を与えた幼虫の過冷却点の平均は -9.0°C であり, 過冷却点は約 2.5°C 上昇した。しかし, 処理後5日目までに, 滅菌蒸留水を与えた幼虫と同じレベルまで下降した。

これら過冷却点を測定した幼虫から細菌を分離し, 虫体内の細菌数を調べた。氷核活性 *P. syringae* を与えた幼虫からは細菌はほとんど分離されなかった。一方, 氷核活性 *Er. ananas* を与えた場合には, 過冷却点と分離細菌数が相関しており, 分離細菌数が多い個体ほど過冷却点が高い傾向が見られた (図-3)。

以上の結果から, 幼虫の過冷却点は虫体内の氷核活性細菌数に相関しており, 幼虫腸内で増殖する *Er. ananas* と増殖できない *P. syringae* では幼虫の過冷却点

を上昇させる効果に大きな差異が認められた。次に、 -6°C における凍結死の割合を調べた。氷核活性 *Er. ananas* を与えた区では低温接触2時間で約50%の個体が凍結し、18時間低温接触では、約80%の個体が凍結、死亡した(図-4)。一方、滅菌蒸留水を与えた区では死亡個体数は約20%のみであることから、明らかに氷核活性細菌により、凍結死の割合が増加することが示された。氷核活性 *P. syringae* を与えた区では、凍結、死亡個体数は約36%で、凍結死の割合はあまり増加しなかった。これらの結果により、氷核活性 *Er. ananas* はク

ワノメイガ幼虫の腸内で定着、増殖し、幼虫の耐寒性を効果的に低下させることが明らかとなった。

IV 氷核活性遺伝子を導入した昆虫定着細菌の利用

氷核活性 *Er. ananas* は昆虫の耐寒性を効果的に低下させることがわかったが、*Er. ananas* は植物の葉面に生存する細菌として知られているので、野外散布等では植物に対して凍霜害を引き起こす危険性が考えられる。したがって、昆虫体内でのみ増殖し、植物体上で増殖しない氷核活性細菌を利用の方が作物等への影響を最小限に抑えることができるものと考えられる。残念ながら、昆虫腸内定着細菌の研究があまり進んでいないこともあり、現在のところ、そのような細菌は発見されていない。しかし、氷核活性能は氷核活性遺伝子に支配されており、氷核活性遺伝子を導入した細菌は氷核活性能を獲得するので (GREEN and WARREN, 1985)、昆虫のみに定着、増殖する細菌に氷核活性遺伝子を導入すれば、昆虫腸内に定着できる新規の氷核活性細菌を作成することは可能である。そこで、カイコ腸内で定着、増殖することが明らかになった *Er. ananas* および *Ent. cloacae* について、植物葉面に対する親和性を調べることにした (WATANABE et al., 2000)。代表的な植物葉面細菌である *P. syringae* や *Er. ananas* は乾燥条件の後の湿潤条件において増殖し、乾燥条件の前まで細菌数が回復することから、親和性が高いことがわかった(図-5)。一方で、*Ent. cloacae* は乾燥条件の後の湿潤条件において増殖す

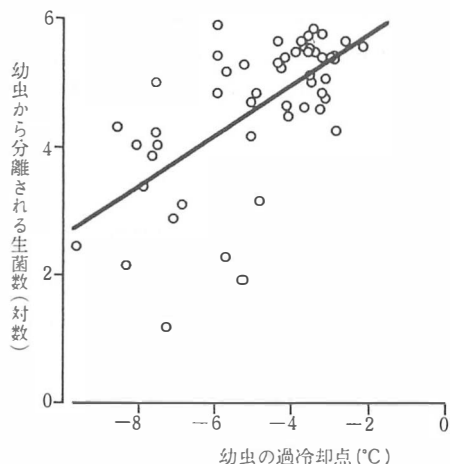


図-3 クワノメイガ幼虫の過冷却点と分離細菌数の関係

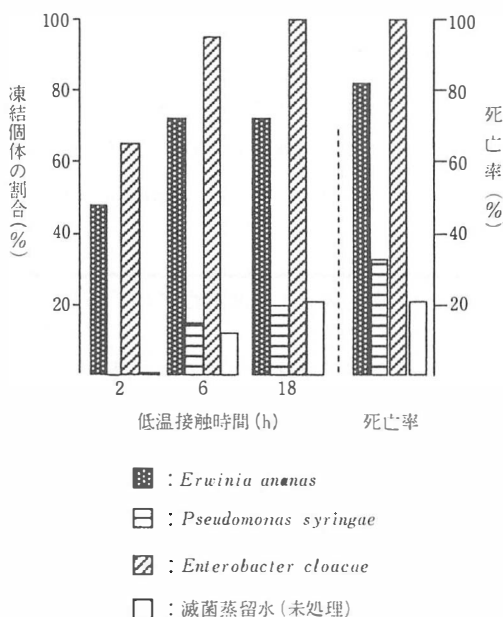


図-4 氷核活性細菌処理したクワノメイガ幼虫の凍結、死亡個体数の割合

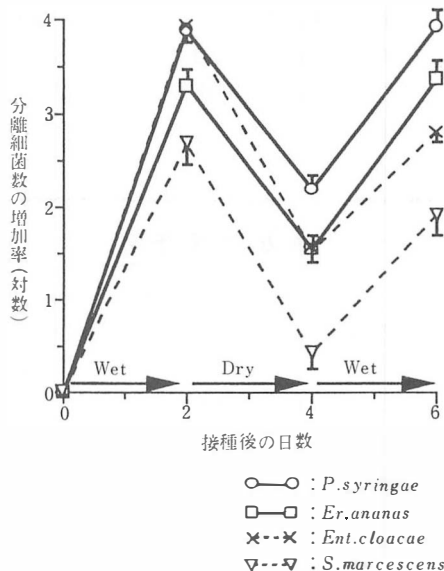


図-5 各種細菌のクワ葉面に対する親和性

るが、乾燥条件の前まで細菌数まで回復しないことから、親和性はあまり高くないことが示唆された。これらの結果から、*Ent. cloacae* は植物葉面上ではあまり増殖しないことが分かった。

そこで、この細菌に氷核活性遺伝子を導入した新たな氷核活性細菌を作出し、害虫防除効果の検討を行った。前述の方法で、氷核活性遺伝子導入 *Ent. cloacae* をクワノメイガ幼虫に与え、幼虫の過冷却点を測定したところ、処理後3日目では -3.3°C であり、滅菌蒸留水を与えた幼虫よりも 8°C 、*Er. ananas* を与えた幼虫よりもさらに 1.4°C 上昇した(図-2)。この過冷却点の上昇は、少なくとも9日目まで安定して維持された。さらに、 -5°C に18時間、低温接触した時の凍結個体数および死亡個体数を測定したところ、*Ent. cloacae* を与えた幼虫は低温接触2時間で約60%が凍結し、18時間後にはすべての個体が凍結し、死亡した(図-4)。一方、滅菌蒸留水を与えた幼虫では低温接触18時間後でも凍結した個体はなく、すべての幼虫が生存していた。以上のように、氷核活性遺伝子を導入した *Ent. cloacae* は、*Er. herbicola* 以上に強い生物防除活性を有することがわかった。

おわりに

氷核活性細菌を利用した害虫防除法は冬の氷点下になる時に、昆虫を細菌の氷核活性能により凍結、死亡させるものであるため、この生物的防除法は、野外で利用する場合には自然気象に依存する。したがって、冬期の気温が零下になる寒冷地帯での利用が想定される。また、氷核活性細菌は昆虫の活動期に与えるので、細菌が冬になるまでの間、昆虫体内に維持されている必要がある。予備実験の段階であるが、処理後約4ヵ月間、供試細菌がクワノメイガ幼虫の体内に維持され、その過冷却点は

対象と比較して約 10°C 上昇することから、長期間、安定した効果が期待できるのではないかと筆者らは考えている。また、多くの昆虫はさなぎまたは成虫で越冬するので、さなぎや成虫に氷核活性細菌を定着させる方法についても検討する必要がある。

昆虫腸内定着細菌は、今回明らかにした細菌以外にも多種の細菌が存在していると考えられ、その中には共生細菌のように宿主特異性が非常に高いものも多数存在する。特定の昆虫種にのみ定着、増殖する細菌に氷核活性遺伝子を含む害虫防除関連遺伝子を導入すれば、選択的に害虫を防除する細菌を作出でき、生態系への影響も少ないものと考えられる。今後は各種昆虫に定住している細菌フローラを明らかにするとともに、昆虫腸内定着に関連する因子を解明し、さらに強力な微生物防除剤を開発したいと考えている。

引用文献

- 1) 荒井綜一 (1991): 化学と生物 29: 176~182.
- 2) FIELDS, P. G. (1993): Environ. Entomol. 22: 470~476.
- 3) GREEN, R. L. and G. J. WARREN (1985): Nature 317: 645~648.
- 4) LINDOW, S. E. et al. (1983): Annu. Rev. Phytopathol. 21: 363~384.
- 5) MAKI, L. R. et al. (1974): Appl. Microbiol. 28: 456~459.
- 6) 佐藤 守・渡部賢司 (1998): 植物防疫 52: 23~26.
- 7) STRONG-GUNDERSON, J. M. et al. (1990): J. Insect Physiol. 36: 153~157.
- 8) TAKAHASHI, K. et al. (1995): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.
- 9) 高橋幸吉 (1985): 植物防疫 39: 8~13.
- 10) ——— (1987): 冷凍 62: 73~80.
- 11) WATANABE, K. and M. SATO (1998 a): Curr. Microbiol. 37: 201~209.
- 12) ——— (1998 b); ibid. 37: 352~355.
- 13) ——— (1999): Cryobiology 38: 281~289.
- 14) ——— et al. (1998): J. Invertebr. Pathol. 72: 104~111.
- 15) ——— et al. (2000): J. Appl. Microbiol. 88: 90~97.

主な次号予告

次号10月号は、下記原稿を掲載予定です。

共生微生物 *Wolbachia* 研究—最近の発展と展望

野田博明

カンザワハダニの種内変異と識別法(I) 後藤哲雄

ダイズ圃場におけるタネバエの発生と被害 桑原雅彦

植物防疫基礎講座

農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニ

ュアル(38)天敵生物: ケナガカブリダニ類

望月雅俊

(トピックス) 臭化メチル削減実行プログラムについて 大岡高行

(トピックス) 種子伝染性病害をめぐる最近の国際動向II 浅賀宏一・駒田 且

リレー随筆: 病虫害防除所の活動

(4) 兵庫県病虫害防除所 入江和己

定期講読者以外のお申込みは至急前金にて本会へ

定価1部920円 送料76円