

千葉県で分離された乳化病菌について

千葉県農業総合研究センター 横 山 と も こ

はじめに

1997年の夏、千葉県農業試験場（現 千葉県農業総合研究センター）の芝草圃場でセマダラコガネ幼虫が大発生した。そのとき、体が乳白色になり、元気のない幼虫（口絵①）が多数見つかった。実験室に持ち帰り飼育すると、幼虫はすべて死亡した。死亡した幼虫の体液を顕微鏡で観察すると、孢子と副孢子小体を含んだ非常に特徴的な孢子のうが認められた（口絵②）。幼虫の体が乳白色になる病徴および孢子のうの形態から、セマダラコガネ幼虫は乳化病菌に感染していると思われる。MATSUKI et al. (1997) により報告されるまで、日本における乳化病菌の分離例はなく、本邦産の乳化病菌の性状や殺虫活性などもほとんどわかっていない。そこで、千葉県で感染幼虫から分離された乳化病菌の性状、殺虫活性およびコガネムシ類幼虫に対する防除効果を調査した。また、副孢子小体中に含まれる結晶性タンパク質遺伝子をクローニングし、結晶性タンパク質と殺虫活性とのかかわりを解析した。その結果について紹介する。

I 乳化病菌について

乳化病は、2種類の細菌 *Paenibacillus* (*Bacillus*) *popilliae* および *Paenibacillus* (*Bacillus*) *lentimorbus* により引き起こされる。乳化病菌の属名は、現在 16S rDNA の塩基配列に基づき *Bacillus* 属から *Paenibacillus* 属に移行することが提案されており、ここでは属名をすべて *Paenibacillus* として記載することとする。これら2種の細菌に感染した幼虫の血体腔中で孢子のうが大量に増えることにより、本来透明な体液が乳白色に見えることから「乳化病」という名前が付けられた (HAWLEY and WHITE, 1935)。乳化病菌は、自然界では宿主の昆虫体内でのみ増殖し、人工培地での増殖は非常に困難である。宿主はコガネムシ類幼虫に限られ、経口的に感染する。

乳化病菌は、コガネムシ、特にマメコガネ幼虫の防除のためにアメリカを中心に使われてきた。マメコガネは、1916年ニュージャージー州の芝草のナーセリーで初め

て数頭見つかった以来、ミシシッピ川沿いの東部地域に分布を拡大し、さらに北西部、ヨーロッパおよびオーストラリアへと侵入していった。本種は、日本から輸入した芝草とともにアメリカに持ち込まれたと推測されている (FLEMING, 1968)。アメリカでは、1930年代にその被害が深刻になり、アメリカ農務省内にマメコガネ研究室が開設され、様々な防除方法が検討された。その過程で、*P. popilliae* の高い防除効果が認められ、1939年から53年までマメコガネの生息地域への *P. popilliae* 導入事業が合衆国連邦政府と州政府により行われた。事業が終了した時点で、多くの地域において *P. popilliae* のマメコガネ幼虫に対する十分な防除効果が得られたと報告されている (FLEMING, 1968)。*P. popilliae* は微生物農薬 (Milky spore®) として現在も使われ続けており、非常に歴史のある天敵微生物の一つである (KLEIN, 1992)。しかし、日本においては分離例も少なく、また乳化病菌製剤を使った有効な防除事例もなかったため、乳化病菌は天敵微生物としてほとんど注目されていなかった。

II 千葉県で分離された乳化病菌の性状

千葉県で発見された感染幼虫から分離した菌株をセマダラ株と命名し、定法に従い細菌学的性状を調査した。その結果を表-1に示した。

乳化病菌には、非常に近縁の2種 *P. popilliae* と *P. lentimorbus* が知られている。これまでにこれら2種を区別する性質は三つ報告されている。すなわち、*P. popilliae* のみが副孢子小体をもっていること、2% NaCl 中で生育できること (CLAUS and BERKELEY, 1986)、バンコマイシン抵抗性であること (STAHLY et al., 1992; RIPPERS et al., 1998) である。セマダラ株は、副孢子小体はもっているが、2% NaCl 中では生育できず、バンコマイシン感受性であることから、どちらの種に属するか明確にすることができなかった。一方、これらの三つの性質はそれぞれ例外も多く、これらの性質だけでは2種を区別できないことも報告されている (MILNER, 1974; RIPPERS et al., 1998; HARRISON et al., 2000)。そこで、近年細菌の同定および分類に 16S rDNA の塩基配列が用いられていることから、セマダラ株の 16S rDNA の塩基配列を調べ、それを基に菌の同定を行った。

セマダラ株の 16S rDNA の塩基配列を解読し、相同性

The Strain of Milky Disease Pathogen, *Paenibacillus lentimorbus*, Isolated in Chiba Prefecture. By Tomoko YOKOYAMA

(キーワード: 乳化病菌, コガネムシ類幼虫, 殺虫活性, 結晶性タンパク質, 防除)

検索を行った結果、代表的な乳化病菌株 *P. popilliae* ATCC 14706(T)および NRRL B-4081 より *P. lentimorbus* ATCC 14707(T)の塩基配列と相同性が高いことがわかった (表-2)。また、*P. popilliae* ATCC 14706(T)および NRRL B-4081 とセマダラ株の塩基配列の間には 4 箇

所ギャップが存在したが、*P. lentimorbus* ATCC 14707(T)との間にはギャップはなかった。以上の解析結果から、セマダラ株は *P. popilliae* より *P. lentimorbus* により近縁と判断し、セマダラ株を *P. lentimorbus* と同定した。

MATSUKI et al. は、1997 年に日本で初めて北海道で乳化病菌 3 株を分離した。セマダラ株と北海道の 3 分離株との相同性は、それぞれ 99.8, 99.9 および 99.8%であり (表-2)、セマダラ株はこれら 3 菌株と非常に近縁であることがわかった。

III 殺虫活性について

5 種類のコガネムシ類幼虫 (セマダラコガネ、ヒメコガネ、ウスチャコガネ、ドウガネブイブイおよびマメコガネ) に対するセマダラ株の殺虫活性を調査した結果、すべての幼虫に対して高い殺虫活性を示したことから、これらの幼虫の防除資材として利用の可能性が高いことが示唆された。

セマダラ株の殺虫活性は、幼虫の齢期が進むほど低くなった。そのため、セマダラ株をコガネムシ類幼虫の防除資材として利用する場合、幼虫の発生時期を把握し、なるべく幼虫の若齢期に処理することが望ましいと思われる。

セマダラ株に感染した幼虫は乳白色になって死亡する個体より、餌を食べずに衰弱死している個体のほうが多く認められた。特にドウガネブイブイでは、ほとんどの幼虫が餌を食べなくなり、体重が減少することにより死亡した。体重減少の原因を考察するため、胞子のうを摂食させた場合と体液中に直接注射した場合とで幼虫の体重の推移を比較した。その結果、胞子のうを摂食させたときのみ激しい体重減少が起こり、その程度は胞子のうの濃度が高くなるほど強くなった。このことから、体重減少は、体液中で栄養体細胞や胞子のうが増殖することよりも、胞子のうを幼虫が餌とともに食べることでより消化器官がなんらかの影響を受けることのほうが強く作用して引き起こされるものと考えられ、結晶性タンパク質の関与が示唆された。

IV 結晶性タンパク質について

乳化病菌は、胞子のうの中に副胞子小体を含んでいる菌株が多い。副胞子小体には結晶性タンパク質が含まれており、殺虫活性とのかかわりが論じられてきた。近年、ZHANG et al. (1997) により初めて乳化病菌 *P. popilliae* subsp. *melolonthae* H1 から結晶性タンパク質遺伝子がクローニングされ (*cry18Aa1*)、その遺伝子から予想されるアミノ酸配列が、*Bacillus thuringiensis* の Cry2 結晶性

表-1 セマダラ株の細菌学的性状

試験項目	セマダラ株	<i>P. popilliae</i> a)	<i>P. lentimorbus</i> a)
胞子のうの大きさ			
幅 (μm)	1.3 ~ 1.8		
長さ (μm)	4.2 ~ 6.2		
栄養細胞の大きさ			
幅 (μm)	0.5 ~ 1.0	0.5 ~ 0.8	0.5 ~ 0.7
長さ (μm)	2.5 ~ 7.5	1.3 ~ 5.2	1.8 ~ 7.0
副胞子小体の存在	+	+	—
運動性	—	—	d ^{b)}
グラム染色	—	—	—
カタラーゼ活性	—	—	—
嫌気下での生育	+	+	+
Voges-Proskauer 反応	—	—	—
生育温度 (℃)			
最高	40	35	35
最低	20	20	20
NaCl 中での生育			
0.5% NaCl	+		
1.0% NaCl	—		
2.0% NaCl	—	+	—
3.0% NaCl	—		
0.001% リゾチーム			
中での生育	+	+	+
pH 5.6 での生育	—	—	—
バンコマイシン抵抗性	—		

a) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2 (CLAUS and BERKELEY, 1986) の記載から引用した。b) 菌株によって反応が異なることを示す。11 ~ 89%の菌株は陽性反応である。

表-2 セマダラ株, *Paenibacillus popilliae* ATCC 14706(T), *P. popilliae* NRRL B-4081, *Paenibacillus lentimorbus* ATCC 14707(T), *P. popilliae* var. *popilliae* Mame, var. *popilliae* Hime および var. *popilliae* Sakura の 16S rDNA 塩基配列の相同性

No.	菌株名	相同性 (%)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	セマダラ	—						
2	14706(T)	97.6	—					
3	B-4081	97.7	99.3	—				
4	14707(T)	99.3	98.0	98.2	—			
5	Mame a)	99.8	97.6	97.7	99.3	—		
6	Hime a)	99.8	97.4	97.5	99.1	99.7	—	
7	Sakura a)	99.9	97.6	97.7	99.3	99.9	99.8	—

a) 北海道で分離された菌株を示す。

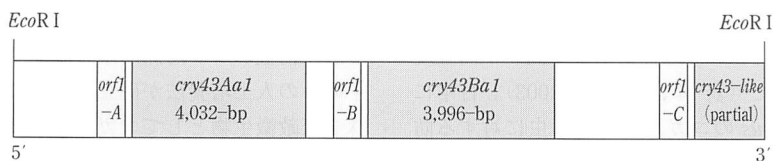


図-1 抗体陽性クローンに含まれていた DNA 断片中の予想される遺伝子

表-3 セマダラ株からクローニングした結晶性タンパク質遺伝子発現クローンのドウガネブイブイ 1 齢幼虫に対する殺虫活性

発現タンパク質	累積死亡率 (%)			
	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目
<i>cry43Aa1</i> ^{a)}	23.3	50.0	80.0	90.0
<i>cry43Ba1</i> ^{a)}	10.0	10.0	16.7	16.7
非組換え大腸菌 ^{b)}	0	0	0	0

^{a)} *cry43Aa1* および *cry43Ba1* 遺伝子を発現させたクローンの細胞懸濁液を、1 ml ずつ 10 g の腐葉土の入ったプラスチックカップに接種した (1,000 μg 発現タンパク質/カップ)。^{b)} 非組換え大腸菌 BL21 株の細胞懸濁液を発現クローンの細胞懸濁液と同じ細胞数になるように調整し、1 ml ずつカップに接種した。

タンパク質のそれと類似していることが報告されている。また、遺伝子から作られるタンパク質は、コフキコガネの 1 種 *Melolontha melolontha* の幼虫に対して殺虫活性を示さないが、一時的な摂食阻害を引き起こすことも報告されている。そこで、セマダラ株においても、摂食阻害および殺虫活性と結晶性タンパク質との関係を明らかにするために、全 DNA ライブラリーを作製し、結晶性タンパク質特異的抗血清を用いて遺伝子のクローニングを試みた。その結果、*cry18Aa1* とは全く異なる新規の結晶性タンパク質遺伝子 *cry43Aa1*、*cry43Ba1* および *cry43-like* をクローニングすることができた(図-1)。また、これらの遺伝子のうち *cry43Aa1* が作り出すタンパク質のみが幼虫に対して強い殺虫活性および摂食阻害効果を示すこともわかり(表-3、図-2)、乳花病菌において結晶性タンパク質が殺虫活性に重要な役割を果たしていることもわかった。

cry43Aa1 遺伝子と非常に類似の殺虫活性をもつ結晶性タンパク質遺伝子が北海道の乳花病分離株からもクローニングされており、*cry43* 遺伝子の地理的分布にも興味がもたれる。

V 防除効果について

乳花病菌は、感染源である胞子のうの人工培養が非常に難しい。そのため、アメリカで上市されている商品は、胞子のうを幼虫の血体腔に注射して増殖させた後、幼虫

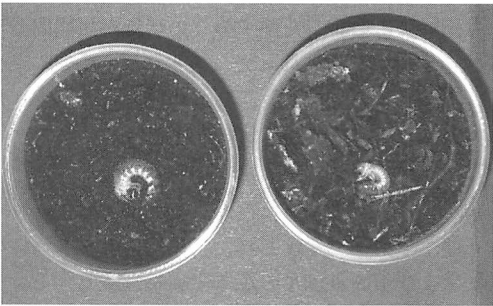


図-2 *cry43Aa1* 発現クローンを処理した腐葉土で飼育したドウガネブイブイ幼虫(処理 10 日目)
左：無処理，右：*cry43Aa1* 発現クローン処理。

表-4 セマダラ株の人工培養胞子のうを散布したゴルフ場練習用グリーンにおけるコガネムシ類幼虫の防除効果

試験区	補正健全幼虫密度指数 ^{a)}	
	処理後の日数	
	14 日	35 日
5 × 10 ¹¹ 胞子のう/m ²	32.9	86.4
2.5 × 10 ¹¹ 胞子のう/m ²	38.7	114.8
MEP	108.4	102.9
無処理	100	100

^{a)} 健全幼虫とは、乳花病菌に感染していない幼虫を示す。

補正健全幼虫密度指数＝
$$\frac{\text{処理区の施用後健全幼虫密度} \times \text{無処理区の施用前健全幼虫密度}}{\text{処理区の施用前健全幼虫密度} \times \text{無処理区の施用後健全幼虫密度}} \times 100$$

から胞子のうを回収し製剤化している。このように手間・コストのかかる方法では実用化は困難であるため、大日本インキ化学工業(株)と共同で胞子のうの人工培養法の開発に取り組んだ。その結果、培地中に活性炭、特定のペプトン類、アミノ酸(グルタミン酸、ピルビン酸)を添加することにより胞子のうの人工的な大量培養に成功した(木村ら、2003)。また、人工培養で得られた胞子のうの殺虫活性を生物検定およびポット試験により確認することができた。そこで、実際にゴルフ場の練習用グリーン、イチゴ苗生産現場およびゴルフ場のナーセリ

ーで人工培養胞子のうを用いた防除試験を行った。その結果、すべての試験において対照薬剤より高いか同程度の防除効果が得られた(表-4; 木村ら, 2003)。日本において、*P. lentimorbus* のコガネムシ類幼虫に対する防除効果を実証できたのは初めてのことであり、また、人工培養で得られた胞子のうを用いて、コガネムシ類幼虫を防除できたのは世界で初めてである。

一方、圃場に散布した胞子のうの活性が短期間で消失することが問題として残った(表-4)。現在、胞子のうの活性を持続させるために、製剤化するときに加える保護効果のある物質について検討している。

お わ り に

我々は、千葉県で分離された乳化病菌セマダラ株の菌の性状および 16S rDNA の塩基配列を調査し、セマダラ株の特徴および既知の乳化病分離株との相違を明らかにした。また、新規結晶性タンパク質遺伝子をクローニングし、結晶性タンパク質と殺虫活性との関係も明らかにした。これらの結果には新発見も多く含まれ、本邦産乳化病菌に関する基礎的なデータの蓄積に貢献することが

できた。さらに、セマダラ株のコガネムシ類幼虫に対する殺虫活性および防除効果を確認できたこと、および胞子のうの人工培養法が確立できたことにより、セマダラ株を天敵微生物としてコガネムシ類幼虫防除のために利用できる可能性が非常に高まった。今後、製剤化法を確立して試作製剤を使った防除試験を行い、効果を実証して早期の実用化に向け試験を進めていく予定である。

引 用 文 献

- 1) CLAUS, D. and R. C. W. BERKELEY (1986): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, p.1105 ~ 1207.
- 2) FLEMING, W. E. (1968): U. S. Department of Agriculture Technical Bulletin, No. 1383.
- 3) HARRISON, H. et al. (2000): *J. Invertebr. Pathol.* 76: 169 ~ 175.
- 4) HAWLEY, I. M. and G. F. WHITE (1935): *New York Entomol. Soc. J.* 1935 43: 405 ~ 412.
- 5) 木村雅敏ら (2003): *DIC Technical Review* 9: 9 ~ 14.
- 6) KLEIN, M. G. (1992): *The Use of Pathogens in Scarab Pest Management*, Intercept Books, Andover, MD, p.179 ~ 189.
- 7) MATSUKI, N. et al. (1997): *Appl. Entomol. Zool.* 32: 583 ~ 588.
- 8) MILNER, R. J. (1974): *Aust. J. Biol. Sci.* 27: 235 ~ 247.
- 9) RIPPET, K. et al. (1998): *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 395 ~ 402.
- 10) STAHL, D. P. et al. (1992): *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 740 ~ 743.
- 11) ZHANG, J. et al. (1997): *J. Bacteriol.* 179: 4336 ~ 4341.

登録が失効した農薬 (17.10.1 ~ 10.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名(製造業者又は輸入業者)登録失効年月日。

「殺虫剤」

- フェニソプロモレート乳剤
12590：エイカロール乳剤 45 (シンジェンタ ジャパン)
2005/10/05
- D-D 剤
10457：旭 D-D (鹿島ケミカル) 2005/10/13
- エチルチオメトン粒剤
14029：井筒屋ダイシストン粒剤 (井筒屋化学産業)
2005/10/18
- 除虫菊乳剤
112：ピレオール (ナガオカ) 2005/10/30
- BPPS 水和剤
8998：シオノギ・オマイト水和剤 (日本農薬) 2005/10/27
- BPPS 乳剤
8990：シオノギ・オマイト乳剤 (日本農薬) 2005/10/27

「殺菌剤」

- フサライド水和剤
12600：三共ラブサイド水和剤 (三共アグロ) 2005/10/05
- 12601：三共ラブサイド水和剤 (北海三共) 2005/10/05
- フェナリモール水和剤
16865：シオノギ・ルビゲン水和剤 (バイエルクロップサイ
エンス) 2005/10/21

●生石灰

- 7786：サメコウ印ボルドー液用粉末生石灰 (醒井工業)
2005/10/25
- フサライド粉剤
14774：ヤシラブサイド粉剤 DL (協友アグリ) 2005/10/26
- 石灰硫黄合剤
89：トモノ石灰硫黄合剤 (大塚化学) 2005/10/30
- オキシリニック酸・フルジオキシニル水和剤
19428：チバガイギー・ウイスベクトスターナ水和剤, (シン
ジェンタ ジャパン) 2005/10/29

「殺虫殺菌剤」

- アシベンゾラル S メチル・チアメトキサム粒剤
20907：デジタルバイオンアクタラ箱粒剤 (シンジェンタ
ジャパン) 2005/10/03
- ジメチルビンホス・フサライド粉剤
15872：三共ラブサイドランガード粉剤 (三共アグロ)
2005/10/13

(35 ページに続く)