

カメムシ類に農薬抵抗性を賦与する共生細菌の発見

独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター ^{きく} 菊 ^ち 池 ^{よし} 義 ^{とも} 智

はじめに

農薬は強力な害虫防除資材の一つとして知られており、農業現場を中心に様々な場所で使用されている。環境負荷や残留農薬の問題はあるものの、世界的な食糧難が課題となっている昨今、害虫防除資材としての農薬の開発・使用はますます重要になると考えられる。また農薬は、マラリアを媒介するハマダラカや睡眠病を媒介するツツェバエなどの吸血性衛生害虫の防除においても広く使用されており、農業現場のみならず公衆衛生の分野においても重要な役割を果たしている。しかし一方で、単一の農薬を連続使用するとしばしば農薬抵抗性の害虫が出現することが古くから報告されてきた。

現在までに約 500 種類の農業害虫、衛生害虫、家屋害虫において農薬への抵抗性発達が報告され、世界的な問題となっている (Whalon et al., 2008)。抵抗性のメカニズムとしては、クチクラ層の肥大による農薬浸透性の低下、農薬の解毒・排出能力の向上、受容体等の農薬標的タンパク質の構造変化など様々な事例が報告されている。従来、このような抵抗性は「昆虫自身の遺伝子によってコードされる性質」であるとしてごく当たり前のよう考えられてきた。しかし、最近我々はホソヘリカメムシ (図-1A) とその近縁種において、その体内に共生する細菌が宿主昆虫の農薬抵抗性に大きく寄与する事例を発見したのでここに紹介する。

I カメムシ類の腸内共生細菌

1 昆虫の共生細菌

農業害虫、衛生害虫、家屋害虫の多くはその体内に共生細菌を保持しており、緊密な相互作用を行っている。これら共生細菌は昆虫体内で特殊な器官や細胞内に局在しており、宿主昆虫の栄養代謝において重要な役割を果たしている (Buchner, 1965; Kikuchi, 2009)。例えばアブラムシなどの吸汁性昆虫では、共生細菌ブフネラが植物篩管液中に不足する必須アミノ酸を補償していることが知られている。多くの吸血性昆虫では、脊椎動物の血液

にビタミンB類がほとんど含まれていないことから、体内に共生する細菌がビタミンB類を供給している。また、シロアリなどの材食性昆虫では、腸内の共生細菌や原虫が木質(セルロースなど)の分解に大きく寄与していることが知られている。これらの昆虫にとって共生細菌は必須のパートナーであり、抗生物質などで共生細菌を除いてしまうと成長や繁殖が著しく阻害される。

このように成長・生存・繁殖に必須な共生細菌を次世代に確実に受け渡すために、これら昆虫は高度に発達した母子間伝播機構を進化させてきた (Buchner, 1965; Kikuchi, 2009)。その様式は昆虫種によって多様であり、母体内で発達中の卵に共生細菌が感染する方法(卵内感染)や、母虫が卵表面に共生細菌を塗りつけふ化した子虫が卵殻やその付着物を摂食することで共生細菌を獲得する方法(卵表面塗布)、親虫の糞を摂食することで共生細菌を獲得する方法(糞食)などが知られている。

2 カメムシ類の共生細菌

カメムシ下目 (Pentatomomorpha) に属する植食性種のほとんどは、中腸後端部に袋状の組織(「盲囊」と呼ばれる)を発達させており(図-1B)、その内腔中に共生細菌を保持していることが知られている (Miyamoto, 1961; 菊池, 2004)。カメムシ下目の中でも、カメムシ上科 (Pentatomoidea) に属するカメムシはγ-プロテオバクテリア綱の共生細菌を保持しており、ほとんどが卵表面塗布によって共生細菌の母子間伝播を行う。

一方、ヘリカメムシ上科 (Coreoidea) とナガカメムシ上科 (Lygaeoidea) に属するカメムシ類は盲囊内にβ-プロテオバクテリア綱の *Burkholderia* を共生させるが、共生細菌の母子間伝播を行わない。ダイズの害虫として知られるホソヘリカメムシ *Riptortus pedestris* を対象とした Kikuchi et al. (2007) の研究により、これらカメムシ類は *Burkholderia* 共生細菌を環境土壌中から経口的に獲得して盲囊内に共生させることが明らかとなってきた。*Burkholderia* 共生細菌はカメムシ体内のみならず農耕地土壌中にも普通に見られ、一般的な細菌用培地を用いて容易に分離培養することができる。

II 農薬を分解する *Burkholderia* の発見

1gの土の中には数100万種もの細菌が生息していると考えられている (Gans et al., 2005)。それら細菌は様々

Symbiotic Bacteria Confer Pesticide Resistance in Heteropteran Insects. By Yoshitomo Kikuchi

(キーワード: カメムシ, 農薬抵抗性, フェニトロチオン, 共生細菌)

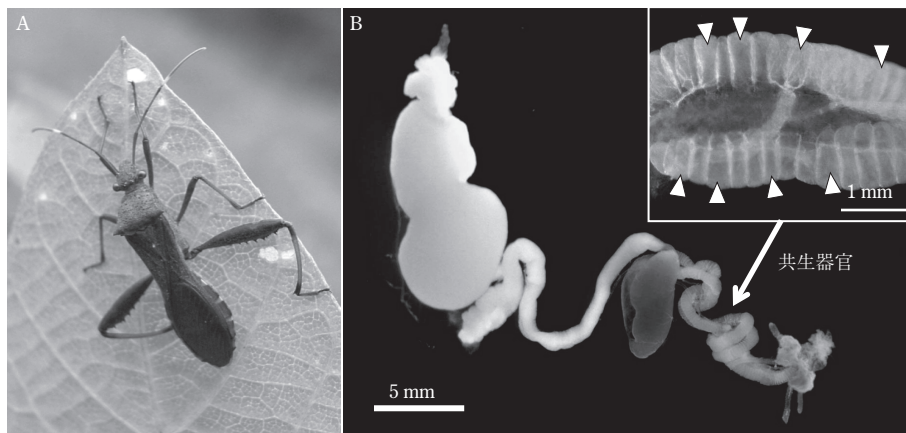


図-1 ホソヘリカメムシの腸内共生系
 (A) ホソヘリカメムシのメス成虫。
 (B) 中腸の全体像。中腸後部の共生器官には多数の盲嚢(矢印頭)が発達し、その内腔中に *Burkholderia* が共生する。

な代謝系を持ち、なかには農薬を分解しこれを栄養源として利用するものも知られている。これら「農薬分解菌」は農薬の環境浄化に有用であると考えられ、多くの微生物学者によって古くから研究されてきた。有機リン系殺虫剤のフェニトロチオンについてもその例外ではなく、分解菌に関する研究が古くから行われてきた (SINGH, 2009)。

フェニトロチオンは世界中で広く使われている農薬の一つであり、アセチルコリンエステラーゼの機能を阻害して昆虫を死に至らしめる。分解菌によって、フェニトロチオンは昆虫にとってほぼ無毒の3-メチル-4-ニトロフェノールに分解され、その後複数のステップを経て炭素源として利用される (図-2 A)。我々は、農耕地土壌における *Burkholderia* 共生細菌の遺伝的多様性を調査する過程で、単離された *Burkholderia* の中にフェニトロチオンを高効率で分解・資化する菌株が含まれていることを発見した (図-2 B)。

III 分解菌との共生が農薬抵抗性に与える影響

分離培養したフェニトロチオン分解性 *Burkholderia* (フェニトロチオン分解菌) とフェニトロチオンを分解できない *Burkholderia* (非分解菌) をそれぞれホソヘリカメムシに感染させ、宿主への影響を比較した。その結果、フェニトロチオン分解菌に感染したホソヘリカメムシと非分解菌に感染したホソヘリカメムシの間で、共生細菌の定着率、宿主の生存率、成長速度、体のサイズ等に有意な違いは見られなかった (KIKUCHI et al., 2012)。しかし、フェニトロチオン (0.2 mM) を塗抹したダイ

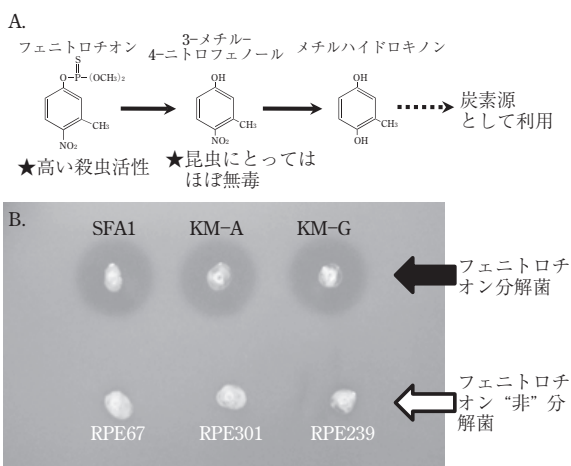


図-2 *Burkholderia* によるフェニトロチオンの分解
 (A) 分解菌によるフェニトロチオンの分解過程。
 (B) フェニトロチオン含有培地上における *Burkholderia* の分解活性。分解菌のコロニー周辺はフェニトロチオンが分解されるため透明化する。フェニトロチオン分解菌および非分解菌について、各3菌株の結果を示す。

ズ種子を3齢若虫に与えてその抵抗性を調査したところ、フェニトロチオン分解菌に感染したホソヘリカメムシでは、非分解菌に感染したホソヘリカメムシに比べてフェニトロチオンへの抵抗性が大幅に増大していることが明らかとなった (図-3)。これらの結果は、農薬分解菌の感染によって宿主カメムシが農薬抵抗性を獲得したことを示している。

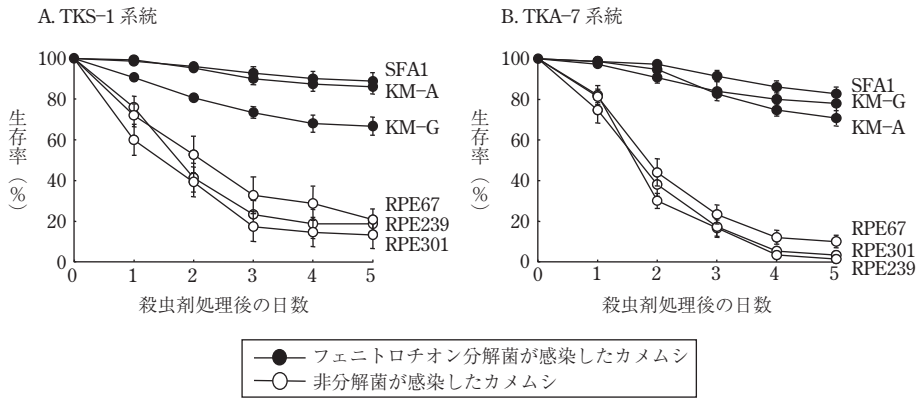


図-3 フェニトロチオン処理したダイズ種子を与えた場合のホソヘリカメムシの生存率
二つのホソヘリカメムシ系統 (A. TKS-1 系統; B. TKA-7 系統) の結果を示す. 感染にはフェ
ニトロチオン分解菌, 非分解菌について各 3 系統を用いた.

IV 農薬分解菌の野外感染率調査

日本各地で採集したホソヘリカメムシ 846 個体について感染率調査を行ったところ, フェニトロチオン分解菌は全く検出されなかった (0%)。稲の害虫であるクモヘリカメムシやサトウキビの害虫であるカンシャコバネナガカメムシ (いずれも *Burkholderia* と共生していることがすでに報告されている (KIKUCHI et al. 2011)) についても同様に感染率の調査をしたところ, カンシャコバネナガカメムシの一部の集団においてフェニトロチオン分解菌の感染が確認された (約 8%)。これらの調査結果から, 日本におけるホソヘリカメムシ類・ナガカメムシ類の野外集団におけるフェニトロチオン分解菌への感染率は一般的に低いものと考えられる。

国内農耕地ではフェニトロチオンの使用回数が厳密に管理されているため, 多くの農耕地土壌におけるフェニトロチオン分解菌の密度は検出限界以下であることが報告されている (TAgO et al., 2006)。このように, 農耕地土壌におけるフェニトロチオン分解菌の密度が低いために, カメムシの野外集団におけるフェニトロチオン分解菌の感染率が低い可能性は高い。この場合, 環境土壌中におけるフェニトロチオン分解菌の密度が増加すればカメムシへの感染が起こる可能性が示唆される。この仮説を検証するために, 以下のような実験を行った。

V 農薬散布と分解菌感染の関係

フェニトロチオン分解菌は農薬であるフェニトロチオンを分解・資化して増殖することができる。実験室内において, 野外農耕地から採取してきた土壌に週 1 回の頻度でフェニトロチオンを 4 回散布したところ, そこから

単離された土壌細菌の実に 80% 以上がフェニトロチオン分解菌で占められていた。この土の上でホソヘリカメムシを飼育し, 成虫になった段階で分解菌感染の有無を調査したところ, 実に 90% 以上の個体が分解菌を保持していることが明らかとなった (KIKUCHI et al., 2012)。コントロールとして蒸留水を散布した土壌ではフェニトロチオン分解菌は検出限界値以下の密度であり, そのような土でホソヘリカメムシを飼育しても分解菌の感染は全く見られなかった。これらの実験結果は, 農耕地におけるフェニトロチオンの散布が土壌中のフェニトロチオン分解菌の増殖を促し, これによって共生細菌を介したカメムシ類の農薬抵抗性発達が促進される可能性を強く示唆している。

おわりに

以上の結果を総合すると, *Burkholderia* 共生細菌によるカメムシ類の農薬抵抗性獲得は以下のような過程を経て成立するものと考えられる (図-4 参照)。①農薬の連続散布によって土壌中の農薬分解菌が増殖する。②カメムシがこれら農薬分解菌を土壌中から取り込んで共生する。③農薬分解菌と共生したカメムシは農薬抵抗性を獲得する。

一般的に, 農薬抵抗性の獲得は昆虫自身の遺伝子に生じた突然変異に起因するものであり, 昆虫集団中に現れた抵抗性個体が農薬の使用による選択を受け, 次第に集団中の個体数を増加させて顕在化するものと考えられている。今回の共生細菌による農薬抵抗性獲得機構の発見はこのような従来のモデルを否定するものではなく, それに加えて, これまで知られていなかった新しい農薬抵抗性の発達機構を提示するものと言える。

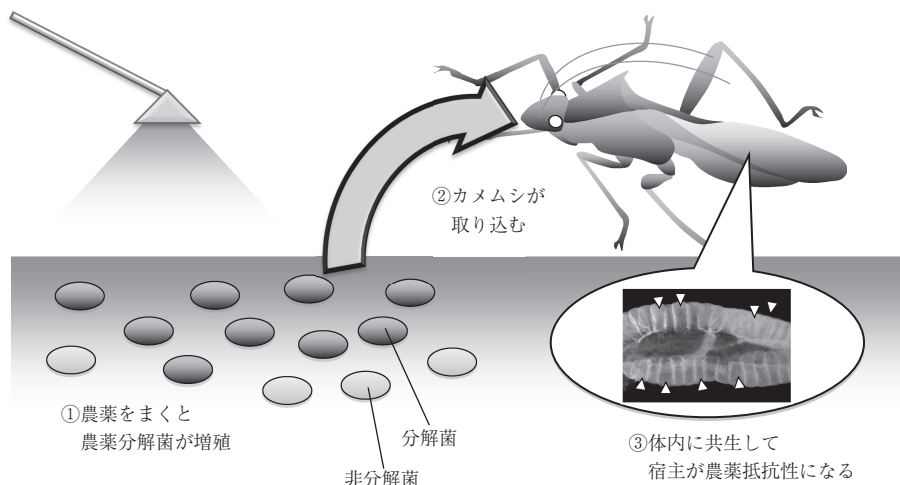


図-4 共生細菌によるカメムシ類の農薬抵抗性発達機構の概略図

本現象は現行の害虫防除法においては全く考慮されていない盲点ともいえ、その現状把握と対応策の検討が今後必要になると考えられる。そのためには、従来の昆虫に力点をおいた発生予察ばかりではなく、農耕地土壌における微生物動態の把握も重要な課題になると考えられる。次世代シーケンサーの登場により、数100万種からなる土壌微生物叢の動態についても研究の俎上に載せることが可能となってきた。野外農耕地という生態系において、作物と昆虫、そして土壌微生物がどのような相互作用を行い、せめぎ合い、影響し合っているのか、今後の技術発展を見据えながら総合的な理解につなげていければと期待している。

引用文献

- 1) BUCHNER, P. (1965): Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms, Interscience, New York, 909 pp.
- 2) GANS, J. et al. (2005): Science 309: 1387 ~ 1390.
- 3) 菊池義智 (2004): 植物防疫 58: 424 ~ 428.
- 4) KIKUCHI, Y. (2009): Microbes Environ. 24: 195 ~ 204.
- 5) ——— et al. (2007): Appl. Environ. Microbiol. 73: 4308 ~ 4316.
- 6) ——— et al. (2011): ISME J. 5: 446 ~ 460.
- 7) ——— et al. (2012): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 8618 ~ 8622.
- 8) MIYAMOTO, S. (1961): Sieboldia 2: 197 ~ 259.
- 9) SINGH, B. K. (2009): Nat. Rev. Microbiol. 7: 156 ~ 164.
- 10) TAGO, K. et al. (2006): Microbes Environ. 21: 58 ~ 64.
- 11) WHALON, M. E. et al. (2008): Global Pesticide Resistance in Arthropods, CABI, Oxford, 169 pp.

新しく登録された農薬 (24.11.1 ~ 11.30)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、適用雑草等を記載。（登録番号：23150 ~ 23160）種類名に下線付きは新規成分。※は新規登録の内容。

「除草剤」

- **DBN・DCMU 粒剤** ※新製剤
23150：ラーチ **HD 粒剤**（保土谷アグロテック）12/11/07
23151：こっば **HD 粒剤**（レインボー薬品）12/11/07
DBN：1.0%
DCMU：1.0%
樹木等：一年生雑草、多年生広葉雑草、スギナ
- **プロピリスルフロロン・プロモブチド水和剤** ※新混合剤
23152：ゼータファイヤフロアブル（住友化学）12/11/07
プロピリスルフロロン：1.7%
プロモブチド：16.8%
移植水稲：水田一年生雑草、マツバイ、ホタルイ、ウリカワ、ミズガヤツリ（北海道を除く）、ヘラオモダカ（北海道、東北）、ヒルムシロ、セリ（北海道、東北を除く）

- **プロピリスルフロロン・プロモブチド粒剤** ※新混合剤
23153：ゼータファイヤジャンボ（住友化学）12/11/07
プロピリスルフロロン：2.25%
プロモブチド：22.5%
移植水稲：水田一年生雑草、マツバイ（北陸、九州を除く）、ホタルイ、ウリカワ、ミズガヤツリ（北海道を除く）、ヘラオモダカ（北海道、東北）、ヒルムシロセリ（北海道、東北を除く）
- **プロピリスルフロロン・プロモブチド粒剤** ※新混合剤
23154：ゼータファイヤ1キログ粒剤（住友化学）12/11/07
プロピリスルフロロン：0.90%
プロモブチド：9.0%

(34 ページに続く)