

解 説

Agrochemistry and Biology Series

コガネムシ類幼虫に特異的な *Bacillus thuringiensis*

堀 秀 隆, 佐 藤 令 一*, 大 庭 道 夫**

(株)クボタ技術開発本部生物農薬グループ

*東京農工大学農学部応用生物科学科

**九州大学農学部生物的防除研究施設

(平成6年11月20日受理)

Bacillus thuringiensis Specific to Scarabaeids

Hidetaka HORI, Ryoichi SATO* and Michio OHBA**

Biopesticide Laboratory, Advanced Technology Laboratories, Kubota Co.,
Koyo-dai, Ryugasaki 301, Japan

*Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture
and Technology, Saiwai-cho, Fuchu 183, Japan

**Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

は じ め に

持続的農業を支える農薬の新しい試みとして生物農薬が関心を集めている。さまざまな生物農薬の可能性が天敵関係にある生物の組合せのなかに求められているが、生物農薬のなかでもっとも広くまた長く用いられている *Bacillus thuringiensis* もその存在意義が再認識されている。*B. thuringiensis* の殺虫活性は鱗翅目、双翅目、鞘翅目昆虫幼虫の広い範囲に及ぶ。

最近われわれはコガネムシ類幼虫に対して殺虫活性を示すまったく新しいタイプの *B. thuringiensis* を徳島県の土壌から分離した。われわれの発見した菌株は、土壌生息の難防除害虫であるコガネムシ幼虫に対して有効な生物農薬になる可能性をもっている。本総説では生化学、農薬施用の多方面からこの新しい菌株の解説を行ない、併せて生物農薬のなかでもっとも多く利用されている *B. thuringiensis* の一般的解説も行なう。*B. thuringiensis* を有効成分とする BT 製剤に対する理解の一助となれば幸いである。紙幅の都合で遺伝子に関してはすべて割愛した。

Bacillus thuringiensis の分類

B. thuringiensis は土壌および土壌に近い環境に生息

する、胞子を作る桿菌である。*Bacillus cereus* にきわめて近い菌であり、殺虫性タンパクを細菌細胞内に生産蓄積する特徴をもつ。現在も世界各地の土壌から新しい活性スペクトルをもった *B. thuringiensis* が単離されている。図1に筆者の一人、大庭らが推定した、殺虫活性をもつ *B. thuringiensis* が土壌から分離される頻度を示した。土壌から分離される *B. cereus* 群の細菌のうち約1~3%が結晶性タンパクを生産する。この割合は地域で異なりインドネシアでは6%、アメリカではもっと低いようである。しかしこれらの結晶性タンパク生産菌のうち60%以上は鱗翅目、双翅目、鞘翅目には無毒である。結晶性タンパクを生産しない菌 (*B. cereus* に分類される) のうち *B. thuringiensis* の鞭毛の抗血清に反応するものは約30%だが、血清型が40を越える現在ではこの割合ははるかに高いと思われる。つまり非常に高い割合で *B. cereus* と *B. thuringiensis* とは血清反応で交差することになる。このように比較的小さな出現頻度のなかで現在までに、数多くの *B. thuringiensis* が単離され、新規な株がみつまっている (表1)。なかでも、Goldberg と Margalit が1977年にイスラエルの乾燥地帯で、蚊の幼虫ボウフラを殺虫する *B. thuringiensis* serovar *israelensis* を発見したことは、*B. thuringiensis* の殺虫活性の対象が鱗翅目昆虫に限られ

表1 *Bacillus thuringiensis* の殺虫性タンパクの遺伝子, 分子量, 由来, 標的昆虫

遺伝子名	亜種および株名	血清型	分子サイズ (kDa)	標的昆虫
<i>cryIA(a)</i>	<i>kurstaki</i> HD-1	3a3b3c	130	鱗翅目 (L)
	<i>aizawai</i>	7	130	L
	<i>sotto</i>	4a4b	130	L
<i>cryIA(b)</i>	<i>berliner</i> 1715	1	133	L
	<i>kurstaki</i> HD-1	3a3b3c	131	L
	<i>kurstaki</i> NRD-12	3a3b3c	133	L
	<i>aizawai</i> IPL-7	7	130	L
	<i>aizawai</i> IC-1	7	130	L
<i>cryIA(c)</i>	<i>kurstaki</i> HD-73	3a3b3c	133	L
<i>cryIB</i>	<i>thuringiensis</i> HD-2	1	138	L
	<i>entomocidus</i> HD-110	6	130	L
<i>cryIC</i>	<i>entomocidus</i> 601	6	135	L
	<i>entomocidus</i> HD-110	6	135	L
<i>cryID</i>	<i>aizawai</i> HD-68	7	133	L
<i>cryIE</i>	<i>tolworthi</i>	9	133	L
<i>cryIF</i>	<i>aizawai</i>	7	134	L
<i>cryIG</i>	<i>galleriae</i>	5a5b	130	L
<i>cryIH</i>				L
<i>cryIIA</i>	<i>kurstaki</i> HD-263	3a3b3c	71	L/双翅目 (D)
	<i>kurstaki</i> HD-1	3a3b3c	71	L/D
<i>cryIIB</i>	<i>kurstaki</i> HD-1	3a3b3c	71	D
<i>cryIIIA</i>	<i>tenebrionis</i>	8a8b	70	鞘翅目 (C)
	EG2158		73	C
<i>cryIIIB</i>	<i>tolworthi</i> EG2838	9	74	C
	<i>kumamotoensis</i> EG4961	18	74	C/L
	<i>pakistani</i>	13		C
<i>cryIIIC</i>	<i>galleriae</i> BTS137J	5a5b	129	C
<i>cryIIID</i>	<i>kurstaki</i> BT1109P	3a3b3c	73	C
<i>cryIVA</i>	<i>israelensis</i>	14	134	D
<i>cryIVB</i>	<i>israelensis</i>	14	128	D
<i>cryIVC</i>	<i>israelensis</i>	14	78	D
<i>cryIVD</i>	<i>israelensis</i>	14	72	D
<i>cryV</i>	4835		81	C/L
<i>cryVI</i>	<i>japonensis</i> Buibui	23	130	C
<i>cytA</i>	<i>israelensis</i>	14	28	D
	<i>morrisoni</i> PG-14	8a8b	28	D
<i>cytB</i>	<i>kyushuensis</i>	11a11c	25	D

ないことを示した点で画期的であった。

1983年にはコロラドハムシ等に効く *B. thuringiensis tenebrionis* が発見され、鞘翅目昆虫も *B. thuringiensis* の対象昆虫になった。新規な *B. thuringiensis* は今後とも発見され続けると思われる。

B. thuringiensis は従来生化学的諸性質、たとえばエステラーゼ活性等に基づいて分類されたが、現在はパスツール研究所の de Barjac らの提案により、鞭毛の抗

原 (H 抗原) に対する抗血清を用いて、抗原抗体反応を行ない分類するセロタイピング (血清学的分類) が用いられている¹⁾。鞭毛抗原に対する反応性に基づいて分類された型、血清型は、現在 40 種類以上知られている。血清型と殺虫スペクトルの間には大まかな対応関係があるが、血清型が同一であっても必ずしも殺虫する対象昆虫 (殺虫スペクトル) が同じではないことは注意しなければならない。これは毒素タンパクの遺伝子が転移性遺

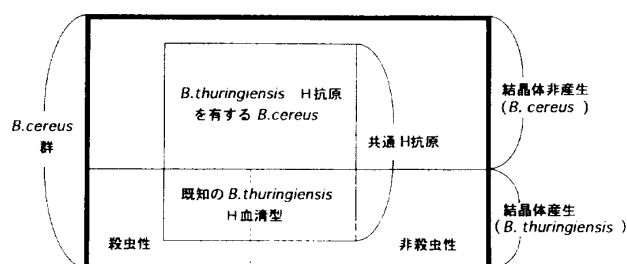


図 1 土壌を主とする自然界から分離される *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis* 群の結晶体産生能、昆虫毒性、および H 抗原による分別

伝要素、トランスポゾン、として行動し、長い進化のなかで種々の細菌間を移動したためと考えられる。

われわれの単離した菌株は血清型 23 *B. thuringiensis* serovar *japonensis* の鞭毛抗原の抗血清に強く凝集され血清型 23 に同定した²⁾。 *B. thuringiensis* serovar *japonensis* の標準菌株は鱗翅目昆虫であるコナガ幼虫に強い殺虫活性を示し、カイコ、チャハマキには中程度、ハスモンヨトウには強い活性を示す。ところ

が血清型 23 と同定された新しい菌株はこれらの鱗翅目幼虫に対し 50 μg 毒素タンパク/g・飼料の高濃度でもまったく殺虫活性を示さない。

ブイブイ株の殺虫スペクトル

人工飼育しているいくつかの昆虫幼虫を用いてこの新しい菌の殺虫活性を調査したところ、鞘翅目昆虫ドウガネブイブイ *Anomala cuprea* の幼虫に対する殺虫活性が非常に強いことを発見した^{2,3)}。血清型 23 に属し、鱗翅目に対する殺虫活性がなく、鞘翅目昆虫に対して示す菌株は現在まで知られておらず、われわれはこの新規な菌株に *B. thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui と命名した (以下ブイブイ株)²⁾。ドウガネブイブイに対する LC_{50} は 0.09 μg 毒素タンパク/g・飼料であった。この値はいくつかの *B. thuringiensis* がコガネムシ幼虫に対して示した毒素のなかでもっとも強いものである。

この新規菌株は、カブトムシ、マツノマダラカミキ

表 2 コガネムシ類幼虫に対する *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui の殺虫活性

コガネムシ幼虫	齢 期	トキシン濃度 (μg 130 kDa タンパク/g コンポスト)	致死率 (%) 処理後日数		
			7 日	14 日	21 日
ドウガネブイブイ (<i>Anomala cuprea</i>)	1	25	100	100	100
		5	100	100	100
		0.5	100	100	100
		0.25	40	100	100
		25	60	100	100
アオドウガネ (<i>Anomala albopilosa</i>)	1	25	100	100	100
		25	0	10	90
		25	10	30	90
ヒメコガネ (<i>Anomala rufocuprea</i>)	3	25	10	30	90
サクラコガネ (<i>Anomala daimiana</i>)	1	25	0	50	63
チビサクラコガネ (<i>Anomala shonfeldti</i>)	3	25	10	30	100
コガネムシ (<i>Mimela splendens</i>)	1	25	100	100	100
マメコガネ (<i>Popillia japonica</i>)	1	25	100	100	100
セマダラコガネ (<i>Blitopertha orientalis</i>)	2	25	100	100	100
カブトムシ (<i>Allomyrina dichotoma</i>)	2	25	0	0	0
ニジュウヤホシテントウ (<i>Henosepilachna vigintioctopunctata</i>)	2	50	0	0	0

サクラコガネとセマダラコガネの場合、致死率の測定にはそれぞれ 8 匹と 5 匹の幼虫を用い、他の場合はすべて 10 匹の幼虫を用いた。ドウガネブイブイとマメコガネは実験を 3 回繰り返した。すべての実験値はコントロール値を引いてある。

り、ニジュウヤホシテントウ、ヨモギハムシの幼虫に対しては殺虫活性を示さなかったが、サクラコガネ、チビサクラコガネ、アオドウガネ、マメコガネ、セマダラコガネ、ヒメコガネなどのコガネムシ類の幼虫にはいずれも高い殺虫活性を示した(表2)³⁾。とくにドウガネブイブイ、アオドウガネ、マメコガネ等に強い殺虫活性を示したことは、これらの幼虫が土壌生息性の難防除害虫であることから画期的なことであると思える。ドウガネブイブイは温暖な地方で種々の農作物の根部を食害し、マメコガネは Japanese beetle と呼ばれ、アメリカ合衆国やアゾレス諸島で農作物に被害を与えている重要害虫であり、両者に対して強い活性を示したことは付加価値の高い *B. thuringiensis* といえる。

鞘翅目昆虫に対して殺虫活性をもつ *B. thuringiensis* は 1983 年ドイツの Krieg らによって初めて報告された⁴⁾。この菌株は重要な貯穀害虫を含む鞘翅目ゴミムシダマシ科昆虫 Tenebrionidae に殺虫活性を示すことから *B. thuringiensis tenebrionis* と呼ばれたが、ハムシ科のコロラドハムシにも強い殺虫活性を示した。以来現在までに 10 菌株以上の鞘翅目昆虫に活性をもつ *B. thuringiensis* が発見されている。これらはブイブイ株を除いてすべてコロラドハムシに対して殺虫活性をもち、しかもある場合は鱗翅目昆虫幼虫に対しても殺虫活性を示す。しかしブイブイ株はハムシ、鱗翅目昆虫に対し殺虫活性を示さず、*B. thuringiensis tenebrionis* に代表されるような、鞘翅目昆虫に活性を示す既存の菌株とは明らかに異なる。

殺虫性タンパク

B. thuringiensis の殺虫活性の実体は殺虫性タンパク(以下プロトキシン)でタンパク分解酵素の分解を受け活性化タンパク(以下毒素)になる。プロトキシンの多数集合し結晶体を細菌細胞内に形成する。結晶体は大きさ 1~2 μm 位の種々の立体的形状をとっている。立方体ないし直方体(*B. thuringiensis tenebrionis* 等)、四角錐を底面で2個つなぎ合わせたバイピラミッド(図2)(*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 等)等の形が多い。*B. thuringiensis* serovar *japonensis* 基準菌株とブイブイ株の結晶体は球体ないし楕円体で互いに非常に似ている。活性、つまりタンパクレベルではまったく異なるが、同じ鞭毛抗原性を示しかつ同じ結晶形態をとるのはなぜなのか興味を覚えるところである。

B. thuringiensis のプロトキシンの結晶体は普通、pH 10~12 のアルカリ溶液で可溶化する。アルカリでの浸漬を長くすれば活性を失う。アルカリ処理の際 β -

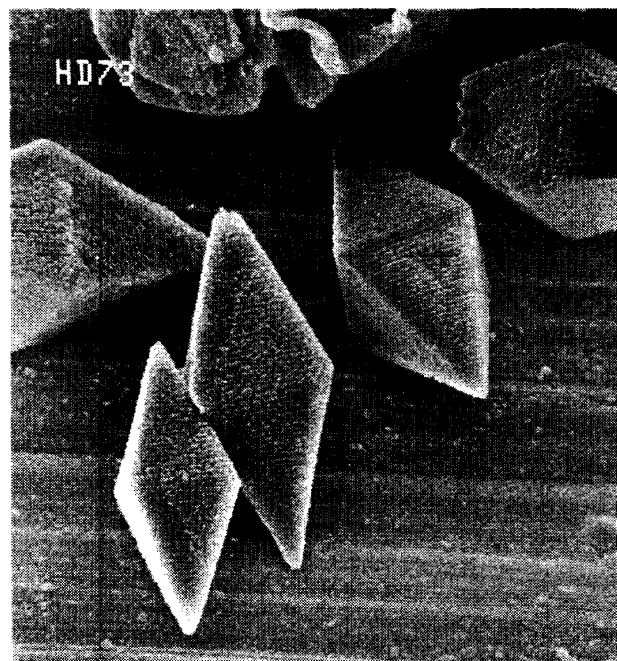


図2 *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-73 の結晶体の走査電子顕微鏡写真((株)クボタ, 坂中一敦氏提供)

メルカプタン、ジチオスレイトール等の還元剤を加えて CryIA タンパク結晶体と CryII タンパク結晶体とを分離することができる。しかしこれら還元剤はブイブイ株の結晶体からのプロトキシンの溶解量に影響しない⁵⁾。

われわれはブイブイ株の培養菌体から結晶体を単離精製、可溶化しいくつかの生化学的性質を明らかにした⁵⁾。ブイブイ株の結晶体は pH 10 くらいの比較的穏和な条件で容易に可溶化され、HD-1 株の結晶体より pH の低いアルカリ溶液で可溶化することが示された⁵⁾。プロトキシンはマイナスに荷電していて陰イオン交換体に吸着し、DEAE イオン交換クロマトグラフィーによって、殺虫活性を示す2画分が 0.1 と 0.2 M-NaCl により溶出する。SDS-PAGE 分析による分子サイズは前者は 65 kDa、後者は 130 kDa であった。前者の存在量は後者に比べ非常に少ないが、結晶体を直接 SDS-PAGE 分析した場合は 130 kDa の単一のバンドしか検出できず(図3)、低分子毒素の起源は非常に興味をもたれた。

低分子毒素の由来を推察するうえで興味ある知見がある。それは、一般に *B. thuringiensis* の殺虫性タンパク結晶体の表面ないし内部にタンパク分解酵素が存在し、結晶体を可溶化すると分解酵素が働き、一定時間後には 70 kDa クラスの毒素が出現する⁶⁾という報告である。この Bulla らの知見がブイブイ株の低分子毒素の由来にも当てはまるか否かは両タンパクをコードする遺伝子の塩基配列を決定すれば明らかとなるであろう。

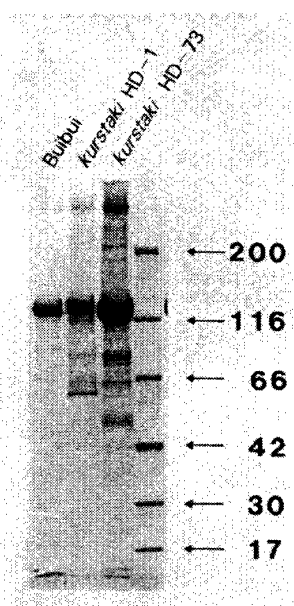


図3 *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buihui, *kurstaki* HD-1 および *kurstaki* HD-73 由来の殺虫性結晶タンパクの SDS-PAGE

1% SDS を含む市販の SDS-PAGE プレートを用いた。アクリルアミド濃度は 4~20% 勾配である。右側の数字はマーカーのサイズを kDa で表示した。

自動ペプチドシーケンサーによって両トキシンの N-末端アミノ酸配列を決定した。130 kDa タンパクは $\text{NH}_2\text{-XX-ProAsnGlnAsnGluTyrGluIleIleAspAla-Leu}$, 65 kDa タンパクは $\text{NH}_2\text{-SerArgAsnProGly-ThrPheIle}$ と決定され少なくとも N-末端近傍のアミノ酸配列は両者で異なっていた。しかも現在までに報告されている、鞘翅目昆虫を殺虫するプロトキシンのアミノ酸配列には相同の配列はなく、ブイブイ株のプロトキシンは新規であることが示唆された。

今までに報告されている *B. thuringiensis* のプロトキシンの分子サイズは 130 kDa と 70 kDa の二つのクラスに分けられる (表 1)。鱗翅目昆虫に活性を示す多くのプロトキシンは 130 kDa クラスが多い。最近相次いで発見されている、鞘翅目昆虫に活性を示すプロトキシンの分子サイズは 70 kDa クラスである。唯一 CryIIIC 殺虫性タンパクは 130 kDa のプロトキシンであるが、タンパク分解酵素で分解し 70 kDa のタンパクにして初めて活性を示す⁷⁾。これらの事実を考えると、DEAE クロマトグラフィーで 65 kDa の毒素が検出された事実は、ブイブイ株も非常に少量の 70 kDa クラスのタンパクを生産している可能性を示唆するものかもしれない。しかし 130 kDa が主要プロトキシンであり、

その活性発現にタンパク分解酵素による前処理を必要としない点で従来の鞘翅目昆虫に活性を示すプロトキシン (CryIII 群, CryV) と異なり、ブイブイ株のトキシンは特異的である。

プロトキシンの活性化

昆虫幼虫が殺虫性タンパク結晶体を食下すると、pH 10 位の高いアルカリ性である中腸消化液で結晶体からプロトキシンが可溶化する。可溶化した 130 kDa あるいは 70 kDa クラスのプロトキシンはさらに、消化液に存在するアルカリ性タンパク分解酵素によって消化され C-末端の半分 (130 kDa プロトキシンの場合)^{8,9)} と多少の N-末端を失い¹⁰⁾ 毒素となり、昆虫幼虫の中腸上皮細胞の特定部位 (レセプター) に結合すると考えられている。70 kDa クラスのプロトキシンの場合も、消化酵素の分解を受け両端のアミノ酸を多少失い、やや低分子化され毒素となり同じようにレセプターに結合すると考えられている。

B. thuringiensis serovar *kurstaki* HD-1 や HD-73 由来の鱗翅目幼虫に活性を示す 130 kDa のプロトキシンをカイコ、コナガ、ハスモンヨトウ、チャハマキ、イエバエの幼虫中腸消化液で処理すると、みなそれぞれ 50~60 kDa の毒素を生じる。これら毒素は C-末端半分とおおよそ 30 あるいは 60 残基の N-末端アミノ酸を失っていた。また N-末端の切断箇所はトリプシン、キモトリプシンの認識部位と一致していた¹⁰⁾。またイエバエはこの毒素では殺されないので、消化液が毒素を生産するだけでは殺虫に十分ではないことを示している。

B. thuringiensis serovar *kurstaki* HD-1 や HD-73 の 130 kDa プロトキシンをトリプシン、キモトリプシン、V8 プロテアーゼ等で消化しても、中腸消化液による処理の場合と同じようにおおよそ 60 kDa のペプチドになる^{9,11,12)}。このペプチドは消化液で 24 時間以上処理を行なっても、都合のよいことに、幼虫にとっては悪いことに、それ以上小さく切断されることはない。このペプチドは最小単位の毒素と考えられている。ちなみにトリプシンは Arg, Lys のカルボキシル側、キモトリプシンは主として芳香族アミノ酸残基のカルボキシル末端側を認識して切断する。

ブイブイ株のプロトキシンから毒素を作るために、イオン交換クロマトグラフィーで精製した 130 kDa プロトキシンを V8 プロテアーゼで消化した。消化物を経時的に SDS-PAGE 分析したところ、24 時間以上 V8 酵素で処理しても、それ以上は消化されない分子サイズおおよそ 65 kDa のタンパク分解酵素抵抗性のコアペプチド

が検出できた⁵⁾。

ブイブイ株のプロトキシンを V8 酵素処理して得た抵抗性ペプチドが最小単位の毒素か否かは現在不明であるが、ブイブイ株のプロトキシシムも *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1 等の鱗翅目に殺虫性を示すプロトキシシム等と同じように、C-末端半分の切断と、N-末端の短いアミノ酸鎖の切断が毒性の発揮に必要なと考えられる。これはおそらくこのような切断の後に毒素分子が一定の三次元的コンフォメーションをとり、それが細胞膜との相互作用に必須なことを示していると思われる。

B. thuringiensis serovar *kurstaki* HD-1 株、ブイブイ株由来の分解酵素抵抗性コアペプチドのなかにトリプシン、キモトリプシンが認識する切断部位がないわけではなく、アミノ酸配列をみればいくつかの切断可能な部位がみつけれられる。しかしこれらの部位は中側に折り畳まれていてタンパク分解酵素が接近できず、抵抗性のコアペプチドが生成すると考えられる。

毒素の殺虫機構——中腸上皮細胞の毒素レセプター

幼虫中腸の組織で最内側に面している上皮細胞層は、杯状細胞と円筒細胞からなる一層の細胞層で、中腸の内容物から栄養を吸収する最前線である。杯状細胞には大きな腔が存在し、円筒細胞の中腸内腔側にはヒトの小腸の微絨毛のようなブラッシュ状の小突起が存在する。この小突起の近辺には、毒素が特異的に結合する結合部位(レセプター)が存在すると考えられている。上皮細胞膜上にあるこのレセプターに毒素が結合すると、毒素タンパクの N-末端近傍にある疎水性部分が細胞膜の疎水性部分と相互作用を起こして細胞膜内に陥入し、小孔を作る。すると細胞の選択的イオン輸送が攪乱され、細胞内に溶質が流入し、栄養吸収の最前線にある上皮細胞はホメオスタシスを失うと考えられている。

毒素によって中腸組織や培養細胞が膨潤することが観察されるのは、細胞の選択的透過性が失われ水が細胞内に流入することを意味していると考えられる。

しかし毒素とレセプターとの結合の本当の姿は未解決の問題で、さまざまな仮説がある。Knowles と Dow¹³⁾ の考えをひもといてレセプターと毒素との結合様式を整理してみたい。

レセプターと毒素の相互作用には大別して三つのモデルが考えられる。

1) レセプター自身が膜を貫通している。レセプターはゲートで、毒素はレセプターに結合しゲートを開く。これはリガンドによるチャンネルの開閉と同じモデルで

ある。このモデルでは小孔形成と毒素結合とが直接結びついている。このモデルにも弱点がある。あるプロトキシシム、たとえば CryIA(C) はヤガの 1 種 *Spodoptera frugiperda* の膜によく結合するが活性はない。このモデルではこのような現象を説明することができない。

2) 毒素とレセプターが共同で小孔を形成する。脂質二重膜に毒素を加えると小孔が形成される。このときこの毒素に感受性の幼虫の上皮細胞膜を加えると、膜の径、化学量論的数値が著しく異なることが観察されているのがこのモデルの根拠である。

3) レセプターは毒素の膜への集合、挿入を触媒する。しかし小孔形成にそれ以上の役割は果たさない。このモデルにはさらに二説が可能である。

(a) レセプターは単に毒素が結合する手である。手一杯に毒素と結合すると膜上の毒素の濃度が上昇する。レセプターは単に毒素濃度を上げるだけであるから、毒素が高濃度ならレセプターがなくても小孔を作らなければならない。確かにある毒素はタンパクを含まない脂質二重層に小孔を形成できるのがこのモデルの根拠である。しかしすべての毒素が作れるわけではない。

(b) レセプターに毒素が結合すると、毒素分子の形が変化して膜に陥入することができるようになる。このモデルではレセプターは小孔形成に必須で、毒素のコンフォメーション変化なしには毒素は膜に挿入されることはない。

ごく簡単にまとめたが、Knowles と Dow は (b) を合理的なものと考えているのであろう。最近イギリスの Knight ら¹⁴⁾ およびアメリカの Sangadala ら¹⁵⁾ はレセプターがアミノペプチダーゼであると報告したが、これが事実なら (b) に述べたモデルにたいへん都合よい知見である。

膜に形成されるとする小孔に関しては、K⁺ 選択的、カチオンが透過できる、またアラニン等の低分子は透過できる、電荷に関係なく蔗糖までの低分子は透過できる等の諸説があるが実体ははっきりしていない。また直径は 0.6 nm、長さは細胞膜のスパンで 6 nm という報告がある。

鞘翅目昆虫に殺虫活性を示す CryIII 毒素は三つのドメインからなることが CryIII 毒素の X-線結晶解析から示された¹⁶⁾ (図 4)。Li らは、レセプターに結合した毒素は膜上にクラスターを形成し、ドメイン I にある α -ヘリックス部分が膜に陥入し、毒素数分子が協同して小孔を形成すると考えている。

レセプターがアミノペプチダーゼ活性をもっていることを肯定的に捉えれば、次のように考えることもできよ

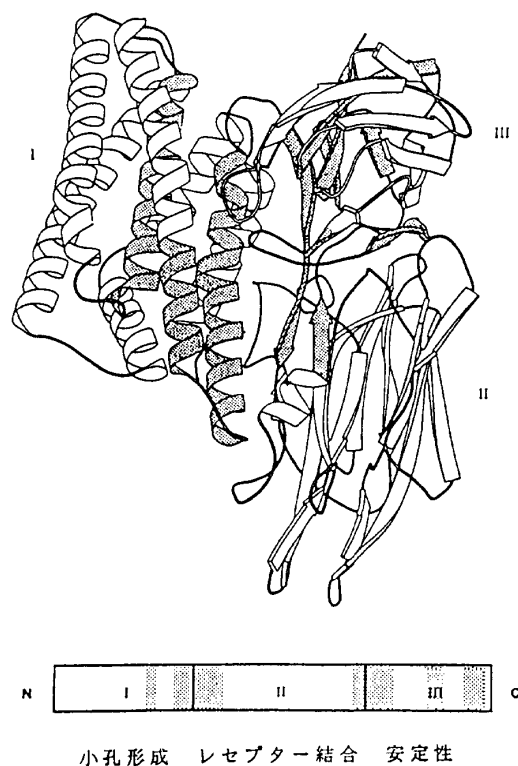


図 4 コンピュータグラフィックスによる殺虫性タンパク CryIIIa の構造

下の棒は、CryIIIa プロトキシンの3個の機能ドメインおよび cry 遺伝子に保存されている5個のブロック（網目模様）の位置をタンパクの一次構造上に示してある。棒の下には各ドメインの役割を示した。Li ら (1991) と Knowles (1994) から引用改変。

う。すなわちレセプターを中心に上皮細胞膜上に集合した毒素は、レセプターのアミノペプチダーゼ活性によって最終的にトリミングされコンフォメーション変換を遂げる。この分子形変換は後の反応に必須で、毒素のドメイン I の α -ヘリックス部分が膜に陥入できるようになる。レセプターが酵素活性をもっているということはたいへん魅力ある知見である。

前述したようにプロトキシンは幼虫中腸内で修飾され、生じた毒素は N-末端アミノ酸の何残基かを失っている。消化酵素による N-末端の切断がアミノペプチダーゼによるトリミングに先立って必要なのではないかとわれわれには想像される。

ブイブイ株の殺虫機構

一方ブイブイ株の殺虫性タンパクの作用機作の詳細は不明であるが、筆者の一人、佐藤らはいくつかの興味ある知見を得ているので紹介したい。

前述したように CryI 型の毒素は幼虫消化液により分

解され、生じた断片（約 60 kDa の消化液抵抗性断片）が殺虫活性を発揮する。一方ブイブイ株の毒素はドウガネブイブイの消化液によって試験管内で数分のうちに分解され、断片は 20 kDa 以下になった。またこの消化液は CryIA 毒素をも小断片に分解した。

このような例はコロラドハムシの消化液と CryIIIa 毒素との間にもみられ、昆虫消化液と毒素の組合せ如何では消化液抵抗性断片は存在しない場合があることを示している。もしこのように短時間で幼虫中腸内において毒素が分解されるなら、毒素の作用機構は他の *B. thuringiensis* の毒素の場合と異なる可能性が考えられる。

一方ドウガネブイブイ幼虫を無菌飼育し、消化液を採取し毒素を消化すると、消化液抵抗性の 70 kDa 程度の断片を検出できる。これはドウガネブイブイの腸管内に共生する細菌が腸管内での毒素消化に重要な働きをしていることを示唆している。

土壌中での残効性

われわれは上に紹介してきたブイブイ株の製剤（以下ブイブイ BT 剤）を調製し、いくつかの室内試験、および隔離された狭い実験場のスポットで圃場試験を行なっている。そこで得られた、ブイブイ株製剤が将来性をもっていることを示す実験結果をいくつか紹介したい。活性評価はすべてドウガネブイブイの幼虫を用いて行なった。

B. thuringiensis のプロトキシンの製剤（以下 BT 剤）は圃場で作物に散布した場合、一般に紫外線照射によっておよそ 2~3 週間のうちに著しく活性を失う。一方土壌中には地表面より多くの微生物が存在しさまざまなタンパク分解酵素を分泌していると考えられ、土壌内に散布された BT 剤も急速に失活するものと考えられる。そこでブイブイ BT 剤の土壌中での残効性を実験室内で評価してみた（図 5）。畑土を採取し殺菌せずに、ブイブイ BT 剤を混合し実験室内で一定条件下に静置した。経時的に残効性を調査すると、120 日間ほぼ一定の活性を保持し続けた。一方夏の高湿期を間に挟んだ野外の実験場では、活性は 80 日間で 10% 程度に減少した。しかし殺虫効果は初めの一回の散布で十分で、 LC_{50} の 10 倍量散布すれば 80 日後にまだ LC_{50} より多めの毒素が存在するためと推定された。

ブイブイ株毒素の LC_{50} は、処理後 7 日目の致死率から計算すると約 $0.1 \mu\text{g}$ 130 kDa 毒素/g・コンポストである³⁾。 LC_{50} 値の 10 倍量の毒素を用いると処理後 2~3 日で幼虫はほぼ全部死亡するが、 LC_{50} 値あるいはそ

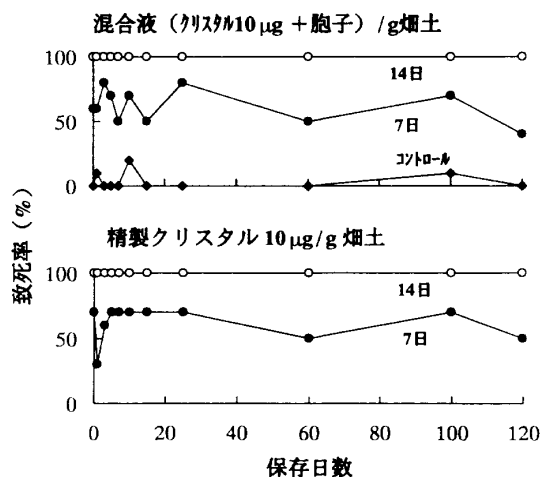


図5 *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui 由来の殺虫性タンパクの土壌中での残効性

非殺菌畑土 1g に $10\mu\text{g}$ のブイブイ株のプロトキシンとおよそ 10^8 個の孢子を含んだ混合液 1ml を混合する (上図)。あるいは $10\mu\text{g}$ のプロトキシンのみを含んだ液 1ml を混合する (下図)。処理後 7 日 (●), 14 日 (○) に致死率を調査した。(◆) は毒素を処理しない畑土 (コントロール実験) の殺虫率を示す。Suzuki ら²¹⁾から引用改変。

の 1/10 量の低濃度の毒素で処理しても、幼虫の死亡はゆっくりと進み、処理後 20 日の致死率はほぼ 100% に近い。コガネムシ幼虫はこの間摂食を停止している。したがって LC_{50} 付近の濃度が土壌内で保証されていれば、圃場においても高い防除効果が期待できると思える。

ブイブイ BT 剤の土壌への浸透性

シバを張った狭いスポットにブイブイ BT 剤を散布し経時的に土壌サンプルを採取し、殺虫活性がどのように垂直方向に移行するかを調査した。散布後 1 日 1 回 1 リットル/ m^2 の水を毎日まいた。土壌カラムを一定時間経過後くり抜き、0~3, 3~6, 6~9 cm の三つのゾーンから土をサンプリングして殺虫活性を測定した (図 6)。およそ 4 週間後に 6~9 cm のゾーンに毒素が到着していることが読みとれる。コガネムシ幼虫は夏の生育期には、圃場の畑土内や、ゴルフコースの土内の 0~15 cm の間に生息していると予想される。毒素の土壌浸透性は、土壌組成、灌水条件に左右され、図 6 のデータを一般化するのは尚早であるが、10 cm 程度の浸透が期待できれば、活性が長時間安定なことから相まって、実際のフィールドにおいても高い防除効果を期待できる。

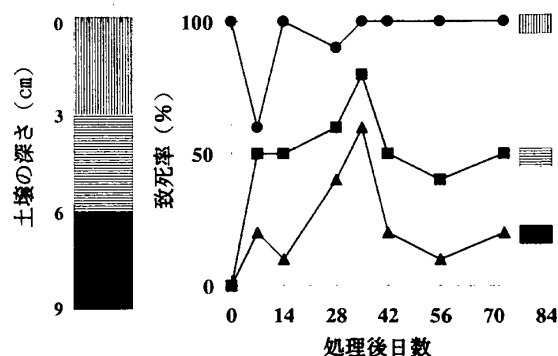


図6 *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui の殺虫性タンパクの土壌中での垂直方向への浸透性

土壌カラムを適宜採取し、0~3, 3~6, 6~9 cm の三つの深さに分け、各ゾーンでの殺虫活性をドウガネブイブイ 1 齢幼虫を用いて処理後 7 日目に測定した。Suzuki ら²¹⁾から引用改変。

シバポットでのドウガネブイブイの幼虫に対する防除効果

野外ではコガネムシ幼虫の発生は気まぐれともいえる。幼虫を実験区に放し確実に防除効果を評価する以下のような実験をデザインした。ブイブイ BT 剤をシバを張った狭い区域に散布しすぐに一定量の水を散布後、シバをサッチ層、硬い砂層とともにくり抜きポットに移植した。毎日水を一定量供給する以外は自然条件下にポットを置いた。このポットにドウガネブイブイの 1, 2, あるいは 3 齢の幼虫を放飼し、50 日後にシバの地上部の被害状況、乾燥重量、幼虫の致死率、生存幼虫の齢期などを調査した。散布した毒素濃度はポット当たり 2 mg である。

ブイブイ BT 剤を散布しないコントロール区では地上部の緑は完全に喪失し、乾燥重量は著しく低下した。ブイブイ BT 剤を散布した場合、1 齢, 2 齢を放飼した区では、地上部は非常に新鮮な緑に保たれ被害はみられなかった。しかし 3 齢を放飼した区では多少の被害が地上部に達し緑が多少失われた¹⁷⁾。

まとめ

新規な *B. thuringiensis* を探索し、コガネムシ科昆虫幼虫にのみ活性を示す菌株を発見した。この *B. thuringiensis* は活性、タンパク質、遺伝子のすべての点で既知の *B. thuringiensis* 菌株のいずれともまったく異なる。しかし毒素は 5 個の保存領域をもち、殺虫の機構は基本的に他の *B. thuringiensis* と類似している

と考えられる。この *B. thuringiensis* はドウガネブイブイ、マメコガネ、アオドウガネなどの難防除害虫の駆除に有効と思われる強い活性を示した。

持続的農業を追求するうえで新しいタイプの農薬の開発が強く要望されている。期待される新しい農薬は標的昆虫を殺すが他の生物に大きな影響をおよぼすことがなく、自然生態系を攪乱することがない農薬である。

生物農薬が新しい農業生産技術の一つとして定着できるか否かは、害虫の防除効果の判断基準を単なる殺虫効果にだけ求めるのではなく、長期的、総合的な視野からの効果判断基準がつくれ、それが多くの人々に理解されるか否かにかかっていると思える。

紙幅がなく遺伝子関係をまったく省いたが、興味ある方は Höfte & Whiteley¹⁸⁾ 等を、またブイブイ株に関してはわれわれの報告^{19,20)}を参考にさせていただきたい。

本総説の執筆をお奨めくださった東京農工大学・岩花秀典教授、研究に常に助言くださったクボタの浅野昌司博士、遺伝子、製剤の仕事をともした荻原克俊、鈴木伸和、南 政慶、貴重な写真を提供していただいた坂中一敦の諸氏に感謝します。

引用文献

- 1) H. de Barjac & E. Frachon: *Entomophaga* **35**, 233 (1990)
- 2) M. Ohba, H. Iwahana, S. Asano, N. Suzuki, R. Sato & H. Hori: *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 54 (1992)
- 3) N. Suzuki, H. Hori, K. Ogiwara, S. Asano, R. Sato, M. Ohba & H. Iwahana: *Biol. Control* **2**, 138 (1992)
- 4) A. Krieg, A. Huger, G. Lagenbruch & W. Schnetter: *J. Appl. Entomol.* **96**, 500 (1983)
- 5) H. Hori, N. Suzuki, K. Ogiwara, M. Himejima, L. S. Indrasith, M. Minami, S. Asano, R. Sato, M. Ohba & H. Iwahana: *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 307 (1994)
- 6) L. A. Bulla, Jr., K. J. Kramer, D. J. Cox, B. L. Jones, L. I. Davidson & G. L. Lookhart: *J. Biol. Chem.* **256**, 3000 (1981)
- 7) B. Lambert, H. Höfte, K. Annys, S. Jansen, P. Soetaert & M. Perferoen: *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2536 (1992)
- 8) D. J. Tyrell, L. A. Bulla, Jr., R. E. Andrews, K. J. Kramer, L. I. Davidson & P. Nordin: *J. Bacteriol.* **145**, 1052 (1981)
- 9) A. Tojo & K. Aizawa: *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 576 (1983)
- 10) K. Ogiwara, L. S. Indrasith, S. Asano & H. Hori: *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 121 (1992)
- 11) L. S. Indrasith, K. Ogiwara, M. Minami, T. Iwasa, T. Maruyama, A. Suzuki, S. Asano, K. Sakanaka & H. Hori: *Appl. Entomol. Zool.* **26**, 485 (1991)
- 12) C. T. Choma, W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor & H. Kaplan: *Eur. J. Biochem.* **189**, 523 (1990)
- 13) B. Knowles & J. A. Dow: *BioEssays* **15**, 469 (1993)
- 14) P. J. K. Knight, N. Crickmore & D. J. Ellar: *Mol. Microbiol.* **11**, 429 (1994)
- 15) S. Sangadala, F. S. Walters, L. H. English & M. J. Adang: *J. Biol. Chem.* **269**, 10088 (1994)
- 16) J. Li, J. Carroll & D. J. Ellar: *Nature* **353**, 815 (1991)
- 17) N. Suzuki, H. Hori, M. Tachibana & S. Asano: *Biol. Control* **4**, 361 (1994)
- 18) H. Höfte & H. R. Whiteley: *Microbiol. Rev.* **53**, 242 (1989)
- 19) R. Sato, K. Takeuchi, K. Ogiwara, M. Minami, Y. Kaji, N. Suzuki, H. Hori, S. Asano, M. Ohba & H. Iwahana: *Curr. Microbiol.* **28**, 15 (1994)
- 20) K. Ogiwara, H. Hori, M. Minami, K. Takeuchi, R. Sato, M. Ohba & H. Iwahana: *Curr. Microbiol.* **30**, 1 (1995)
- 21) N. Suzuki, H. Hori, M. Tachibana, L. S. Indrasith & A. Fujiie: *Appl. Entomol. Zool.* **29**, 610 (1994)