

学位論文題名

昆虫・植物循環細菌の特性解明ならびに  
害虫防除への応用に関する研究

学位論文内容の要旨

昆虫および植物には病原性細菌ならびに非病原性細菌を含めて、多種多様の細菌群が生息していることが知られている。また、植物を食物としている昆虫においては、その腸内フローラは植物関連細菌と深く関わっていると考えられる。しかしながら、これらの両宿主に共通して生息している細菌群や両宿主を循環伝搬して生息する細菌群（昆虫・植物循環細菌）について研究された報告は認められず、これらの細菌群における氷核活性や薬剤耐性能の伝達等の特性についても解明されていない。また、昆虫・植物循環細菌は生物的防除等、多方面への利用が考えられるが、これまで検討が行われていない。

本研究では、昆虫・植物循環細菌の分離、同定を行い、その特性解明を行うとともに、昆虫・植物循環細菌の利用法の一例として、氷核活性系統による越冬害虫の生物的防除への利用について検討を行った。

1. 昆虫・飼料植物から共通に分離される細菌の同定

カイコ、クワノメイガ、トビイロウンカ等、数種昆虫及びその飼料植物（クワ、イネ）から多数の細菌株を分離し、各種細菌学的性質により種を同定した。その結果、昆虫からは *Erwinia herbicola* 群細菌 (*Er. ananas*, *Er. herbicola* 等)、*Staphylococcus* sp.、および *Serratia marcescens* が高密度に分離され、優勢フローラを形成していた。また、*Enterobacter cloacae* は低密度であるが、ほとんどの昆虫種から分離された。一方、植物からは *Er. herbicola* 群細菌、および *Pseudomonas syringae* が高密度に分離され、優勢フローラを形成していた。また、*Enterobacter cloacae* も低密度であるが分離された。これらの結果から、*Er. herbicola* 群細菌および *Ent. cloacae* が昆虫とその飼料植物における共通細菌であることが明らかになった。

2. 共通細菌 *Er. herbicola* 群細菌及び *Ent. cloacae* の昆虫腸内増殖様式

*Er. herbicola* 群細菌がカイコ腸内において定着、増殖することが明らかとなった。また、*Er. herbicola* 群細菌のクワ分離株はカイコ分離株と同様にカイコ腸

内で良く定着、増殖した。クワノメイガ、トビイロウンカ、ツマグロヨコバイ等他の昆虫における飼料植物との共通細菌 *Ent. cloacae* の植物分離株もまた、宿主昆虫分離株と同様に宿主昆虫の腸内において増殖した。これらの結果、植物葉面上の *Er. herbicola* 群細菌及び *Ent. cloacae* は食餌と共に昆虫に取り込まれ、腸内で増殖した後、昆虫が排泄したフンから葉面へ再び移行することが示唆され、昆虫と植物を循環伝搬する細菌（昆虫・植物循環細菌）であることが明らかになった。

### 3. 昆虫・植物循環細菌 *Er. herbicola* 群細菌及び *Ent. cloacae* の特性解明

本実験における昆虫・植物循環細菌の特性を明らかにするため、氷核活性能、多剤耐性能、及び昆虫腸内における遺伝子伝達能等について研究を行った。従来、氷核活性系統として報告されている昆虫及び植物由来 *Er. herbicola* 群細菌ならびに今回分離された氷核活性系統について6種の細菌学的性質により検討を行った結果、供試菌株20株は全て *Er. ananas* と同定された。

氷核活性細菌、20菌株の氷核活性遺伝子の全長をPCR-RFLP解析した結果、両端のN、Cドメインにはそのサイズに差異は認められなかったが、繰り返し配列部分（Rドメイン）の長さ、12グループに類別される段階的な差異が認められた。さらに、Rドメインの *PvuII* 部位から *DraI* 部位の間で、そのサイズや制限酵素部位に変異が認められ、可変領域であることが示唆された。しかし、これらの細菌の氷核活性能と氷核活性遺伝子のサイズとの間には相関関係は認められなかった。

一方、昆虫及び植物から分離された *Ent. cloacae* はストレプトマイシン等5つの薬剤に耐性を有する菌株と感受性の菌株に分類され、植物分離株としては、*Ent. cloacae* の多剤耐性株が初めて分離された。耐性の菌株は全て100kbのプラスミド（pMUL1）を有しており、サザン法によりそれらの遺伝子が全てpMUL1プラスミド上に存在することが明らかになった。さらに、継代中にpMUL1プラスミドの一部が欠失し、薬剤耐性能の一部を失った変異株におけるサザン解析により、pMUL1プラスミドの物理的地図を構築した。一方、pMUL1プラスミドは培地上での接合実験により、*Er. herbicola* 群細菌に伝達されることが証明され、自然界における薬剤耐性能の拡散が示唆された。

さらに、昆虫の腸内において、昆虫・植物循環細菌間でプラスミドを介した遺伝子伝達が起こっている可能性についても検討した。その結果、pBPW1及びRSF1010等、伝達性プラスミドを導入した *Er. herbicola* 群細菌は、昆虫腸内において他の *Er. herbicola* 群細菌に高頻度にプラスミドを接合伝達した。さらに、異種細菌である *Ent. cloacae* にも高頻度にプラスミドを接合伝達し、昆虫腸内での遺伝子伝達が証明された。これらの結果から自然界においても昆虫腸内でプラスミド等を介した遺伝子拡散が起こっている可能性が示唆された。

#### 4. 氷核活性を有する昆虫・植物循環細菌による農業害虫の生物的防除への利用

昆虫・植物循環細菌の利用法の1つとして、氷核活性細菌による農業害虫の生物的防除への利用についても検討を行った。氷核活性を有する *Er. ananas* をクワノメイガ幼虫に与え腸内に定着させ、対照区と比較して、耐寒性の検討を行ったところ実験区では明らかな耐寒性の低下が認められた。また、これらの氷核活性 *Er. ananas* を供試した幼虫の耐寒性は少なくとも処理後9日間低下し続けた。一方、従来用いられてきた氷核活性 *P. syringae* を与えた場合、昆虫腸内に定着、増殖できないために、幼虫の耐寒性の低下はほとんど認められず、かつ、これらの幼虫からは氷核活性細菌はほとんど分離されなかった。これらの結果から、昆虫腸内に定着、増殖可能な氷核活性細菌を利用した方法 (gut-colonization 法と新称) による越冬害虫の生物的防除が可能であることが示唆された。さらに、氷核活性遺伝子を導入した形質転換 *Ent. cloacae* は *Er. ananas* より強力にかつ安定的にクワノメイガ幼虫の耐寒性を低下させることが明らかになった。

以上のように、本研究は数種昆虫とその飼料植物とから共通に分離される細菌を明らかにするとともに、これら共通細菌の有する特性の1つとして氷核活性性能に關与する氷核活性遺伝子の解明を行った。このことにより、本特性を利用した害虫の生物的防除の可能性が明らかにされた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 塚 敏 彦  
副 査 教 授 富 田 房 男  
副 査 教 授 伴 戸 久 徳

学 位 論 文 題 名

## 昆虫・植物循環細菌の特性解明ならびに 害虫防除への応用に関する研究

本論文は、図 34、表 27、引用文献 166 を含み、9 章からなる総頁 163 の和文論文である。別に参考論文 16 編が添えられている。

昆虫およびその飼料植物には多種多様の細菌フローラの存在が知られている。しかし、これらの両宿主を循環伝搬して生息する細菌群（昆虫・植物循環細菌）について研究された報告は認められていない。また、これらの細菌群の特性解明及びその利用についても検討が行われていない。

本研究では、昆虫・植物循環細菌の同定および特性解明を行うとともに、昆虫・植物循環細菌の利用法として、越冬害虫の生物的防除について検討を行った。得られた結果の概要は下記の通りである。

### 1. 昆虫・飼料植物から共通に分離される細菌の同定

カイコ、クワノメイガ、トビイロウンカ等、数種昆虫及びその飼料植物（クワ、イネ）から多数の細菌株を分離し、各種細菌学的性質により種を同定した。その結果、*Erwinia herbicola* 群細菌（*Er. ananas*, *Er. herbicola* 等）がいずれの材料からも高密度に分離された。また、*Enterobacter cloacae* もほとんどの供試昆虫、及びその飼料植物から分離され、これらの細菌群は昆虫とその飼料植物における共通細菌であることが判明した。

### 2. 共通細菌 *Er. herbicola* 群細菌及び *Ent. cloacae* の昆虫腸内増殖様式

*Er. herbicola* 群細菌のクワ分離株はカイコ分離株と同様にカイコ腸内で良く定着、増殖した。上記共通細菌である *Ent. cloacae* の植物分離株もまた、昆虫分離株と同様に増殖した。また、供試昆虫の糞からもこれらの細菌が多数検出された。これらの結果から、*Er. herbicola* 群細菌及び *Ent. cloacae* は昆虫と植

物を循環伝搬する細菌（昆虫・植物循環細菌）であることが明らかになった。

### 3. 昆虫・植物循環細菌 *Er. herbicola* 群細菌及び *Ent. cloacae* の特性解明

共通細菌の特性を明らかにするため氷核活性能、多剤耐性能、及び昆虫腸内における遺伝子伝達能等について調べた。供試した細菌株 20 株について、細菌学的性質である糖の分解能ならびに氷核活性能の検討から細菌種を同定したところ *Er. ananas* と同定された。また、これらの氷核活性遺伝子の全長を PCR-RFLP 解析した結果、繰り返し配列部分 (R ドメイン) の中に可変領域が存在し、そのサイズや制限酵素部位により、12 グループに類別された。しかし、これらの細菌の氷核活性能と遺伝子のサイズとの間には相関関係は認められなかった。一方、昆虫及び植物から分離された *Ent. cloacae* はストレプトマイシン等 5 剤に耐性を有する菌株と感受性の菌株に分類され、耐性の菌株は全て一つの伝達性プラスミド (pMUL1) を有していた。さらに、昆虫の腸内において、昆虫・植物循環細菌間でプラスミドを介した遺伝子伝達が起きている可能性についても検討したところ、伝達性プラスミド (pBPW1 及び RSF1010 等) を導入した菌株から *Er. herbicola* 群細菌または *Ent. cloacae* に高頻度にプラスミドの接合伝達が起こることが判明し、自然界においても昆虫腸内でプラスミド等を介した遺伝子伝搬が起きていることが示唆された。

### 4. 氷核活性を有する昆虫・植物循環細菌による農業害虫の生物的防除への利用

氷核活性細菌 *Er. ananas* をクワノメイガ幼虫の腸内に安定的に定着、増殖させる方法 (gut-colonization 法と新称) により、従来用いられてきた氷核活性 *P. syringae* の散布法よりもはるかに効果的に幼虫の耐寒性を低下させ得ること、また、氷核活性遺伝子を導入した *Ent. cloacae* は様々な昆虫種の腸内に定着する可能性が高いことから生物的防除の標的害虫の適用範囲を拡大させることが可能となった。

以上のように本研究は、昆虫・植物循環細菌の同定を行うとともに、これらの細菌が有する氷核活性能、薬剤耐性能、および昆虫腸内における遺伝子伝達等の特性を解明した。このことにより氷核活性能を利用した越冬害虫等の生物的防除を可能にしたものである。その結果は、学術的のみならず農業上の応用面においても寄与するところ大きいと評価される。

よって審査員一同は、渡部賢司が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。