

霧島屋久島国立公園における *Bacillus thuringiensis* の分離と 優良殺虫性タンパク質遺伝子の検索

菊田 治典・黒岩 学・浅野 真一郎*・飯塚 敏彦*

Isolation and Insecticidal Crystal Protein Gene Screening of
Bacillus thuringiensis from Kirisima Yakushima Island national park

Harunori KIKUTA, Manabu KUROIWA, Shinichiro ASANO* and Toshihiko IIZUKA*
(June 1997)

I 緒 言

Bacillus thuringiensis はグラム陽性の芽胞形成桿菌で、栄養型細胞末期に芽胞とともに殺虫性結晶タンパク質を産生する。この結晶タンパク質は、昆虫のアルカリ性消化液でプロトキシニンに分解され、さらに消化液中のトリプシンで活性化されて特異的な殺虫性を示すことが知られている。一般に酸を消化液とする人畜については無害とされている。加えて、自然環境において紫外線により速やかに不活化され、環境を汚染しない生物農薬として特に注目されている。生物農薬の開発においては、より特異的で、より殺虫活性の高い菌株の検索が必要となっている¹⁾²⁾。*B.thuringiensis* は自然環境の豊かな所に、未知の菌株が多数存在することが示唆されている³⁾。しかし、いまだ包括的な調査報告は少なく不十分である⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

屋久島はユネスコの世界自然遺産条約登録地、環境庁の原生自然環境保全地域、林野庁の森林生態系保護地域などに指定され、自然環境がよく保全されている。屋久島の森林は、島の周辺を囲む照葉樹林と島の中山間部の屋久杉などの針葉樹林をあわせ持ち、生物群が豊富な島である⁷⁾。

従って本実験は、原生林環境のよく保存された屋久島において *B.thuringiensis* の分離を行うとともに地域的分布調査および優良菌株の検索を目的として行った。

II 材料および方法

I 土壌からの *B.thuringiensis* の分離

屋久島は、九州最南端の佐多岬から南海上 70 km に浮かぶ周囲約 132 km、面積約 503 km² のほぼ円形の島で、海岸部と山岳部とは気候および土質が異なっている。土壌の採取は海岸部の温暖地の広葉樹林帯から主に行った。即ち、西部林道 I 5 地点、西部林道 II 5 地点、西部林道 III 6 地点、西部林道 IV 4 地点、西部林道 V 5 地点、花山林道 6 地点、蛇の口林道 14 地点、屋久杉ランド I 8 地点、屋久杉ランド II 10 地点、小瀬田愛子岳林道 I 6 地点、小瀬田愛子岳林道 II 5 地点、小瀬田愛子岳林道 III 4 地点、白谷雲水峽 2 地点、吉田林道伐採 7 地点、餅田林道 6 地点、宮之浦林道 11 地点、永田岬林道 5 地点、志戸子ガジュマル 2 地点、永田灯台北側連絡通路 4 地点、シドッチ神父岬 6 地点、尾之間自然公園 4 地点、中間ガジュマル 1 地点、大川滝付近 2 地点、栗生神社 5 地点、湯泊神社 5 地点、小島神社 3 地点、尾之間子間姫神社 10 地点、船行神社 4 地点、小瀬田神社 5 地点、榊川神社 2 地点、楠川神社 4 地点、志戸子神社 1 地点、矢筈岬 4 地点、吉田神社 3 地点、計 35 地域 182 地点を選定し、土壌を採取して供試サンプルとした (Table 1)。

B.thuringiensis の分離は、菊田ら (1989)⁸⁾ の方法を改変して行った。即ち、土壌サンプル 10 g に滅菌蒸留水 10 ml を加え攪拌した後、静置し上清 1.0 ml を分取し 98℃ 10 分間加熱した。加熱液は段階希釈し、肉エキスペプトン培地 (肉エキス 0.3%、ペプト

北海道文理科学短期大学酪農科微生物利用学

Department of Dairy Science, Utilization of Microorganism, Hokkaido College of Arts and Sciences, Ebetsu, Hokkaido, 069 Japan

* 北海道大学農学部応用分子昆虫教室

Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060 Japan

本研究は 1995 年北海道文理科学短期大学共同研究の助成を受けたものである

Table 1 屋久島における土壌 *B. thuringiensis* の調査地域および調査地点

調査地域	調査地点名	調査地域	調査地点名
西部林道Ⅰ	Seib1 1, Seib1 2, Seib1 3, Seib1 4, Seib1 5	宮之浦林道	Miya1, Miya2, Miya3, Miya4, Miya5, Miya6, Miya7, Miya8, Miya9, Miya10, Miya11
西部林道Ⅱ	Seib2-1, Seib2 2, Seib2 3, Seib2 4, Seib2 5	永田岬林道	NagaM1, NagaM2, NagaM3, NagaM4, NagaM5
西部林道Ⅲ	Seib3 1, Seib3 2, Seib3-3, Seib3 4, Seib3-5, Seib3-6	志戸子ガジュマル園	Sgaj1, Sgaj2
西部林道Ⅳ	Seib4 1, Seib4 2, Seib4 3, Seib4 4	永田燈台北側連絡路	NagaT1, NagaT2, NagaT3, NagaT4
西部林道Ⅴ	Seib5-1, Seib5 2, Seib5-3, Seib5 4, Seib5 5	シドッチ神父岬	Shid1, Shid2, Shid3, Shid4, Shid5, Shid6
花山林道終点	Hana1, Hana2, Hana3, Hana4, Hana5, Hana6	尾之間自然公園	Onos1, Onos2, Onos3, Onos4
蛇の口林道	Jano1, Jano2, Jano3, Jano4, Jano5, Jano6, Jano7, Jano8, Jano9, Jano10, Jano11, Jano12, Jano13, Jano14	中間ガジュマル	Ngaj1
屋久杉ランドⅠ	Yaku1 1, Yaku1 2, Yaku1 3, Yaku1 4, Yaku1 5, Yaku1 6, Yaku1 7, Yaku1 8	大川滝	Ohok1, Ohok2
屋久杉ランドⅡ	Yaku2 1, Yaku2 2, Yaku2-3, Yaku2-4, Yaku2 5, Yaku2-6, Yaku2 7, Yaku2 8, Yaku2-9, Yaku2-10	栗生神社	Kuri1, Kuri2, Kuri3, Kuri4, Kuri5
小瀬田愛子岳林道Ⅰ	Aiko1 1, Aiko1 2, Aiko1-3, Aiko1 4, Aiko1 5, Aiko1 6, Aiko1 7	湯泊神社	Yudo1, Yudo2, Yudo3, Yudo4, Yudo5
小瀬田愛子岳林道Ⅱ	Aiko2 1, Aiko2 2, Aiko2-3, Aiko2 4, Aiko2 5	小島神社	Koji1, Koji2, Koji3
小瀬田愛子岳林道Ⅲ	Aiko3-1, Aiko3-2, Aiko3 3, Aiko3 4	尾之間小間姫神社	Koma1, Koma2, Koma3, Koma4, Koma5, Koma6, Koma7, Koma8, Koma9, Koma10
白谷雲水峽	Shir1, Shir2	安房神社	Anbo1, Anbo2
吉田林道	YoshR1, YoshR2, YoshR3, YoshR4, YoshR5, YoshR6, YoshR7	船行神社	Funa1, Funa2, Funa3, Funa4
餅田(永田川)林道	Moch1, Moch2, Moch3, Moch4, Moch5, Moch6	小瀬田神社	Kose1, Kose2, Kose3, Kose4, Kose5
		梶川神社	Tabu1, Tabu2
		梶川神社	Kusu1, Kusu2, Kusu3, Kusu4
		志戸子神社	Shitj1
		矢筈岬神社	Yaha1, Yaha2, Yaha2, Yaha4
		吉田神社	YoshJ1, Yoshj2, Yoshj3



Fig. 1 屋久島における土壌調査地

ン0.3%, 寒天1.5%)に散布した。これらを30°Cで4日間培養し, 得られたコロニーは, 2%マラカイトグリーン加熱染色を行った後0.3%サフラニン溶液によって芽胞および結晶タンパク質の識別染色を行い, 光学顕微鏡で結晶の有無を確認し, 結晶タンパク質の確認されたものを *B.thuringiensis* とした。

得られた *B.thuringiensis* は走査型電子顕微鏡によって結晶タンパク質の形態観察を行った。走査型電子顕微鏡の試料作製は菊田(1990)³⁾の方法に従った。即ち, 肉エキスペプトン培地で4日間培養した菌株を1白金耳採り, 1cmのガラス円盤上で滅菌蒸留水に浮遊混和させた。浮遊混和液は自然乾燥の後, イオンスパッター (日電子技術サービス株式会社製 JFC-1100型)によって金蒸着し, 走査型電子顕微鏡試料とした。走査型電子顕微鏡は (日電子技術サービス株式会社製 JSM-T 200) を用い観察した。

2 H抗原抗体作成と吸着反応

H抗原は研究室保存の *B.thuringiensis*, H血清型基準菌株33株を用い作成した (Table 2)。即ち, 供試菌株は肉エキスペプトンブイヨン培地 (肉エキス0.3% ペプトン0.3%) 10 ml に接種し, 30°C一晩振盪培養した後, 遠心分離 (10,000 rpm, 10分) し, ペレットを得た。得られたペレットは10 ml 滅菌 PBS buffer (0.12% Na₂HPO₄, 0.07% NaH₂PO₄, 0.68% NaCl) で2回洗浄した後, 更に, ホルマリンを最終濃度1%になるように加えて密閉し, 室温で1時間処理した。ホルマリン処理した菌株は遠心分離 (3,000 rpm, 10分) し, ペレットを得

た。得られたペレットは滅菌 PBS buffer を加え抗原液とした。

抗体作成には, 体重約2.5 kgの家兎を用い抗原液を耳静脈内に4日間隔で4回注射した。注射量は初回0.5 ml とし, 以後2回目: 1 ml, 3回目: 2 ml, 4回目: 3 ml と1 ml 量ずつ増量させた。最後の注射から7日後, 頸動脈から全採血した。採取した血液は30°C 24時間インキュベイト後, 分離した血清を分取した。血清は56°C, 30分加熱し, 抗原を除去した。

抗原を除去した血清は混在する HSSA 抗体の除去を行った。即ち, 作成した血清と同一菌株の HSSA 抗原を作成し, 血清から吸着することによって除去した。即ち, 抗原液作成法と同一方法で培養した菌株を, PBS buffer で洗浄後, 菌液を100°C, 2時間加熱し, H抗原を破壊し, HSSA 抗原液とした。得られた HSSA 抗原液は, スピッツグラス10本に1 ml ずつ分取し, 遠心分離 (10,000 rpm, 10分) し, 上清液をすて集菌した。更に, PBS buffer 4 ml に懸濁し, 血清1 ml を加え攪拌し, HSSA 抗体の吸着を行い, 遠心分離 (30 rpm, 1時間) した。これら一連の作業を9回くりかえし, 最後の処理が済んだ血清をH抗体液とし, 4°Cで保存した。H抗体液1 ml に PBS buffer 3 ml を加え血清量を20倍希釈して使用した。

土壌から分離された *B.thuringiensis* はH抗体液を用いて抗原抗体反応を行った。即ち, 供試菌株は肉エキスポリペプトン培地L型試験管を用い3時間培養し培養菌液2 μ l とH抗体液2 μ l を混和し, 光学

Table 2 H抗血清を作成した *B. thuringiensis* 亜種

亜種	品種	血清型	亜種	品種	血清型
thuringiensis	BA-068	1	tolworthi		9
finitimus		2	darmstadiensis		10
alesti		3 a	toumanoffi		11 a, 11 b
kurstaki	HD-1	3 a, 3 b	kyushuensis	A	11 a, 11 c
sumiyoshiensis	84-F-51-46	3 a, 3 d	thopsoni		12
fukuokaensis	84-F-26-3	3 a, 3 d, 3 e	pakistani	HD-395	13
dendrolimus		4 a, 4 b	israelensis	ONR-60A	14
kenyae		4 a, 4 c	indiana		16
galleriae	A	5 a, 5 b	tohokuensis		17
subtoxicus		6	kumamotoensis		18
entomosidus		6	tochigiensis		19
oyamensis		6 a, 6 c	yunnanensis		20
aizawai	IPL	7	colmeri		21
morrisoni		8 a, 8 b	shandongensis		22
tenebrionis		8 a, 8 b	japonensis		23
ostrinae		8 a, 8 c	leonensis		24
nigeriae		8 b, 8 d			

顕微鏡で観察し、運動の停止しているものを陽性反応とした。

3 殺虫活性検定

殺虫活性検定に用いた供試菌株は菊田ら (1989)⁹⁾の方法を改変して精製した。即ち、供試菌株は9 cm ペトリシャーレ平板肉エキスポリペプトン寒天培地で30°C 5日間培養し、50 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) を用いて集菌した。集菌した菌液は遠心分離(10,000 rpm, 10分)によって上清を除去した後、1 M NaCl bufferを加え混和し、超音波破碎機(TOMY SEIKCO co.la UR-20 P)によって洗浄処理し、遠心分離(10,000 rpm, 10分)してペレットを得た。これら一連の洗浄を3回くり返しペレットを得た。得られたペレットには更に滅菌蒸留水を加え懸濁し、遠心分離する同操作を3回くり返し、

得られたペレットを乾燥、計量し、殺虫活性検定供試菌株とした。

殺虫活性検定試験供試昆虫はカイコ (*Bombyx mori*) を用いた。カイコは本研究室の保存種(支125号×日125号)を用い、蚕用人工飼料(クロレラ配合飼料:日本クロレラ株式会社)で飼育した、5齢幼虫を供した。

検定方法は、供試昆虫を24時間絶食させ、人工飼料に菌液を塗布し摂食させて行なった。即ち、精製した供試菌株10 mgを1 mlの滅菌蒸留水に混和し、これを原液として段階希釈し、各段階希釈液を供試昆虫各区が24時間で食べ尽くす量の人工飼料に塗布し、飼餌させた。また、24時間後からは通常飼育とした。死亡判定は24, 48, 72時間毎に観察し、物理的刺激を与えても反応を示さないものを死亡とした。

4 殺虫性結晶タンパク質産生遺伝子 cry I の検索

供試 DNA の抽出は Nadine ら(1991)¹⁰⁾に従った。即ち、供試菌株を肉エキスポリペプトン寒

天培地にて30°C, 12時間培養後、100 μ l 滅菌蒸留水に一白金耳量を懸濁し、98°C, 10分処理後、遠心分離(15,000 rpm, 1分)し、上清液を供試 DNA とした。

cry I 遺伝子の増幅は、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によって行った¹¹⁾。即ち、PCR 反応液 (DNA sample; 5 μ l, 10 X PCR buffer (500 mM KCl, 25mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH8.3, 0.2% Gelatin); 3 μ l, dNTP Mixture; 3 μ l, Taq DNA -Polymerase; 1 μ l, Primer Mixture; 20 μ l) にミネラルオイルを重合させ、サーマルプログラマー (日本テクノサービス株式会社製 XE-2000) を用いて94°C 3分, 2本鎖 DNA の熱変性に92°C 1分, プライマーのアニーリングに53°C 1分, DNA 合成に72°C 1分を30サイクル反応させた後、72°C 5分間処理を行った。反応後は10°C冷却保存した。使用したプライマーは Table 3 に示した。

cry I 遺伝子 DNA 断片の観察は2.0%アガロースゲル電気泳動法によった。即ち、使用ゲルは TAE buffer (40 mM Tris-acetate pH 8.0, 2 mM EDTA) を用いアガロース濃度1.5%に調整し、0.5 ppm エチジウムブロマイド溶液10 μ lを60°Cに溶解したゲルに混合固化させて電気泳動に供し、UV照射をして行って写真撮影し判定した。マーカーには、Hind IIIにて反応させた λ DNA を用いた。

III 結果および考察

屋久島土壌から *B.thuringiensis* の分離は芽胞形成細菌68,153株の中から検索し、分離状況は Table 4 から Table 7 に示した。地域別分離状況は、蛇の口林道; 7地点, 小瀬田愛子岳林道 I; 5地点, 西部林道 II; 3地点および西部林道 IV, 尾之間自然公園および尾之間子問姫神社; 2地点, 次いで西部林道 I, 花山林道, 小瀬田愛子岳林道 II, 宮之浦林道および小瀬田神社; 1地点となり10地域25地点から分離され、地域の分離率は28.6%, 地点における分

Table 3 PCR 法にもちいた cry I 遺伝子プライマー

遺伝子	プライマー
cry I A (a)	5'-GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC-3'
cry I A (b)	5'-TCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTA-3'
cry I A (c)	5'-TCACTTCCCATCGACATCTACC-3'
cry I B	5'-GTCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC-3'
cry I C	5'-CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTTC-3'
cry I D	5'-GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC-3'
cry I E	5'-CTTAGGGATAAATGTAGTACAG-3'
cry I F	5'-CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC-3'
TYIUNI	5'-ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGA CTTTCTC-3'

Table 4 屋久島土壌における *B. thuringiensis* 分離結果(1)

調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名	調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名
西部林道 I	Seib 1-1	77	0		蛇の口林道	Hana 4	105	0	
	Seib 1-2	115	1	Seib 1-2-1		Hana 5	800	0	
	Seib 1-3	2,566	0			Hana 6	166	0	
	Seib 1-4	247	0			Jano 1	62	1	Jano 1-1
	Seib 1-5	220	0			Jano 2	213	1	Jano 2-1
西部林道 II	Seib 2-1	16	0			Jano 3	248	3	Jano 3-1
	Seib 2-2	30	1	Seib 2-2-1					Jano 3-2
	Seib 2-3	217	1	Seib 2-3-1					Jano 3-3
	Seib 2-4	41	1	Seib 2-4-1		Jano 4	400	2	Jano 4-1
	Seib 2-5	42	0						Jano 4-2
西部林道 III	Seib 3-1	25	0			Jano 5	169	4	Jano 5-1
	Seib 3-2	34	0						Jano 5-2
	Seib 3-3	33	0						Jano 5-3
	Seib 3-4	30	0						Jano 5-4
	Seib 3-5	45	0		Jano 6	129	0		
西部林道 IV	Seib 3-6	30	0		Jano 7	138	0		
	Seib 4-1	29	0		Jano 8	511	0		
	Seib 4-2	39	0		Jano 9	163	4	Jano 9-1	
	Seib 4-3	31	1	Seib 4-3-1				Jano 9-2	
	Seib 4-4	29	1	Seib 4-4-1				Jano 9-3	
西部林道 V	Seib 5-1	30	0					Jano 9-4	
	Seib 5-2	30	0		Jano 10	244	2	Jano 10-1	
	Seib 5-3	33	0					Jano 10-2	
	Seib 5-4	24	0		Jano 11	168	0		
	Seib 5-5	24	0		Jano 12	174	0		
花山林道終点	Hana 1	28	0		Jano 13	68	0		
	Hana 2	57	0		Jano 14	95	0		
	Hana 3	212	2	Hana 3-1					

Table 5 屋久島土壌における *B. thuringiensis* 分離結果(2)

調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名	調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名
屋久杉ランド I	Yaku 1-1	170	0		小瀬田愛子岳 林道II	Aiko 1-3	230	2	Aiko 1-3-1
	Yaku 1-2	160	0						Aiko 1-3-2
	Yaku 1-3	14	0			Aiko 1-4	2,079	4	Aiko 1-4-1
	Yaku 1-4	26	0						Aiko 1-4-2
	Yaku 1-5	10	0						Aiko 1-4-3
	Yaku 1-6	85	0						Aiko 1-4-4
	Yaku 1-7	20	0			Aiko 1-5	526	1	Aiko 1-5-1
	Yaku 1-8	324	0			Aiko 1-6	110	2	Aiko 1-6-1
	Yaku 1-9	30	0						Aiko 1-6-2
	Yaku 1-10	1	0			Aiko 2-1	13	1	Aiko 2-1-1
屋久杉ランド II	Yaku 2-1	114	0		Aiko 2-2	109	0		
	Yaku 2-2	156	0		Aiko 2-3	31	0		
	Yaku 2-3	21	0		Aiko 2-4	63	0		
	Yaku 2-4	96	0		Aiko 2-5	428	0		
	Yaku 2-5	123	0		小瀬田愛子岳 林道III	Aiko 3-1	7	0	
	Yaku 2-6	10	0			Aiko 3-2	165	0	
	Yaku 2-7	118	0			Aiko 3-3	85	0	
	Yaku 2-8	2,500	0		Aiko 3-4	217	0		
小瀬田愛子岳 林道I	Aiko 1-1	875	0		白谷雲水峽	Shir 1	25	0	
	Aiko 1-2	485	1	Aiko 1-2-1	Shir 2	2,500	0		

Table 6 屋久島土壌における *B. thuringiensis* 分離結果(3)

調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名	調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名
吉田林道伐採	YoshR 1	200	0		栗生神社	Kuri 1	651	0	
	YoshR 2	33	0			Kuri 2	280	0	
	YoshR 3	3	0			Kuri 3	315	0	
	YoshR 4	15	0			Kuri 4	124	0	
	YoshR 5	81	0			Kuri 5	593	0	
	YoshR 6	2,500	0		湯泊神社	Yudo 1	21	0	
	YoshR 7	52	0			Yudo 2	86	0	
餅田(永田川)林道	Moch 1	243	0			Yudo 3	55	0	
	Moch 2	115	0		Yudo 4	55	0		
	Moch 3	85	0		Yudo 5	13	0		
	Moch 4	18	0		小島神社	Koji 1	43	0	
	Moch 5	3	0			Koji 2	38	0	
	Moch 6	11	0			Koji 3	49	0	
	宮之浦林道	Miya 1	48	0		尾之間子問姫神社	Koma 1	99	0
Miya 2		247	0		Koma 2		72	0	
Miya 3		8	0		Koma 3		68	0	
Miya 4		5	0		Koma 4		72	0	
Miya 5		26	0		Koma 5		35	0	
Miya 6		18	0		Koma 6		76	0	
Miya 7		10	0		Koma 7		82	0	
Miya 8		59	0		Koma 1 k	39	3	Koma 1 k-1	
Miya 9		37	0					Koma 1 k-2	
Miya 10		18	1	Miya 10-1				Koma 1 k 3	
永田岬林道		Miya 11	244	0		Koma 2 k	45	0	
	NagaM 1	18	0		Koma 3 k	373	1	Koma 3 k 1	
	NagaM 2	88	0						
	NagaM 3	16	0						
	NagaM 4	141	0						
	NagaM 5	69	0						

離率は14.3%となった。

また、分離菌株数は蛇の口林道；17菌株、小瀬田愛子岳林道Ⅰ；10菌株、尾之間自然公園；5菌株、尾之間子問姫神社；4菌株、西部林道Ⅱおよび小瀬田神社；3菌株、西部林道Ⅰおよび西部林道Ⅳ；2菌株、次いで花山林道、小瀬田愛子岳林道Ⅱ、宮之浦林道；1菌株で、合計48菌株が分離され、主として林道からの *B. thuringiensis* の分離が多く、神社では2神社から分離されただけであった。

この結果は、同地域においても調査地点毎に *B. thuringiensis* が分離される地点と分離されない地点がある結果となった。菊田ら(1990)は北海道において、土壌中から分離される *B. thuringiensis* はスポット的に存在することを報告している。本試験はこの報告を裏付ける結果となった。また、地域、地点毎に分離の有無は認められたが、本結果においては *B. thuringiensis* の分布に特異的な偏りは考えにくく、*B. thuringiensis* は屋久島全域に分布していると考えられた。

分離された *B. thuringiensis* の結晶タンパク質形態は走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察し、Fig. 2か

ら Fig. 7 に示した。その結果、結晶タンパク質形態は4タイプに大別された(Table 8)。即ち、菱形結晶および方形結晶双方を有するタイプが28株、粒状結晶または不定形結晶を有するタイプが10株、菱形結晶だけを有するタイプおよび菱形、方形、不定形結晶を混在しているタイプがそれぞれ5株となった。また、菱形結晶および方形結晶を有するタイプの中で方形結晶の産生割合が著しく高い菌株も観察された。

結晶タンパク質形態については、菊田(1990)が北海道土壌および死亡昆虫から *B. thuringiensis* の分離を行い詳細な報告をしている。即ち、北海道土壌においては、*B. thuringiensis* は菱形結晶および方形結晶を有するタイプがもっとも多く、次いで菱形結晶だけを有するタイプ、不定形結晶を有するタイプはわずかであるとした。本実験において屋久島土壌から分離された *B. thuringiensis* の結晶タンパク質形態は菱形結晶および方形結晶を有するタイプが優占したものの、北海道では少なかった不定形結晶を有するタイプが多く分離され、北海道における結果とは異なる結果となった。

Table 7 屋久島土壌における *B. thuringiensis* 分離結果(4)

調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名	調査地域	調査地点	分離コロニー数	分離菌株数	菌株名
安房神社	Anbo 1	117	0		吉田神社	YoshJ 1	2,500	0	
	Anbo 2	226	0			YoshJ 2	2,500	0	
	Anbo 3	2,500	0			YoshJ 3	2,500	0	
船行神社	Funa 1	2,500	0		志賀子ガジュマル	Sgaj 1	547	0	
	Funa 2	948	0			Sgaj 2	311	0	
	Funa 3	364	0		永田燈台北側 連絡路	NagaT 1	69	0	
	Funa 4	576	0			NagaT 2	349	0	
小瀬田神社	Kose 1	230	0			NagaT 3	331	0	
	Kose 2	109	0			NagaT 4	122	0	
	Kose 3	640	0		シドゥッチ神父岬	Shid 1	120	0	
	Kose 4	410	0			Shid 2	112	0	
	Kose 5	339	3	Kose 5-3 Kose 5-6 Kose 5-7		Shid 3	70	0	
Shid 4						191	0		
				Shid 5		193	0		
				Shid 6	246	0			
榑川神社	Tabu 1	721	0		尾之間自然公園	Onos 1	40	0	
	Tabu 2	2,500	0			Onos 2	130	3	Onos 2-1
楠川神社	Kusu 1	28	0						Onos 2-2
	Kusu 2	191	0						Onos 2-3
	Kusu 3	2,500	0						
	Kusu 4	113	0			Onos 3	65	0	
志賀子神社	Shitj 1	2,500	0			Onos 4	109	2	Onos 4-1
矢筈岬神社	Yaha 1	2,500	0		中間ガジュマル	Ngaj 1	644	0	
	Yaha 2	298	0			大川滝付近	Ohok 1	725	0
	Yaha 3	444	0				Ohok 2	2,500	0
	Yaha 4	391	0						

Table 8 屋久島土壌において分離された *B. thuringiensis* の SEM 観察による結晶タンパク質形態

結晶タンパク質形態	菌 株					菌株数
菱 形	Koma 3k-1	Onos 4-1	Onos 4-2	Jano 2-1	Aiko 1-2-1	5
	Koma 1k-1	Koma 1k-2	Koma 1k-3	Onos 2-1	Onos 2-2	
菱 形 方 形	Onos 2-3	Hana 3-1	Seib 2-2-1	Seib 4-4-1	Aiko 1-5-1	28
	Aiko 1-4-1	Aiko 1-4-2	Aiko 1-3-2	Aiko 1-4-3	Aiko 1-4-4	
	Kose 5-6	Kose 5-7	Jano 1-1	Jano 5-1	Jano 5-2	
	Jano 5-3	Jano 5-4	Jano 9-1	Jano 9-2	Jano 9-3	
	Jano 9-4	Jano 10-1	Jano 10-2			
菱 形 方 形 不定形	Aiko 1-3-1	Aiko 1-6-1	Aiko 1-6-2	Kose 5-3	Jano 4-1	5
不定形	Seib 1-2-1	Seib 2-3-1	Seib 2-4-1	Seib 3-5-1	Seib 4-3-1	10
	Jano 3-1	Jano 3-2	Jano 3-3	Jano 4-2	Aiko 2-1-1	
	Miya 10-1					

カイコに対する殺虫活性検定の結果は Table 9 に示した。即ち、分離された菌株 48 株の内、殺虫活性株 24 株、無活性株 24 株で殺虫活性株分離率は 50.0%であった。菊田 (1990) は北海道の土壌分離 *B.thuringiensis* における殺虫活性株分離率は 57%であったことを報告している。本実験の結果は、北海道土壌分離 *B.thuringiensis* の殺虫活性株分離率と比較してやや低い結果となった。

また、分離地域によって殺虫活性株分離率の高い地域と低い地域が認められた。即ち、西部林道から

分離された *B.thuringiensis* の殺虫活性株分離率は 33.3%、小瀬田愛子岳林道では 27%と低い値なのに對し、蛇の口林道では 70.6%、尾之間子間姫神社では 75.0%、尾之間自然公園では 40%となった。これらのことから、殺虫活性菌株の分布には地域的な変異が存在する可能性が示唆された。これら殺虫活性株分離率の比較の高い地域は、人家にやや近く人の出入りの多い地域であり、殺虫活性株分離率の比較的低い地域は自然の良く保存された地域であった。この結果から人間生活の何らかの影響も示唆され

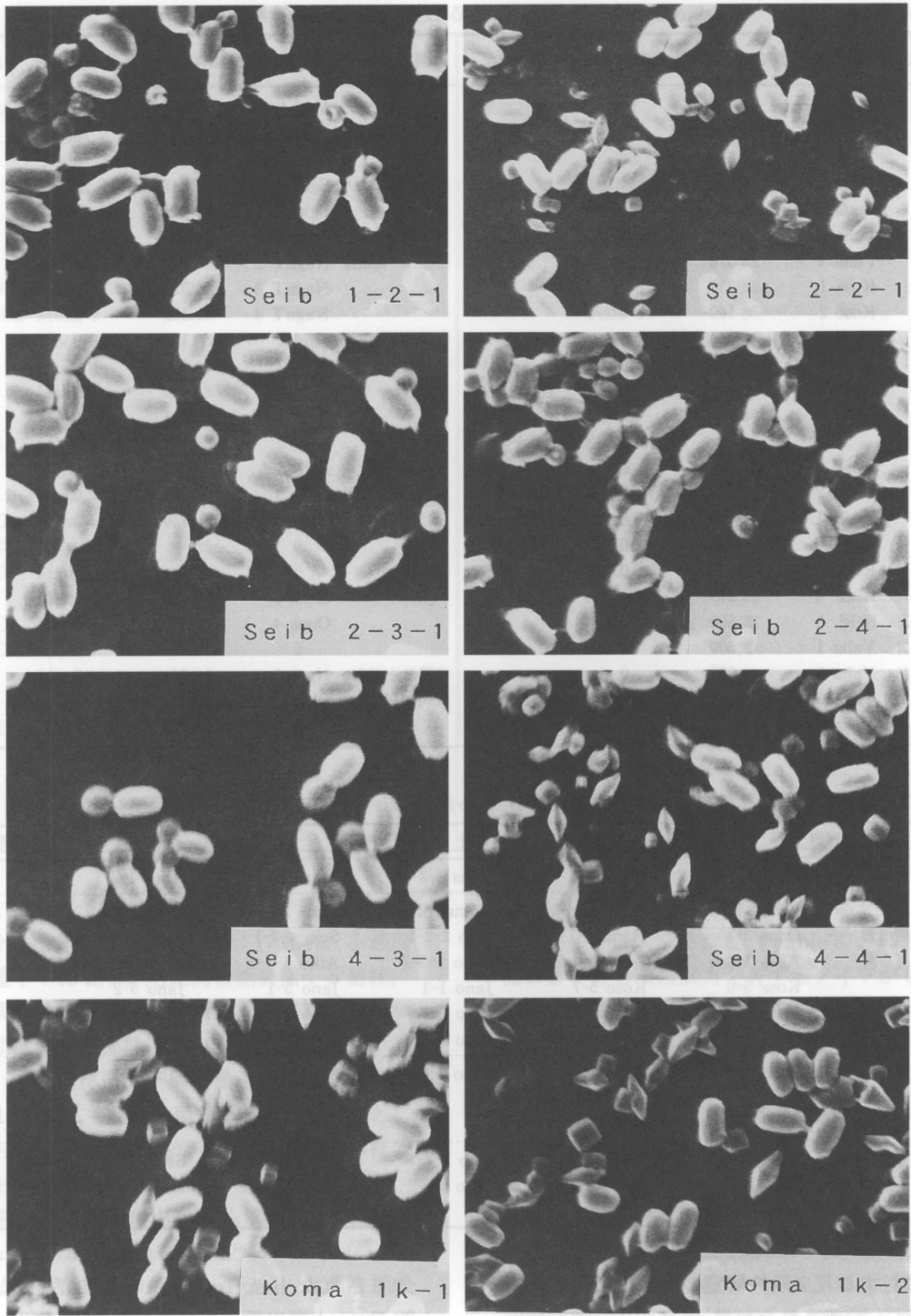


Fig. 2 分離された *Bacillus thuringiensis* の芽胞および結晶タンパク質の形態(1)

この菌は、幼虫に寄生するバクテリアで、その幼虫は、この菌の芽胞を食して、その結晶タンパク質を消化できず、死んでしまう。この菌は、殺虫剤として広く利用されている。この菌の芽胞は、一般的に桿状で、一端が丸く、もう一端が尖っている。結晶タンパク質は、長い棒状で、一端が尖っている。この菌の芽胞と結晶タンパク質の形態は、図2に示されている通りである。

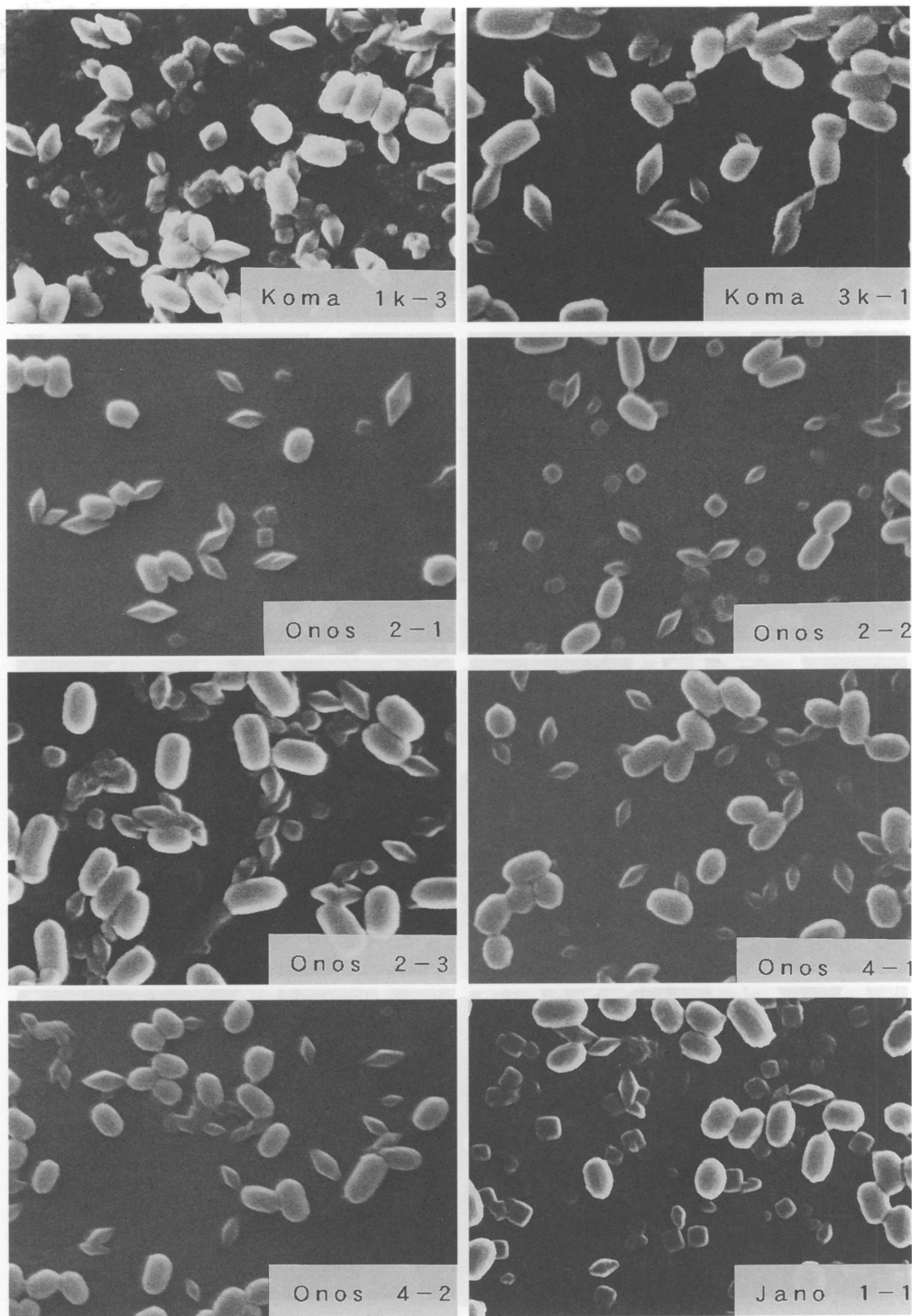


Fig. 3 分離された *Bacillus thuringiensis* の芽胞および結晶タンパク質の形態(2)

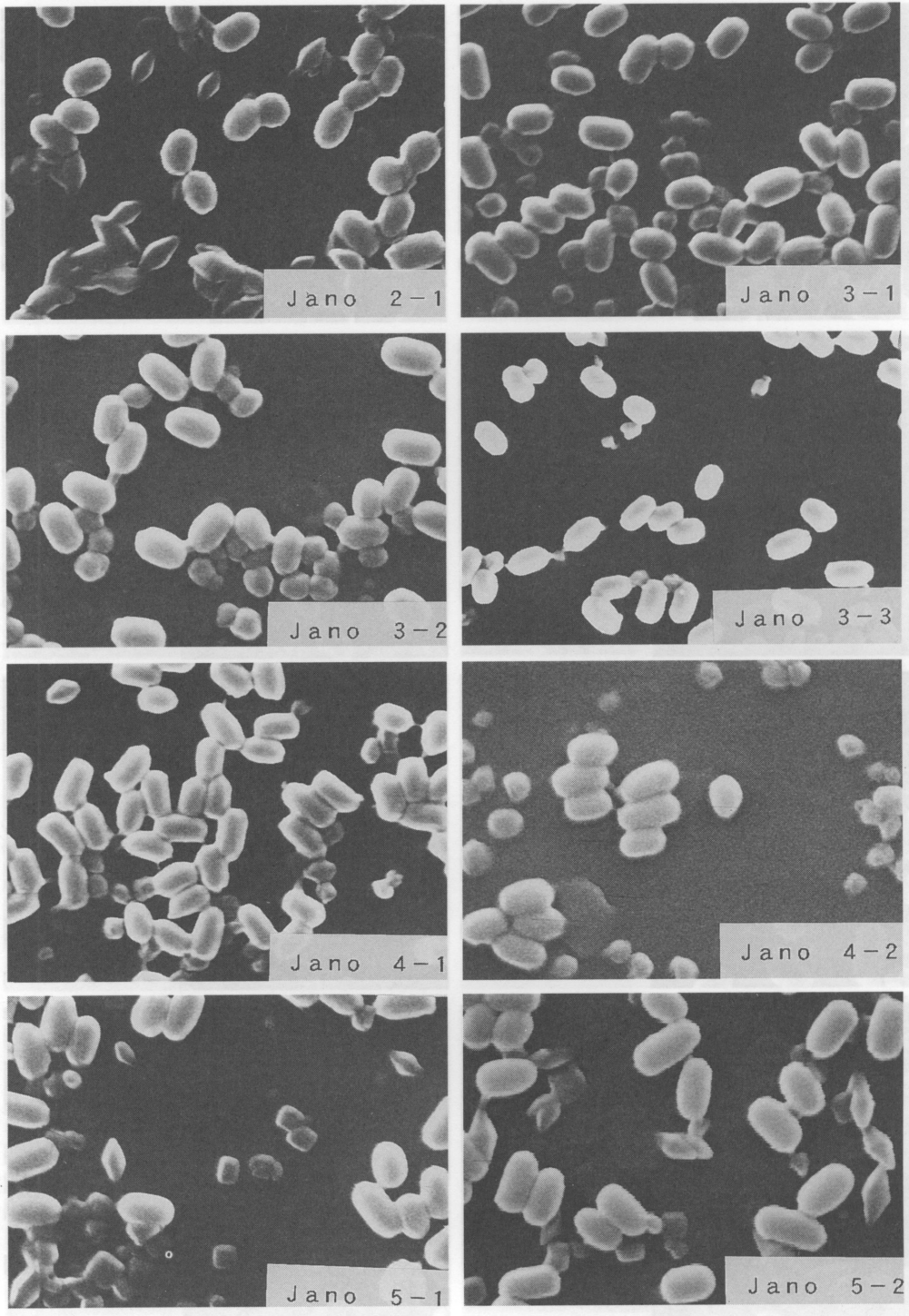


Fig. 4 分離された *Bacillus thuringiensis* の芽胞および結晶タンパク質の形態(3)

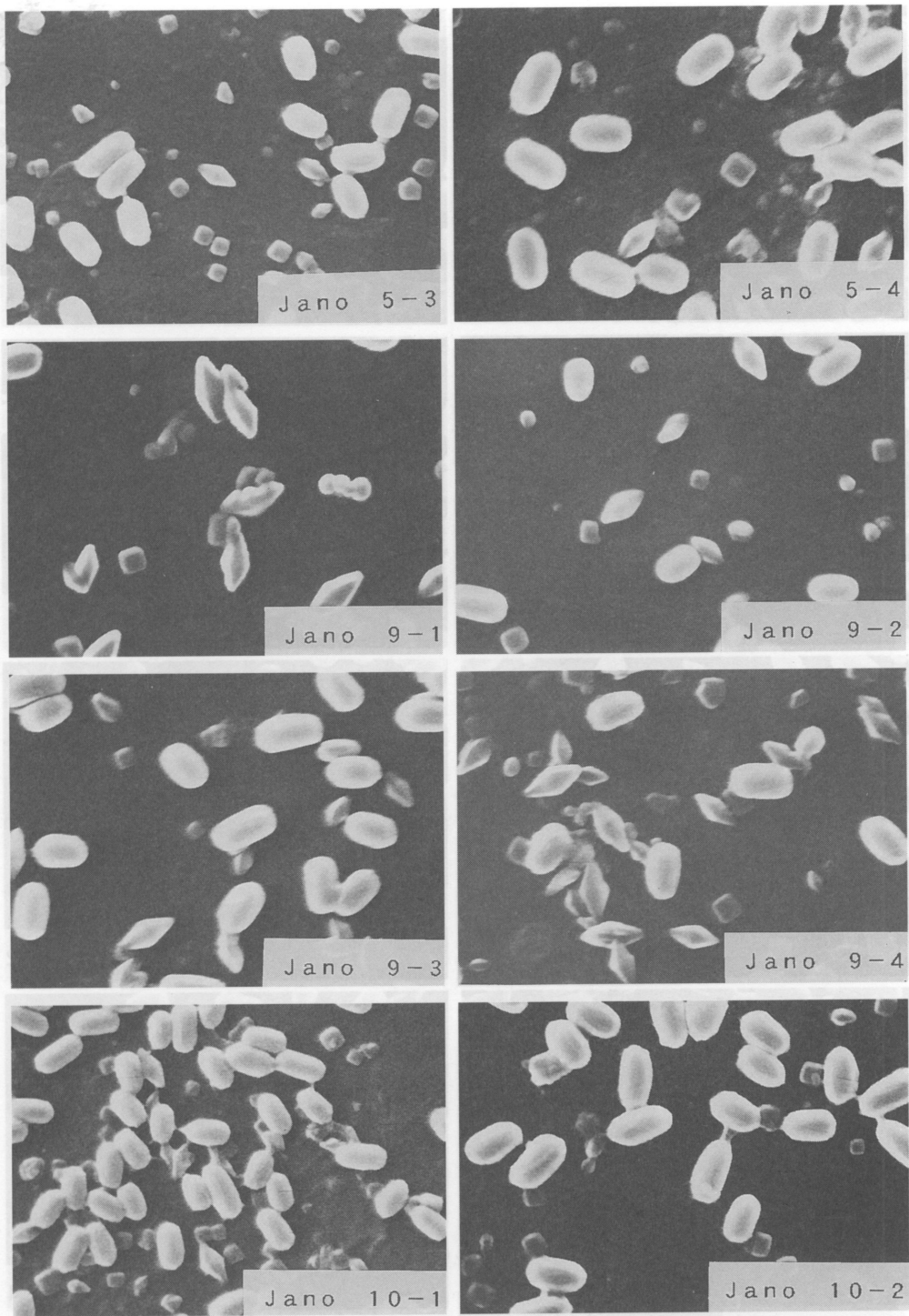


Fig. 5 分離された *Bacillus thuringiensis* の芽胞および結晶タンパク質の形態(4)

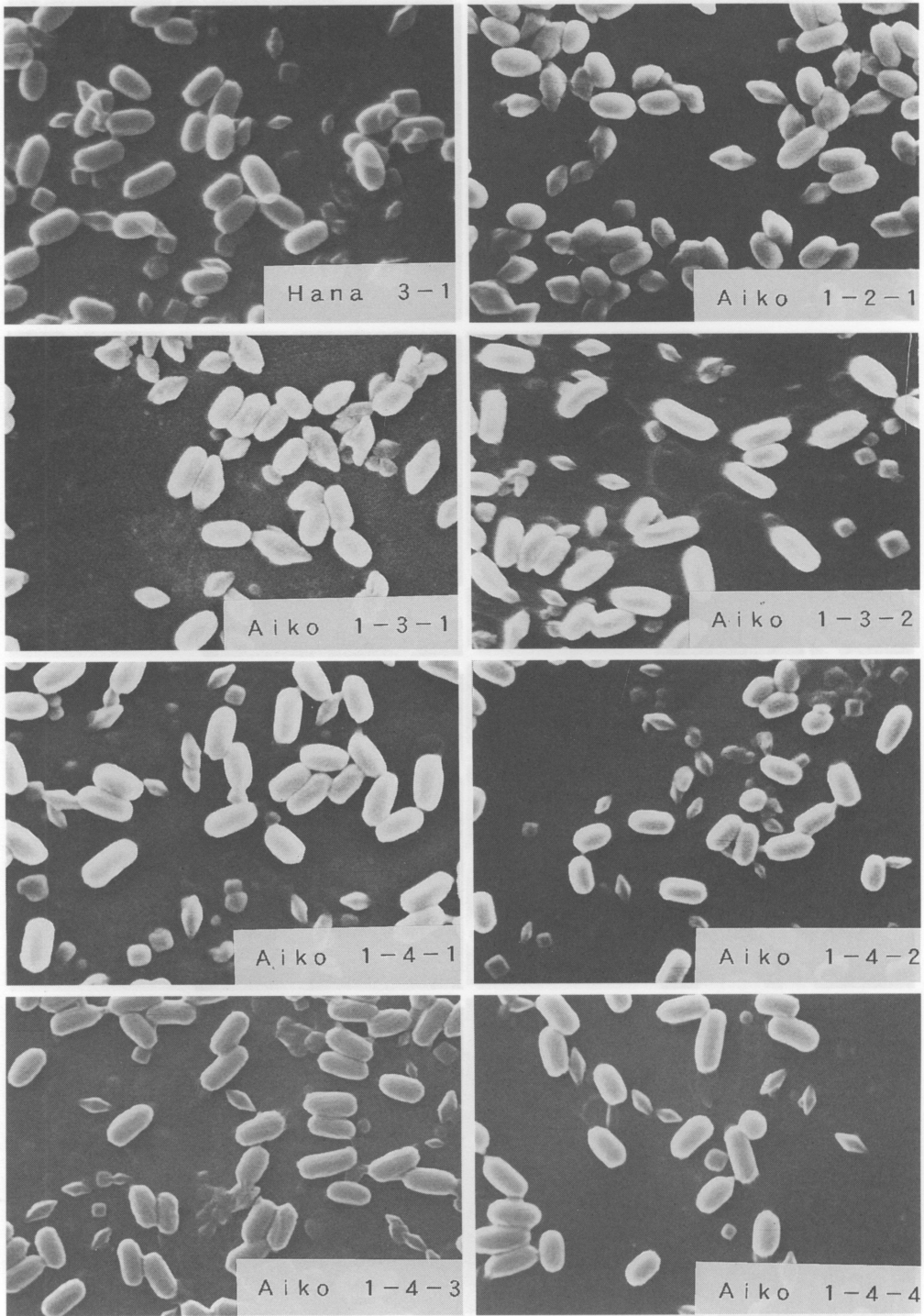


Fig. 6 分離された *Bacillus thuringiensis* の芽胞および結晶タンパク質の形態(5)

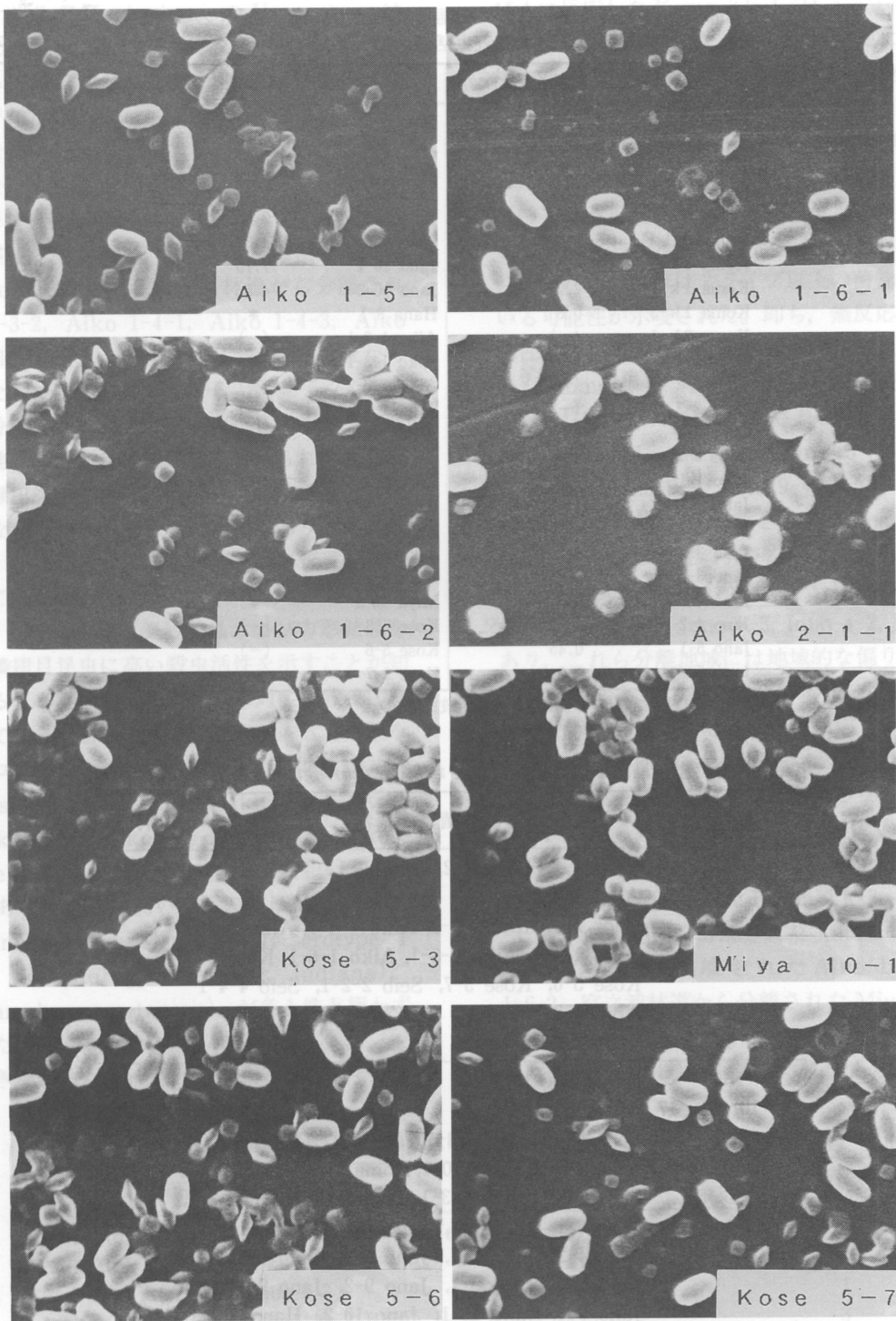


Fig. 7 分離された *Bacillus thuringiensis* の芽胞および結晶タンパク質の形態(6)

Table 9 屋久島土壌において分離された *B. thuringiensis* の蚕（5 齢起蚕）に対する殺虫活性

菌株	殺虫活性(LD50)	菌株	殺虫活性(LD50)
Seib 1-2-1	(-) mg	Jano 5-3	(-) mg
Seib 2-3-1	(-)	Jano 5-4	1.0
Seib 2-2-1	*	Jano 9-1	7.75
Seib 2-4-1	(-)	Jano 9-2	2.25
Seib 4-3-1	(-)	Jano 9-3	7.75
Seib 4-4-1	*	Jano 9-4	4.5
Koma 1k-1	4.5	Jano 10-1	7.75
Koma 1k-2	2.25	Jano 10-2	4.5
Koma 1k-3	0.8	Hana 3-1	*
Koma 3k-1	(-)	Aiko 1-2-1	(-)
Onos 2-1	4.5	Aiko 1-3-1	4.5
Onos 2-2	(-)	Aiko 1-3-2	(-)
Onos 2-3	(-)	Aiko 1-4-1	(-)
Onos 4-1	(-)	Aiko 1-4-2	(-)
Onos 4-2	9.0	Aiko 1-4-3	*
Jano 1-1	4.5	Aiko 1-4-4	(-)
Jano 2-1	(-)	Aiko 1-5-1	(-)
Jano 3-1	(-)	Aiko 1-6-1	(-)
Jano 3-2	9.0	Aiko 1-6-2	*
Jano 3-3	(-)	Aiko 2-1-1	(-)
Jano 4-1	9.0	Miya 10-1	*
Jano 4-2	(-)	Kose 5-3	(-)
Jano 5-1	0.45	Kose 5-6	(-)
Jano 5-2	1.0	Kose 5-7	(-)

「(-)」無殺虫活性, 「*」LD50 未検定殺虫活性株

Table 10 屋久島土壌において分離された *B. thuringiensis* のH-セロタイプ

H-セロタイプ	菌株名	菌株数
1	Onos 4-1, Onos 4-2, Jano 2-1	3
4	Aiko 1-4-2	1
5	Onos 2-2, Aiko 1-3-2, Aiko 1-4-1, Aiko 1-4-3, Aiko 1-4-4, Aiko 1-5-1, Aiko 1-6-1, Kose 5-3, Kose 5-6, Kose 5-7, Seib 2-2-1, Seib 4-4-1	12
16	Aiko 1-2-1	1
18	Onos 2-3	1
lor4	Koma 3k-1	1
3, 10, 11, 17	Aiko 2-1-1	1
全反応	Seib 2-4-1, Seib 4-3-1, Jano 1-1, Aiko 1-3-1, Aiko 1-6-2, Miya 10-1, Koma 1k-2, Koma 1k-3	8
無反応	Seib 1-2-1, Seib 2-3-1, Koma 1k-1, Onos 2-1, Jano 3-1, Jano 3-2, Jano 3-3, Jano 4-1, Jano 4-2, Jano 5-1, Jano 5-2, Jano 5-3, Jano 5-4, Jano 9-1, Jano 9-2, Jano 9-3, Jano 9-4, Jano 10-1, Jano 10-2, Hana 3-1	20

た。今後より詳細な生態学的検討が必要と思われる。

菊田 (1990) は北海道における土壌から分離された *B. thuringiensis* において結晶タンパク質形態と殺虫活性について検討し、菱形、方形結晶および菱形、方形を有する *B. thuringiensis* は鱗翅目昆虫殺虫活性株であることを示した。本実験において菱形、方形、結晶および菱形、方形結晶を有しながら鱗翅

目昆虫殺虫活性の無い株が分離された。即ち、Onos 2-2, Onos 2-3, Jano 5-3, Aiko 1-3-2, Aiko 1-4-1, Aiko 1-4-2, Aiko 1-4-4, Aiko 1-5-1, Aiko 1-6-1, kose 5-3 kose 5-6, kose 5-7 の12株は、菱形、方形結晶および菱形、方形、結晶を持っているにもかかわらず、鱗翅目昆虫に殺虫活性が無く、菊田 (1990) の報告とは異なる結果となった。

分離された *B.thuringiensis* の H-serotype は Table 10 に示した。即ち、本実験で用いた 24 亜種の抗体によって同定できたのは 18 株で、分離された 48 菌株の内 37.5% であった。他の 31 株については同定できなかった。

H-serotype が決定できた菌株は H-serotype 5 (serovar galleriae) が 12 株で H-serotype 同定株の 66.6% を占めた。即ち、尾之間自然公園から分離された Onos 2-2, 小瀬田愛子岳林道から分離された Aiko 1-3-2, Aiko 1-4-1, Aiko 1-4-3, Aiko 1-4-4, Aiko 1-5-1, Aiko 1-6-1, 小瀬田神社から分離された Kose 5-3, Kose 5-6, Kose 5-7, 西部林道から分離された Seib 2-2-1, Seib 4-4-1 で分離地域は 4 地域に限られ地域に偏りが見られた。分離地域の小瀬田愛子岳林道, 西部林道は人の出入りは極度に少ない自然の保全された地域であり, 尾之間自然公園, 小瀬田神社は樹木が人工的に管理保存された地域であった。

serovar galleriae は菱形結晶および方形結晶を産生し, 鱗翅目昆虫に高い殺虫活性を示すことが知られている。本実験の結果カイコに対する殺虫活性株は 1 株で, その他 11 株は H-serotype 5 とされながらカイコに殺虫活性を示さなかった。即ち, Onos 2-2, Onos 2-3, Aiko 1-3-2, Aiko 1-4-1, Aiko 1-4-2, Aiko 1-4-4, Aiko 1-5-1, Aiko 1-6-1, kose 5-3, kose 5-6, kose 5-7 については新しいタイプの菌株である可能性が高い。その他は H-serotype 1 (serovar thuringiensis) が 3 株, H-serotype 4 (serovar kenya), 16 (serovar indiana), 18 (serovar kurmamotoensis), が各 1 株と極わずかであった。

同定できなかった 31 菌株は, H-serotype 1 およ

び 4 に反応した Koma 3k-1, H-serotype 3, 10, 11, 17 に反応を示した Aiko 2-1-1, 更に, 本試験で用いた 24 亜種の抗体に無反応株または全反応株に大別された。

即ち, 無反応株とされたのは 20 菌株で全体の 41.6% となった。これらの菌株は供試 24 亜種以外の亜種である可能性が示唆されたが, 20 菌株の内カイコに殺虫活性を有する株と有さない株とに大別され, これらの菌株は 2 タイプ以上の菌株が混在している可能性が示唆された。即ち, 無反応株の内殺虫活性を有していたのは尾之間子間姫神社から分離された Komalk-1, 尾之間自然公園から分離された Onos 4-1, 蛇の口林道分離された Jano 3-4, Jano 4-1, Jano 5-1, Jano 5-2, Jano 5-4, Jano 9-1, Jano 9-2, Jano 9-3, Jano 9-4, Jano 10-1, Jano 10-2, 花山林道から分離された Hana 3-1 であった。また, 殺虫活性の有さない株は西部林道から分離された Seib 1-2-1, Seib 2-3-1, 蛇の口林道分離された Jano 3-1, Jano 3-3, Jano 4-2, Jano 5-3 であり, これら分離地域には地域的な偏りがあった。

全反応株とされたのは全体の 16.6% の 8 菌株であった。これらは鞭毛抗原抗体反応では大別できないタイプの菌株である可能性が示唆されたが, 更にカイコに殺虫活性を有する株と有さない株とに大別され, これらの菌株も 2 タイプ以上の菌株が混在していた。即ち, 殺虫活性を有していたのは尾之間子間姫神社から分離された Koma 1k-2, Koma 1k-3, 蛇の口林道から分離された Jano 1-1, 小瀬田愛子岳林道から分離された Aiko 1-3-1, Aiko 1-6-2, 宮之浦林道から分離された Miya 10-1 の 6 株, 殺虫活性を有していないのは西部林道から分離された Seib 2-4-1, Seib 4-3-1 であった。

Table 11 屋久島土壌において分離された *B. thuringiensis* の保有する cry I 遺伝子

Cry I 遺伝子	菌株名	菌株数
A(a), A(b), A(c)	Jano 5-3, Jano 5-4, Jano 9-1, Jano 9-2, Jano 9-3, Jano 9-4	6
A(a), A(b), A(c), B, D	Aiko 1-3-2	1
A(a), A(b), A(c), C, F	Onos 2-3	1
A(a), A(b), A(c), D	Koma 1k-1, Koma 1k-2, Koma 1k-3	3
A(b), A(c)	Onos 2-1, Koma 3k-1	2
A(b), A(c), C	Jano 5-1, Jano 5-2	2
A(b), A(c), D	Aiko 1-3-1	1
A(b), A(c), D, F	Aiko 1-4-1	1
A(b), A(c), F	Jano 10-2	1
A(b), B, D	Jano 10-1	1
A(b), C	Seib 1-2-1, Seib 2-3-1	2
A(b), C, D, F	Aiko 1-2-1, Hana 3-1	2
A(b), D	Aiko 1-4-2	1

PCR法によって増幅された *B. thuringiensis* が有する cry I 遺伝子については Table 11 に示した。cry I 遺伝子を保有した菌株は、本実験で分離された 48 株の内 24 菌株において認められ、総分離株の 50% を占めた。cry I 遺伝子を保有した菌株 24 菌株は、cry I 遺伝子 A (a), A (b), A (c), B, C, D, E, F を複数保有し、その組み合わせによって 13 タイプに大別された。即ち、A (a), A (b), A (c) を持つタイプ；Jano 5-3, Jano 5-4, Jano 9-1, Jano 9-2, Jano 9-3 および Jano 9-4 の 6 株。A (a), A (b), A (c), D タイプ；Koma1k-1, Koma1k-2 および Koma1k-3 の 3 株。A (b), A (c) タイプ；Onos 2-1, Koma 3 k-1 の 2 株。A (b), A (c), C タイプ；Jano 5-1 および Jano 5-2 の 2 株。A (b), C タイプ；Seib 1-2-1 および Seib 2-3-1 の 2 株。A (b), C, D, F タイプ；Aiko 1-2-1 および Hana 3-1 の 2 株。A (a), A (b), A (c), B, D タイプ；Aiko 1-3-2。A (a), A (b), A (c), C, F タイプ；Onos 2-3。A (b), A (c), D タイプ；Aiko 1-3-1。A (b), A (c), D, F タイプ；Aiko 1-4-1。A (b), A (c), F タイプ；Jano 10-2。A (b), B, D タイプ；Jano 10-1。A (b), D タイプ；Aiko 1-4-2 で各 1 株であった。

これらの結果、A (a), A (b), A (c) タイプは蛇の口林道、A (a), A (b), A (c), D タイプは子間姫神社からの分離菌株に限られており、地域的にやや偏りが見られた。

cry I 遺伝子は鱗翅目昆虫に対して殺虫活性を示す。しかし、本実験では cry I 遺伝子を保有しないで蚕に対して殺虫活性を示した菌株が得られた。即ち、Seib 2-2-1, Seib 4-4-1, Onos 4-2, Jano 1-1, Jano 3-2, Jano 4-1, Aiko 1-4-3, Aiko 1-6-2, Miya 10-1, Kose 5-3 の計 10 菌株であり、cry I 遺伝子を有していないことがわかった。これらの菌株は既存の cry I 遺伝子以外の鱗翅目昆虫殺虫活性遺伝子を保有していたことにより新しい cry I 遺伝子の分離の可能性を示した。

屋久島において検索された cry I 遺伝子パターンにおいて、北海道からの分離株と共通なタイプは A (a), A (b), A (c), C, F タイプ, A (b), A (c), C タイプおよび A (b), C タイプの 3 タイプで他のタイプは北海道および屋久島に特異なタイプであった(未発表)。この結果 *B. thuringiensis* における殺虫活性の特性からみると、北海道および屋久島における分離株は cry I 遺伝子組み合わせにおいて著しく異なっていた。*B. thuringiensis* はその土地の気候風土に適応して分布しており、北海道と屋久島

においては地域的特性を有しているという結果が得られた。

また、本実験における分離 *B. thuringiensis* の中には、新亜種が含まれている可能性も示唆された。

IV 摘 要

本実験は *B. thuringiensis* の地域的分布の特徴を知ることおよび優良菌株の検索を目的とし、屋久島の 35 地域 182 地点の土壌を採取して *B. thuringiensis* を分離した。その結果、10 地域 26 地点から 48 菌株分離された。

分離された *B. thuringiensis* の結晶タンパク質形態は菱形結晶タンパク質のみを有するタイプ、菱形結晶タンパク質と方形結晶タンパク質を混在するタイプ、菱形結晶タンパク質、方形結晶タンパク質、および不定形結晶タンパク質の 3 種を混在するタイプ、粒状結晶タンパク質、または不定形結晶タンパク質を有するタイプの 4 タイプだった。

本実験で分離された *B. thuringiensis* の中でカイコに殺虫活性が認められたのは 24 菌株でその割合は 50% であった。

本実験で分離された *B. thuringiensis* の中で、H 抗原タイプが決定されたのは、18 菌株 (5 タイプ) で、残りの 30 菌株は同定できなかった。同定できなかった菌株の内、H-抗血清に全反応した株が 8 株、無反応株が 20 株あった。これら全反応株および無反応株それぞれに、殺虫活性が有るものと無殺虫活性のものがあり、それぞれに 2 タイプ以上の菌株が混在した。

本実験で分離された菌株の中で cry I 遺伝子を保有した菌株は 24 菌株で、分離菌株の 50% であった。分離された菌株の cry I 遺伝子はその組み合わせによって 13 タイプに大別された。分離された菌株で cry I 遺伝子保有しない菌株の中で、カイコに対する殺虫活性を有した菌株が得られた。このことは新しいタイプの遺伝子を有している可能性が示唆された。

V 引用文献

- 1) 飯塚敏彦, 1989. 殺虫性タンパク質とその利用. 化学と生物, 27 (5): 287-302.
- 2) 山本敬司, 飯塚敏彦, 1984. *Bacillus thuringiensis* の生産する殺虫性菌体内毒素. 蛋白質・核酸・酵素 29: 444-454.
- 3) 菊田治典, 1990. 北海道における土壌および死亡昆虫から分離された *Bacillus thuringiensis* 株の検索. 酪農学園大学紀要, 15, No.1/2: 1

- 69.
- 4) 佐々木潤, 浅野真一郎, 伴戸久徳, 飯塚敏彦, 1994. 北海道の土壤から分離した *Bacillus thuringiensis* 株の性状. 日蚕雑, 63: 361-366.
 - 5) 石川義文, 林田 勉, 井川 晃, 1964. 愛知県の養蚕家のほりから *Bacillus thuringiensis* の検索. 日蚕雑 33: 480-483.
 - 6) 小野恵子, 渡辺 仁, 1983. わが国における *Bacillus thuringiensis* の地域分布について. 日蚕雑 52: (1), 47-50.
 - 7) 湯本貴和, 1990. 屋久島. 講談社. 1-201.
 - 8) 菊田治典・浅野真一郎・飯塚敏彦, 1989. 北海道の土壤から分離された *Bacillus thuringiensis*. -喜茂別町, 蘭越町, ニセコ町からの分離株-. 北大農邦文紀要, 16 (4) 383-389.
 - 9) 菊田治典, 橋本明, 坂本与市, 飯塚敏彦, 1990. 北海道における土壤から分離された *Bacillus thuringiensis*. 野幌森林公園からの分離株. 酪農学園大学紀要, 14 (2): 189-197.
 - 10) Nadine B. Carozzi, Vance Kramer, Gregory W. Warren, Stephen Evola, and Michael G. Koziel, 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles. Appl. Environ. Microbiol. 57: 11, 3057-3061.
 - 11) 浅野真一郎, 伴戸久徳, 飯塚敏彦, 1993. PCR法による *Bacillus thuringiensis* Cry II 遺伝子の増幅と同定. 日蚕雑, 62: 223-227.

Summary

In this research, isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil samples collected on Yakushima Island was conducted and the insecticidal crystal protein genes of those isolates identified.

48 *B.thuringiensis* isolates were obtained from 32 of a total of 182 sampling points covering several areas. Morphological examinations of these isolates were conducted using a scanning electron microscope and 4 types of crystal forms were observed: bipyramidal, cuboidal, mixed bipyramidal and cuboidal, and irregular.

Insecticidal activity against the silkworm, *Bombyx mori*, was detected in 24 strains out of the 48. Six serovars in 18 strains were identified for H-serotype and another 30 strains were untypable. cry I gene probes were conducted for the DNA of each of the 48 isolates. Of these isolates, 24 strains (50%) were found to include cry I genes.