

## 屋久島土壌から分離された*B.thuringiensis* (2)

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	683
掲載ページ	p. 225-235
発行年月	1999年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 屋久島土壌から分離された *B. thuringiensis* II. 殺虫活性と *cry* 遺伝子

菊田 治典<sup>1)</sup>・黒岩 学<sup>1)</sup>・高木龍一郎<sup>1)</sup>・飯塚 敏彦<sup>2)</sup>

1) 酪農学園大学酪農学部

2) 北海道大学農学部

(1999年4月21日 受理)

HARUNORI KIKUTA<sup>1)</sup>, MANABU KUROIWA<sup>1)</sup>, RYUICHIRO TAKAGI<sup>1)</sup> and TOSHIHIKO IIZUKA<sup>2)</sup>: Study on the isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* in soil samples from Yakushima Island (II) Insecticidal activity and the identification of cry genes

We previously reported that 53 *B. thuringiensis* Isolates in soils from Yakushima Island were serologically investigated. In the present study, the insecticidal activity of these strains against the silkworm *Bombyx mori* and the mosquito larvae *Aedes japonicus* was investigated and the identification of cry genes in these strains was conducted using the PCR method.

Oligonucleotide primers used for making DNA probes were *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Ea*, *cry2Aa*, *cry4Aa*, *cry1Ba*, *cry10Aa* and *cry 11Aa* genes, depending on their specific nucleotide domains.

Cry gene profiles of 24 serovar *kurstaki* strains were the same for *cry1Aa*, *cry1Ab* and *cry1Ac* with a type strain of HD-1, except for *cry1Aa* the Jano9-2-2 strain composed of *cry1Aa* and *cry1Ab*. All of the strains included the *cry2Aa* gene.

In the 14 strains of serovar *galleriae*, all of the strains included the same *cry1Ab* and *cry2Aa* genes as the type strain.

In the other serovar from Yakushima Island, *thuringiensis*, *kenyae* and *israelensis* strains displayed different profiles from the type strains used in this experiment.

Serovar *kurstaki* Jano9-2-2 revealed high insecticidal activity against silkworm larvae compared with the control strain HD-1.

Serovar *israelensis* Aiko2-1-1 also revealed high activity against the *Aedes japonicus* larvae compared with the type strain. These two strains seem to include novel cry genes.

1) *Rakuno Gakuen University, Ebetsu 069-8501, Japan*; 2) *Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan*

Key words: *B. thuringiensis*, isolates, Yakushima Island, insecticidal, cry gene.

*B. thuringiensis* が産生する殺虫性結晶タンパク質 (ICP) 遺伝子の DNA 解析が SCHNEPF *et al.*,

(1985); SHIBANO *et al.*, (1985); ADANG *et al.*, (1985) によりなされて以来, これまでに報告された 42 種の *B. thuringiensis* の遺伝子が HÖFTE and WHITELEY (1989) により, 各遺伝子の持つ殺虫活性スペクトルと産生される結晶タンパク質のアミノ酸

1) 〒069-8501 江別市文京台緑町

2) 〒069-8589 札幌市北区 9 条 9 丁目

相同性を基に, *cryI* (鱗翅目昆虫活性), *cryII* (鱗翅目・双翅目昆虫活性), *cryIII* (鞘翅目昆虫活性) および *cryIV* (双翅目昆虫活性) に分類された。その後, 線虫に対して殺虫性を有する *cryV* と *cryVI* が報告され (FEITELSON, 1992), *cry* 遺伝子は改めて整理され, 27 種のグループに分類された (CRICK-MORE, 1998; 飯塚, 1997)。*cry* 遺伝子構造ならびに殺虫活性スペクトルが解明されるに従って, 新しい *cry* 遺伝子を有する *B. thuringiensis* 菌株の検索が生物殺虫剤開発の今後の方向ともなっている (YAMAMOTO, 1993; IIZUKA, 1994)。従って, 自然界に未だ埋もれたままになっている新しい殺虫スペクトルを有する遺伝子探索は今後益々重要な手法となる。

本実験では, 屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* について, カイコ, *Bombyx mori* ならびにヤマトヤブカ *Aedes japonicus* に対する殺虫検定を行うとともに, これら菌株の *cry* 遺伝子保有状況を PCR 法によって検索し, 2, 3 の優良菌株を明らかにしたので報告する。

#### 材料および方法

##### 1) 供試菌株ならびに殺虫活性検定供試菌株の純化

供試菌株は, 菊田ら (印刷中) が屋久島土壌から分離した *B. thuringiensis* 53 株および type strain 基準株 13 株とした。

殺虫活性検定に用いた供試菌株は培養時に放出される酵素系の夾雑物を除去するために菊田 (1990) の方法を改変して精製した。即ち, 供試菌株を 9 cm のペトリシャーレ肉エキスポリペプトン寒天平板培地で 30°C 5 日間培養し, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を用いて集菌した。集菌した菌液は遠心分離 (10,000 rpm, 10 分間) によって上清を除去した後, 1 M-NaCl buffer を加え混和し, 超音波破砕機 Handy Sonic (東亜電波工業株式会社製) によって洗浄処理し, 遠心分離 (10,000 rpm, 10 分間) してペレットを得た。これら一連の洗浄を 3 回繰り返してペレットを得た。得られたペレットは, 更に滅菌蒸留水に懸濁し, 遠心分離する操作を 3 回繰り返した後, 乾燥, 計量し, 殺虫活性検定供試菌株とした。

##### 2) 生物検定

屋久島で分離した *B. thuringiensis* 53 株は 5 齢起蚕 (*Bombyx mori*) および卵から孵化後飼育を行い体長 5 mm に生長したヤマトヤブカ (*Aedes japonicus*) を供試して生物検定を行なった。

##### 3) 殺虫性結晶タンパク質遺伝子の検索

###### ① 供試 DNA の抽出

供試 DNA の抽出は CARROZZI (1991) の方法を改変して行った。即ち, 供試菌株は L 型試験管を用い, 肉エキスポリペプトン液体培地で, 30°C, 16 時間モノ振盪培養した。培養後, 培養液は遠心分離 (10,000 rpm, 10 分間) し, 上清を除去してペレットを得た。得られたペレットは 500  $\mu$ l 滅菌蒸留水に懸濁し, 98°C, 10 分間処理後, 遠心分離 (15,000 rpm, 1 分間) し, 上清液を分取した。分取した上清液に 500  $\mu$ l クロロホルム/イソプロピルアルコールを加えて懸濁し, 遠心分離 (12,000 rpm, 3 分間) し, 2 層の内上層液を分取した。上層液に 99.9% エタノール 1 ml を加え懸濁し, -20°C で 1 時間インキュベートし, その後, 遠心分離 (15,000 rpm, 15 分間) ・上清の除去を行い, 20 分間脱気を行い DNA を得た。得られた DNA に 20  $\mu$ l 滅菌蒸留水を加えて供試 DNA とした。

###### ② *cry* 遺伝子の検索

本実験の生物検定に供した昆虫がカイコとヤマトヤブカであることから次の *cryIAa*, *IAb*, *IAC*, *IBa*, *ICa*, *IDa*, *IEa*, *IFa*, *2Aa*, *4Aa*, *4Ba*, *10Aa*, *11Aa* 遺伝子のプローブを作り同定をおこなった。

DNA プローブを作るために用いた oligonucleotide primer は, *cryI* グループについては KALMAN *et al.* (1993), *cry2* は ASANO *et al.* (1993), *cry4* ならびに *cry10*, *cry11* については ASANO (1996) に基づき調製した (Table 1, 2, 3)。

*cry* 遺伝子の増幅は, PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によって行った。即ち, PCR 反応液 (DNA sample, 5  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer (500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.2% Gelatin), 3  $\mu$ l; dNTP Mixture, 3  $\mu$ l; Taq DNA-polymerase, 1  $\mu$ l; Primer Mixture, 20  $\mu$ 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 分間, 2 本鎖 DNA の熱変性に 92°C 1 分間, プライマーのアニーリングに 53°C 1 分間, DNA 合成に 72°C 1 分間を 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 5°C で冷却保存した。

PCR 法によって増幅された *cry* 遺伝子は, 2% アガロースゲル電気泳動法により解析した。即ち, PCR 反応液を 6  $\mu$ l 分取し, PCR 用 Sample buffer (50% グリセロール, 0.25% ブロモフェノールブ

Table 1. Characteristics of primers used for *cryI* gene screening.

Primer	Sequence						Gene	bp.size
<i>cryI</i> TYIAA	5'-GAGCC	AAGCA	GCTGG	AGCAG	TTTAC	ACC-3'	<i>cryIAa</i>	724
<i>cryI</i> TYIAB	5'-TCGAA	TTGAA	TTTGT	TCCGG	CAGAA	GTA-3'	<i>cryIAb</i>	238
<i>cryI</i> TYIAC	5'-TCACT	TCCCA	TCGAC	ATCTA	CC-3'		<i>cryIAc</i>	487
<i>cryI</i> TYIB	5'-GTCAA	CCTTA	TGAGT	CACCT	GGGCT	TC-3'	<i>cryIBa</i>	830
<i>cryI</i> TYIC	5'-CAACC	TCTAT	TTGGT	TCAGG	TTC-3'		<i>cryICa</i>	288
<i>cryI</i> TYID	5'-GGTAC	ATTTA	GATAT	TCACA	GCCAC-3'		<i>cryIDa</i>	414
<i>cryI</i> TYIE	5'-CTTAG	GGATA	AATGT	AGTAC	AG-3'		<i>cryIEa</i>	880
<i>cryI</i> TYIF	5'-CCGGT	GACCC	ATTAA	CATTC	CAATC-3'		<i>cryIFa</i>	368
<i>cryI</i> Reverse	5'-ATCAC	TGAGT	CGCTT	CGCAT	GTTTG	ACTTT CTC-3'		

Table 2. Characteristics of primers used for *cryII* gene screening.

Primer	Sequence					Gene	bp.size
<i>cryII</i> AgeneF	5'-CAGAT	ACCCT	TGCTC	GTGTA	A-3'	<i>cry2Aa</i>	1,070
<i>cryII</i> AgeneR	5'-ATAGG	CCCGT	GCTCC	ACCAG	G-3'		

Table 3. Characteristics of primers used for *cryIV* gene screening.

Primer	Sequence					Gene	bp.size
<i>cryIV</i> A4D35	5'-GGTGC	TTCCT	ATTCT	TTGGC-3'		<i>cry4Aa</i>	1,288
<i>cryIV</i> A4D33	5'-TGACC	AGGTC	CCTTG	ATTAC-3'			
<i>cryIV</i> B4D15	5'-CGAGG	TGAAA	TTTGC	TCC-3'		<i>cry4Ba</i>	1,132
<i>cryIV</i> B4D13	5'-ATGGC	TTGTT	TCGCT	ACATC-3'			
<i>cryIV</i> C4D45	5'-ATGAA	TCCAT	ATCAA	AATAA G-3'		<i>cry10Aa</i>	2,040
<i>cryIV</i> C4D43	5'-AAGAA	CTTTG	TTTTA	ATTAA C-3'			
<i>cryIV</i> D4D55	5'-ATGGA	AGATA	GTTCT	TTAGA T-3'		<i>cry11Aa</i>	1,933
<i>cryIV</i> D4D53	5'-CTACT	TTAGT	AACGG	ATT-3'			

ルー), 6  $\mu$ l 混合し, 2%アガロースゲルのサンプル  
 コームに充填し, 電気泳動 (100 V, 60 分間) に供し  
 た。泳動 buffer は TAE buffer を用いた。マーカー  
 には, 制限酵素 Hind III にて反応させた DNA  
 ( $\lambda$  Hind III マーカー) を用いた。泳動されたゲルをエ  
 チジウムプロマイド染色液 (50  $\mu$ g エチジウムプロ  
 マイド/ml 水溶液) に 20 分間浸し, 紫外線 (312  
 nm) 照射して観察した。

## 結 果

### 1) 屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* の *cry* 遺伝子プロファイル

#### ① *cryI* 遺伝子プロファイル

屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* 53 株  
 の *cryI* 遺伝子保有状況を H-serotype ごとに大別  
 し, Table 4 に示した。

本実験で分離した serovar *thuringiensis* 3 株  
 Jano 2-1, Onos 4-1 ならびに Koma 3k-1 は  
 Jano 2-1 および Onos 4-2 が *cryIEa* または  
 Ba, Ac, Ab を保有し基準株 *thuringiensis* HS に一

致した。しかし, Koma 3k-1 は本実験で検索した  
*cryI* 遺伝子を保有していなかった。

本実験で分離した H 3 a, 3 b, 3 c (serovar *kur-  
 staki*) Jano 9-2-2 のみが *cryIAc, Ab* 遺伝子を保  
 有していたのに対し, 他の 23 株は全て *cryIAa, Ac,  
 Ab* を保有しており, *kurstaki* HD-1 に一致した。

H 3 a, 3 d (serovar *sumiyoshiensis*) に属する 6  
 株 Jano 3-1, Jano 3-2, Jano 3-3, Jano 4-1,  
 Jano 4-2 および Miya 10-1 は, それぞれ電気泳  
 動像の *cryIAc, Da, Ab* 位置に微弱な反応が認めら  
 れた。H 4 a, 4 c (serovar *kenyae*) の Aiko 1-4-  
 2 が *cryIAc, Ab* を保有し, Onos 2-3 は *cryIAb* を  
 保有していた。H 5 a, 5 b (serovar *galleriae*) の 14  
 株 Seib 2-2-1, Seib 4-4-1, Aiko 1-3-2,  
 Aiko 1-4-1, Aiko 1-4-3, Aiko 1-4-4, Aiko  
 1-5-1, Aiko 1-6-1, Aiko 1-6-2, Kose 5-  
 3, Kose 5-6, Kose 5-7, Onos 2-2, Onos 4-  
 2 は, 全て基準株と同様 *cryIAb* を保有していた。  
 H 14 (serovar *israelensis*) の分離株 Aiko 2-1-1  
 は基準株が *cryI* 遺伝子を保有していないのに対し,

Table 4. *CryI* genes profile of *B. thuringiensis* isolates from Yakushima Island.

H-serotype (subspecies)	strain	<i>cry</i> genes	H-serotype (subspecies)	strain	<i>cry</i> genes
1 ( <i>thuringiensis</i> )	<i>thuringiensis</i> HS*	<i>cryIEorB</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	3a, 3d ( <i>sumiyoshiensis</i> )	<i>sumiyoshiensis</i> *	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **
	Jano 2-1	<i>cryIEorB</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		Jano 3-1	light <i>cry2Ac</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **
	Onos 4-1	<i>cryIEorB</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		Jano 3-2	light <i>cry3Ac</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **
	<i>thuringiensis</i> BA-068*	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>		Jano 3-3	light <i>cry4Ac</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **
	<i>thuringiensis</i> 996*	<i>cryIAb</i>		Jano 4-1	light <i>cry5Ac</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **
	Koma 3k-1	None		Jano 4-2	light <i>cry6Ac</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **
	<i>kurstaki</i> HD-1*	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		Miya 10-1	light <i>cry7Ac</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **
	<i>kustaki</i> HD-263*	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		<i>kenyae</i> *	<i>cryIAC</i> , <i>Ab</i>
	Hana 3-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		Aiko 1-4-2	<i>cryIAC</i> , <i>Ab</i>
	Jano 1-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		Onos 2-3	<i>cryIAb</i>
	Jano 5-1-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		<i>galleriae</i> A*	<i>cryIAb</i>
	Jano 5-1-2	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		<i>galleriae</i> B*	<i>cryIAb</i>
	Jano 5-2	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>		Seib 2-2-1	<i>cryIAb</i>
Jano 5-3	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Seib 4-4-1	<i>cryIAb</i>		
Jano 5-4	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-3-2	<i>cryIAb</i>		
Jano 9-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-4-1	<i>cryIAb</i>		
Jano 9-2-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-4-3	<i>cryIAb</i>		
Jano 9-3-3	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-4-4	<i>cryIAb</i>		
Jano 9-3-4	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-5-1	<i>cryIAb</i>		
Jano 9-4-4	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-6-1	<i>cryIAb</i>		
Jano 9-4-5	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-6-2	<i>cryIAb</i>		
Jano 9-4-6	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Kose 5-3	<i>cryIAb</i>		
Jano 10-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Kose 5-6	<i>cryIAb</i>		
Jano 10-2	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Kose 5-7	<i>cryIAb</i>		
Koma 1k-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Onos 2-2	<i>cryIAb</i>		
Koma 1k-2	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Onos 4-2	<i>cryIAb</i>		
Koma 1k-3-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>israelensis</i> *	None		
Koma 1k-3-3	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 2-1-1	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i> **		
Koma 1k-3-5	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>indiana</i> *	None		
Onos 2-1-1	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-2-1	None		
Onos 2-1-2	<i>cryIAa</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	Seib 4-3-1	<i>cryIAb</i>		
<i>kurstaki</i> HD-2*	<i>cryIAC</i> , <i>Ab</i>	Aiko 1-3-1	<i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>		
Jano 9-2-2	<i>cryIAC</i> , <i>Ab</i>				
<i>kurstaki</i> HD-73*	<i>cryIEorB</i> , <i>Ab</i>				

\*: Type serover strains used in this experiment.

\*\*: The electrophoretic pattern of the PCR products is light more than the ordinary pattern.

電気泳動像の *cryI*Ac, Da, Ab 位置に微弱な反応が認められた。H 16 (serovar *indiana*) の Aiko 1-2-1 は *cryI* 遺伝子を保有していなかった。

本学保存の *B. thuringiensis* H 抗血清に無反応であった Seib 4-3-1 は, *cryI*Ab を保有していた。運動性が無く H-serotype を判定できなかった Aiko 1-3-1 は, *cryI*Ac, Da, Ab を保有していた。

屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* において, 同一 serotype 内で *cryI* 遺伝子保有状況が異なっていたのは, serovar *thuringiensis*, *kurstaki* および *kenyae* であった。H 1 (serovar *thuringiensis*) に大別された分離株の *cryI* 遺伝子保有タイプは 2 タイプ (*cryIEa* または *Ba*, *Ac*, *Ab* 保有タイプと *cryI* 遺伝子保有しないタイプ), *H3a*, *3b*, *3c* (serovar *kurstaki*) に大別された分離株では 2 タイプ (*cryIAa*, *Ac*, *Ab* 保有タイプと *cryI*Ac, *Ab* 保有タイプ), *H 4a*, *4c* (serovar *kenyae*) のに大別された分離株でも 2 タイプ (*cryI*Ac, *Ab* 保有タイプと *cryI*Ab 保有タイプ) に分類された。

## ② *cry2* 遺伝子プロファイル

屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* の *cry2* 遺伝子保有状況を H-serotype ごとに大別し, Table 5 に示した。

H 3a, 3b, 3c (serovar *kurstaki*) の分離株 24 株, H 4a, 4c (serovar *kenyae*) の Aiko 1-4-2, H 5a, 5b (serovar *galleriae*) の分離 14 株, H 14 (serovar *israelensis*) の Aiko 2-1-1, 運動性が無く H-serotype を判定できなかった Aiko 1-3-1 は, 全て *cry2Aa* 遺伝子を保有していた。

## ③ *cry4*, 10, 11 遺伝子プロファイル

屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* の *cry4* 遺伝子保有状況を H-serotype ごとに大別し, Table 6 に示した。屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* の中, *cry4Aa*, *4Ba*, *10Aa*, *11Aa* を保有していたのは, H 14 の *israelensis* 株と Aiko 2-1-1 株のみで基準株と一致した。

## 2) 屋久島土壌から分離された *B. thuringiensis* 保有の *cry* 遺伝子と殺虫活性

### ①カイコ (*Bombyx mori*) 5 齢起蚕に対する殺虫活性

屋久島から分離された *B. thuringiensis* 株の *cryI*・2 遺伝子保有状況と 5 齢起蚕に対する殺虫活性は, Table 7 に示した。

H 1 (serovar *thuringiensis*) に大別された分離株の中, *cryIEa*, または *Ba*, *Ac*, *Ab*, を保有してい

た 2 株の殺虫活性は, Jano 2-1 が LD<sub>50</sub>, 3.17 μg, Onos 4-1 が LD<sub>50</sub>, 8.91 μg であった。Jano 2-1 と Onos 4-1 は, *cryI*・2 遺伝子保有状況が同じであったが, 殺虫活性が異なっていた。このことから, これら 2 株は, 本実験で同定した *cryI*・2 遺伝子以外の鱗翅目殺虫性 *cry* 遺伝子を保有している可能性が示唆された。また, *cryI* 遺伝子を保有していなかった Koma 4k-1 株も, カイコに対して殺虫活性を有していたことから, 本実験で同定した *cryI*・2 遺伝子以外の鱗翅目殺虫性の *cry* 遺伝子を保有している可能性が示唆された。

H 3a, 3b, 3c (serovar *kurstaki*) に大別された分離株 24 株の中, Jano 9-2-1 の LD<sub>50</sub> が 0.09 μg と最も殺虫活性が高かった。また他の菌株は LD<sub>50</sub> が 0.11~1.12 μg の範囲であった。

H 3a, 3d (serovar *sumiyoshiensis*) の 6 株, H 4a, 4c (serovar *kenyae*) の 2 株, H 5a, 5b (serovar *galleriae*) の 14 株は, いずれも殺虫活性を有しており, 且つ菌株内で変異が認められた。しかし, カイコに対する殺虫活性が強いとされている serovar *kurstaki* HD-1 (IIZUKA and GOTO, 1987) を上回る菌株は Jano 9-2-1 のみであった。

運動性が無く H-serotype が判定できなかった Aiko 1-3-1 は, *cryI*Ac, Da, Ab を保有しており, 殺虫活性 LD<sub>50</sub> 0.11 μg であり, やや強い殺虫活性を示した。

### ②ヤマトヤブカ (*Aedes japonicus*) に対する殺虫活性

屋久島土壌から分離された *B. thuringiensis* の *cryI*・2・4・10・11 遺伝子保有状況と *Aedes japonicus* に対する殺虫活性の比較は, Table 8 に示した。

本実験で分離された 53 株の中, 最も殺虫活性の強い株は基準株と同じプロファイルを有する H 14 (serovar *israelensis*) に同定された Aiko 2-1-1 で LD<sub>50</sub> は 1 ppm であり, この他 *cry2Aa* 遺伝子を有し, H 3a, 3b, 3c (serovar *kurstaki*) に属する Jano 9-3-4 株は LC<sub>50</sub> が 12.5 ppm であった。これらは優良 *cry* 遺伝子を保有する可能性が認められた。

## 考 察

屋久島土壌から分離された 53 株の *B. thuringiensis* は菊田ら (印刷中) の報告で serovar *kurstaki* 24 株, serovar *galleriae* 14 株, serovar *sumiyoshien-*sis 6 株等, 特徴的な H-serotype フローラを示し

Table 5. *Cry2* gene profile of *B. thuringiensis* isolates from Yakushima Island.

H-serotype (subspecies)	strain	<i>cryII</i> gene	H-serotype (subspecies)	strain	<i>cryII</i> gene
1 ( <i>thuringiensis</i> )	<i>thuringiensis</i> HS*	None	3a, 3d ( <i>sumiyoshiensis</i> )	<i>sumiyoshiensis</i> *	None
	<i>thuringiensis</i> BA-068*	None		Jano 3-1	None
	<i>thuringiensis</i> 996*	None		Jano 3-2	None
	Jano 2-1	None		Jano 3-3	None
	Koma 3k-1	None		Jano 4-1	None
	Onos 4-1	None		Jano 4-2	None
				Miya 10-1	None
3a, 3b, 3c ( <i>kurstaki</i> )	<i>kurstaki</i> HD-1*	<i>cry2Aa</i>	4a, 4c ( <i>kenyae</i> )	<i>kenyae</i> *	<i>cry2Aa</i>
	<i>kurstaki</i> HD-2*	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-4-2	<i>cry2Aa</i>
	<i>kurstaki</i> HD-73*	<i>cry2Aa</i>		Onos 2-3	None
	<i>kustaki</i> HD-263*	<i>cry2Aa</i>	5a, 5b ( <i>galleriae</i> )	<i>galleriae</i> A*	<i>cry2Aa</i>
	Hana 3-1	<i>cry2Aa</i>		<i>galleriae</i> B*	<i>cry2Aa</i>
	Jano 1-1	<i>cry2Aa</i>		Seib 2-2-1	<i>cry2Aa</i>
	Jano 5-1-1	<i>cry2Aa</i>		Seib 4-4-1	<i>cry2Aa</i>
	Jano 5-1-2	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-3-2	<i>cry2Aa</i>
	Jano 5-2	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-4-1	<i>cry2Aa</i>
	Jano 5-3	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-4-3	<i>cry2Aa</i>
	Jano 5-4	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-4-4	<i>cry2Aa</i>
	Jano 9-1	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-5-1	<i>cry2Aa</i>
	Jano 9-2-1	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-6-1	<i>cry2Aa</i>
	Jano 9-2-2	<i>cry2Aa</i>	Aiko 1-6-2	<i>cry2Aa</i>	
	Jano 9-3-3	<i>cry2Aa</i>	Kose 5-3	<i>cry2Aa</i>	
	Jano 9-3-4	<i>cry2Aa</i>	Kose 5-6	<i>cry2Aa</i>	
	Jano 9-4-4	<i>cry2Aa</i>	Kose 5-7	<i>cry2Aa</i>	
	Jano 9-4-5	<i>cry2Aa</i>	Onos 2-2	<i>cry2Aa</i>	
	Jano 9-4-6	<i>cry2Aa</i>	Onos 4-2	<i>cry2Aa</i>	
	Jano 10-1	<i>cry2Aa</i>	14 ( <i>israelensis</i> )	<i>israelensis</i> *	<i>cry2Aa</i>
	Jano 10-2	<i>cry2Aa</i>		Aiko 2-1-1	<i>cry2Aa</i>
	Koma 1k-1	<i>cry2Aa</i>	16 ( <i>indiana</i> )	<i>indiana</i> *	None
	Koma 1k-2	<i>cry2Aa</i>		Aiko 1-2-1	None
	Koma 1k-3-1	<i>cry2Aa</i>			
	Koma 1k-3-3	<i>cry2Aa</i>			
	Koma 1k-3-5	<i>cry2Aa</i>			
	Onos 2-1-1	<i>cry2Aa</i>	Untypable	Seib 4-3-1	None
Onos 2-1-2	<i>cry2Aa</i>	Aiko 1-3-1		None	
		Nonmotility			

\*: Type serover strains used in this experiment.

Table 6. *Cry4, 10, 11* genes profile of *B. thuringiensis* isolates from Yakushima Island.

H-serotype (subspecies)	strain	<i>cryIV</i> genes	H-serotype (subspecies)	strain	<i>cryIV</i> genes	
1 ( <i>thuringiensis</i> )	<i>thuringiensis</i> HS*	None	3a, 3d ( <i>sumiyoshiensis</i> )	<i>sumiyoshiensis</i> *	None	
	<i>thuringiensis</i> BA-068*	None		Jano 3-1	None	
	<i>thuringiensis</i> 996*	None		Jano 3-2	None	
	Jano 2-1	None		Jano 3-3	None	
	Koma 3k-1	None		Jano 4-1	None	
	Onos 4-1	None		Jano 4-2	None	
3a, 3b, 3c ( <i>kurstaki</i> )	<i>kurstaki</i> HD-1*	None		Miya 10-1	None	
	<i>kurstaki</i> HD-2*	None		4a, 4c ( <i>kenyae</i> )	<i>kenyae</i> *	None
	<i>kurstaki</i> HD-73*	None			Aiko 1-4-2	None
	<i>kurstaki</i> HD-263*	None			Onos 2-3	None
	Hana 3-1	None	5a, 5b ( <i>galleriae</i> )	<i>galleriae</i> A*	None	
	Jano 1-1	None		<i>galleriae</i> B*	None	
	Jano 5-1-1	None		Seib 2-2-1	None	
	Jano 5-1-2	None		Seib 4-4-1	None	
	Jano 5-2	None		Aiko 1-3-2	None	
	Jano 5-3	None		Aiko 1-4-1	None	
	Jano 5-4	None		Aiko 1-4-3	None	
	Jano 9-1	None		Aiko 1-4-4	None	
	Jano 9-2-1	None		Aiko 1-5-1	None	
	Jano 9-2-2	None		Aiko 1-6-1	None	
	Jano 9-3-3	None		Aiko 1-6-2	None	
	Jano 9-3-4	None		Kose 5-3	None	
	Jano 9-4-4	None		Kose 5-6	None	
	Jano 9-4-5	None		Kose 5-7	None	
	Jano 9-4-6	None	Onos 2-2	None		
	Jano 10-1	None	Onos 4-2	None		
	Jano 10-2	None	14 ( <i>israelensis</i> )	<i>israelensis</i> *	<i>cry4Aa, Ba, cry10Aa, cry11Aa</i>	
	Koma 1k-1	None		Aiko 2-1-1	<i>cry4Aa, Ba, cry10Aa, cry11Aa</i>	
	Koma 1k-2	None		16 ( <i>indiana</i> )	<i>indiana</i> *	None
	Koma 1k-3-1	None	Aiko 1-2-1		None	
	Koma 1k-3-3	None	Untypable	Seib 4-3-1	None	
	Koma 1k-3-5	None				
	Onos 2-1-1	None	Nonmotility	Aiko 1-3-1	None	
	Onos 2-1-2	None				

\*: Type serovar strains used in this experiment.

ていた。これら菌株の保有する *cry* 遺伝子の中 HÖFTE and WHITELEY (1989) の分類に基づく *cryI, II, IV* に属する *cry* 遺伝子プライマーを作成し、本実験では *cry* 遺伝子の同定を行うとともにカイコ 5 齢幼虫ならびにヤマトヤブカに対する殺虫活性検定を行った。

*cry* 遺伝子同定の結果は *cryI* 遺伝子プロファイル (Table 4), *cry2* 遺伝子プロファイル (Table 5), *cry4, 10, 11* 遺伝子プロファイル (Table 6) とともに、それぞれ基準株と比較してその遺伝子構成に特異的な相違は認められなかった。しかし、これら 53 株の殺虫活性を明らかにした時、従来の *cry* 遺伝子プロファイルでは説明のつかない活性を示す菌株が存在したならば、その菌株は新しい遺伝子を保有する可能性がある。このことからカイコに対する殺虫

活性がより強い serovar *kurstaki* Jano 9-2-1 (Table 7), ならびに serovar *israelensis* Aiko 2-1-1 が将来優良菌株として遺伝子の詳細な検討を必要とする株であることが示唆された。

屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* において、同一 serovar 内で *cryI* 遺伝子保有状況が異なっていたのは、*thuringiensis, kurstaki* および *kenyae* であった。serovar *thuringiensis* に大別された分離株の *cryI* 遺伝子保有タイプは 2 タイプ、即ち、*cryIEa* または *Ba, Ac, Ab* 保有タイプと *cryI* 遺伝子保有しないタイプであった (Table 4)。serovar *kurstaki* に大別された分離株では 2 タイプ、即ち、*cryIAa, Ac, Ab* 保有タイプと *cryIAc, Ab* 保有タイプであった (Table 4)。serovar *kenyae* に大別された分離株では 2 タイプ、即ち、*cryIAc, Ab* 保



Table 7. Larvicidal activity of *B. thuringiensis* isolates from Yakushima Island against 5th-instar larvae to the silkworm.

H-serotype (subspecies)	Strain	<i>cryI</i> genes	<i>cryII</i> genes	LD50 ( $\mu$ g)	H-serotype (subspecies)	strain	<i>cryI</i> genes	<i>cryII</i> genes	LD50 ( $\mu$ g)		
1 ( <i>thuringiensis</i> )	Jano 2-1	<i>cryIEorB</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	None	3.17	3a, 3d ( <i>sumposiensis</i> )	Jano 3-3	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	None	0.31		
	Onos 4-1	<i>cryIEorB</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	None	8.91		Jano 3-2	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	None	0.89		
	Koma 3k-1	None	None	6.50		Jano 4-1	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	None	0.89		
	3a, 3b, 3c ( <i>kurstaki</i> )	kurstaki HD-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>		0.11	Jano 3-1	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	None	1.12	
		Jano 9-2-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>		0.09	Jano 4-2	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	None	1.12	
		Jano 9-4-4	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>		0.11	Miya 10-1	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	None	1.12	
		Jano 9-4-5	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>		0.11	4a, 4c ( <i>kenyae</i> )	Aiko 1-4-2	<i>cryIAC</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	3.20
		Koma 1k-3-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>		0.11		Onos 2-3	<i>cryIAb</i>	None	3.20
		Hana 3-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>		0.31	5a, 5b ( <i>galleriae</i> )	Aiko 1-4-1	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31
		Jano 1-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>		0.31		Kose 5-7	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31
Jano 5-1-1		<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Seib 4-4-1	<i>cryIAb</i>		<i>cry2Aa</i>	0.89		
Jano 5-1-2		<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Kose 5-3	<i>cryIAb</i>		<i>cry2Aa</i>	0.89		
Jano 5-2		<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Aiko 1-3-2	<i>cryIAb</i>		<i>cry2Aa</i>	1.12		
Jano 5-4	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Aiko 1-5-1	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>		1.12			
Jano 9-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Aiko 1-6-1	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>		1.12			
Jano 9-3-4	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Seib 2-2-1	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>		3.20			
Jano 9-4-6	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Aiko 1-4-3	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>		3.20			
Jano 10-2	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Aiko 1-4-4	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>		3.20			
Koma 1k-2	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Aiko 1-6-2	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>	3.20				
Koma 1k-3-3	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Kose 5-6	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>	3.20				
Onos 2-1-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31	Onos 2-2	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>	3.20				
Onos 2-1-2	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.89	Onos 4-2	<i>cryIAb</i>	<i>cry2Aa</i>	3.20				
Jano 9-3-3	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.89	14 ( <i>israelensis</i> )	Aiko 2-1-1	light <i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	no-activity			
Koma 1k-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.89		16 ( <i>indiana</i> )	Aiko 1-2-1	None	None	no-activity		
Koma 1k-3-5	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.89			Untypable	Seib 4-3-1	<i>cryIAb</i>	None	no-activity	
Jano 5-3	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	1.12		Nonmotility		Aiko 1-3-1	<i>cryIAC</i> , <i>D</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.11	
Jano 10-1	<i>cryI4a</i> , <i>Ac</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	1.12								
Jano 9-2-2	<i>cryIAC</i> , <i>Ab</i>	<i>cry2Aa</i>	0.31								

Table 8. Mosquitocidal activity to *B. thuringiensis* isolates from Yakushima Island against *Aedes japonicus* larvae.

H-serotype (subspecies)	strain	<i>cryIcA</i> gene	<i>cry2A</i> gene	<i>cryIV</i> genes	LC50 (ppm)	H-serotype (subspecies)	strain	<i>cryIcA</i> gene	<i>cry2A</i> gene	<i>cryIV</i> genes	LC50 (ppm)	
I ( <i>thuringiensis</i> )	Jano 2-1	None	None	None	no-activity	3a, 3d ( <i>sumbiosiensis</i> )	Jano 4-2	None	None	None	1,000.00	
	Koma 3k-1	None	None	None	no-activity		Jano 3-1	None	None	None	no-activity	
	Onos 4-1	None	None	None	no-activity		Jano 3-2	None	None	None	no-activity	
3a, 3b, 3c ( <i>kurstaki</i> )	Jano 9-3-4	None	<i>cry2Aa</i>	None	12.50	4a, 4c ( <i>kenyae</i> )	Jano 4-1	None	None	None	no-activity	
	Jano 5-1-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	56.80		Miya 10-1	None	None	None	no-activity	
	Jano 10-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	106.23		Onos 2-3	None	None	None	318.32	
	Koma 1k-3-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	106.23			Aiko 1-4-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	1737.81
	Jano 10-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	121.26		5a, 5b ( <i>galleriae</i> )	Seib 4-4-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	110.78
	Jano 9-2-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	214.32			Aiko 1-3-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	156.81
	Jano 5-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	224.41			Aiko 1-4-3	None	<i>cry2Aa</i>	None	222.47
	Jano 9-2-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	283.60			Aiko 1-4-4	None	<i>cry2Aa</i>	None	222.47
	Koma 1k-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	448.56			Aiko 1-6-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	318.32
	Jano 9-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	640.09			Aiko 1-4-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	447.47
	Koma 1k-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	783.74			Aiko 1-5-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	448.56
	Onos 2-1-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	783.74		Seib 2-2-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	494.73	
	Jano 9-4-6	None	<i>cry2Aa</i>	None	891.05		Onos 2-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	891.05	
	Jano 5-4	None	<i>cry2Aa</i>	None	1,000.00		Kose 5-7	None	<i>cry2Aa</i>	None	2,427.16	
	Jano 9-3-3	None	<i>cry2Aa</i>	None	1,000.00		Kose 5-6	None	<i>cry2Aa</i>	None	22.47	
Jano 9-4-4	None	<i>cry2Aa</i>	None	1,000.00	Aiko 1-6-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	318.32			
Jano 5-3	None	<i>cry2Aa</i>	None	1,057.99	Kose 5-3	None	<i>cry2Aa</i>	None	904.69			
Onos 2-1-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	1,136.45	Onos 4-2	None	<i>cry2Aa</i>	None	no-activity			
Hana 3-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	1,737.81	14 ( <i>israelensis</i> )	<i>israelensis</i>	None	<i>cry2Aa</i>	<i>cry4Aa, Ba, cry10Aa, cry11Aa</i>	10.00		
Jano 1-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	1,961.68		Aiko 2-1-1	None	<i>cry2Aa</i>	<i>cry4Aa, Ba, cry10Aa, cry11Aa</i>	1.00		
Koma 1k-3-3	None	<i>cry2Aa</i>	None	45.58		16 ( <i>indiana</i> )	Aiko 1-2-1	None	None	None	no-activity	
Jano 5-1-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	51.70	Untypable		Seib 4-3-1	None	None	None	100.00	
Jano 9-4-5	None	<i>cry2Aa</i>	None	131.08	Nonmotility		Aiko 1-3-1	None	<i>cry2Aa</i>	None	904.69	

有タイプと *cry1Ab* 保有タイプとなった (Table 4)。同一 serovar 内において異なる菌株の *cry* 遺伝子の保有状況が異なることは従来も認められており、GONZALEZ (1982) および JARRETT and STEPHENSON (1990) は、*B. thuringiensis* の殺虫性結晶タンパク質遺伝子をコードするプラスミドが、感染昆虫内および液体培地中において、栄養細胞間で転移することを報告している。また JARRETT (1985) は、42°C の液体培養によってプラスミドを消失している変異株が、0.05–0.25% の割合で生じることを報告している。これらのことから、本実験において同一 serovar において遺伝子保有状況が異なっていたのは、*B. thuringiensis* が比較的地理的に近い自然環境において分離されたことを考慮するとプラスミド遺伝子の転移を起こしていた可能性が示唆された。

運動性が無く H-serotype を判定できなかった Aiko 1-3-1 が、*cry1Ac*, *Da*, *Ab* を保有していた。中谷ら (1994) は、この菌株と同様に運動性が無く、菱形の崩れた結晶を産生する *wuhanensis* が *cry1Ab* 遺伝子を保有することを報告していることから、Aiko 1-3-1 が *wuhanensis* と同様の菌株である可能性が示唆された。

#### 摘 要

屋久島各地で分離された *B. thuringiensis* 53 株について、カイコ、*Bombyx mori* ならびにヤマトヤブカ、*Aedes japonicus* に対する殺虫活性を検討すると共に、これら菌株が保有する *cry* 遺伝子の同定を PCR 法によって行った。

PCR 法に供した oligonucleotide primer は、生物検定にカイコならびにヤマトヤブカを材料とした関係上、*cry1Aa*, *1Ab*, *1Ac*, *1Ba*, *1Ca*, *1Da*, *1Ea*, *1Fa*, *2Aa*, *4Aa*, *4Ba*, *10Aa*, *11Aa* 遺伝子用に用意した特異配列とした。

serovar *kurstaki* 24 株の *cry* 遺伝子は Jano 9-2-2 1 株のみが serovar *kurstaki* HD-2 タイプの *cry1Ac*, *1Ab*, を保有していたが、残る 23 株は HD-1 タイプの *cry1Aa*, *1Ab*, *1Ac*, を保有していた。また、*cry2Aa* については serovar *kurstaki* すべてが保有していた。serovar *galleriae* 14 株はすべて *cryAb* と *cry2Aa* 遺伝子を保有していた。本実験において、それぞれの serovar 基準株と比較して *cry* 遺伝子比較して *cry* 遺伝子構成が異なっていた菌株は serovar *thuringiensis* Koma3k-1, serovar *kenyae* Onos2-3, serovar *israelensis* Aiko2-1-1 であった。

殺虫活性検定において、カイコに対する殺虫活性から対照区として供試した serovar *kurstaki* HD-1 を上回る LD<sub>50</sub> 値を示したのは serovar *kurstaki* Jano 9-2-1 であり、また、ヤマトヤブカに対する殺虫活性が対照区として供試された serovar *israelensis* を上回ったのは Aiko 2-1-1 であった。これらの 2 株については新たな *cry* 遺伝子構造を有する可能性が示唆された。

#### 引用文献

- ADANG, M. J., STAVER M. J., ROCHELEAU T. A., LEIGHTON J., BARKER R. F. and THOMPSON D. V. (1985): Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* **36**, 289-300.
- ASANO, S., BANDO, H. and IIZUKA, T. (1993): Amplification and identification of *cryII* gene from *Bacillus thuringiensis* by PCR procedures. *J. Seric. Sci. Jpn.* **62**: 223-227.
- CAROZZI, N. B., KRAMER, V. C., WARREN, W. G., EVOLA, S. and KOZEIL, M. G. (1991): Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3057-3061.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SHNEPF, E., VAN, R. J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEEAN, D. (1998): Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-13.
- FEITELSON, J. S., PAYNE, J. and KIM, L. (1992): *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology.* **10**, 271-275.
- GONZALEZ, J. M., DULMAGE, H. T. and CARLTON, B. C. (1981): Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* **5**, 351-365.
- HÖFTE, H. and WHITELEY, H. R. (1989): Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, **53** (2), 242-255.
- IIZUKA, T., ISHIKAWA, S., ASANO, S., BANDO H., ZHENG, Z. and MURAI, N. (1994): Insecticidal activity of the Cry1A(a) and Cry1B delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* was related after the coding region of the gene was truncated and expressed in *Escherichia coli*. *J. Seric. Sci. Jpn.* **63**, 303-309.

- IIZUKA, T. and GOTO, C. (1987): Toxic effect of crystal protein from *Bacillus thuringiensis* on *Bombyx mori* and *Mamestra brassicae*. J. Seric. Sci. Jpn. **56**, 379-384.
- 飯塚敏彦 (1997) : *Bacillus thuringiensis* の産生する殺虫タンパク質とその病原機作 — 現在までの歴史をたどって — J. Seric. Sci. Jpn. **66**, 311-322.
- JARRETT, P. (1985): Potency factors in the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* and the significance of plasmids in their control. J. Appl. Bacteriol. **58**, 437-448.
- JARRETT, P. and STEPHENSON M. (1990): Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 1608-1614.
- KALMAN, S., KIEHNE, K. L., LIBS J. L. and YAMAMOTO, T. (1993): Cloning of novel *Cry1C*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1131-1137.
- 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. 酪農大紀要. **15**, 1-69.
- 中谷育弘・浅野真一郎・伴戸久徳・飯塚敏彦 (1994) : *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* *cry1A(b)* 遺伝子の構造解析ならびに殺虫活性. J. Seric. Sci. Jpn. **63**, 140-148.
- SCHNEPF, H. E., WONG, H. C. and WHITELEY, H. R. (1985): The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. **260**, 6264-6272.
- SHIBANO, Y., YAMAGATA, A., NAKAMURA, N., IIZUKA, T., SUGISAKI, H. and TAKANAMI, M. (1985): Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein. Gene **34**, 243-251.
- YAMAMOTO, T. and POWELL, G. K. (1993): *Bacillus thuringiensis* crystal proteins; Recent advances in understanding its insecticidal activity. Advanced Engineered pesticides, ed. by L. KIM, Marcel Dekker, Inc., New York, pp.3-42.