

## 害虫を凍らせて殺す微生物農薬の開発

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	渡部, 賢司 佐藤, 守
巻/号	23巻3号
掲載ページ	p. 37-40
発行年月	2000年3月

## 害虫を凍らせて殺す微生物農薬の開発

渡部 賢司・佐藤 守

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所

昆虫腸内で増殖することが可能な氷核活性細菌を葉の表面などから見つけ出し、それらの昆虫の耐寒性を低下させる能力を確認した。さらに、その能力を増強させると同時に凍霜害などの植物への悪影響を最小限にするために、昆虫腸内で増殖するが植物体上で増殖しにくい細菌に氷核活性遺伝子を導入したトランスジェニック細菌を作出した。これらの細菌が付着した葉を食べた昆虫は耐寒性の低下により、氷点下5℃程度におくと凍結・死亡することが明らかとなり、新たな微生物農薬として期待できる。

### 1. はじめに

冬を越す昆虫の多くは凍結死から逃れるために、糖や多価アルコール類を蓄積し、体内の水分が凍り始める温度を下げています。また、腸内に残留している餌などは水が凍り始める時の核となり、凍結開始温度を上げる原因となるため、これらをきれいに排泄する。これらの結果、耐寒性の昆虫は-10℃以下の寒さにあっても凍結せず、生き延びることができる。

氷核活性細菌とは水が凍結するときの核（氷核）として働く細菌のことである。不純物を含まない水は通常-20℃以下でも凍結しないが、氷核活性細菌を含んだ水は-2～-4℃で凍結する。この細菌は最初に腐植葉から氷核となる能力（氷核活性能）を持つものとして発見され（Maki et al., 1974）、その後、農作物への早霜や遅霜の原因として研究が進められた（Lindow et al., 1983）。これらの研究の中で氷核活性能は細胞膜に局在する氷核活性蛋白質によることが分

かり、その遺伝子（氷核活性遺伝子）が単離された（Green and Warren, 1985）。現在では、3属7種の細菌から氷核活性遺伝子が単離、同定されている。

近年、欧米において、代表的な氷核活性細菌であるシュードモナス・シリング（*Pseudomonas syringae*）で処理することにより越冬昆虫を防除する方法が検討されており、テントウムシの一種では氷核活性細菌処理により、未処理区と比較して10℃以上も高い温度で凍結する（Strong-Gunderson et al., 1990）。また、ある種の貯穀害虫では-5℃で約80%が死亡することが報告されている（Fields, 1993）。これらの研究により、氷核活性細菌による害虫防除が一躍、注目を浴びたが、氷核活性シュードモナス・シリング処理による害虫防除の効果は処理してから約1週間程度の間しか継続しない等の問題点も指摘されていた。

本研究では氷核活性能をもち、且つ昆虫腸内に定着能をもつ細菌を分離、同定し、これらの細菌で処理することにより、害虫防除効果を長期間持続させることを目標に検討を行なった。

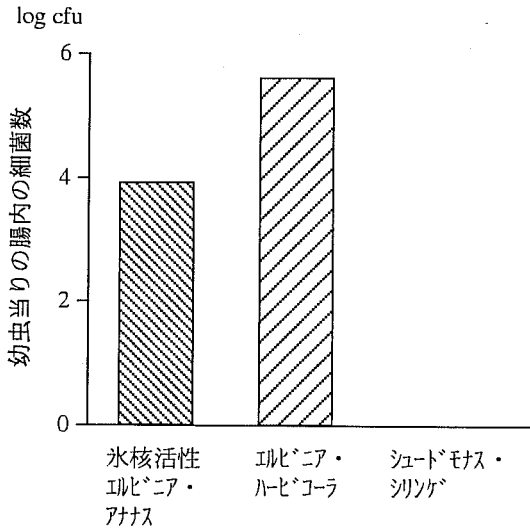


図1 氷核活性エルビニア・アナナスのカイコ腸内への定着性

## 2. 昆虫腸内に定着する氷核活性細菌

昆虫からは病原性または非病原性の多種の細菌が分離されている。我々は昆虫と植物を循環伝搬する細菌（昆虫・植物循環細菌）を同定する研究の過程において、カイコやクワノメイガの幼虫腸内には腸内細菌科に属するエルビニア・ハービコーラ (*Erwinia herbicola*) 群細菌やエンテロバクター・クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) が定住しており、これらの細菌は経口接種によりカイコ腸内で定着、増殖することが明らかになった (Takahashi et al., 1998, Watanabe et al., 1998, Watanabe and Sato, 1998b)。エルビニア・ハービコーラ群細菌とは近縁の細菌群の総称であるが、その中には氷核活性能をもつものが知られており、我々の解析の結果ではその全てがエルビニア・アナナス (*Erwinia ananas*) に属することが分かっている (Watanabe and Sato, 1998a)。これらの結果から、氷核活性エルビニア・アナナスは昆虫腸内に定着、増殖可能な氷核活性細菌であると考えられることから、予備実験として、カイコ幼虫に経口接種したところ、予想通り腸内において定着、増殖することが分かった (図1)。これ

に対し、シュードモナス・シリソゲは増殖できなかった。

## 3. 氷核活性エルビニア・アナナスによるクワノメイガ幼虫の耐寒性の低下

クワノメイガはクワの葉を食害する多化性の害虫であり、終令幼虫で越冬する。越冬する前(9月下旬~10月)の2~4令幼虫に各種氷核活性細菌を塗付したクワを2日間与えて、幼虫の耐寒性がどのように変化するか調べた。耐寒性は過冷却点と-6℃における凍結死の割合を指標にして評価した。

まず、対照として滅菌蒸留水を与えたクワノメイガ幼虫の過冷却点の平均は処理後3日目まで-11.3℃であった(図2)。氷核活性エルビニア・アナナスを与えたクワノメイガ幼虫の過冷却点の平均は-4.7℃であり、滅菌蒸留水を与えた幼虫と比較して、約6.6℃上昇した。この過冷却点の上昇は少なくとも9日後まで安定して維持された。一方、氷核活性シュードモナス・シリソゲを与えた幼虫の過冷却点の平均は-9.0℃であり、過冷却点は約2.5℃上昇した。しかし、処理後5日目までに、滅菌蒸留水を与えた幼虫と同じ

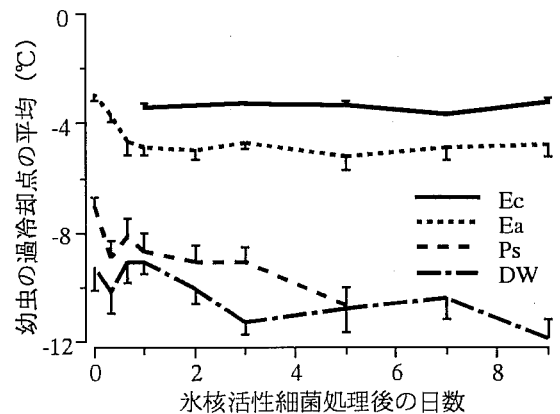


図2 氷核活性細菌処理によるクワノメイガ幼虫の過冷却点

Ec: 氷核活性遺伝子を導入したエンテロバクター・クロアカエ  
 Ea: 氷核活性エルビニア・アナナス  
 Ps: 氷核活性シュードモナス・シリソゲ  
 DW: 滅菌蒸留水 (未処理)  
 barは標準誤差を示す。

レベルまで下降した。以上の結果から、エルビニア・アナナスと幼虫腸内で増殖できないシュードモナス・シリングでは、幼虫の過冷却点を上昇させる効果に大きな差異が認められた。次に、 $-6^{\circ}\text{C}$ における凍結死の割合を調べた。氷核活性エルビニア・アナナスを与えた区では低温接触2時間で約50%の個体が凍結し、18時間低温接触では、約80%の個体が凍結、死亡した(図3)。一方、滅菌蒸留水を与えた区では死亡個体数は約20%のみであった。氷核活性シュードモナス・シリングを与えた区でも、凍結、死亡個体数は約36%であった。これらの結果により、氷核活性エルビニア・アナナスはクワノメイガ幼虫の耐寒性を効果的に低下させることが分かった(図4)。

#### 4. 氷核活性遺伝子を導入した昆虫定着細菌の利用

氷核活性エルビニア・アナナスは昆虫の耐寒性を効果的に低下させるが、この細菌は元来植物の葉面に生存するので、野外散布等では植物に対して凍霜害を引き起こす危険性が考えられる。従って、昆虫体内でのみ増殖し、植物体上で増殖しない氷核活性細菌を用いる方が作物等への影響を最小限に抑えることができる。前述のように、氷核活性能は氷核活性遺伝子に支配されており、氷核活性遺伝子を導入した細菌は氷核活性能をもつようになるので、昆虫のみに定着、増殖する細菌に氷核活性遺伝子を導入すれば、より安全性が高く、効果的に害虫を凍結死させる新規の氷核活性細菌を作出することができる。既に我々は昆虫定着細菌であるエンテロバクター・クロアカエが植物体上ではあまり増殖しないことを明らかにしており、(Watanabe and Sato, 2000) この細菌に氷核活性遺伝子を導入した新たな氷核活性細菌を作出し、害虫防除効果の検討を行った。

前述の方法で、細菌をクワに塗付してクワノメイガ幼虫に与え、過冷却点を測定したと

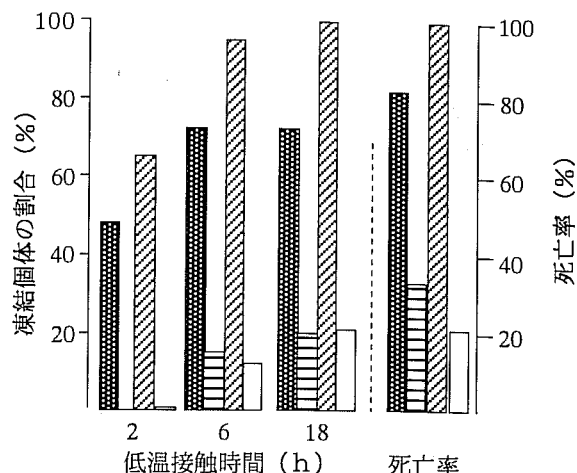


図3 氷核活性細菌処理したクワノメイガ幼虫の凍結、死亡個体数の割合

■: エルビニア・アナナス  
 □: シュードモナス・シリング  
 ▨: エンテロバクター・クロアカエ  
 □: 滅菌蒸留水 (未処理)

ころ、氷核活性遺伝子導入エンテロバクター・クロアカエを与えた幼虫の過冷却点は3日後に $-3.3^{\circ}\text{C}$ であり、滅菌蒸留水を与えた幼虫よりも約 $8^{\circ}\text{C}$ 、エルビニア・アナナスを与えた幼虫よりもさらに $1.5^{\circ}\text{C}$ 上昇した(図2)。この過冷却点の上昇は、少なくとも9日まで同じレベルを維持した。さらに、氷核活性遺伝子を導入したエンテロバクター・クロアカエを与えたクワノメイガ幼虫の耐寒性を調べるために、 $-5^{\circ}\text{C}$ に18時間、低温接触した時の凍結個体数及び死亡個体数を測定したところ、エンテロバクター・クロアカエを与えた幼虫は低温接触2時間で約64%が凍結し、18時間後にはすべての個体が凍結し、死亡した(図3)。これに対し、滅菌蒸留水を与えた幼虫では低温接触18時間後でも凍結した個体はなく、すべての幼虫が生存していた。

#### 5. 今後の課題

氷核活性細菌を利用した害虫防除法は氷核活性細菌により昆虫の耐寒性を低下させ、冬の氷点下になる時に凍結、死亡させるものである。

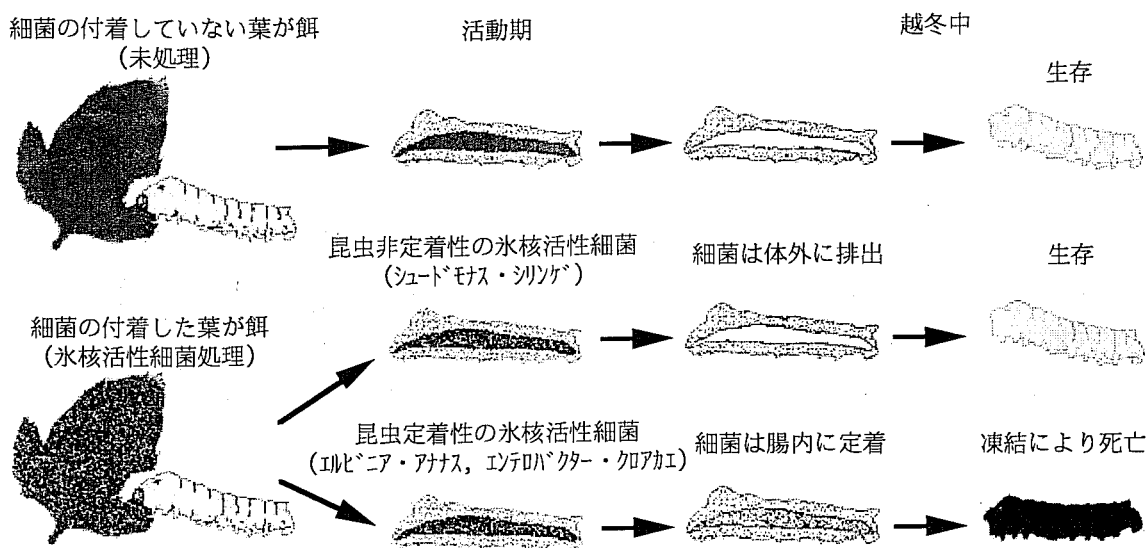


図4 氷核活性細菌処理による越冬害虫防除のメカニズム

従って、昆虫の活動期に与えた氷核活性細菌の効果が冬になるまで、すなわち約3～6カ月の間、維持されている必要がある。現在、その検討を行っているが、これまでに処理後約4カ月間、クワノメイガ幼虫の過冷却点が約10℃上昇することが分かっており、長期間、安定した効果が期待できる。また、今回、対象昆虫として幼虫越冬するクワノメイガを用いたが、多くの昆虫は蛹または成虫で越冬するものが多く、それらの昆虫種への適用を試みる必要がある。さらに、特定の昆虫種にのみ定着、増殖する細菌に氷核活性遺伝子を導入すれば、選択的に害虫を防除する細菌を作出でき、生態系への影響も少ないものと考えられる。近年、共生微生物等やその他の寄主特異的な微生物が多種の昆虫から発見されつつあり、これらの微生物の利用についても検討したい。今後は遺伝子操作により、さらに強力な微生物防除剤としての氷核活性細菌を開発するとともに、野外実験等を行

い、実用化に向けた検討を行いたいと考えている。

参考文献

Fields, P.G. (1993) Environ. Entomol. 22:470-476.  
 Green, R.L. and G.J. Warren (1985) Nature 317:645-648.  
 Lindow, S.E. et al., (1983) Annu. Rev. Phytopathol. 21: 363-384.  
 Maki, L.R. et al. (1974) Appl. Microbiol. 28:456-459  
 Strong-Gunderson, J.M. et al. (1990) J. Insect Physiol. 36: 153-157.  
 Takahashi, K. et al. (1995) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.  
 Watanabe, K. and M. Sato (1998a) Curr. Microbiol. 37: 201-209.  
 Watanabe, K. and M. Sato (1998b) Curr. Microbiol. 37: 352-355.  
 Watanabe, K. et al. (1998) J. Invertebr. Pathol. 72:104-111.  
 Watanabe, K. and M. Sato. (2000) J. Appl. Microbiol. (in press).

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2