

害虫防除における氷核活性細菌の利用

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 佐藤 まもる わたなべ けんじ
守・渡部 賢司

はじめに

従来、害虫の微生物的防除というと、その害虫に病原性を有する微生物（ウイルスを含む）を用いる研究がほとんどであった（岡田，1994）。この分野をさらに発展させるためには、病原微生物ばかりに頼らない新たな研究方向を模索する必要があると思われる。例えば、昆虫の生理、生殖をかく乱する微生物の利用であるとか、今回紹介する氷核活性細菌の利用なども一つの方向と思われる。氷核活性細菌とは、氷核タンパクを外膜表層に生産し、それが氷核となり $-3\sim-5^{\circ}\text{C}$ 程度で水を凍結できる微生物である。純水（氷核がない）では -40°C でも凍らず、既知の氷核因子である AgI 結晶でも -8°C で凍結を始めるというから、この微生物がいかに強い氷核能力を持つかわかっていただけたらと思う（詳しくは高橋，1985；佐藤，1988 を参照されたい）。

植物の凍霜害の誘導微生物として知られていた氷核活性細菌を用いて、害虫を凍死させて防除するという新しい考えが1990年代初めに提案され、注目を集めた。また、ほぼ同時期に昆虫からも氷核活性細菌が分離され、自然界における昆虫の冬期間の生存にこれら微生物が関与している可能性も示された。その後、基礎的研究と共に、害虫防除に向けて発展可能な興味深い研究がなされてきた。ここでは、これら最近の研究成果について関連研究を含めながら紹介する。

I 昆虫における内因性氷核因子

昆虫は寒い冬が近づくと、体内の低温耐性を高めることにより、氷点下の温度でも凍らずに、過冷却状態を維持して、冬を乗り切る。非耐凍性の昆虫でも糖や糖アルコールを蓄積することにより、過冷却維持能力を高める。一方、非常な寒さ（例えば -40°C ）に耐える、いわゆる耐凍性を持つ昆虫は体内（通常血液内）に氷核タンパク質をもち、これにより凍結死から免れることができる。この氷核タンパク質により比較的高い温度で細胞外（体液）の凍結が始まり、ゆっくり氷結が進行し、浸透

圧の関係で各器官の細胞内の水分が引き出される。そのため昆虫の凍結死につながる細胞そのものの凍結は防げるというわけである。この氷核タンパクは分子量約77万の球形のリポタンパクで、タンパク質44.8%、脂肪51.4%、炭水化物3.8%を含んでいる。リン脂質のホスファチジルイノシトールが氷核の活性部位ではないかとされている。このイノシトール部が氷の六方晶系の格子構造に似ており、これが氷核形成の源になっているのではないかと推察されている。

細菌の氷核タンパクと昆虫の氷核リポタンパクとは、アミノ酸組成が異なる。細菌ではアラニン、グリシン、セリン、スレオニンが多く、昆虫（ガガンボ）の氷核リポタンパクは、アスパラギン酸、グルタミン酸が多い。しかし、抗原抗体反応では互いに反応し、昆虫由来のものも、アミノ酸の繰り返し構造があるのではないかと推測されている（島田，1993）。なお Tsumuki and Konno (1994) はニカノメイガの氷核タンパクが筋肉にあり、また次項で述べる同昆虫から分離された微生物（*Fusarium*）の氷核タンパクとよく似た化学的性質を有するという報告をしている。氷核タンパク（遺伝子）の進化の観点から興味深い。

II 昆虫からの氷核活性細菌の分離

氷核活性細菌の昆虫からの最初の検出は、野菜の世界的害虫であるコナガ（*Plutella xylostella*）の蛹で認められた。金子ら（1989）は、コナガの過冷却点（SCP）を調査しているとき、 5°C で予冷すると、SCPが明らかに上昇することを見いだした。そしてその原因が体内水分の糖含量の変化や血液、脂肪体の関与によるものでもないこと、また無菌飼育したコナガではこの現象が見られないことなどから、微生物の関与を強く示唆した。その後彼らは氷核活性細菌を分離し、それを *Erwinia her-bicola* と同定した（金子，1991）。同じころ、Lee et al. (1991) により、ハムシ（*Ceratoma trifurcata*）、テントウムシ（*Hippodamia convergens*）の消化管から2種の氷核活性細菌が分離され、これら細菌はそれぞれ、*Enterobacter agglomerans* と *Enterobacter taylorae* と同定された。さらに筆者らは、クワノメイガから氷核活性を有する *Erwinia ananas* と *Pseudomonas syringe* を分離した（Takahashi et al., 1995）。

Biological Control of Insect Pests Using Ice-nucleating Bacteria. By Mamoru SATO and Kenji WATANABE

（キーワード：害虫防除，生物的防除，氷核活性細菌，*Erwinia ananas*，氷核因子）

以上5種の細菌が分離されているが、このうち、*Erwinia herbicola*, *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia ananas* は極めて近縁な細菌で、*Erwinia herbicola* 群細菌としてくられる。筆者らは、これまで発表された6種の氷核活性遺伝子の塩基配列の比較において、各細菌種間のアミノ酸レベルの一致率が約60%を示すのに対し、*Erwinia ananas* と *Erwinia herbicola* 間では、98%と異常に高い一致率 (WARREN, 1995) が見られるのに注目し、この両 *Erwinia* は同種ではないかと想定した。さらに、筆者らはこれまで各種植物から氷核活性を持つ *Erwinia* を多数分離しているが、いずれも *Erwinia ananas* と同定されていたこと、またこれら菌株とアメリカ等から取り寄せた *Erwinia herbicola* と報告されていた菌株、計20株の氷核活性遺伝子のRドメインの“変異”が段階的に生じていて、両種はほとんど区別なくそれぞれの変異グループに配分されたこと (WATANABE and SATO, 1998) もその考えを強く示唆した。そこで、既報の *Erwinia herbicola* 菌株について、両種を類別できるとされる数種糖分解能を調査したところ、予想したとおり、すべて *Erwinia ananas* と同定された (WATANABE and SATO, 1998)。したがって、現在、氷核活性を持つ *Erwinia* 属細菌は *Erwinia ananas* (新学名 *Pontoea ananas* pv. *ananas*) と *Erwinia uredovora* (*Pontoea ananas* pv. *uredovora*) であるといつてよいと筆者らは考えている。

一方、Tsumuki et al. (1992) はニカメイガ幼虫の消化管から氷核活性を有する糸状菌 *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* を分離した。これをこの昆虫が摂取するとSCPが -20°C から -5°C まで上昇することを示した。これは、氷核活性をもつ糸状菌の最初の報告である。

III 氷核活性細菌による害虫防除の試み

1 貯穀害虫における利用

氷核活性細菌を用いた害虫防除法は、FIELDS (1990) により提案されたのが最初であろう。彼は貯穀害虫 rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* に凍結乾燥で粉末化した *Pseudomonas syringae* を100 ppmあるいは1,000 ppmの濃度で処理することにより、無処理区でのSCPの -17°C を、それぞれ 6°C あるいは 8°C ほど上昇させることを見いだした。さらにLEE et al. (1992) は8種の貯穀害虫について同様な検討を行い、そのうち5種の昆虫において100 ppmの *Pseudomonas syringae* の処理において顕著なSCPの上昇を確認した。最も高いSCPを示した事例は Lesser grain borer, *Rhyzopertha*

dominica に処理したときの -3.3°C であった。また、これら昆虫に細菌粉末を 23°C で24時間処理したのち、 -5°C の低温条件に24時間保持すると、表-1に示すように、前述のSCPの上昇を認めた昆虫種を含む6種で顕著な凍結死の誘導が認められた。そして、死亡率も *Pseudomonas syringae* の濃度に依存し、この氷核活性細菌による誘導死であることが明らかであった。FIELDS (1993) は同様の実験を耐凍性が増加した *Cryptolestes ferrugineus* を用いて圃場レベルで検討した。その結果は、1,000 ppm処理で、少なくとも処理後22日以前までの死亡率で明瞭な差異が見られた。

2 畑作物害虫における利用

LEEの研究グループはテントウムシ (lady beetle), *Hippodamia convergens* における基礎研究 (STRONG-GUNDRSON et al., 1990 a, b) を基に次の応用研究を行った。北米のジャガイモの重要害虫である Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) について、*Pseudomonas syringae* の粉末を用いる方法で実験を行った。この昆虫は土壤中で成虫越冬するが、このSCPは約 -7°C であり、もともと耐凍性のものではない。LEE et al. (1994) は土壤中に0から1,000 ppmの濃度に *Pseudomonas syringae* の粉末を混ぜ、そこに昆虫を放ち、そのSCPの上昇を検討した。その結果、無処理では -7.6°C であるのに対して、1,000 ppmでは -3.7°C であった。1 ppmでも上昇が認められる場合があった。また、細菌処理の土壤中の昆虫を氷点下の温度に保持する

表-1 *Pseudomonas syringae* の乾燥粉末 (100, 1,000 ppm) 処理および低温 (-5°C) 処理による各種貯穀害虫の凍結死の誘導 (LEE et al., 1995 を改変)

昆虫種 (学名と英名)	生存率 (%)		
	対照	100	1,000 ppm
<i>Tenebrio molitor</i> (Yellow mealworm larvae)	97	77	73
<i>Sitophilus granarius</i> (Grainery weevil adults) ^{a)}	96	62	48
<i>Cryptolestes pusillus</i> (Flat grain beetle adults)	97	0	0
<i>Plodia interpunctella</i> (Indianmeal moth larvae) ^{b)}	43	0	0
<i>Tribolium castaneum</i> (Red flour beetle adults) ^{c)}	19	0	0
<i>Rhyzopertha dominica</i> (Lesser grain borer adults)	90	3.6	0
<i>Gibbium psyllodes</i> (Shiny spider beetle adults) ^{d)}	93	25	0

*和名 ^{a)}: グラナリアコクゾウムシ, ^{b)}: ノシメマダラメイガ, ^{c)}: コクヌストモドキ, ^{d)}: セマルヒョウホンムシ

と、例えば、 -5°C においては無処理区では、わずかな死亡昆虫が見られるだけなのに対して、処理区の凍結による死亡率は約80%を示すようになった。

このように、当初の実験はほとんど *Pseudomonas syringae* の粉末を使用しており、生菌での検討はテントウムシに細菌懸濁水を飲ませるなどわずかになされたのみであった。ただ、この粉末を用いる方法は、処理後7日以内は効果が認められるが、それ以降は全く効果が見られないという、実用化に向けての欠点が指摘されていた (LEE et al., 1995)。

3 クワ害虫における利用

筆者らはこの欠点を除き、かつ幅広い応用に道を開くため、生菌の *Erwinia ananas* を用いるという新しい試みを行った。また、害虫の表面に細菌をまぶすというこれまでのものと異なり、氷核活性細菌を食べさせ、腸内で増殖させ、長期間効果を維持させるという新しい方法を用いた。そこで、基礎実験として、昆虫腸内での増殖の有無をモデル昆虫としてカイコを用い、検討したところ、クワ葉面細菌として優先フローラを形成する *Erwinia ananas* を含む *Erwinia herbicola* 群細菌がよく増殖することが判明した (WATANABE et al., 1998 a)。一方、*Pseudomonas syringae* は増殖せず、すぐに消滅した。そこで氷核活性を持つ *Erwinia ananas* を含む人工飼料を5齢になったばかりのカイコに半日間食べさせてのち、3~4日後に中腸を摘出してSCPを測定した結果、無処理区では -8°C であるのに対し、氷核活性 *Erwinia ananas* の接種区ではSCPが $-2.5\sim-4.0^{\circ}\text{C}$ までに上昇した (渡部・佐藤, 1996)。

次に、筆者らは、実際のクワの重要害虫であるクワノメイガについて検討を行った (渡部ら, 1998)。この昆虫を選んだ理由は、前項で述べたように、この昆虫からは氷核活性 *Erwinia ananas* が分離されているし、カイコと同じチョウ目の昆虫であるので、十分、同様な効果が認められるであろうと考えたからである。また、本種は幼虫越冬をすることも将来の実用試験に向けて好都合であったからである。クワ葉面に細菌を塗布し、風乾してから、幼虫に2日間与え、そのあと3日間絶食させて、一部はSCPの測定に (幼虫全体の測定)、一部は -6°C に2, 6, 18時間低温接触させて、凍結の有無とそれに伴う死亡率を調査した。その結果、対照区 (蒸留水、非氷核活性細菌) のSCPは -10°C であったのに対して、氷核活性 *Erwinia ananas* の区では -5.0°C まで上昇が認められた。さらに低温接触による凍結誘導死も氷核活性細菌接種の効果が顕著に見られ、図-1に示すように、対照の無処理区、非氷核活性 *Erwinia* 処理区

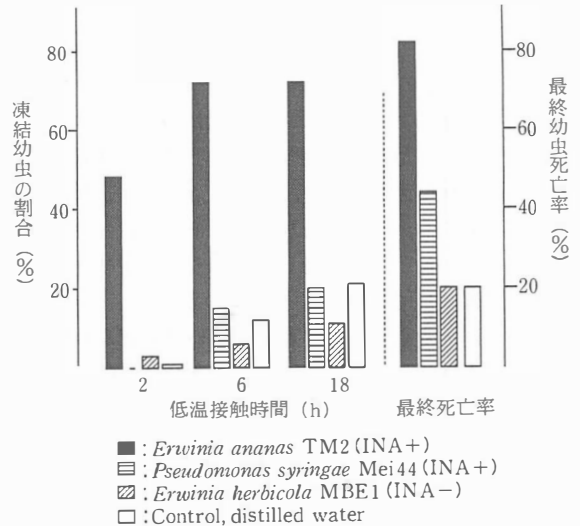


図-1 氷核活性 (INA) 細菌を食下させたクワノメイガ幼虫の低温接触 (-6°C) により誘導される凍結死

に比べ、凍結幼虫の出現率および最終的な死亡率に明らかな差異が認められた。ただ、この幼虫はまだ耐凍性が付与されていない時期のものであり、そのため、対照区でも比較的多めの死亡率 (20%) になったものと推定される。また、氷核活性能を持つが、昆虫に定着できない *Pseudomonas syringae* を食下させた場合にも防除効果が見られなかったが、この点からも、昆虫定着性細菌の利用の有用性が支持された。以上の結果は、害虫防除における氷核活性細菌の利用面で新たな方法を示した点で意味のあるものと筆者らは考えている。

4 その他害虫における利用

LANDRY and PHILLIPS (1996) はアリ (red imported fire ant) に *Pseudomonas syringae* を噴霧することによりSCPの上昇がみられることから、氷核活性細菌をアリの管理への利用を考えている。また、筆者らはイネの害虫における氷核活性細菌の利用も検討している段階である。

おわりに

以上述べたように、氷核活性細菌を用いた害虫防除の研究はまだ初期の段階ではあるが、幾つか、実用化に向けて興味深い結果も得られてきている。例えば、貯穀害虫の場合は、限られた場所 (室) で、低温処理をすればよいわけである。食用の穀物であるため農薬処理などなるべく避けたい等の理由から、実用化に最も近いかもしれない。一方、圃場の害虫への利用としては、まずトラップ植物 (例えば播種時期を遅らせた若い苗) に害虫

を集め、そこに氷核細菌を限定的に散布するのの一つの考え方もかもしれない。このような限定された空間において使用すれば、標的害虫のみならず、有用昆虫（例えば、天敵昆虫やポリネーター）も無差別に殺してしまうかもしれないという危険や有用植物への影響も（凍霜害の誘導を）ある程度回避できるであろう。さらに、植物への影響の軽減については現在検討中であるが、昆虫では増殖できるが、植物での増殖が十分でない微生物への氷核遺伝子を導入しての利用も考えられよう。

冒頭で述べたように、これは非病原性細菌を利用した新たな微生物的防除の試みである。氷核活性のみならず、病原性以外の新たな機能を持った微生物の利用の研究の発展が望まれる。

引用文献

- 1) FIELDS, P.G. (1990): Proc. Int. Working Conf. on Stored-Product Protection 5(2): 1183~1191.
- 2) ——— (1993): Environ. Entomol. 22: 89~118.
- 3) 金子順一ら (1989): 応動昆 33: 82~91.
- 4) ———ら (1990): 同上 35: 7~11.
- 5) LANDRY, C.E. and S.A. PHILLIPS (1996): Environ. Entomol. 25: 859~866.
- 6) LEE, R.E. et al. (1992): J. Econ. Entomol. 85: 371~374.

- 7) ——— et al. (1994): ibid. 87: 377~381.
- 8) ——— et al. (1995): Biological ice nucleation and its applications. (LEE, R.E. et al., ed.) APS Press, St. Paul, pp. 257~269.
- 9) 岡田斉夫 (1994): 植物防疫 48: 1~6.
- 10) 佐藤 守 (1988): 遺伝 42: 30~34.
- 11) 島田公夫 (1993): 昆虫の季節適応 (竹田真木生, 田中誠二編) 文一総合出版, 東京, pp. 397~409.
- 12) STRONG-GUNDERSON, J.M. et al. (1990 a): J. Insect Physiol. 36: 153~157.
- 13) ——— et al. (1990 b): Appl. Environ. Microbiol. 58: 2711~2716.
- 14) 高橋幸吉 (1985): 植物防疫 39: 8~13.
- 15) TAKAHASHI, K. et al. (1995): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61: 439~443.
- 16) TSUMUKI, H. and H. KONNO (1994): Biosci. Biotech. Biochem. 58: 578.
- 17) ——— et al. (1992): J. Insect Physiol. 36: 153~157.
- 18) 渡部賢司・佐藤 守 (1996): 応動昆虫学会講要 40: 233.
- 19) ———ら (1998): 蚕糸学会講要 68: 89.
- 20) WATANABE, K. and M. SATO (1998): Curr. Microbiol. (in press).
- 21) ——— et al. (1998): J. Invertebr. Pathol. (in press).
- 22) WARREN, G.J. (1995): Biological ice nucleation and its applications. (LEE, R.E. et al., ed.) APS Press, St. Paul, pp. 85~99.

書評

『不完全菌類図説 その採集から同定まで』

椿 啓介 編著

B5版, 173ページ, 本体12,000円,
アイピーシー社 刊

有性生殖器官が見出されず、アナモルフだけしか解っていない為に、不完全菌類という、考えてみれば変な用語で一括されている糸状菌のグループは、植物病原菌として重要であるだけでなく、最近の微生物活性利用の面で一層重視されるようになってきた。しかしこのグループの菌は、体制が単純であるためにかえって分類・同定が困難であり、病徴の観察は得意であるが分類の仕事には慣れていない、病害防除の現場の近くにいる者には病原菌の確認がなかなか厄介なことである。今般、不完全菌類の分類の権威である、椿 啓介氏が、筑波大学生物学類の門下である徳増征二、安藤勝彦、中桐 昭、岡田元の諸氏の協力を得て本書を編集されたことは、我々にとって大きな朗報である。

本書の標題は不完全菌類図説とあるが、著者が繰り返し強調しているように、不完全菌類の分類を議論する研究書ではなくて、採集から分離、培養を経て同定に至る経路を初心者身に付けさせる解説書である。言い換えれば、これは何かではなく、これが何かを知るにはどうすれば良いか、を教える本のように思われる。

本書は、不完全菌類研究の過去と現在、菌類の一般的

な分離法、顕微鏡観察とプレパラートの作成、菌類試料の採集・純粋分離・培養、不完全菌類の同定指針、培地、備えておきたい同定用参考書、代表的な不完全菌類の属の図説(158属)、の8章から成っている。第4章の菌類試料の採集・純粋分離・培養の項は、土壤菌、落葉菌、葉面菌、植物寄生菌、糞生菌、微小動物捕食(捕捉)菌および寄生菌、菌寄生菌、水生菌、海生菌に分けてそれぞれの専門家が執筆しているが、細かいところに専門家の行き届いたコツが惜しみなく述べられていて、たいへん解りやすい。また第5章の不完全菌類の同定指針では、分生子をまず確認した時点で、可能な限り属あるいは属グループにたどりつきたい検索の立場を優先し、人為的な色彩が強いが同定への道筋をまず作り、それに各分生子型の判別を加えて検索表を作成したとしている。すなわち、分生子の形態、分生子柄の形態、分生子の個体発生様式、分生子形成様式、という初心者でも非常に解りやすい4種の検索形質に基づいて、属、または属グループに到達し、さらに Barnett らや Chalmichael らの成書の図版と比較し、引用文献を調べて、おのおの詳しい記載に当たるようにしてある。

一般の病理関係者にとって、自分の知識に無い新しい菌を見出した時に、その分類を行うことはかなり困難である。分類学の専門書を見ても、もうひとつ核心に近づけない。かゆい所に手が届かないのである。しかし、この本は少し違う。意外と初心者にとって親切なのである。座右に置いて活用されることをお勧めする。

(JT 植物保護開発センター 山田昌雄)