

論文の内容の要旨

氏名：山本 裕一

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：都市環境における *Bacillus thuringiensis* 検索の実践と効率性の検証

緒言

現在の農業において、農薬の使用は非常に重要である。従来からの主流である化学農薬は、収量増加や品質維持のために多く使用されてきた。しかし、化学農薬の使用は、標的とした害虫とともに関係のない昆虫も駆除してしまい、周辺環境や昆虫相に影響を及ぼしているという指摘もある。さらに、農薬の使用過多により、耐性昆虫の出現や天敵昆虫減少などに伴う被害の深刻化も示唆されている。そのため、現在は減農薬あるいは無農薬栽培が支持されており、市場でも減農薬や無農薬の作物に付加価値がついている。しかし、農薬を減らして安定的に作物を栽培することは容易ではない。

近年では、化学農薬に替わる製剤として生物的防除資材という農薬が市販されており、農業従事者の選択肢は増えている。中でも、昆虫病原微生物 *Bacillus thuringiensis* は高い毒性と限定的な殺虫範囲を持つことから、中心的な生物的防除資材として価値を見出されてきた。*B. thuringiensis* を用いた資材は BT 剤と呼ばれており、生物的防除資材の中でも各農薬メーカーから多くの商品が生産され、今までトップのシェアを保っている。しかしながら、実際に使用されている菌株数は決して多くない。*B. thuringiensis* は、これまでに H 血清型によって 70 種類以上に分類されている芽胞形成細菌であり、一部の株が殺虫性を持つ。芽胞形成時にタンパク質様物質 (crystal) を産生し、これが昆虫体内などのアルカリ消化液によって部分分解され、プロテナーゼ等によって Cry タンパク質となることで昆虫を致死させる。この Cry タンパク質は、*B. thuringiensis* の株によってそれぞれ機能が異なっており、現在までにチョウ目、ハエ目、コウチュウ目への殺虫性を示す株が知られている。また、高い殺虫性を示す株は全 *B. thuringiensis* の中でも数%にとどまっている。従って、現在 BT 剤として利用されている株は数株ほどである。また、同じ血清型株であっても高い殺虫性を持たない亜種株や増殖能が低い株も存在する。加えて、*B. thuringiensis* は自然環境においてはこれまで分離率が低い細菌であるとされてきた。このため、そもそも研究対象となる *B. thuringiensis* が少ないということも問題点である。このように、*B. thuringiensis* は農薬に利用可能な有用株が少ないこともあり、現在の BT 剤の出荷量は腹這い状態である。現在、我が国では *B. thuringiensis* の分離実験の例は過去と比べて多くなく、多数の株を効率的に検索可能な手法の開発が可能となれば、BT 剤開発や殺虫機構の解明など、多くの研究に貢献できる。

本研究では、これまで低いとされていた *B. thuringiensis* の検索率を向上させるため、効率的な検索方法を開発することを目的とし、実験を行った。あわせて、分離実験で得られた分離株間に存在する系統関係を調査するため、分子生物学的手法による検証実験も行った。

分離実験

まず、新規手法として新たな細菌分離手法と分離場所の選定を行った。従来の *B. thuringiensis* 分離は、対象となる土壌サンプルなどを研究室に持ち込み、70℃で約 30 分加熱することで *B. thuringiensis* をはじめとした芽胞を有する細菌以外の細菌を死滅させ、セレクションを行っていた。しかし、この方法では研究室に持ち込むことが困難な大きな物体を対象とした実験が不可能である。これに対し、本研究では DD チェッカーという簡易検索キットを用いた。これは、元来食品工場などにおいて、食中毒菌である *Bacillus*

cereus を分離するために作成された選択培地であり、*B. cereus* と非常に近縁である *B. thuringiensis* も検索することが可能である。これにより、あらゆるものを分離対象とすることが可能となっただけでなく、屋内からも *B. thuringiensis* の分離が可能となった。また、分離場所には、人や物資の流動が多くこれまで実験報告の少ない都市環境に着目し、本研究では日本大学生物資源科学部敷地内を都市環境として見なした。毎年5月に大学敷地内から任意の20ヶ所を選定し、2010年から2015年までの計6年間継続して分離実験を行った。使用した培地は30~37°Cで培養し、*Bacillus* 属様コロニー数を計測し、単離した後に染色を経て顕微鏡観察で菌体を確認した。

分離実験の結果、6年間合計250個の *Bacillus* 属コロニーを分離した。その内、*B. thuringiensis* は170株が単離された(図1)。*Bacillus* 属コロニーの数を分母とし、*B. thuringiensis* の数を分子とした時の分離率(BT index)は68.0%であった。従来の調査では、離島の土壌における分離率は約3%、植物葉の表面からは3.4%、河川の水からは4.4%とされている。本調査の分離率は6年間合計で68%、各年代でも平均50%を超えており、従来の分離率と比較しても飛躍的に高いことが示唆された。高い分離数を記録した場所は、トイレの床やベンチなど、不特定多数の人々が接するユニークな場所である。これは、対象とした都市環境が様々な人や物資が行き交う場所であることに起因している。すなわち、人々が多く訪れる場所は、微生物の流動が激しく、*B. thuringiensis* を含む多くの微生物が日々入れ替わっているためと推察される。このため、今回のような大学敷地内でも、不特定多数の人々が使用あるいは訪れる場所でDDチェッカーを使用すれば、*B. thuringiensis* を高い頻度で分離できることが示唆された。

2010年 分離場所		<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>	2011年 分離場所		<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>	2012年 分離場所		<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>
給水機のボタン		3	0	実験室黒板		1	0	下駄箱		6	5
自動販売機のボタン		3	1	PASMO読み取り部		4	0	ほうきの穂		1	0
ビオトープの水・1		1	1	本館のオブジェ		1	0	葉の表面		1	0
ビオトープの水・2		4	4	ビオトープの水		1	0	貯水池		3	2
バラ園・バラ葉裏		2	1	ベンチ		13	6	10号館 貯水池		4	2
ベンチ		11	6	2号館ビオトープ		3	3	正門 石碑		1	0
男子トイレの床		12	6	スタジイ木の幹		1	1	短大棟 ビオトープ水		3	3
サクラの葉表		6	5	モミジの葉		5	5	農場までのコンクリ		1	0
噴水の水		4	3	小田急線つり革		4	4	計		20	12
生体(手の甲)		1	1	眼鏡		2	2				
園場・蛇口		3	0	計		35	21				
携帯電話		3	2								
計		53	30								
2013年 分離場所		<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>	2014年 分離場所		<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>	2015年 分離場所		<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>
体育館前の机		1	1	体育館のアリーナ床		13	9	フェロモントラップ屋根		5	5
本館4階 男子トイレ 床		5	1	湘南キャンパスの記念碑		12	10	図書館横の石碑		1	1
ガレリア 灰皿の上		3	1	12号館前机		12	11	図書館のヘッドホン		1	1
ガレリア ゴミ箱		6	6	フェロモントラップの淵		11	9	応昆虫室の屋根		6	6
靴の裏		14	12	本館横外階段		16	13	サークル棟部室床		10	5
計		29	21	農場自販機ボタン		2	2	農場棟流し場の壁		2	1
				計		66	54	生命農学科園場の水溜		9	5
								新1号館のステージ床		2	0
								バイクのシート		2	1
								農場棟の玄関マット		9	7
								計		47	32

図1 本手法における6年間の分離場所と *Bacillus* 属コロニーおよび *B. thuringiensis* 数の一覧

解析実験

分離実験で得られた分離株について、SSU rRNA 遺伝子とゲノムプロファイリング(GP)法の2通りの手法による系統解析実験を試みた。供試株は、2010年から2015年までの分離株170株に加えて対象株としてH血清型で分類されている標準株40株、近縁株である*B. cereus*および*Bacillus subtilis*、外群として大腸菌*Escherichia coli*を合わせた、計212株を用いた。SSU rRNA 遺伝子解析の結果、標準株、*B. cereus*、分離株は非常に近縁な関係にあり、分類することは不可能だった。過去に行われた、Soufiane and Co^{te} (2009)の分子生物学的手法に基づく系統解析等において、*B. thuringiensis*と*B. cereus*の分類は不可能であるという結論が発表されている。本研究の結果も、これら従来の結果を支持する結果となった。

次に、GP法による解析を行った。ここでは、*B. cereus*、*B. subtilis*、*E. coli*を除く210株を用いた。実験の結果、全株の組み合わせの中で最も高い類似度(Pattern Similarity Score)は0.981であった。*PaSS*は、 0.986 ± 0.003 以上で同一株とみなされる。本研究では、この数値を超える*PaSS*は得られなかった。このことから、今回の解析では全株が分類可能であり、同一株は存在しないという結果が得られた。しかし、分離株170株のうち、標準株と近縁と示唆された株は20株のみであった(図2)。残り150株は、系統樹上ではほぼ独立したまとまりを形成し、今回供試した標準株以外の株と近縁である可能性が示唆された。同時に、本手法で得られた分離株に、多数の未知の株が含まれている可能性もある。

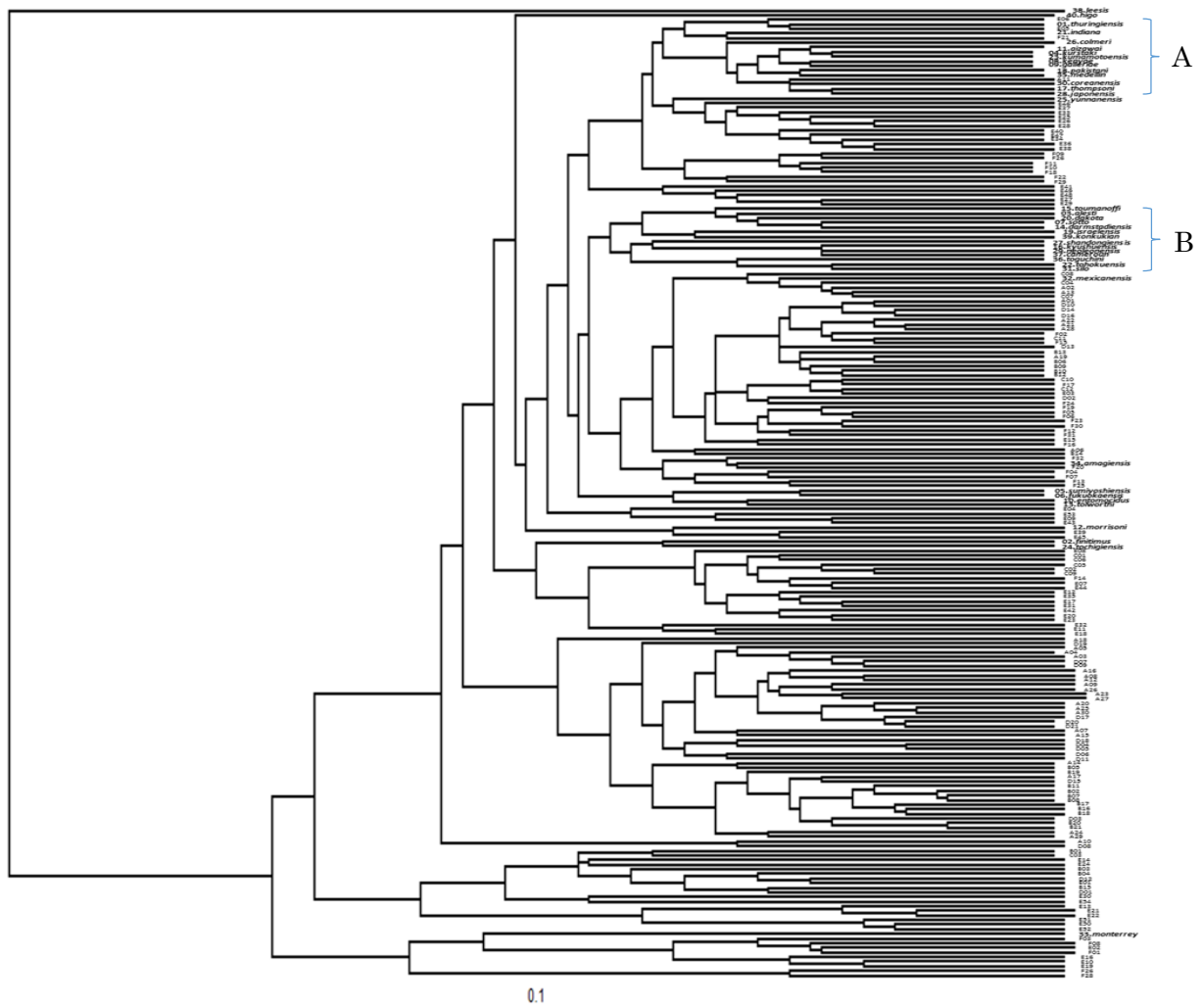


図2 GP法による系統樹

太文字は標準株、それ以外は分離株を示す。A、Bは、分離株の集中したクラスターを示す。

総括

我が国における *B. thuringiensis* の研究は、生物的防除資材への利用を目的とするものや毒素タンパク質である *cry* タンパク質の機能解明など、応用研究が多く行われている。その一方、分離実験などの基礎研究はあまり多くない。本研究は、分離実験という基礎研究と解析実験という応用研究の 2 つを行っている。分離実験では、市販の検査キットを用いることで実験行程を簡略化し、今まで報告例の少なかった都市環境という場所からの分離に成功した。その結果、6年間で各年代平均 50%以上の分離率という高頻度かつ安定的な結果を得た。これにより、本手法が *B. thuringiensis* を分離する新たな手法になり得ると示唆された。これは、*B. thuringiensis* が芽胞形成菌であるため、他の細菌よりも長期間その場所に留まっていたためと推察される。中国では、実験施設であるクリーンルームに多数の *Bacillus* 属細菌が存在していることが報告されている (Wu and Liu, 2007)。また、コンクリートの壁などにも微生物の集積が確認されているため (Mabuchi and Sano, 2008)、都市環境は微生物の分離に好都合な場所であることが示された。同時に、大学を含む都市環境は人や物資の流動が激しいため、微生物相が頻繁に変異していることも高い分離率を記録した要因である。

本手法で得られた分離株の解析を、2種類の分子生物学的手法を用いることで行った。SSU rRNA 遺伝子配列解析では、*B. cereus* と *B. thuringiensis* の標準株および分離株の類似性が極めて高いことが示唆された。従って、供試した標準株および分離株を明確に識別することはできなかった。これは、過去の *B. thuringiensis* の分類においても同様の結果が示されており、SSU rRNA 遺伝子配列解析をはじめとする特定遺伝子配列解析では、*B. thuringiensis* を分類できないとする既知報告と一致した。一方、GP 法による解析では、ほとんどの分離株がそれぞれ異なる株であったことが判明した。さらに、GP 法で得られた類似度に基づく系統樹を作成したところ、標準株と分離株はいくつかのまとまりを形成し、標準株や分離株ごとの近縁性を示した。従来の分離実験では、分離株は H 血清型分類によって分類され、*crystal* の形状等で細分化されていた。しかし、同じ H 血清型の菌株内でも標準株と分離株の *crystal* の形状が異なる場合や保有する *Cry* 遺伝子のタイプが異なる場合がある (佐々木ら, 1994)。本研究で用いた GP 法は、H 血清型だけにとらわれないゲノム全体から断片を増幅可能な技術である。このことから、GP 法により標準株と近縁ではないと判断された分離株の中にも、未知の特性を持つ株を分離している可能性も充分あることが示された。つまり、新規検索法は非常に多様な系統の *B. thuringiensis* 株の分離が可能であると示唆され、本分離手法が有用なものであるという知見を得た。

本研究では、都市環境からの分離実験と解析実験という基礎研究と応用研究を行った。これにより、新規検索法が高頻度に *B. thuringiensis* を検索可能であることに加え、得られた分離株が非常に多様であることが判明した。以上の 2 つの実験により、都市環境における検索法は従来よりも飛躍的に *B. thuringiensis* の検索が可能な手法であることが明らかとなった。