

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 岩野秀俊
(副査) 教授 藤田佳克 教授 光澤浩
准教授 畠山吉則

本論文は、今まで分離率が低いとされてきた *Bacillus thuringiensis* を、従来よりも高効率に検索可能な新規手法の開発とその効率性の検証を行ったものである。以下に、本論文の要旨と審査結果について記載した。

第1章 緒言

現在の農業において、農薬の使用はいまだ必要不可欠な存在といえる。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共に非標的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がある。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、農薬の使用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複数の微生物的防除資材が市販されており、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 *B. thuringiensis* は高い病原性と限定的な殺虫範囲を持つことから、中心的な微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、微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ている。しかしながら、実際に使用されているBT剤の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、一部の株が殺虫活性を持つ。しかし、高い殺虫活性を示す株は現在確認されている *B. thuringiensis* の中でも数%にとどまっている。また、*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。過去の調査では土壌、植物葉、河川の水など、様々な場所から *B. thuringiensis* の分離が試行されてきたが、どの報告も分離率は5%以下である。この点を解消し、分離率を向上することができれば有用株発見の頻度は増え、今後の *B. thuringiensis* 研究にも貢献することができる。そこで、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、分離実験を行った。合わせて、分離実験で得られた分離株間に存在する類縁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。

第2章 都市環境における *Bacillus thuringiensis* の分離実験

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°C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。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。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無作為に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、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。そのうち、*B. thuringiensis*は170株が単離された。*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。これに対し、本実験の分離率は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。同時に、本手法が6年間安定的に*B. thuringiensis*を確保できる手法であることも確認された。

第3章 SSU rRNA 遺伝子配列解析による分離株間差異の検出

分離実験で得られた分離株について、まずSSU rRNA 遺伝子比較による系統解析実験を試みた。供試株は、2010年から2014年までの分離株138株に加えて、対照株として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181株を用いた。SSU rRNA 遺伝子解析の結果、分離株、標準株、そして*B. cereus*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Soufiane and Côté(2009)やChen and Tsen(2002)が行った分子生物学的手法に基づく系統解析では、*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。さらに今回のSSU rRNA 遺伝子配列解析の結果は、今後の*B. thuringiensis*分類には単一の解析手法だけでなく、複数の手法を組み合わせる必要があることを示した。

第4章 ゲノムプロファイリング(GP)法による分離株間差異の検出

次に、ゲノムプロファイリング法(以下、GP法)による解析を行った。ここでは、*B. cereus*、*B. subtilis*、*E. coli*を除き、2015年の分離株32株を加えた計170株の分離株を用いた。供試株間の類似度を算出した結果、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(Naimuddin et al., 2000)。本研究では、この数値(0.986)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、供試株の中には同一株は存在しないという結果が得られた。この*PaSS*の値を基に系統樹を作成したところ、分離株170株のうち、標準株と近縁と示された株は20株のみであった。残り150株は、系統樹上ではほぼ独立したクラスターを形成し、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。

第5章 総合討論

我が国における*B. thuringiensis*の研究は、微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の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。本研究では、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つを行った。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。また、分離株はトイレの床やベンチなど、不特定多数の人々が接する場所に多く存在することも明らかとなった。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生存できたためと推察される。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。これにより、大学敷地内以外の場所でも*B. thuringiensis*を含む多様な微生物を検索することができると考えられた。

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て行った。SSU rRNA 遺伝子配列解析では供試株間の類似性が極めて高く、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。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いて系統樹を作成したところ、標準株と分離株はいくつかのクラスターを形成し、標準株や分離株ごとの類似性が示された。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*(副芽胞封入体)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殺虫活性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も、未知の特性を持つ株である可能性が推察された。以上の検証実験により、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考えられ、本分離手法が有用なものであるという知見を得た。

以上、本論文では今まで分離率が低いと報告されていた *B. thuringiensis* を、従来よりも飛躍的に高効率に分離可能とする手法を開発した。加えて、新規に開発された分子生物学的手法(GP 法)により、都市環境から分離された *B. thuringiensis* 株がそれぞれ異なる亜種株に細分化されたことが明らかとなった。これらの結果から、今後の昆虫病原性微生物 *B. thuringiensis* を利用した微生物的防除資材の開発において有益な情報を得ることができ、さらに昆虫病原性微生物の害虫防除への資材研究に新たな方向性を示した。また、本論文における分離実験は、査読付きの原著論文として *Journal of Insect Biotechnology & Sericology* 誌に掲載されており、学術的な意義があると判断される。

よって、本論文は博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 28 年 2 月 1 日