

都市環境における
Bacillus thuringiensis 検索の
実践と効率性の検証

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源生産科学専攻
博士後期課程

山本 裕一

2015

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 都市環境における <i>Bacillus thuringiensis</i> の分離実験	7
1 序論	7
2 材料および方法	9
2-1 <i>Bacillus</i> 属菌の分離	9
2-2 分離した <i>Bacillus</i> 属コロニーの単離	9
2-3 <i>B. thuringiensis</i> の判定	10
3 結果	15
4 考察	23
第 3 章 SSU rRNA 遺伝子配列解析による分離株間差異の検出	26
1 序論	26
2 材料および方法	28
3 結果	32
4 考察	41
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	43
1 序論	43
2 材料および方法	45
2-1 ランダム PCR	45
2-2 温度勾配ゲル電気泳動(TGGE)	45
2-3 プロファイル比較	46
3 結果	48
4 考察	119
第 5 章 総合討論	123
1 新規 <i>B. thuringiensis</i> の有用性	123
2 <i>B. thuringiensis</i> は見つけにくい細菌なのか	123

3 都市環境における分離手法の評価	124
4 都市環境における分離手法の将来性	125
5 分離株の解析方法の選定	126
6 これからの <i>B. thuringiensis</i> 分離研究	128
第 6 章 摘要	130
第 7 章 謝辞	131
第 8 章 文献	132

第1章 緒言

人類の誕生以来、人々は安定した食糧を得るために、自らが食用とする植物を管理し始めた。多くの食糧を得るため、食用の植物を栽培し、栽培時期の選考や害虫・害獣の防除など、より多くの食糧を収穫できるような工夫がされてきた。

日本は古くから農耕を行っており、農業において様々な努力が行われてきた。その中でも、人糞を肥料として施肥するという農法は日本やアジア諸国独自の特徴とされている(久馬, 2013)。また、害虫対策も日本独自の方法で行われていた。日本が水田での稲作栽培を行った当初は、害虫よりもネズミなどの害獣が問題視されており、高床式倉庫などが考案されたと言われている(岩田, 1966)。その後、数々の農業従事者が害虫による被害を認識しはじめると、平安時代ではウンカやヨトウムシを捕食するトンボやハチなどを益虫として認識するようになった。さらに、1600年頃には家伝殺虫散という日本最古の農薬が現れたとされている(岡本, 1993)。家伝殺虫散は、一定の効果を示したと記載があるものの、現在の研究ではそこまで高い効力はなかったと判明している。その後、江戸時代の1732年にはウンカやイナゴの大量発生による凶作、いわゆる享保の大飢饉が起こり、大量の餓死者を出した。それ以前には、鯨油を水田に流すなどの措置がウンカの防除として実施されていた。これは、水田の水面に鯨油による油膜を張ることで、水面に落ちたウンカを油で窒息死させるものである。この鯨油によるウンカの防除は有効な手段であったが、局所的にしか伝わっていなかったため、多くの藩ではこの後も飢饉が続くことになる。近代になり、明治時代には苗木の燻蒸やボルドー液の使用が実施されはじめ、大正時代に正式な実用段階に至ったとされている(農林省振興局植物防疫課, 1960)。このように、我が国の農業は常に害虫の脅威にさらされてきており、害虫対策は非常に重要なものであることがわかる。

一方、外国においては化学合成殺虫剤が多く作られ、流通していた。その中で

も、アメリカのモンサント社が開発した **dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT)**は衛生害虫だけでなく、農業害虫に対しても非常に強力な殺虫効果を示すことがわかったことから、多くの諸外国で利用されるようになった経緯がある。しかし、レイチェル・カーソン女史が1962年に公表した「**Silent spring**」は、DDTが対象となる害虫以外の昆虫にも強い殺虫性を発揮してしまい、自然環境へ大きな負荷を与えてしまうことに警鐘を鳴らした(Carson, 1962)。また、化学農薬の使用過多によって、害虫とともに天敵昆虫が減少してしまうと、次の発生時期以降に害虫の数が増加するリサージェンスが頻発することも知られている。そのほか、化学農薬に対する耐性害虫を出現させてしまう場合があり、結果的に被害を拡大させてしまうことがある。加えて、昨今世界では地球環境の保全や保護への意識が高まっていることもあり、これからの農業においても、自然環境へ負荷の小さい殺虫剤を使用することが望まれている。現在では、無農薬農法や減農薬農法などが普及しており、このような農法で生産した作物には付加価値が付与されることが多い。しかし、減農薬や無農薬の農法は非常に難しく、農業従事者が持つ正しい知識や経験などによって成功率が依存する。そこで、現在では様々な農薬メーカーから、化学農薬とは異なる農薬や防除資材が開発されている。このような防除資材のひとつに生物的防除資材がある(仲井ら, 2009)。

生物的防除資材は、従来のような化学合成物質を使った資材ではなく、自然環境に存在する天敵昆虫や天敵微生物を利用した資材であり、生物農薬とも呼ばれる。材料となる生物は、もともと環境中に存在するため自然環境への負荷は少なく、農地の周辺環境にも影響が非常に少ない。近年、害虫管理への対策は、予防という行為と共に防除という二つの管理システムが重要であるとされ、この考え方は **Integrated Pest Management(IPM:総合的害虫管理)**という概念として現在までに知られている。IPMは、これからの農業において基準となる概念であり、

地球環境保全のためにも重要な考え方である。IPM では、害虫の発生予察や経済的に許容される被害の程度、さらに防除の是非の検討や害虫の発生予防を考慮することが前提となっており、やみくもに薬剤を散布することを推奨していない。IPM における害虫の発生予防と防除という概念に基づいて作成された生物農薬には、天敵昆虫を用いたものや天敵微生物を用いたものがある。前者は、アブラムシを捕食するテントウムシやオンシツコナジラミに寄生するオンシツツヤコバチなどの捕食性昆虫や捕食寄生性昆虫が主流である(世古・三浦, 2013 ; 矢野, 1988)。一方、後者は昆虫に感染し、流行病を引き起こす昆虫病原微生物である。昆虫病原微生物には、糸状菌、細菌、原虫、ウイルスなどが存在し、特定の昆虫に対して様々な病気を引き起こす。捕食性昆虫や捕食寄生性昆虫および昆虫病原微生物はどれも作用する昆虫の範囲が狭く、農業における害虫に対して選択的に使用することが可能である。また、IPM ではこれらの製剤を既存の選択性の高い化学農薬とともに複合的に用いることを推奨している。天敵微生物を用いた製剤の中でも、*Bacillus thuringiensis* を用いた細菌製剤は、現在の生物的防除資材全体の出荷量においてトップのシェアを持っている(日本植物防疫協会, 2012)。

B. thuringiensis はグラム陽性の芽胞形成細菌である。本菌はべん毛抗原における H 血清型分類によって、現在までに 70 種類を超える分離株が報告されており(Roh et al., 2009)、さらにそれぞれの血清型から細分化された亜血清型に分類されている。*B. thuringiensis* は、芽胞形成時に殺虫性結晶タンパク質である副芽胞封入体(Insecticidal Crystal Protein: ICP)またはクリスタル(以下 crystal)と呼ばれるタンパク質様物質を産生するという特徴を持つ。この crystal は、昆虫の幼虫体内などのアルカリ消化液によって前駆体となり、プロテナーゼ K 等で部分分解されることで活性型の Cry タンパク質となる。この Cry タンパク質は、幼虫の中腸細胞に存在する受容体と結合することで、細胞を破壊する。さらに、*B.*

thuringiensis は破壊された中腸細胞を通して中腸内に取り込まれた雑菌とともに幼虫の体腔側に侵入し、敗血症を引き起こす。この2つの症状により、罹病昆虫は致死する(姫野, 1999 ; Schnepf et al., 1998)。Cry タンパク質の産生能は、*B. thuringiensis* の持つ環状 DNA 上に存在する *Cry* 遺伝子にコードされており、この遺伝子を導入した遺伝子組み換え作物も存在する(Kumar et al., 2008)。さらに *B. thuringiensis* と同属の細菌である *Bacillus cereus* は *crystal* を産生しないため、この *crystal* の有無によって *B. thuringiensis* と *B. cereus* を判別することが可能である。現在までに *B. thuringiensis* が何のためにこの *crystal* を産生しているのかは解明されていないため、より詳細な特性解析が望まれる。*crystal* は、*B. thuringiensis* の株ごとに異なる特性を持ち、同一の血清型株であっても特性が大きく異なる分離株が存在するなど、菌株ごとの性質は非常に多様である。例として、*subsp. morrisoni* と *subsp. tenebrionis* という株があるが、この2株は同じ血清型に分類されているにも関わらず、毒性の対象昆虫が全く異なるため、株名が異なっている(Ibarra and Federici, 1986)。野外環境に存在する *B. thuringiensis* は、ほとんどの株が非殺虫性あるいは弱い殺虫性しか持たないが、一部の株においては強力な殺虫活性を保有していることが判明している。代表的な株が *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* と serovar *aizawai* であるが、この2種類は生物農薬の一つである BT 剤として利用されるほど強い殺虫活性を示している。さらに、*B. thuringiensis* の殺虫活性は微孢子虫や菌類などの他の昆虫病原微生物の殺虫活性よりも強力であるため、比較的短時間で効果を発揮するなど、有用性は高い(鮎沢, 1978)。このため、近年では *B. thuringiensis* を用いた生物的防除資材(BT 剤)が多く流通しており、出荷量のシェアはトップを占めている。また、Cry タンパク質は殺虫活性の他に細胞破壊活性を有しており、株によってヒトのガン罹病細胞に対する破壊活性(Mizuki et al., 2000)やトリコモナス症原因

微生物である *Trichomonas vaginalis* に対する攻撃性も確認されている (Kondo et al., 2002 ; 水城ら, 2004)。中でも、ガン細胞に破壊活性を示す Cry タンパク質はパラスポリン (parasporin) と呼ばれており、現在までに 6 グループ 19 種類に分類されている (Nagamatsu et al., 2010)。このパラスポリンは、ヒトのガン細胞を選択的に破壊することが可能であり、健全細胞には全くの無害である (Mizuki et al., 2000)。

このように、*B. thuringiensis* は様々な活性が明らかになっているため、現在はより詳しい機能解明や新規 BT 剤のための殺虫性検証などの性状解析が行われている。これら有用な特性を持つ株はほとんどが野外環境からの分離株であるが、野外からの *B. thuringiensis* の分離率は非常に低い。BT 剤は生物的防除資材の中でも非常に大きなシェアを持つ資材であり、これからの新規農薬開発には新たな有用特性を持った株の獲得が必要不可欠である。

過去の報告では、土壌からの分離や植物体の表面、河川の水からの分離の試みが行われているが、分離率は低い傾向にある (Ohba et al., 2000)。これまで確認されている有用株は野外から発見された分離株から見つかっているため、*B. thuringiensis* の研究において有用株の分離率の向上は非常に重要な要素である。また、現在でも新たな血清型の *B. thuringiensis* が発見されていることから、自然環境下においては未知の *B. thuringiensis* 株がまだ多く存在していると考えられる。さらに、現在の BT 剤の出荷率は生産コストや殺虫性、殺虫範囲などの問題で停滞している傾向があるため、適応範囲の広い株や増殖能の高い株、耐酸性や耐アルカリ性などの新規特性保有株なども求められている。特に、我が国は降水量が多いため、国土は主に酸性土壌であり、耐酸性株の発見は非常に重要である。

そこで、本研究では *B. thuringiensis* の新規検索方法の確立を目的とした分離

実験を実施した。まず、従来法よりも高頻度な分離を目指すため、これまでとは異なる視点で実験を行うこととした。このため、これまでにあまり報告されていない場所として、人間生活と密接な関わりが深い都市環境を対象に実験を行った。本研究では 2010 年から 2015 年までの 6 年間にわたる分離実験を試みた。また、得られた分離株の中の種多様性を確認するため、分子生物学的手法による検証実験を行った。検証実験には、SSU rRNA 遺伝子配列解析およびゲノムプロファイリング(GP)法の 2 つの手法を用いた。

本論文は、2 章に都市環境における分離検索実験を、3 章と 4 章に 2 種類の分子生物学的手法による分離株間の差異の検証結果を記載した。さらに、得られた結果から、5 章では *B. thuringiensis* の有用性やこれからの研究課題についても考察した。

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

1 序論

B. thuringiensis はグラム陽性の桿状の昆虫病原細菌である。本菌は芽胞形成細菌であり、至適環境外でも生存できる。また、芽胞形成時に crystal というタンパク質様物質を産生する。この crystal は昆虫体内の消化管のようなアルカリ環境下で融解し、プロテアーゼ K 等で部分分解されることで活性型の Cry タンパク質となる。この Cry タンパク質が、昆虫中腸内の円筒細胞に存在する受容体と結合し、アポトーシスの誘導や孔形成を引き起こすことで中腸円筒細胞が破壊され、昆虫の摂食を阻害する。さらに、破壊された部位を通じて菌体や雑菌が昆虫の体腔側に侵入し、中腸内の雑菌とともに増殖して敗血症を引き起こす。*B. thuringiensis* に感染した昆虫は、この 2 つの症状によって致死する(姫野,1999 ; Schnepf et al., 1998)。この殺虫機構には、受容体の存在が重要であり、受容体を持たない昆虫には作用しない。また、人獣はこの受容体を持たないため、この殺虫タンパク質を利用した BT 剤として、農作物害虫の微生物的防除資材に活用されている。微生物的防除資材の中でも、*B. thuringiensis* を用いた製剤は出荷量において高いシェアを保持しており(有江・国見, 2010)、有用性が確認されている。また、現在確認されている *B. thuringiensis* は、野外より検出された分離株であるため、今後の製品開発のためにも新規 *B. thuringiensis* 株の効率的な分離手法が求められている(Yamamoto, 1993 ; Iizuka et al., 1994)。しかしながら、*B. thuringiensis* は *Bacillus* 属細菌の中でも検索率が低いとされている(菊田ら, 1999)ため、有用形質を持つ株の検索がやや困難である(Ohba et al., 2000)。

また、分離した後の確認作業も非常に重要である。本菌と近縁な細菌として *B. cereus* が存在するが、本菌との差異は crystal 産生能の有無のみといってもよい

ほど微細である。過去の研究報告においても、*B. cereus* の株群の中から *B. thuringiensis* の血清に反応凝集した株が見つかるなど、非常に近縁であることが知られている (Ohba and Aizawa, 1986)。このように、両細菌は非常に近縁であるため、同じ細菌ではないかとする研究者も存在する。しかし、*B. thuringiensis* の crystal は昆虫に病原性を示し、その毒素タンパク質は昆虫に対してのみ特異的である。反対に、*B. cereus* はセレウリドという、ヒトに対する毒素タンパク質の産生能を持つ。この crystal 産生能やセレウリド産生能を分子生物学的に検査することで、*B. thuringiensis* と *B. cereus* を判別することは可能とされている (Agata et al., 2002)。また、crystal は位相差顕微鏡等を用いることで *B. thuringiensis* からのみ確認可能なため、顕微鏡観察において判別することも可能である。これらのことから、*B. thuringiensis* と *B. cereus* の判別は crystal の有無の調査が簡便かつ確実な手法であるといえる。

これらの既知報告を受け、今後の *B. thuringiensis* 研究ならびに BT 剤の研究開発のためには、まず新規 *B. thuringiensis* 株の検索が必須であり、そのための礎となる新規検索手法の開発が必要であると考えた。従って、本研究では、今までに報告例の乏しい人間生活に密接な関わりのある都市環境を新たな分離場所として設定し、都市環境における *B. thuringiensis* の検索を試みることにした。同時に、得られた菌体は顕微鏡観察し、芽胞と crystal の 2 つの内容物の有無による判定で、*B. thuringiensis* を判断することとした。

2 材料および方法

2-1 *Bacillus* 属菌の分離

分離実験には、DD チェッカー：MYP 寒天培地 (KYOKUTOU PHARMACEUTICAL INDUSTRIAL CO., LTD) を用いた。DD チェッカーは、食品工場などで食中毒菌として知られる *B. cereus* を単離するために作られた検査キットである。*B. thuringiensis* と *B. cereus* はお互いに非常に近縁な細菌であるが、両細菌は crystal の有無が最大の相違点であるため、顕微鏡観察によって両者を分類することが可能である。2010 年から 2015 年までの 6 年間、都市環境として設定した日本大学生物資源科学部構内の中から毎年 5 月にランダムに 20 ヶ所を選択して分離実験を行った(表 1, 図 1)。サンプリングは、DD チェッカーのふたを開け、対象となる場所に DD チェッカーを押し当てることで対象の表面に存在する微生物を培地部分に付着させた。また、水辺では滅菌された綿棒(株式会社 CS)を用いて対象地の水分を含ませ、培地部分に塗り拡げた。サンプリング後は素早くふたを閉じることで、他の細菌侵入の可能性を極力低くした。サンプリング後の DD チェッカーは、インキュベーター(FUKUSHIMA INDUSTRIES CORP.)を用いて 30-37℃で 3-4 日間培養した。培養後、DD チェッカーを確認し、*Bacillus* 属コロニーの形成の有無を確認した。*Bacillus* 属コロニーは、培地上のコロニー周辺にハローが形成されたものを数えた(図 1)。培養後の DD チェッカーは 4℃の暗所で保存した。

2-2 分離した *Bacillus* 属コロニーの単離

確認した *Bacillus* 属コロニーは、乾熱滅菌した爪楊枝で Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar (PEMBA)培地に植菌した。PEMBA 培地は、バチルスセレウス選択寒天基礎培地(Oxoid Ltd)8.2g に D.W. 110ml を加え、オートクレーブで 121℃40 分間処理した後、無菌条件下で polymixin B(Oxoid

Ltd)を 800 μ l、卵黄乳液(Oxoid Ltd)を 10.0ml 入れ、スターラー(Yamato Scientific co., Ltd.)を用いて混和し、作成した。混和した培地を、9cm 径のプラスチックシャーレ(AS ONE CO.)10 枚に分注した。充分固まった培地は、使用するまで 4°Cで保存した。植菌は無菌条件で行い、ピンセットで滅菌爪楊枝を火で数回あぶり、対象とするコロニーに先端を付着させ、未植菌の PEMBA 培地に擦り付けることで行った。植菌後の PEMBA 培地は 30-37°Cで 16 時間以上培養し、コロニーの形成を確認した。コロニーが形成された株は、ステンレスエーゼ(AS ONE Co.)を用いて新しい PEMBA 培地上に画線植菌し、これを 2~3 回繰り返すことで単離した。

2-3 *B. thuringiensis* の判定

単離した株は芽胞染色を行い、*B. thuringiensis* の判別を行った。芽胞染色には、5%(w/v)マラカイトグリーン(KANTO CHEMICAL CO., INC.)、0.3%(w/v)ズダンブラック(SIGMA ALDRICH CO.)、0.5%(w/v)サフラニンレッド(KANTO CHEMICAL CO., INC.)を用いた。まず、単離した菌体に、滅菌した爪楊枝を無菌条件下で付着させてとり、スライドガラスに塗抹し、乾燥させた。その後、弱い火にスライドガラス下部が当たるように 1~2 回あぶり、火炎固定を行った。スライドガラスの菌体塗抹部分が浸るようにマラカイトグリーンの適量を滴下し、湯気が出るまで弱い火であぶった。湯気を確認した後 2 分間静置し、流水をかけて緩やかにマラカイトグリーンを流し落とし、送風機(Japan troika corp.)を用いて乾燥させた。乾燥したスライドガラスにズダンブラックを滴下し、過剰染色を防ぐために上からろ紙を置いて 15 分静置して染色した。染色後、ろ紙をとり、キシレンで 5 秒間ズダンブラックを洗った。乾燥させた後、サフラニンレッドを菌体上に滴下し、20 秒対比染色し、流水で流し落とした。十分に乾燥させた後、位相差顕微鏡(Nikon Corporation)を用いて菌体を観察した。*B. thuringiensis* は同

じ芽胞形成細菌である *B. cereus* と近縁な細菌であるが、*crystal* を産生するという決定的な差異が存在する。菌体内に芽胞と *crystal* とと思われる 2 つの内容物が確認された場合に、*B. thuringiensis* と同定した。この操作を単離したすべてのコロニーで行い、*B. thuringiensis* と断定した数を集計した。分離率の計算は、単離した *Bacillus* 属コロニー数を分母とし、断定された *B. thuringiensis* 数を分子とした時の割合の数値とした。*B. thuringiensis* と判明した菌体は、斜傾培地に植菌し、16 時間 30℃で培養後、室温の暗所で保存した。斜傾培地は、普通寒天培地「ニッスイ」(日水製薬株式会社)を用いて作成した。三角フラスコに D.W. 200ml と 7.0g の培地を入れ、オートクレーブで 121℃ 40 分処理した。その後、5ml 容量のプラスチック培養チューブ(Evergreen Scientific Co.)に 2ml ずつ分注し、傾きを与えて固化させ、斜傾培地とした。

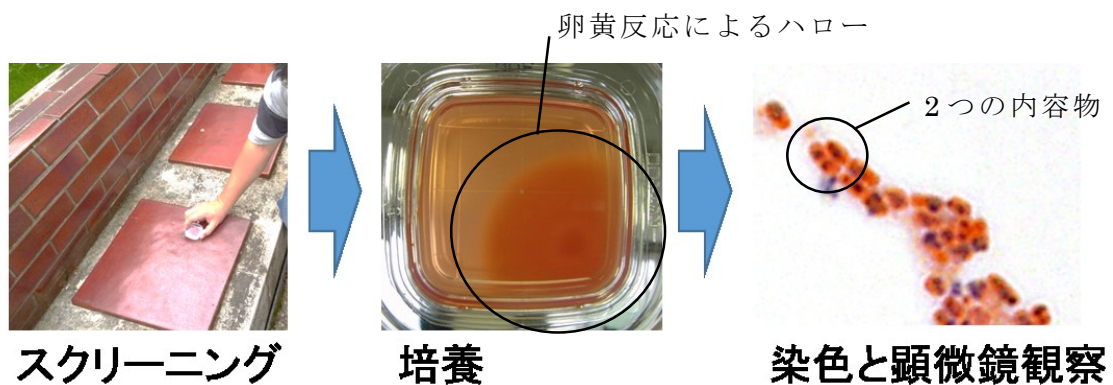


図 1. スクリーニングの状況と培養後の DD チェッカーおよび染色した分離株の顕微鏡写真

顕微鏡写真は 1,000 倍の倍率で撮影したものを拡大して表した。

表 1a. 2010 年の分離場所(20 ヶ所)

1.	本館エレベータのボタン	11.	男子トイレの床
2.	給水機のボタン	12.	サクラの葉表
3.	トラックのドアノブ	13.	圃場の土
4.	自動販売機のボタン	14.	噴水の水
5.	ビオトープの水 1	15.	ATM 画面横
6.	バラ園のバラ葉裏	16.	生体 (手の甲)
7.	パソコンのキー	17.	12 号館エレベータのボタン
8.	手すり	18.	圃場の蛇口
9.	ビオトープの水 2	19.	携帯電話
10.	ベンチ	20.	バラ花卉

表 1b. 2011 年の分離場所(20 ヶ所)

21.	2 号館水飲み場	31.	本館横の池
22.	実験室黒板	32.	2 号館前ビオトープ
23.	カード読み取り部	33.	3 号館自販機ボタン
24.	バラ園噴水	34.	スダジイ木の幹
25.	エスカレーター手すり	35.	モミジの葉
26.	体育館の柱	36.	券売機のボタン
27.	図書館のマウス	37.	バラ園の噴水
28.	本館のオブジェ	38.	フェロモントラップ内の虫
29.	ビオトープの水	39.	つり革
30.	ベンチ	40.	眼鏡

表 1c. 2012 年の分離場所(20 ヶ所)

41.	研究室下駄箱	51.	12 号館の PC マウス
42.	ほうきの穂	52.	貯水池
43.	エタノール容器	53.	10 号館の貯水池
44.	ゴミ箱の側面	54.	正門の石碑
45.	キーボード	55.	短大棟の時計
46.	コンビニ前のベンチ	56.	バックの底
47.	サクラの葉の表面	57.	学生ホールの椅子の金属部分
48.	サクラの葉の裏面	58.	短大棟のビオトープ水
49.	公衆電話タウンページ	59.	農場までの道路
50.	ジャグリング道具のスティック	60.	スマートフォンの画面

表 1d. 2013 年の分離場所(20 ヶ所)

61.	本館 1 階 傘の柄	71.	本館 5 階 ベンチ
62.	本館 1 階 エレベータのボタン	72.	本館 4 階 男子トイレ床
63.	守衛さんの指	73.	ギャラリー 灰皿の上
64.	12 号館 自販機の釣銭受け口	74.	ギャラリー ゴミ箱
65.	デジタルメモのエンターキー	75.	靴の裏
66.	12 号館 椅子	76.	体育館内冷水器
67.	体育館前の机	77.	41 講義室ドアノブ
68.	本館横ギャラリー階の池	78.	本館入口観葉植物の葉
69.	2 号館 1 階手すり	79.	雨水
70.	図書館 1 階 PC キーボード	80.	1 万円札

表 1e. 2014 年の分離場所(20 ヶ所)

81.	体育館のアリーナ床	91.	写真現像用 PC マウス
82.	12 号館 2 階エレベータ前のベンチ	92.	体育館入口壁
83.	5 号館分子遺伝学研究室の机上	93.	本館横外階段
84.	ATM タッチパネル	94.	サークル棟掲示板
85.	ATM 手すり	95.	短大研究室培養棚
86.	湘南キャンパスの記念碑	96.	図書館の本
87.	12 号館前机	97.	ガレリア階池
88.	フェロモントラップの縁	98.	農場自販機ボタン
89.	動物病院診察室前の廊下	99.	12 号館 1 階キーボード
90.	図書館 PC マウス	100.	本館エレベータ床

表 1f. 2015 年の分離場所(20 ヶ所)

101.	フェロモントラップの屋根	111.	応昆温室の黄色い柵
102.	図書館横の石碑	112.	12 号館 PC のマウス
103.	応昆冷蔵庫下の水	113.	ゴミ収集所の門
104.	図書館の 12 番机の左ヘッドホン	114.	新 1 号館のステージ床 a
105.	実行委員会室の天井	115.	図書館 3 階の机
106.	応昆温室の屋根	116.	バイクのシート
107.	サークル棟部室床	117.	農場棟の玄関マット
108.	農場棟男子更衣室前の階段	118.	CNES の門
109.	農場棟流し場の壁	119.	12 号館 2 階実験室前の天井
110.	生命農学科圃場の水溜	120.	新 1 号館のステージ床 b

3 結果

6年間で120ヶ所から分離実験を行ったところ(図2)、すべての年で *B. thuringiensis* を確認した。*B. thuringiensis* を分離した場所は、最終的に120ヶ所中51ヶ所であった(表2)。6年間の実験で、単離した *Bacillus* 属のコロニー数は合計250コロニーであり、そのうち170株を *B. thuringiensis* と判定した。6年間合計で得られた *Bacillus* 属のコロニー数と *B. thuringiensis* の分離株数から得られた分離率は、68.0%であった(表2)。また、各年の *B. thuringiensis* 分離数や分離率の詳細を表3に表した。6年間で、*B. thuringiensis* が最も多く分離された年は2014年であり、54株であった(表3e)。反対に、分離数が最も少なかったのは2012年で、12株であった(表3c)。20ヶ所中、*B. thuringiensis* を分離した場所が最も多かった年は2010年で、12ヶ所から *B. thuringiensis* を分離した(表3a)。2011年と2013年は *B. thuringiensis* 数が同じであったものの、*Bacillus* 属コロニー数が異なるため、分離率は大きく異なった(表3bおよび3d)。

また、各年の最多分離場所は、2010年が学生ホール横のベンチと12号館1階の男子トイレの床、2011年では学生ホール横のベンチ、2012年では応用昆虫科学研究室の下駄箱、2013年では研究室員の靴の裏、2014年では本館の横に位置する外階段の壁、2015年では農場棟の玄関マットであった。中でも、2014年の分離場所は6年間で実施された分離場所の中で、1ヶ所における最多分離数(13株)を記録した場所(本館横外階段)を含んでいた。



図 2. 6 年間に於ける *Bacillus thuringiensis* のサンプリング場所

各年の分離場所(20ヶ所)を表した。また、地図上で表すことができなかった場所は未記載とした。未記載：2010年は2地点。2011年は4地点。2012年は4地点。2013年は4地点。2015年は6地点。

表 2. 6年間で得られた *Bacillus thuringiensis* の分離株数と分離率

分離年	分離場所数	<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i> の分離株	分離率(%)
2010	12	53	30	56.6
2011	10	35	21	60.0
2012	8	20	12	60.0
2013	5	29	21	72.4
2014	6	66	54	81.8
2015	10	47	32	68.1
計	51	250	170	68.0

分離率は分母を *Bacillus* 属コロニー数、分子を *B. thuringiensis* 数とした時の割合として算出した。

表 3a. 2010 年の分離場所および得られた *Bacillus* 属コロニーと
B. thuringiensis の分離株数

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
自動販売機のボタン	3	1
ビオトープの水・1	1	1
ビオトープの水・2	4	4
バラ園・バラ葉裏	2	1
ベンチ	11	6
男子トイレの床	12	6
サクラの葉表	6	5
噴水の水	4	3
生体（手の甲）	1	1
圃場・蛇口	3	0
携帯電話	3	2
計	53	30

表 3b. 2011 年の分離場所および得られた *Bacillus* 属コロニーと
B. thuringiensis の分離株数

分離場所	<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>
実験室黒板	1	0
カード読み取り部	4	0
本館のオブジェ	1	0
ビオトープの水	1	0
ベンチ	13	6
2号館前ビオトープ	3	3
スタジイ木の幹	1	1
モミジの葉	5	5
つり革	4	4
眼鏡	2	2
計	35	21

表 3c. 2012 年の分離場所および得られた *Bacillus* 属コロニーと
B. thuringiensis の分離株数

分離場所	<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>
研究室下駄箱	6	5
ほうきの穂	1	0
葉の表面	1	0
貯水池	3	2
10 号館の貯水池	4	2
正門の石碑	1	0
短大棟 ビオトープ水	3	3
農場までの道路	1	0
計	20	12

表 3d. 2013 年の分離場所および得られた *Bacillus* 属コロニーと
B. thuringiensis の分離株数

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
本館 4 階 男子トイレ床	5	1
ギャラリー 灰皿の上	3	1
ギャラリー ゴミ箱	6	6
靴の裏	14	12
計	29	21

表 3e. 2014 年の分離場所および得られた *Bacillus* 属コロニーと
B. thuringiensis の分離株数

分離場所	<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>
体育館のアリーナ床 a	13	9
湘南キャンパスの記念碑	12	10
12 号館前机	12	11
フェロモントラップの淵	11	9
本館横外階段	16	13
農場自販機ボタン	2	2
計	66	54

表 3f. 2015 年の分離場所および得られた *Bacillus* 属コロニーと *B. thuringiensis* の分離株数

分離場所	<i>Bacillus</i> 属 コロニー数	<i>B. thuringiensis</i>
フェロモントラップ屋根	5	5
図書館横の石碑	1	1
図書館のヘッドホン	1	1
応昆温室の屋根	6	6
サークル棟部室床	10	5
農場棟流し場の壁	2	1
生命農学科圃場の水溜	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

4 考察

B. thuringiensis は、1901年に日本人の石渡繁胤博士がカイコの卒倒病菌として日本語で報告して以降(石渡, 1901)、本菌は日本においてカイコに重篤な毒性を示す病原菌として認知されてきた。しかし、1915年にドイツ人のエルンスト・ベルリナーが同菌を中部ドイツのチューリングア(Thuringia)で発見し、*B. thuringiensis* の名称で初めて国際論文に投稿したことにより、*B. thuringiensis* の正式名が決定するとともにその存在が知れ渡った(Berliner, 1915)。その後、カイコの餌となるクワ葉をはじめとする植物体や、土壌、水などから *B. thuringiensis* の分離が試みられ、*B. thuringiensis* の分布状況の調査が行われてきた。従来までの分離方法は、土壌や水などを現地でサンプリングし、研究施設に持ち込んでから 70°C 約 30 分の加温処理を行うことで、*B. thuringiensis* をはじめとする芽胞を持つ細菌以外の細菌を死滅させ、セレクションを行うというものであった。このように *B. thuringiensis* の検索は自然環境下を主体として行われてきた。しかしながら、自然環境におけるこれまでの分離報告では、土壌において 3%(百武・水城, 2008)、河川の水において 4.4%(Ichimatsu et al., 2000)、植物体表面においては 3.4%(Mizuki et al., 1999)と、必ずしも高い割合とは言えなかった。これを受け、本実験では視点を変え、都市環境というこれまで報告の少なかった場所において 6 年間の継続した分離実験を行い、分離率を算出した。その結果、6 年間すべての年で分離率 50%以上を記録した。6 年間平均では 68.0%と、過去の報告と比較して飛躍的に分離率を向上することができた。また、本実験手法であれば、従来法では対象とすることが難しかった無機物や建造物のような場所においても、簡単にスクリーニングすることが可能であった。加えて、屋内外を問わず検索場所を選定できるため、今まで実施されなかった場所もスクリーニングの候補とすることができた。

今回のスクリーニングにおける各年の最多分離場所は屋内外ともに人々の足元付近が多い傾向にあることが判明した。これは、大学という不特定多数の人々が行き交う場所を検索場所としたことに起因する。すなわち、頻繁に人や物資の移動が起こる都市環境では、人や物資に付着した微生物が各所より持ち込まれることになり、それが原因で微生物相が激しく変動していると推察される。*B. thuringiensis* は芽胞形成細菌であり、その芽胞は太陽光線や紫外線、乾燥をはじめとする外部ストレスに対して耐性を有する。クリーンルームのような、本来滅菌が徹底している場所ですら *Bacillus* 属の菌体が発見されることもある (Wu and Liu, 2007)。このことから、多数の微生物が付着する場所において、芽胞状態の *B. thuringiensis* が残存していたことが示唆された。さらに、風によって建造物の壁などに微生物が集積した場合にも、芽胞形成菌ならば長期間生存することは可能である (間淵・佐野、2008)。このように、他の微生物であれば生存不可能な場所においても、*B. thuringiensis* は芽胞状態で生存し得ることで、これらの場所から多数の株が発見されたと思われた。加えて、他の微生物が生存しにくい環境であるからこそ、*B. thuringiensis* のような芽胞形成細菌だけが生存し、本実験で得られた高い分離率を実現できたと推察された。このことから、DD チェッカーを用いることで、大学敷地内でなくとも都市環境に準ずる場所ならば、*B. thuringiensis* の検索が可能になることが示唆された。

都市環境における検索で *B. thuringiensis* の高い分離率が記録された一方、過去の知見では、1ヶ所あたりの分離率は必ずしも低いばかりではない。例えば、Ichimatsu et al. (2000) の報告では、1ヶ所あたりの最高分離率は 49% であった。つまり、1 サンプルにおける分離率に限れば、高い分離率を示す場合もある。これらの知見では、全ての *Bacillus* 属コロニーの中における *B. thuringiensis* の割合として分離率を算出している。本研究においても、同様に分離率の評価を行っ

た。その結果、*Bacillus* 属コロニーが検出される場所において、1 サンプルあたりの *B. thuringiensis* の割合は、最大で 100%を記録していた。100%を記録した場所は、2010 年で 3 ヶ所(表 3a)、2011 年で 5 ヶ所(表 3b)、2012 年で 1 ヶ所(表 3c)、2013 年で 2 ヶ所(表 3d)、2014 年で 1 ヶ所(表 3e)、2015 年で 4 ヶ所(表 3f)となっていた。つまり、都市環境における検索手法は、1 サンプルあたりの *B. thuringiensis* 率を向上させることができる手法であると言える。さらにこの結果から、多くの細菌にとって生育に適さないはずの都市環境という場所で、*B. thuringiensis* が非常に高頻度に検出されたということを示している。本実験で用いた DD チェッカーは、本来 *B. cereus* を分離する目的で使用されている。このため、培地成分による *B. thuringiensis* とその他の *Bacillus* 属細菌の増殖差異は考えられない。加えて、過去の報告からは、serovar *tochigiensis* において強力なバクテリオシンが確認されたとの知見がある。これらのことから、*B. thuringiensis* は周辺環境の狭い範囲に関してある程度制御できるような、バクテリオシンに類似した放出因子を有している可能性が考えられる。

第3章 SSU rRNA 遺伝子配列解析による分離株間差異の検出

1 序論

昆虫病原微生物 *B. thuringiensis* は、1901 年の発見以降現在までに様々な手法で分類されてきた。最も一般的に行われてきた分類手法は、H 血清型分類である。*B. thuringiensis* をはじめとする細菌の一部は、運動器官としてべん毛を持つ。このべん毛によって、*B. thuringiensis* は自らのコロニーを迅速に大きく拡大させることが可能となる。真正細菌のべん毛は、菌体から複数突出しており、それらが根元で左回転することで 1 本のスクリューとなり、菌体を遊走 (swarming) させる。しかし、その動きが右回転になるあるいはべん毛の回転を停止させてしまうと、推進力を失った菌体は遊走を停止する。その時、鞭毛はほつれた糸のような状態になり、しばしば隣接する菌体と絡まりあうことがある。この状態を抗原抗体反応によって故意に引き起こすものが、H 血清型分類である。すなわち、*B. thuringiensis* のべん毛という抗原に反応する抗体を用い、べん毛の活動を止め、菌体同士が凝集を形成することで特定の血清型株として分類する手法である。遊走した細菌の巨大コロニーは Hauch(ドイツ語)と呼ばれ、ガラスに息を吹きかけた時のように広がる。このため、遊走する細菌の分類に用いられることから H 血清型分類と呼ばれる(波岡、1996)。*B. thuringiensis* は、この分類手法によってこれまでに 69 種類の H 血清型が確認されており(Lecadet et al., 1999)、現在でも新たな血清型株が発見されているため(Roh et al., 2009)、*B. thuringiensis* の種類数は 70 種類以上に及んでいる。しかしながら、*B. thuringiensis* と近縁である *B. cereus* の中にも、*B. thuringiensis* と同じ血清に対して凝集反応を示す株が存在する。また、*B. thuringiensis* 分離株の中にはべん毛を欠損している株やまったく凝集反応を示さない株が存在する。このような株

に対して、H血清型による分類は不明確であり、事実上判別できないことになる。このことから、*B. thuringiensis* の H 血清型以外の分類方法が必要である。これまでの知見では、分子生物学的手法に基づいた分類が多く行われてきた。その中でも、特定遺伝子配列の比較による分類は、*B. thuringiensis* を含む複数の *Bacillus* 属細菌間の関係性調査に用いられてきた。その結果、Small Subunit(SSU) rRNA 遺伝子配列および *gyrB* 遺伝子配列、*aroE* 遺伝子配列の解析では、*B. thuringiensis* と *B. cereus* は分類することが困難であるという知見が報告されている(Soufiane and Côté, 2009)。本研究では、これら既知報告における提言の検証に加え、分離株間の差異検出のために SSU rRNA 遺伝子配列解析を試みた。

2 材料および方法

供試株は、2010年から2014年までの *B. thuringiensis* 分離株 136 株に加え (図 5)、大庭道夫前九州大学教授より分与された標準株 40 株を用いた。 *B. thuringiensis* は保存しているものを 30℃で一晩振とう培養し、ZR-96 Fungal/Bacterial DNA Kit™(Zymo Research Co.)を用いて DNA 抽出を行った。SSU rDNA 配列解析には、SP-*Taq* polymerase(Cosmo Genetech Co., Ltd.)を用いた。プライマーは SP6+16S-F1(5'- GAT TTA CGT GAC ACT ATA GGA ACG CTG GCG GCG TGC CTA A-3')、T7+16S-R1(5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG CAC CTT CCG ATA CGG CTA CC-3')を Sigma-Aldrich Co. LLC.に委託し、合成した。PCR は総量 10 μ l で行った。SP-*Taq* polymerase を 0.1 μ l、1×SP buffer を 1 μ l、2.5mM dNTPs(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mix を 0.8 μ l、プライマーはそれぞれ最終濃度が 0.5 μ M になるように混合した。PCR 反応には、Mastercycler personal (Eppendorf Co., Ltd)を用いた。温度サイクルは、95℃で 1 分、63℃で 45 秒、72℃で 45 秒反応させ、35 サイクル行った。PCR 後、アガロース電気泳動で増幅を確認した。電気泳動で用いるアガロースゲルは、Agarose, For Routine Use(Sigma-Aldrich Co.)に、1 倍に希釈した Tris hydroxymethyl aminomethane、Acetate、Ethylenediaminetetraacetic acid(TAE)緩衝液(株式会社ニッポンジーン)を 1%となるように混合し、電子レンジ(RE-TD1-W5D) (SHARP Co.)を用いて加温しながら融解させた。溶解後のゲルは、ゲルメーカーセット-EXU-HR (TAKARA BIO INC.)を用いて硬化させた。ゲルメーカーセット-EXU-HR 付属の EXU ゲルメーカー台-HR の中に、9.9×11.1cm の EXU ゲルトレイ L-HR をセットし、溶解したゲルを流し入れ、ウェルの大きさが 1.0×3.0mm となる EXU コーム-HR を 3 本設置し、室温で約 15 分静置し作成した。電気泳動は Mupid®-2plus (TAKARA BIO INC.)を用いて 100V、25 分間行った。分子マー

カーとして、Gene Ladder wide 1 (Dye Plus) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)をサンプルと同時に泳動した。電気泳動には産物 3 μ l と滅菌蒸留水 2 μ l に加え、6 \times Loading dye(東洋紡績株式会社)1 μ l を混合したものを 5 μ l アプライした。電気泳動に用いる緩衝液には前途した 1 \times TAE 緩衝液を使用した。染色は、1 μ g/ml のエチジウムブロマイド(臭化エチジウム) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)に浸漬し、Mild Shaker XR-36 (TAITEC Co., Ltd.)で 20 分間低速で振盪しながら染色した。撮影には ChemiDoc XRS(Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用い、紫外線照射下で撮影した。

増幅が確認できた PCR 産物は、DNA 精製キット(Fast Gene Gel/PCR Extraction kit)(NIPPON Genetics Co,Ltd)を用いて精製した後、SP6(5'- GAA CGC TGG CGG CGT GCC TAA -3')および T7(5'- GGC ACC TTC CGA TAC GGC TAC C -3')のプライマーを混合し、株式会社ファスマックに配列解析を委託した。配列解析された遺伝子配列は、PRABI-Doua Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique Site Doua (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>)を用いて 1 本化し、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)ver. 6 内の Clustal W でマルチプルアライメントを行った。その後、最尤法を用いて系統樹を描写した。検証回数は 1,000 回で行った。系統樹には、外群として *Escherichia coli* の遺伝子配列を加えた。また、*B. thuringiensis* の近縁細菌である *B. cereus* と *Bacillus subtilis* を加えた。標準株 40 株の遺伝子配列は、Oda et al. (2011)で解析済みの遺伝子配列を用いた。

表 4. 供試した分離株一覧

調査年	分離場所	<i>B. thuringiensis</i> 数	株名*
2010	自動販売機のボタン	1	A01
	ビオトープの水・1	1	A02
	ビオトープの水・2	4	A03-A06
	バラ園・バラ葉裏	1	A07
	ベンチ	6	A08-A13
	男子トイレの床	6	A14-A19
	サクラの葉表	5	A20-A24
	噴水の水	3	A25-A27
	生体 (手の甲)	1	A28
	携帯電話	2	A29-A30
	小計	30	A01-A30
2011	ベンチ	6	B01-B06
	2号館ビオトープ	3	B07-B09
	スタジイ木の幹	1	B10
	モミジの葉	5	B11-15
	つり革	4	B16-B19
	眼鏡	2	B20-B21
	小計	21	B01-B21
2012	下駄箱	5	C01-C05
	バラ園横 貯水池	2	C06-C07
	10号館 貯水池	2	C08-C09
	短大棟 ビオトープ水	3	C10-C12
	小計	12	C01-C12
2013	体育館前の机	1	D01
	本館4階 男子トイレ床	1	D02
	ガレリア 灰皿の上	1	D03
	ガレリア ゴミ箱	6	D04-D09
	靴の裏	12	D10-D21
	小計	21	D1-D21
2014	体育館のアリーナ床	9	E01-E09
	湘南キャンパスの記念碑	10	E10-E19
	12号館前机	11	E20-E30
	フェロモントラップの縁	9	E31-E39
	本館横外階段	13	E40-E52
	農場自販機ボタン	2	E53-E54
	小計	54	E01-E54
	合計	138	A01-E54

*: 2010年から2014年まで順にアルファベットを振った。

表 5. 供試した標準株一覧

No.	serotype ^{※1}	serovar ^{※2}	No.	serotype ^{※1}	serovar ^{※2}
1	1	<i>thuringiensis</i>	21	16	<i>indiana</i>
2	2	<i>finitimus</i>	22	17	<i>tohokuensis</i>
3	3a,3c	<i>alesti</i>	23	18a,18b	<i>kumamotoensis</i>
4	3a,3b,3c	<i>kurstaki</i>	24	19	<i>tochigiensis</i>
5	3a,3d	<i>sumiyoshiensis</i>	25	20a,20b	<i>yunnanensis</i>
6	3a,3d,3e	<i>fukuokaensis</i>	26	21	<i>colmeri</i>
7	4a,4b	<i>sotto</i>	27	22	<i>shandongiensis</i>
8	4a,4c	<i>kenyae</i>	28	23	<i>japonensis</i>
9	5a,5b	<i>galleriae</i>	29	24a,24b	<i>neoleonensis</i>
10	6	<i>entomocidus</i>	30	25	<i>coreanensis</i>
11	7	<i>aizawai</i>	31	26	<i>silo</i>
12	8a,8b	<i>morrisoni</i>	32	27	<i>mexicanensis</i>
13	9	<i>tolworthi</i>	33	28a,28b	<i>monterrey</i>
14	10a,10b	<i>darmstadiensis</i>	34	29	<i>amagiensis</i>
15	11a,11b	<i>toumanoffi</i>	35	30	<i>medellin</i>
16	11a,11c	<i>kyushuensis</i>	36	31	<i>toguchini</i>
17	12	<i>thompsoni</i>	37	32	<i>cameroun</i>
18	13	<i>pakistani</i>	38	33	<i>leesis</i>
19	14	<i>israelensis</i>	39	34	<i>konkukian</i>
20	15	<i>dakota</i>	40	44	<i>higo</i>

※1:serotype は反応血清型を示し、※2:serovar は血清型分類における株名を表した。

3 結果

2010 年から 2014 年までに分離された分離株 138 株を対象に、PCR による DNA の増幅を試みた。その結果、138 株のすべてにおいて SSU rRNA 遺伝子配列と推定される約 1,500bp の遺伝子断片が確認された(図 3-7)。この遺伝子断片を配列解析した結果、全 136 株の遺伝子配列が得られた。これらの配列をマルチプルアライメントによって比較し、系統樹を描写した結果、図 8 ならびに図 9 のような系統樹が得られた。なお、本研究における供試株の塩基配列は類似度が非常に高かったため、2012 年株からは 5-6 株を選抜して、系統樹を作成した。系統樹では、標準株と分離株が分かれた部分も見受けられた。しかしながら、SSU rRNA 遺伝子の配列には差異がほとんど存在せず、分離株が標準株と一緒に大きな 1 つのクラスター内に収束され、縦に 1 直線に伸びたような系統樹となった(図 8, 9)。これらのことから、SSU rRNA 遺伝子の配列に基づいた系統樹作成では、分離株間における詳細な差異は判別できないことが示唆された。

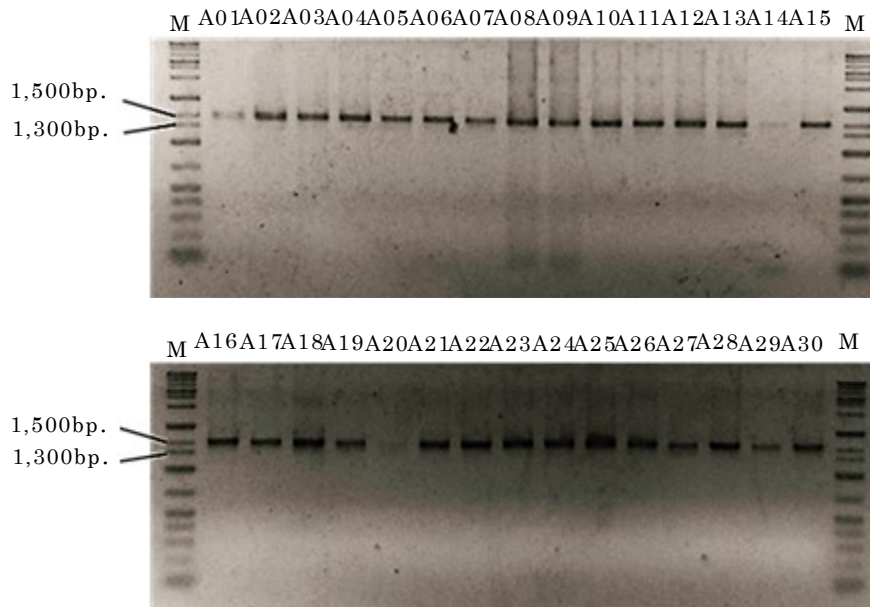


図 3. 2010 年分離株の SSU rRNA 遺伝子増幅泳動図

M はマーカ、Lane 上部の数字は株名を表した。

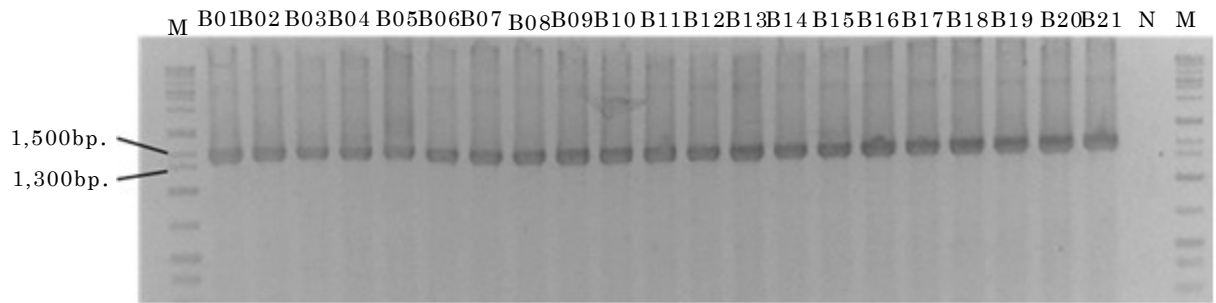


図 4. 2011 年分離株の SSU rRNA 遺伝子増幅泳動図

M はマーカー、Lane 上部の数字は株名、N はネガティブコントロールを表した。

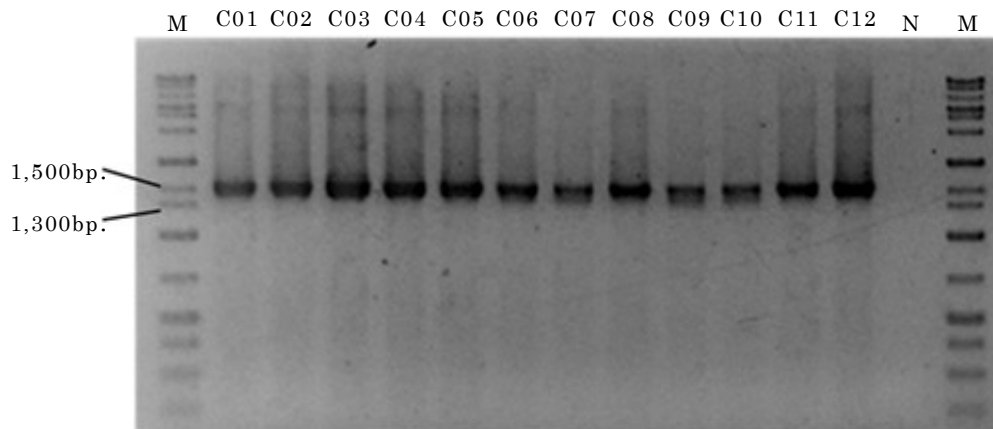


図 5. 2012 年分離株の SSU rRNA 遺伝子増幅泳動図

M はマーカー、Lane 上部の数字は株名、N はネガティブコントロールを表した。

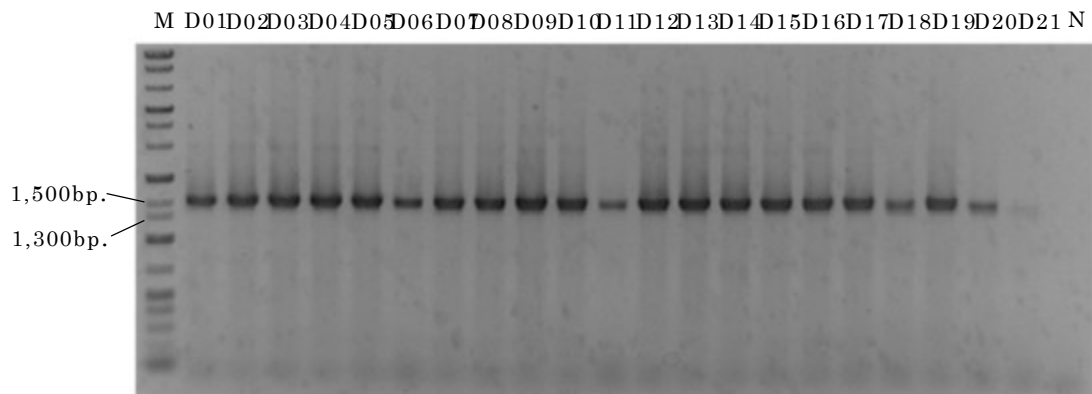


図 6. 2013 年分離株の SSU rRNA 遺伝子増幅泳動図

M はマーカー、Lane 上部の数字は株名、N はネガティブコントロールを表した。

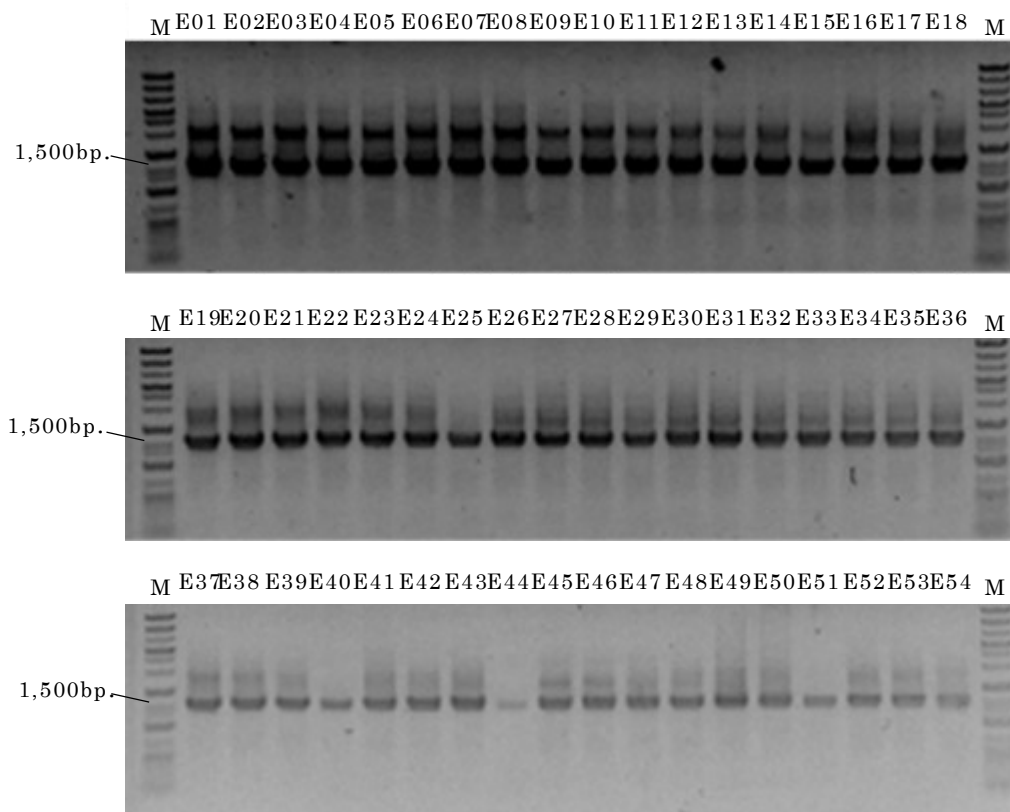


図 7. 2014 年分離株の SSU rRNA 遺伝子増幅泳動図

M はマーカー、Lane 上部の数字は株名を表した。

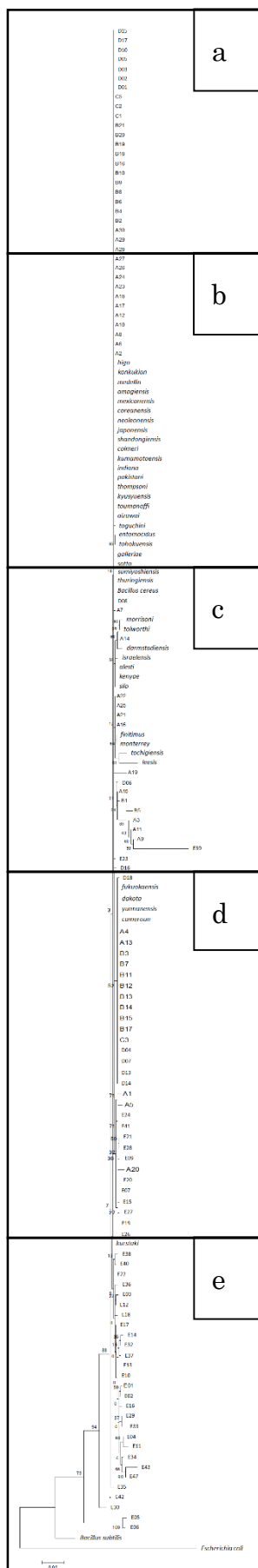


図 8. SSU rRNA 遺伝子配列解析による系統樹

アルファベットは、分割した番号を表した。

D15
D17
D10
D05
D03
D02
D01
C05
C02
C01
B21
B20
B19
B18
B16
B10
B09
B08
B06
B04
B02
A30
A29
A28
A27

図 9a. SSU rRNA 遺伝子配列解析の系統樹分割図

図 8 の系統樹のうち、a の部分について拡大して表した。A-E は、それぞれ 2010-2014 年の分離株であることを示す。

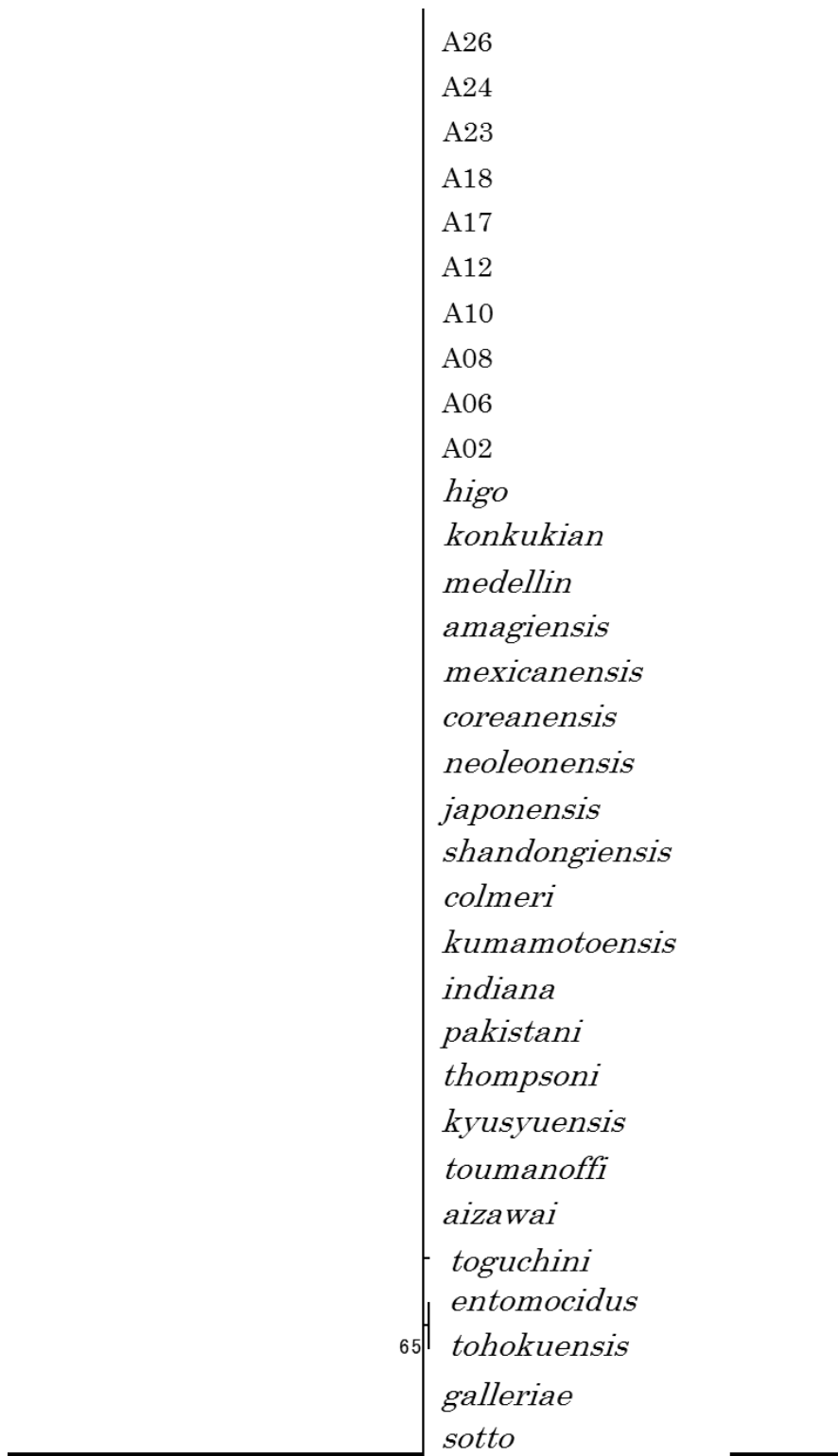


図 9b. SSU rRNA 遺伝子配列解析の系統樹分割図

図 8 の系統樹のうち、b の部分について拡大して表した。A-E は、それぞれ 2010-2014 年の分離株であることを示した。

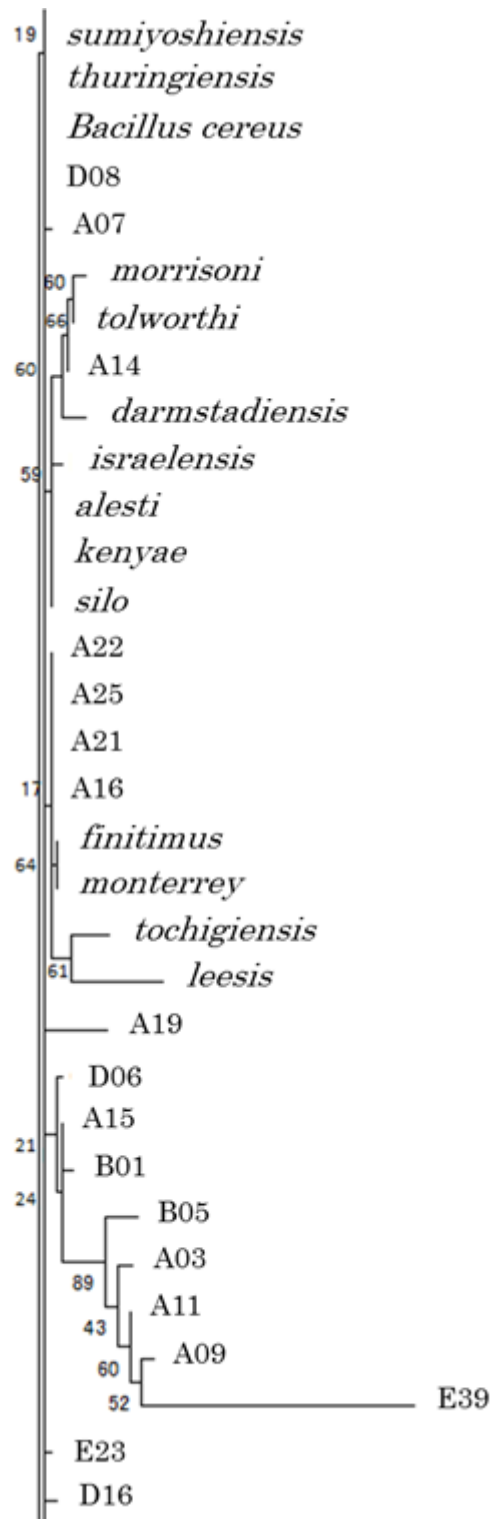


図 9c. SSU rRNA 遺伝子配列解析の系統樹分割図

図 8 の系統樹のうち、c の部分について拡大して表した。A-E は、それぞれ 2010-2014 年の分離株であることを示した。

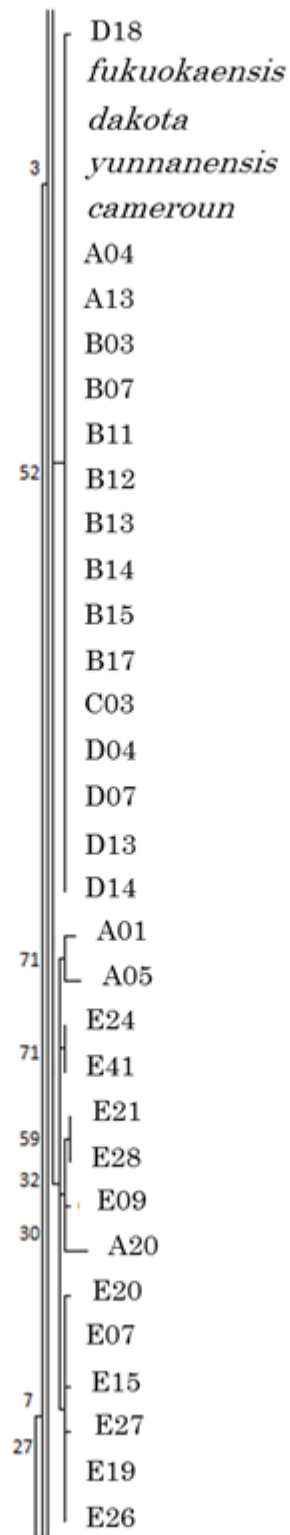


図 9d. SSU rRNA 遺伝子配列解析の系統樹分割図

図 8 の系統樹のうち、d の部分について拡大して表した。A-E は、それぞれ 2010-2014 年の分離株であることを示した。

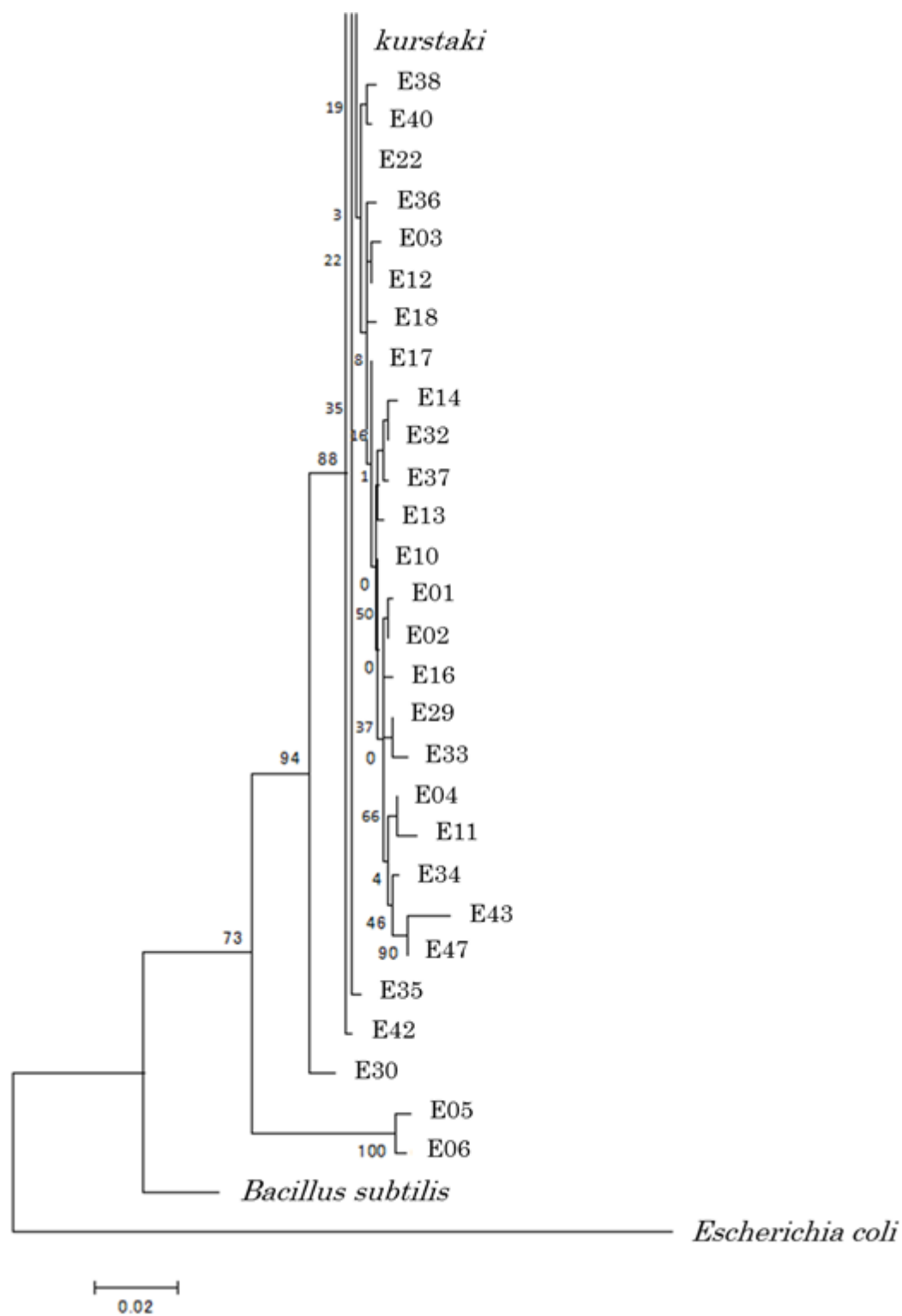


図 9e. SSU rRNA 遺伝子配列解析の系統樹分割図

図 8 の系統樹のうち、e の部分について拡大して表した。A-E は、それぞれ 2010-2014 年の分離株であることを示した。

4 考察

B. thuringiensis は *Bacillus* 属に含まれる土壌細菌の一種である。また、*Bacillus* 属において最も一般的な株として *B. subtilis* があるが、この菌は我が国では枯れた稲わらから分離される菌として知られており、発酵食品である納豆を作り出す有用細菌として認知されている (Sawamura, 1906)。このため、*B. subtilis* は納豆菌とも呼ばれている。一方、ヒトに害をもたらす *Bacillus* 属の細菌として、*B. cereus* が知られている。*B. cereus* は人体に存在する腸内細菌であるが、腸内で菌体数が増加した場合に、ヒトに対して嘔吐や下痢といった中毒症状を引き起こすため、食品工場や加工現場、飲食店などでは、混入を阻止しなければならない重要な細菌である。*B. thuringiensis* は、*B. cereus* と非常に近縁な株であり (Helgason et al., 2000)、*B. thuringiensis* を判別する一部の血清にも *B. cereus* は同じ反応を示す株が存在するため、両細菌の類似性は非常に高いとされる。しかし、*B. thuringiensis* は芽胞形成時に crystal を産生するという特徴を持っており、この crystal の有無こそが両細菌の最大の差異と言える。本章では、このような先行研究の知見を基に、特定遺伝子配列解析で本当に *B. thuringiensis* が分類識別することが可能なのか否かを検証した。その結果、系統樹の樹形がほぼ一直線になるような形を描いたため (図 8, 9)、*B. thuringiensis* 分離株間における塩基配列の差異は極めて小さかった。2014 年の分離株である E39 は、この中では最も大きな差異を示していた (図 9c)。しかし、E39 の SSU rRNA 遺伝子配列を NCBI (National Center Bio information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で検索した結果、*B. thuringiensis* や *B. cereus* を含む *Bacillus* 属の 16S ribosomal RNA 遺伝子の配列と極めて近似していることがわかった。また、E39 を含む供試分離株は顕微鏡観察によって全株に芽胞と crystal の存在が確認されているため、E39 は

他の供試株とわずかな差異はあるものの、その差異は *B. thuringiensis* グループ内の変異であることが確認できた。過去に行われた *B. thuringiensis* を含む *Bacillus* 属細菌の分子生物学的分類結果の多くは、*Bacillus* 属細菌の分類の難しさが記載されていた(Helgason et al., 2000 ; Joung and Côté, 2001 ; Punina et al., 2013)。また、Radnedge et al. (2003)では、suppression subtractive hybridization を用いて *Bacillus anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. cereus* の3種類の差異検出を試みた結果、*B. anthracis* グループに共通しつつ、*B. thuringiensis* や *B. cereus* に存在しない28の遺伝子断片を特定し、これを指標に他2種の *Bacillus* 属細菌との差異を示した。

これらの知見から、*Bacillus* 属細菌のような非常に近縁な生物間同士を比較分類するためには、複数の手法を組み合わせることが望まれると考えられる。あるいは、もっと詳細な識別分類が可能となる新規解析手法の開発と導入が必要であると思われる。

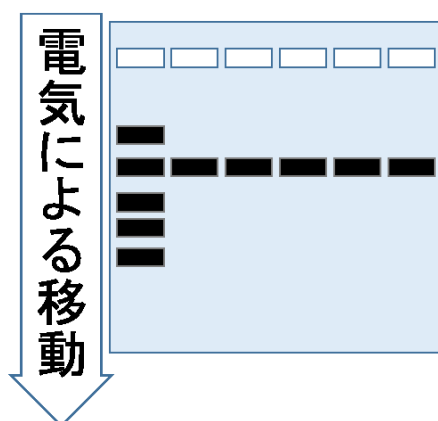
第 4 章 ゲノムプロファイリング(GP)法による分離株間差異の検出

1 序論

B. thuringiensis は、H 血清型による分類だけでも 70 種類以上に分かれる。本研究で分離した *B. thuringiensis* 株がどのような性質を持ち、既知株とどれほど類似しているかを調査することで、今回行った分離検索実験の効率性を検証する必要がある。現在まで行われてきた分子生物学的手法による *B. thuringiensis* の分類識別は、特定遺伝子配列解析法 (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism : AFLP) やそれに加えて制限酵素による断片の切断による多型解析法 (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism : PCR-RFLP) などを組み合わせた複合的な手法が用いられている (Joung and Côté, 2001 ; Punina et al., 2013)。このような複合的な実験手法は操作が煩雑であり、多くの労力を必要とする。そのため、本研究では分子生物学的解析手法としてゲノムプロファイリング法 (**G**enome **P**rofilng、以下 GP 法) を用いた解析を行った。GP 法はランダム PCR、温度勾配ゲル電気泳動 (**T**emperature **G**radient **G**el **E**lectrophoresis: TGGE)、さらにそこから得られたプロファイルと比較するという 3 行程から成り立っている。この GP 法は、サンプルとする生物のゲノム全体から株間差異を検出することが可能であるため、近縁な生物間の系統解析に適している。また、過去には様々な生物の詳細な系統解析に利用されており、*B. thuringiensis* を含む複数種類の昆虫病原細菌の分類にも用いられているため (Hatakeyama et al., 2011 ; Oda et al., 2011 ; Oda et al., 2014)、今回分離した *B. thuringiensis* 株の供試株間差異の検出に用いた。ランダム PCR は、単一の短いプライマーを用いることで不特定多数の断片を検出する手法である。ここで得られた断片を TGGE によって 1 株ずつ電気泳動し、その泳動図をプロファイリングする。通常の電気泳動では電流による

移動度の差異のみで増幅断片を区別するが、TGGE では電流に対して垂直に 15℃ から 55℃ の温度勾配がかけられている。この温度勾配により、増幅断片の 2 重らせん構造が解かれ、単独の断片となる。増幅断片の 2 重らせん構造が解かれると、ゲルの網目構造によって断片が移動しにくくなるため、泳動図内のバンドは曲がって見える(図 10)。この曲がり始める点は増幅産物内の GC 含量に依存して変化するため、たとえ同じ断片長であっても判別することが可能である。また、バンドが解かれるにつれて網目構造に移動を阻害されやすくなるため、ゲルの左側ではバンドは上方へ伸びるような図になり、最終的に完全に解離することで平行して見えるバンドとなる。このプロファイルを一株ずつ比較することによって株間の類似度を数値で算出し、客観的に評価することが可能となる。この GP 法は、先述した PCR-RFLP 法と同様に、異なる原理の手法を複合的に組み合わせている手法である。また、類似度を数値化することで、非荷重結合法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean : 以下 UPGMA)を用いた系統樹作成も可能である。

• 従来の電気泳動



• TGGE

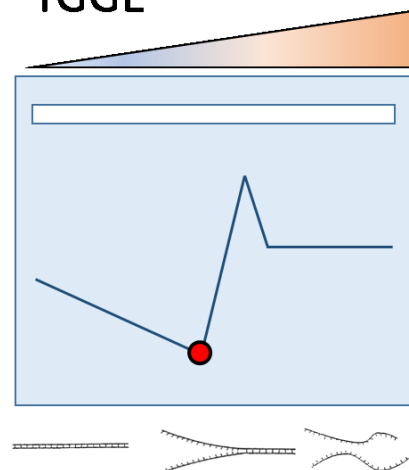


図 10. 従来の電気泳動と TGGE の比較

赤い丸は解離し始めた点(特徴点)を表した。TGGE の下には、増幅産物の解離状態を表した。

2 材料および方法

2-1 ランダム PCR

供試株は、2010年から2015年に分離した分離株170株に加え、H血清型分類による標準株40株を含む計210株を用いた。ランダムPCRには、G-*Taq* DNA polymerase (Cosmo Genetech Co., Ltd.)を用いた。PCR反応は総量20 μ lで行い、10 \times G-*Taq* bufferを2.0 μ l、2.5mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) mixを1.6 μ l、G-*Taq*を0.2 μ l使用した。プライマーは pfM12 (5'-AGA ACG CGC CTC-3')、pfM19 (5'-CAG GGC GCG TAC-3' (Nishigaki and Sakuma, 1994)、Hunt (5'-TGC TGC TGC-3') (Takasaka et al., 2011)の3種類を用い、それぞれ終濃度が0.5 μ Mとなるように混合した。このPCR溶液を、変性94 $^{\circ}$ C15秒、アニーリング40 $^{\circ}$ C(Huntは50 $^{\circ}$ C)30秒、伸長50 $^{\circ}$ C30秒で35回繰り返し、Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf Co., Ltd.)を使用して増幅した。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動で確認した。電気泳動に用いたアガロースゲルや泳動装置、泳動時間および撮影方法は、3章のSSU rRNA遺伝子解析の項と同様に行った。

2-2 温度勾配ゲル電気泳動(TGGE)

増幅が確認されたPCR産物はTGGEで分離展開し、プロファイリングを取得した。TGGEはマイクロTG(TAITEC Co.)を用いて行った。電気泳動ゲルは大きさ2.5x2.5cm、8%アクリルアミド(bis:アクリルアミド(19:1))、6.5M尿素、TBEバッファーによって構成されている。TGGEには分子マーカーに相当するものとして、内部参照点(internal reference: ref)を設置した。refの作成には、pBR322 DNA(NIPPON GENE CO., LTD.)を用いてPCRを行った。refは200bp.と900bp.を示し、200bp.ではref5F(FITC/5'-AGT GGT CCT GCA ACT TTA TC-3')と6R(5'-AAC ATG GGG GAT CAT GTA AC-3')を用い、900bp.ではref6F2 (FITC/ 5'-GCC

GGC ATC ACC GGC GCC ACA GGT GCG GTT G-3')と 900R2 (5'-TAG CGA GGT GCC GCC GGC TTC CAT TCA GGT C-3')を用いた。PCR は全量 50 μ l で行い、LaboPass™ G-Taq DNA Polymerase (COSMO GENETECH CO., LTD.)を使用した。反応液は G-Taq polymerase を 0.3 μ l、10xReaction buffer を 5 μ l、dNTP mix 2.5mM each を 4 μ l、各プライマーは終濃度が 0.12 μ M になるように混合した。PCR 反応は Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf Co., Ltd.)を使用し、94°Cを 30 秒、55°Cを 45 秒、72°Cを 30 秒行い、25 回繰り返した。増幅産物はアガロースゲル電気泳動で確認し、200bp.と 900bp.の産物を 1:2 の比率で混合した。ランダム PCR によって得られた増幅産物と ref を混合し、TGGE の電気泳動ゲルのウェルに 9 μ l 滴下した。電気泳動は 100V で 9 分間行った。泳動したゲルはエチジウムブロマイドで染色した。撮影には ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用い、紫外線照射下で撮影した。

2-3 プロファイル比較

撮影によって得られたプロファイルは、特徴点 (**species identification dots:spiddos**)とプロファイル相同性 (**Pattern Similarity Score:PaSS**)を用いることで他の供試材料のプロファイルと比較した。*spiddos* は、プロファイル中にある供試株のバンドが完全に解離した点を指定し、ref のバンドが解離した点は参照点として指定した。*PaSS* はプロファイルごとの *spiddos* の位置関係を、参照点を軸に数値化したものである。この *spiddos* の指定と *PaSS* の計算には、解析ソフト「microTGGEver20(060404)for spiddos.exe」(Taitec CO.)を使用した。*spiddos* の指定は、プロファイル中の ref 以外のバンドの解離点すべてに行った。*PaSS* は $1 \geq PaSS \geq 0$ であるため *PaSS*=1 で相同性が最大となり、完全に一致したプロファイルを持っていることになる。本研究では 3 つのプライマーを用いて実験を行い、それぞれの *PaSS* を平均化することでプライマーによる誤差を修正

した。その後、平均化された *PaSS* を基に DendroUPGMA (2009 年 12 月改定版
を使用) (URL : <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) によって非荷重結合法に基づく
各株の類似性を解析した。解析結果は、TreeView (Win32) を用いて系統樹として
描写した。

3 結果

GP 法を用いて 210 株の *B. thuringiensis* を解析したところ、すべてのプライマーで、すべての株におけるプロファイルの取得に成功した(図 11-28)。その結果、2011 年の分離株 3 株(B02、B07、B08)の組み合わせおよび 2 株(B20、B21)の組み合わせの計 2 組が、非常に近似したプロファイルであった(図 14-16)。B02 は学生ホール横のベンチ由来、B07 と B08 はビオトープの水由来の株であった。同様に、2015 年の分離株である F09 と F10 も非常に似通ったプロファイルであった(図 26-28)。この他に類似したプロファイルは存在しなかった。2010 年から 2015 年の 6 年間で類似した株もなく、分離年の違いはなかった。

このプロファイルを一株ずつ総当たりで比較した結果、株対株のそれぞれの類似度が数値として得られた(表 6, 7)。類似度が最大を示した株の組み合わせ、すなわち最も類似していた組み合わせは、前述した B07 と B08 であった。反対に、類似度が最も低い組み合わせ、すなわち最も遠縁とされた組み合わせは、標準株である serovar *yunnanensis* と serovar *leesis* であった。*B. thuringiensis* と確定している株が最も遠い類縁関係を示したことから、本研究で供試した全株は *B. thuringiensis* に属する細菌であることが、分子生物学的知見からも判明した。また、*PaSS* の平均値は 0.905 で中央値が 0.909 であった。平均値と中央値がほぼ同じ数値となったことから、突出して変化の大きい株は少なかったことが示唆された(表 6)。

プライマーごとに得られた類似度を平均化し、株間の数値について非荷重結合法(UPGMA)を用いて解析したところ、図 29 と図 31 のような系統樹が得られた。系統樹上では、標準株が密集するクラスターと分離株が密集するクラスターとに分かれた。また、標準株が多く集まるグループのうち、A のクラスターには分離株の E05 と E06、F21、A11 の 4 株も含まれていた(図 30a)。このように標準株

と分離株が隣接するクラスターは A-E の合計 5 つ確認された。B のクラスターには serovar *mexicanensis* とともに C08、C04、A02、A13、C07 の 5 株が含まれていた(図 30b)。同じく、serovar *amagiensis* が含まれた C のクラスターには F32 と F20 の 2 株(図 30c)、serovar *morrisoni* が含まれた D のクラスターには E39 と E45 の 2 株(図 30d)、serovar *monterrey* が含まれた E のクラスターには F03、F08、E02、F01、E16、E10、E19 の 7 株が、それぞれ隣接していると確認された(図 30e)。一方、図 31 の無根系統樹では、E クラスターが他の株と比べて遠い位置にあることが判明した。他のクラスターが図の左側に密集していることから、serovar *monterrey* や F03 などが含まれる E クラスターの株群が、それぞれ特異な特性を持っている可能性が高い。また、標準株には殺虫活性を持つものも含まれているが、分離株に近接した標準株の中で殺虫活性を持つものは、7 株中 4 株だった(表 8)。

この 2 つの系統樹から、分離株の中には標準株に近い特性を持つ株が合計 20 株存在していることがわかった。反対に、標準株と異なるクラスターを形成した分離株は、210 株から 20 株を除いた 190 株が確認された。これら 190 株は、同じ分離年の株が隣接するという一定の傾向があったが、同じ分離場所の株のみが収束することにはなかった。

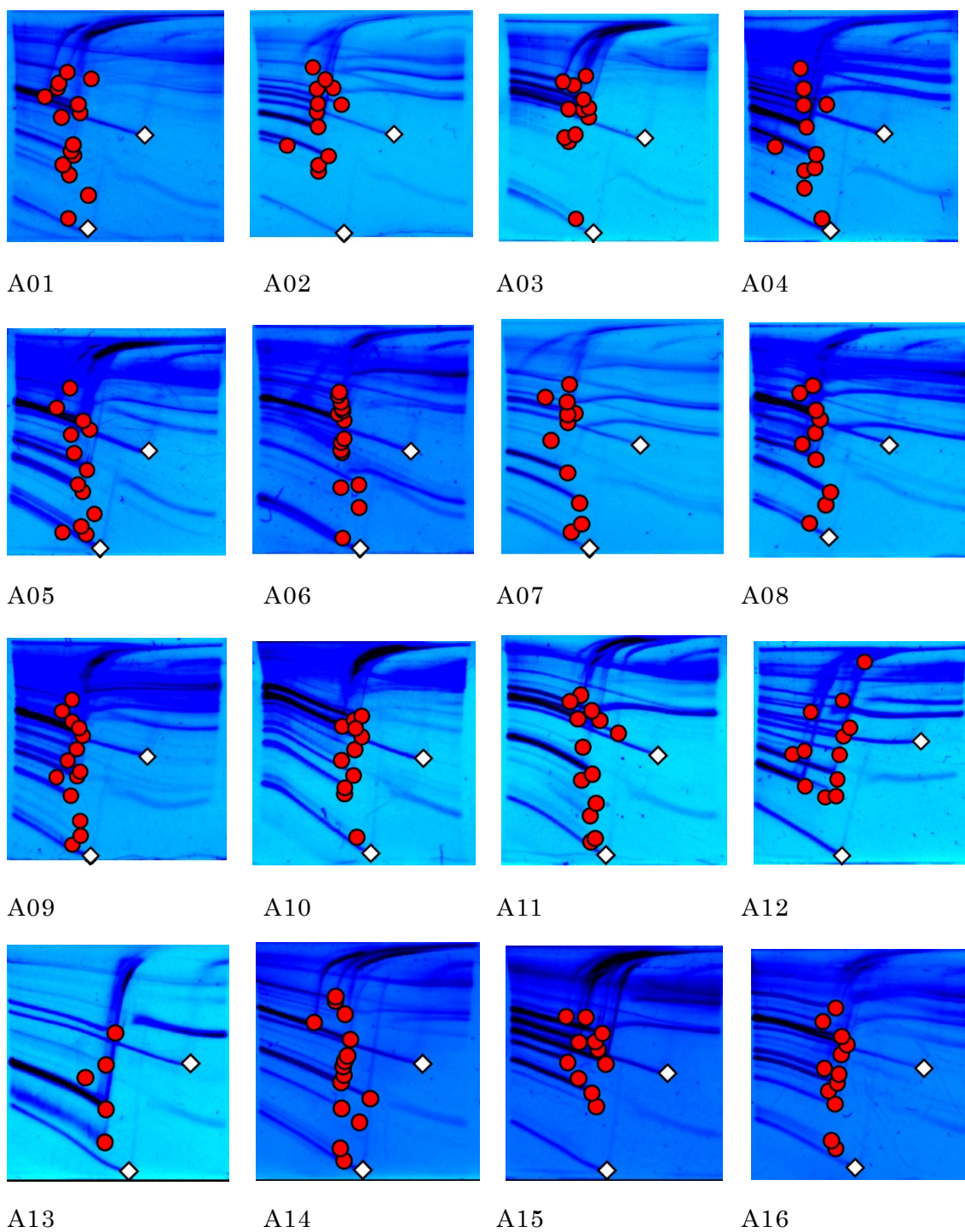


図 11a. 2010 年分離株における pfm12 プライマーの TGGE 泳動図

2010 年に分離された、30 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

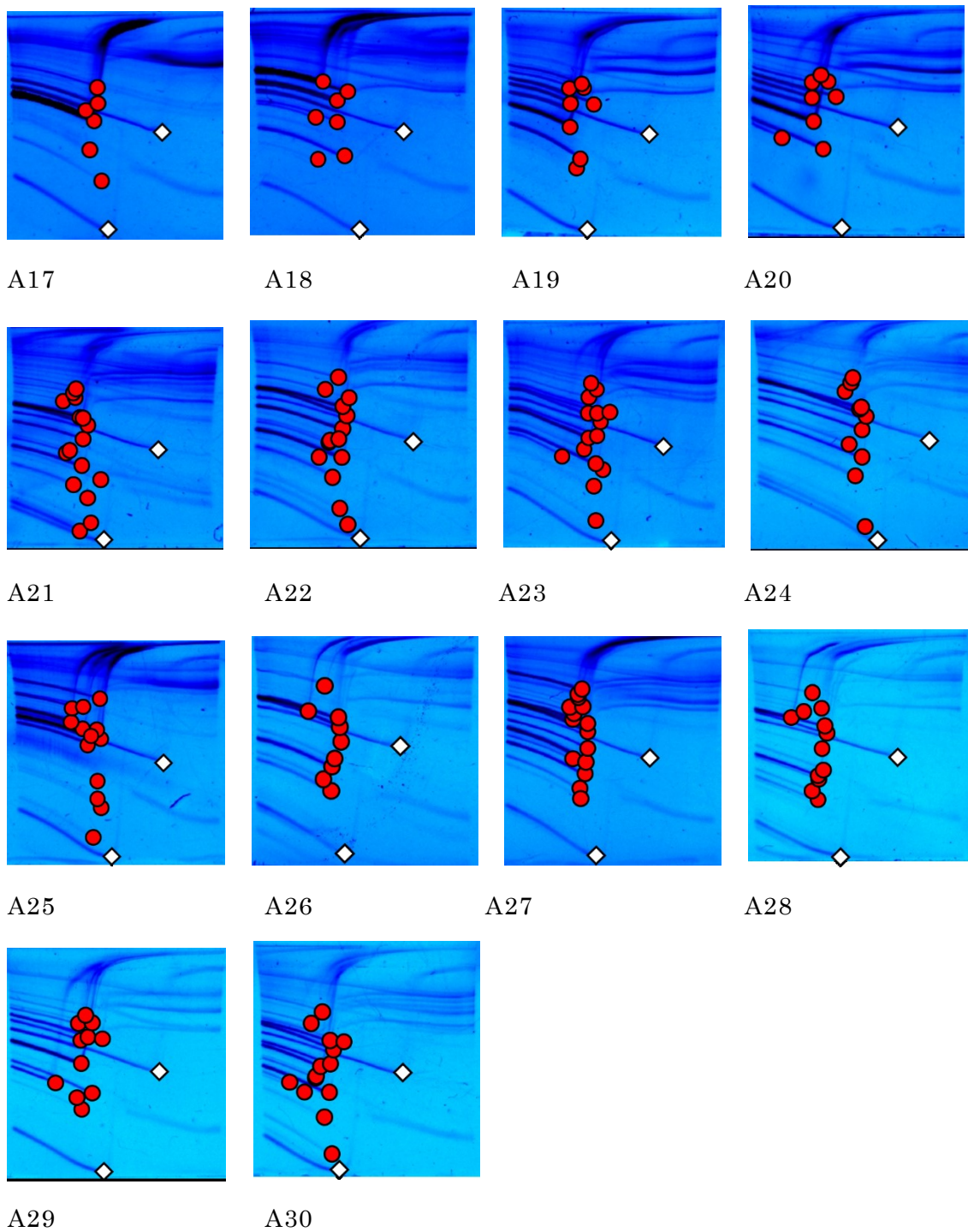


図 11b. 2010 年分離株における pfM12 プライマーの TGGE 泳動図

2010 年に分離された、30 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

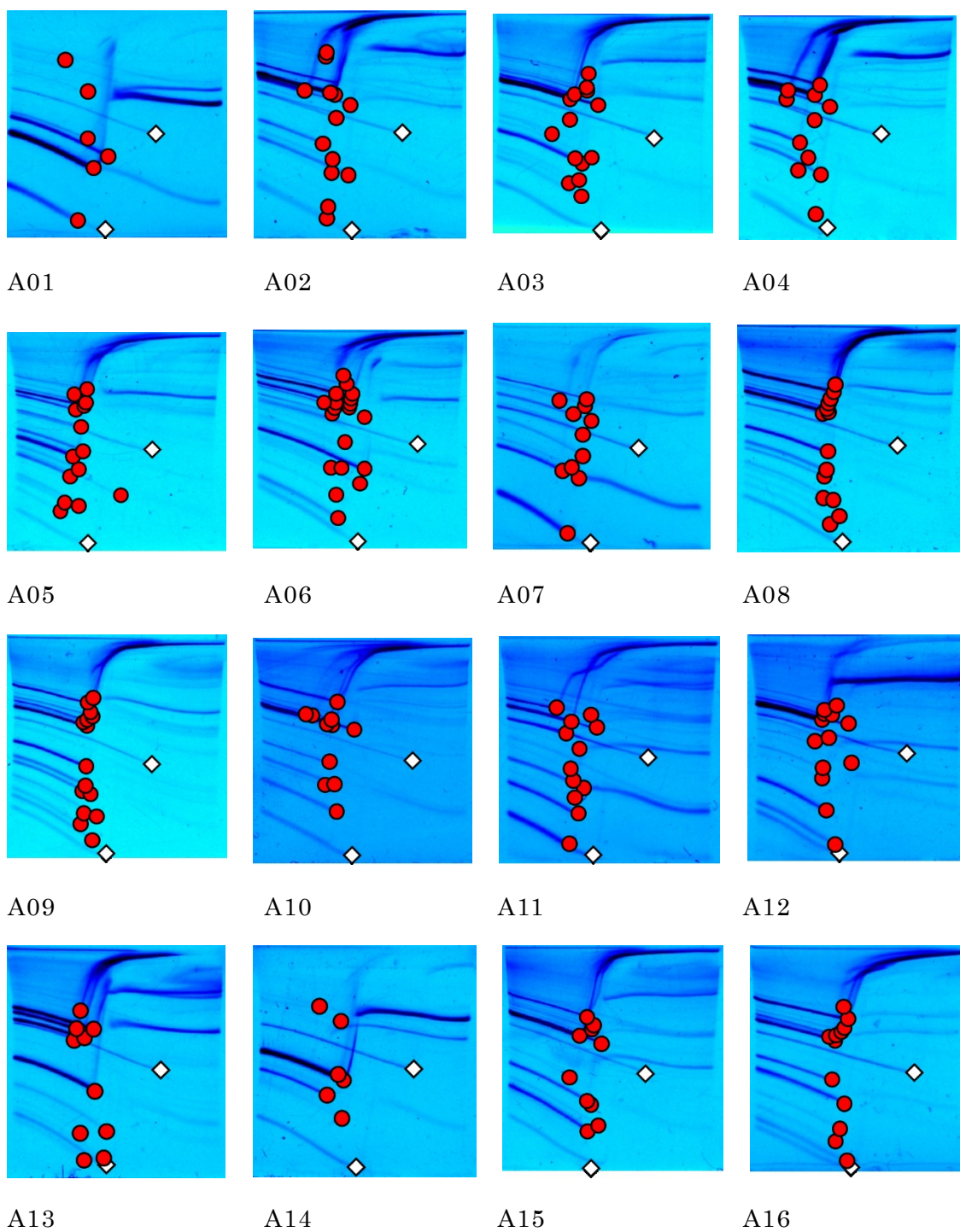


図 12a. 2010 年分離株における pFM19 プライマーの TGGE 泳動図

2010 年に分離された、30 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

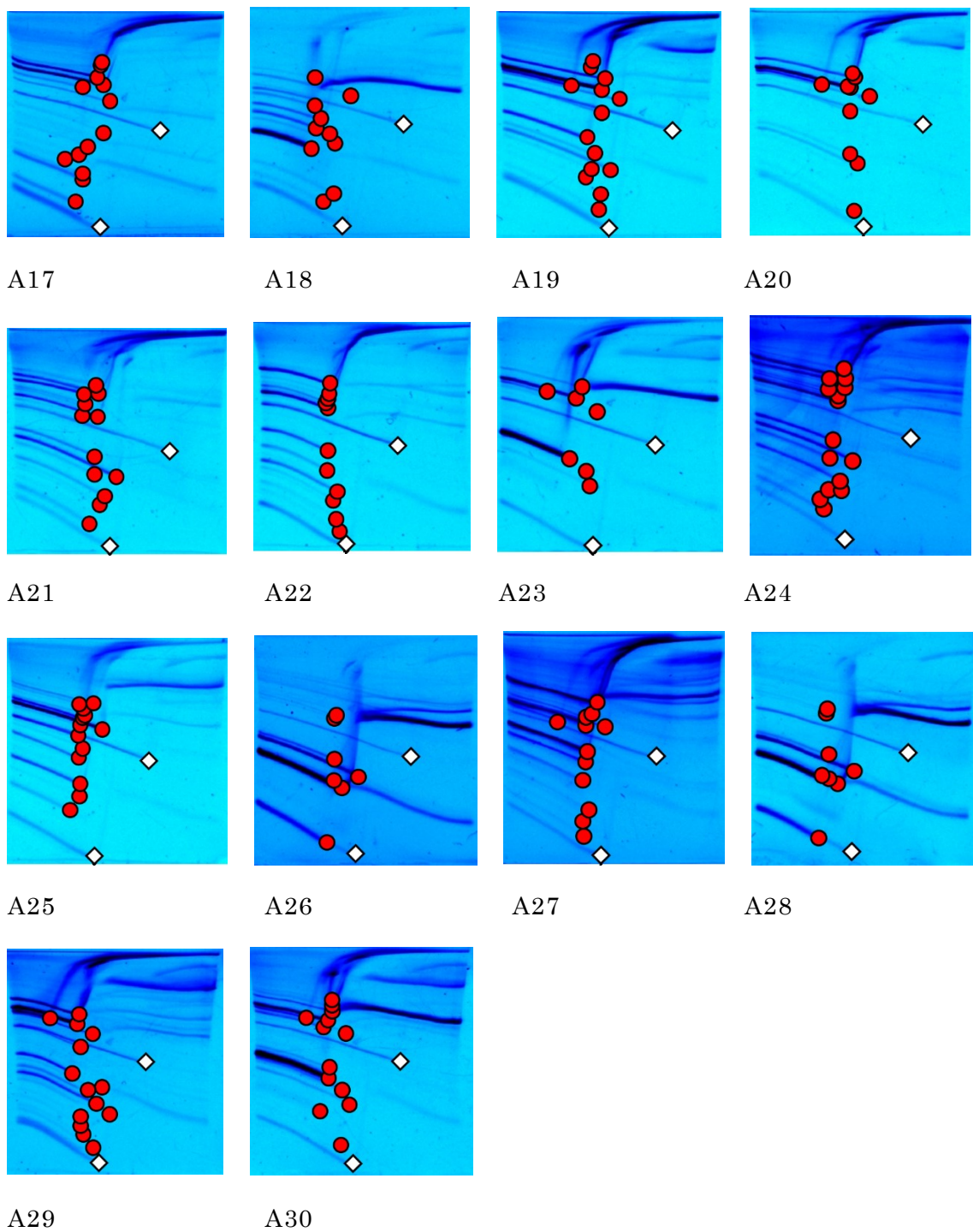


図 12b. 2010 年分離株における pfM19 プライマーの TGGE 泳動図

2010 年に分離された、30 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

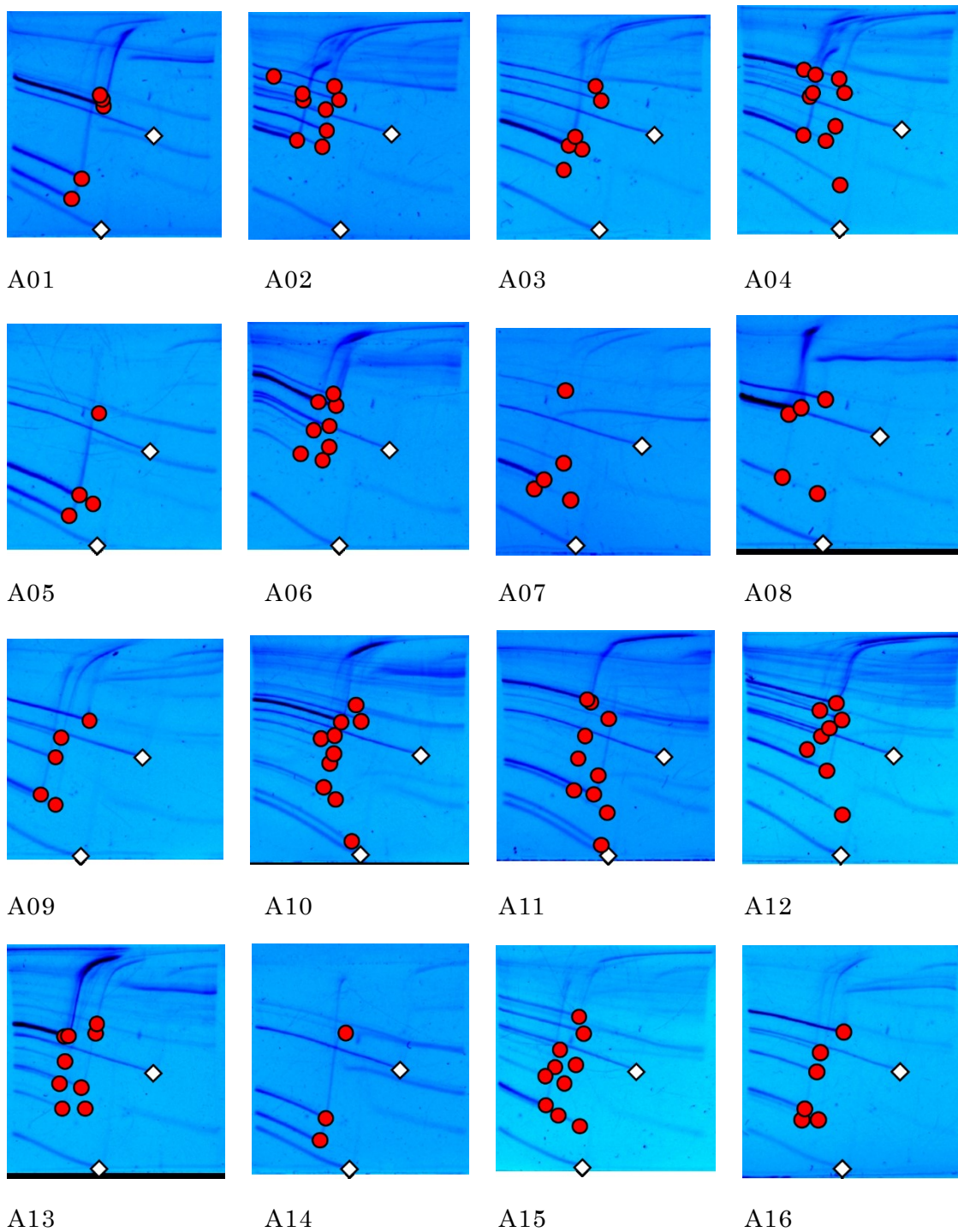


図 13a. 2010 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2010 年に分離された、30 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

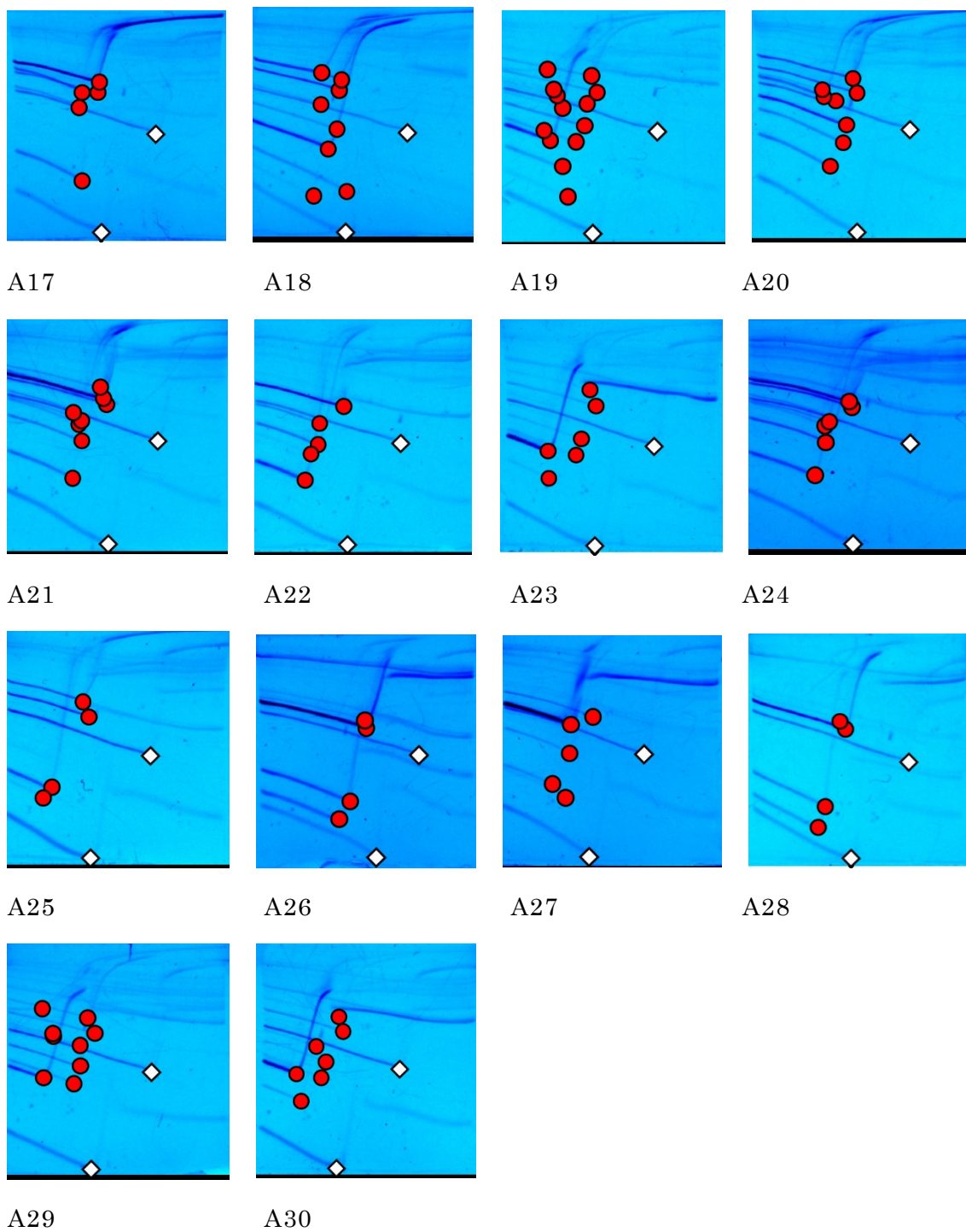


図 13b. 2010 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2010 年に分離された、30 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

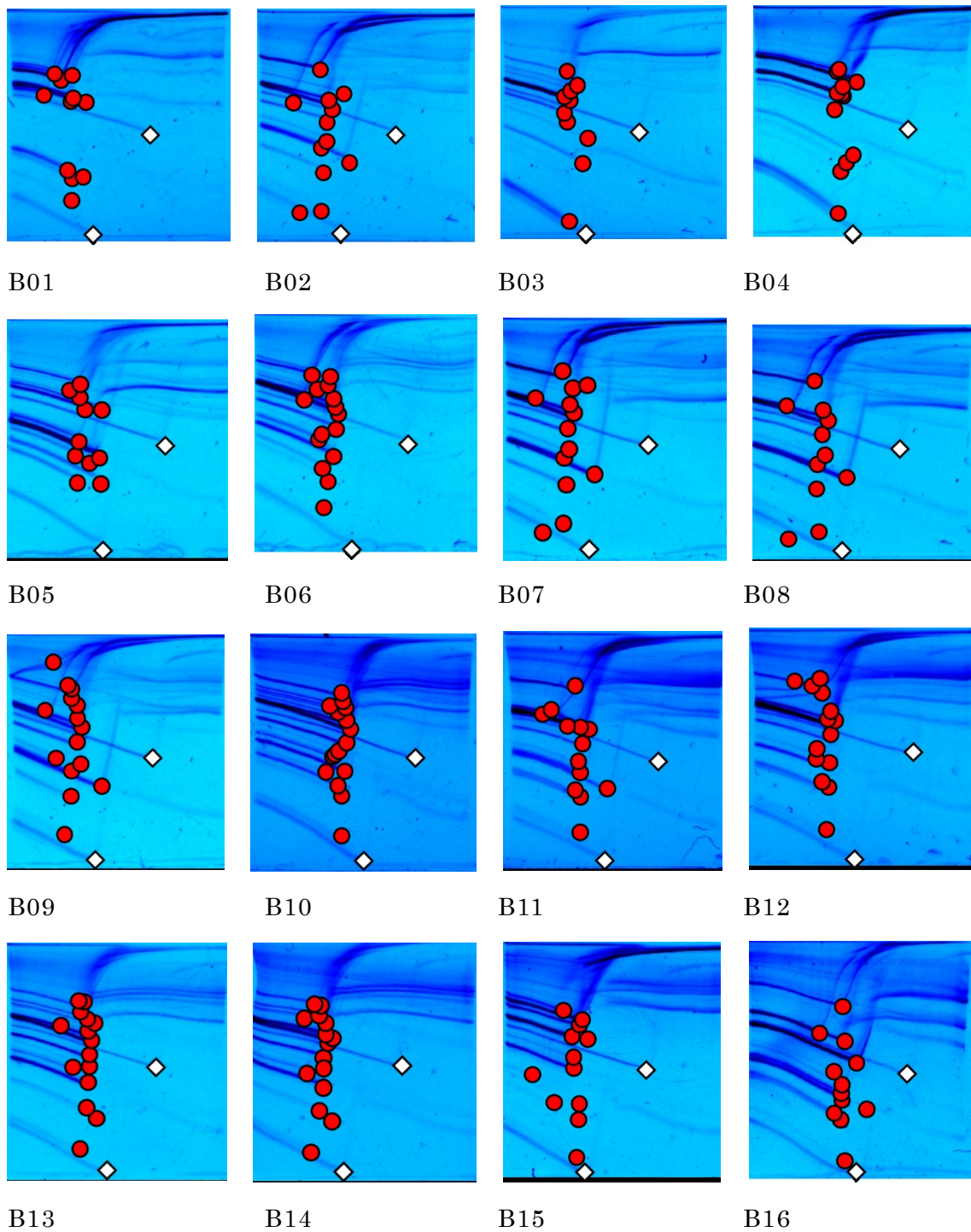


図 14a. 2011 年分離株における pFM12 プライマーの TGGE 泳動図

2011 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

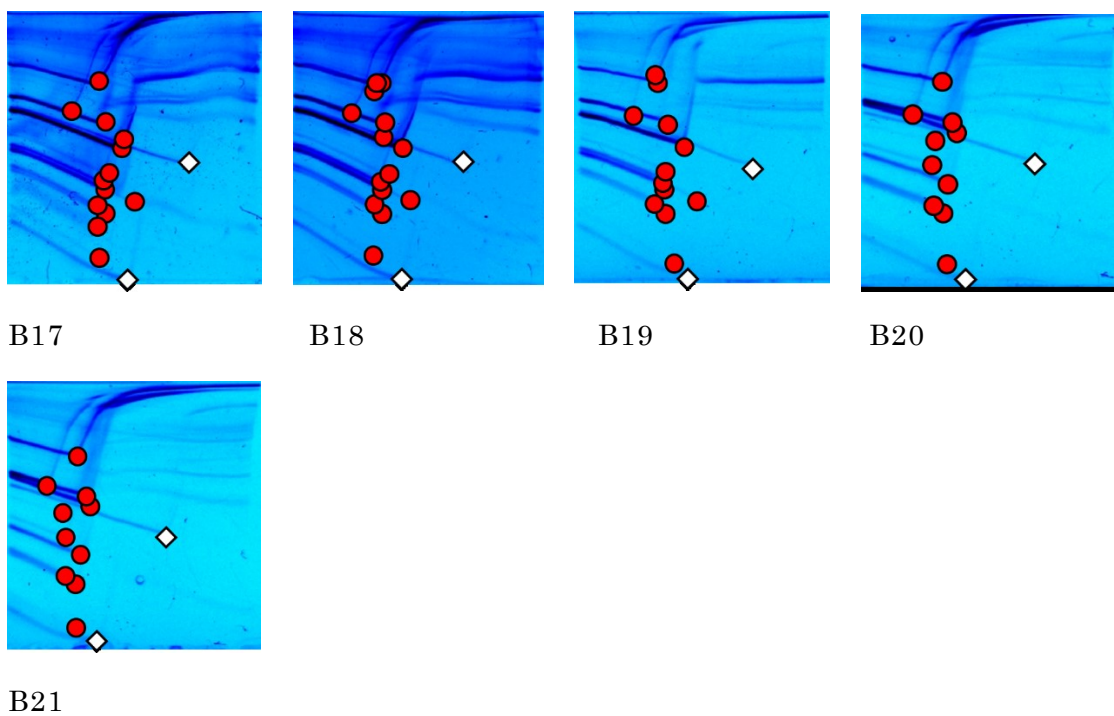


図 14b. 2011 年分離株における pfM12 プライマーの TGGE 泳動図

2011 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

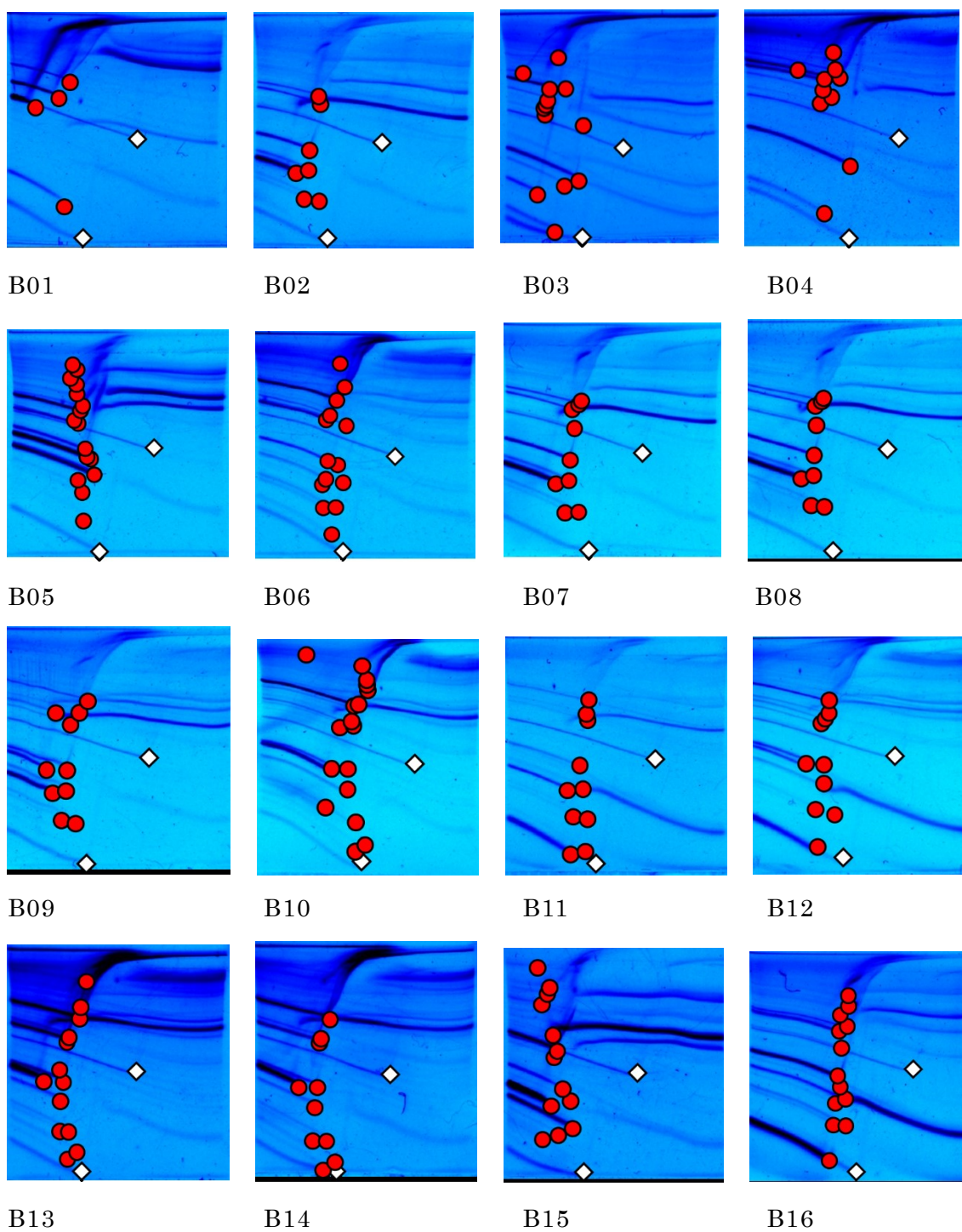
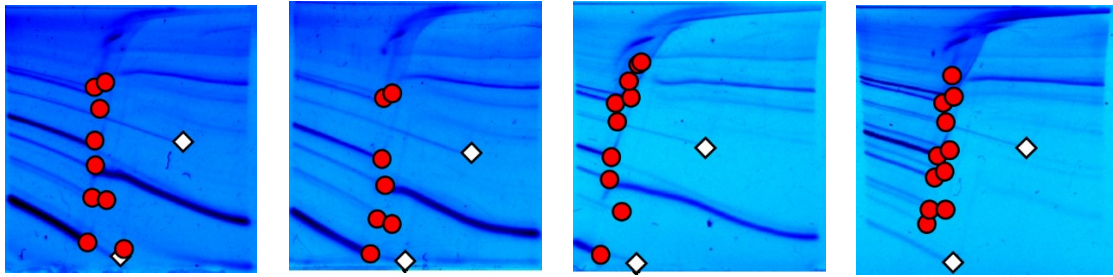


図 15a. 2011 年分離株における pFM19 プライマーの TGGE 泳動図

2011 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

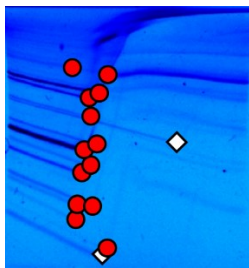


B17

B18

B19

B20



B21

図 15b. 2011 年分離株における pfM19 プライマーの TGGE 泳動図

2011 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

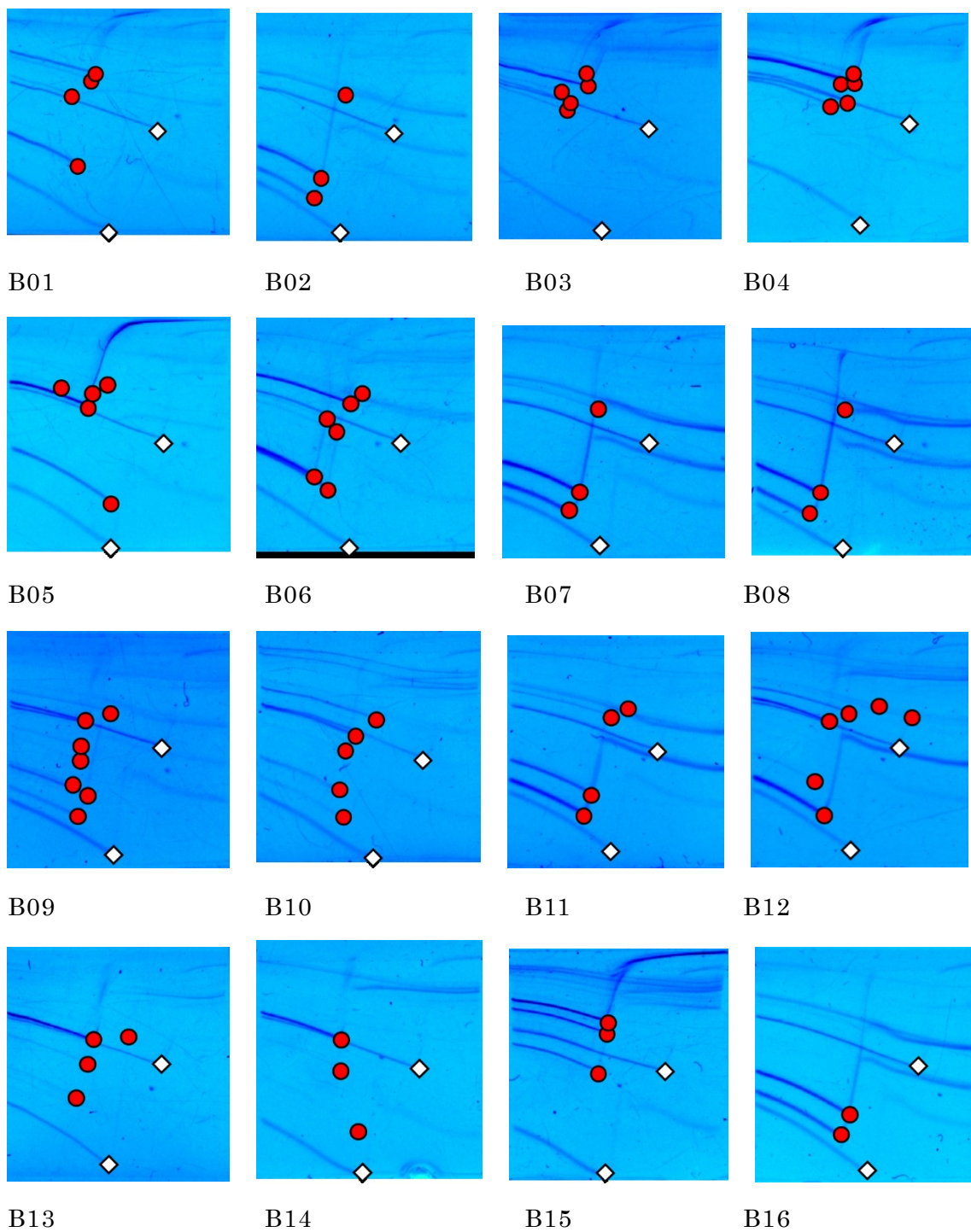
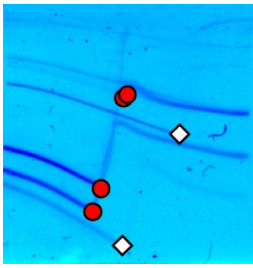
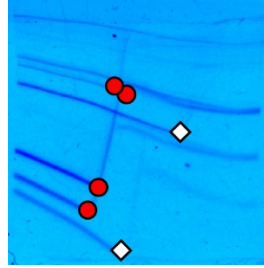


図 16a. 2011 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

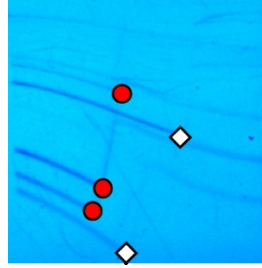
2011 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。



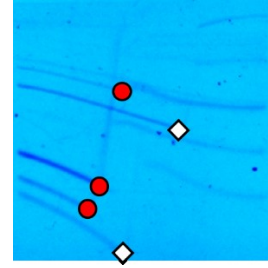
B17



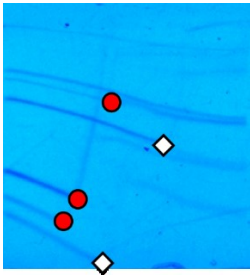
B18



B19



B20



B21

図 16b. 2011 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2011 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

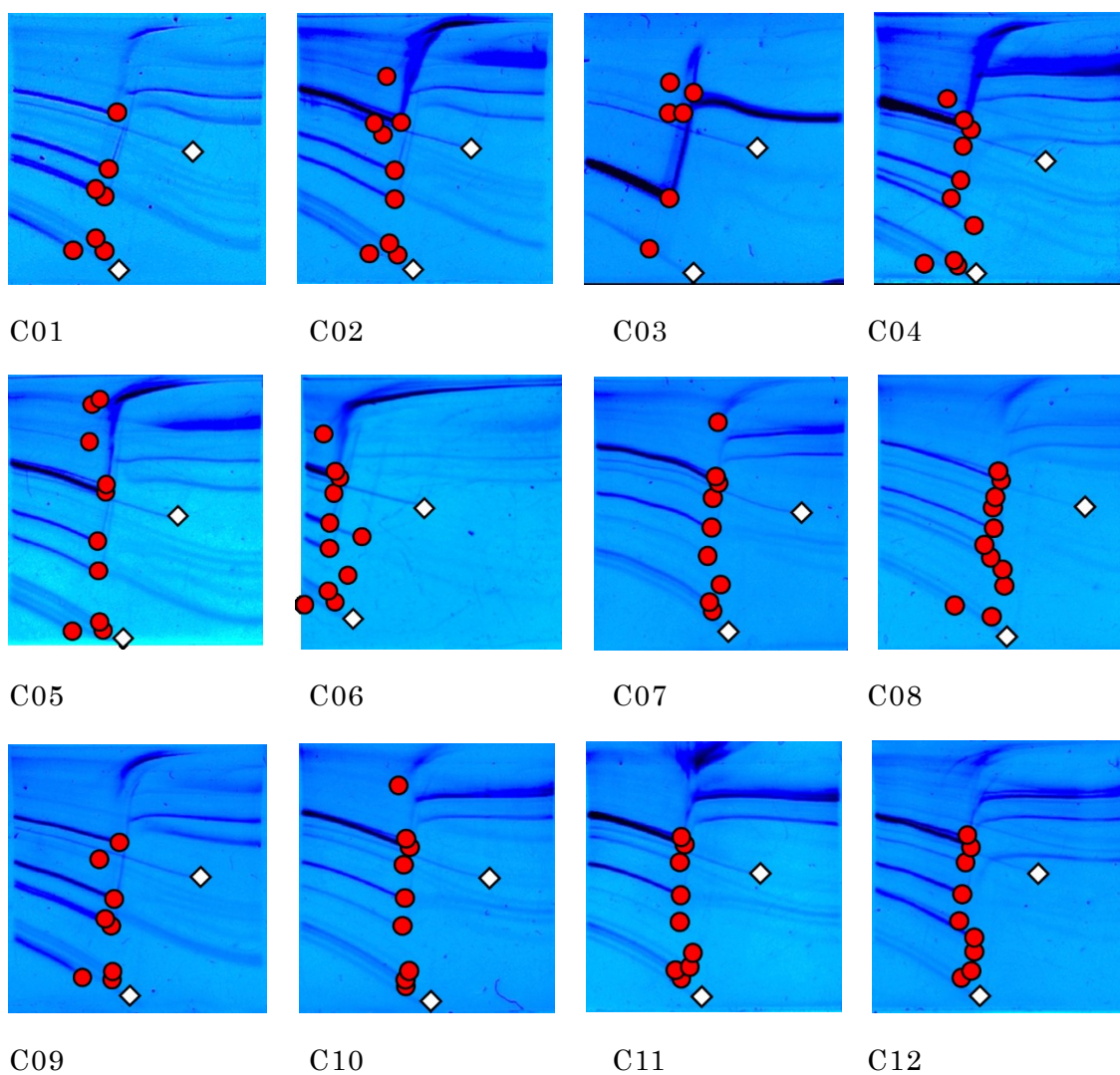


図 17. 2012 年分離株における pfM12 プライマーの TGGE 泳動図

2012 年に分離された、12 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

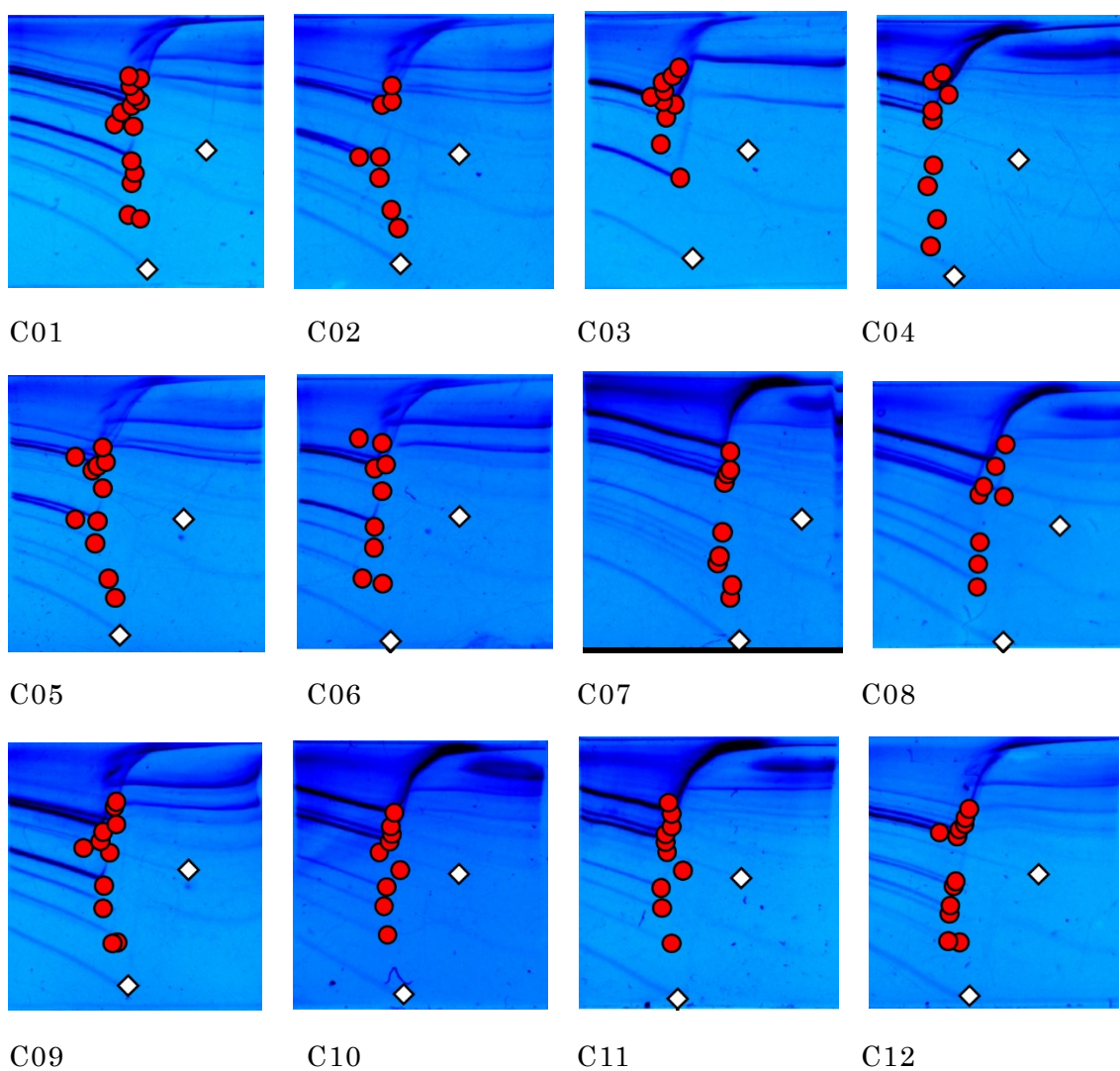


図 18. 2012 年分離株における pfM19 プライマーの TGGE 泳動図

2012 年に分離された、12 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

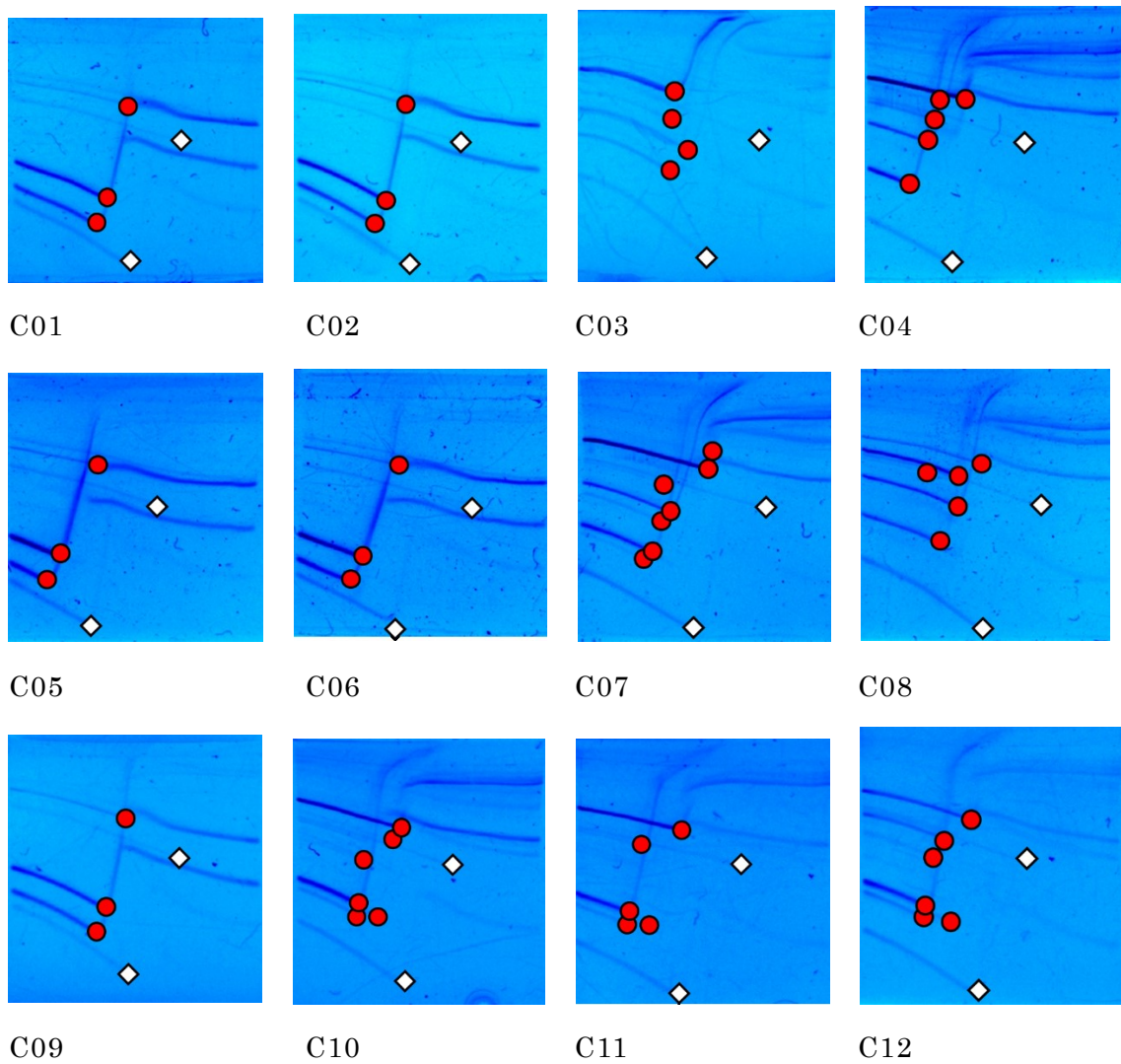


図 19. 2012 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2012 年に分離された、12 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

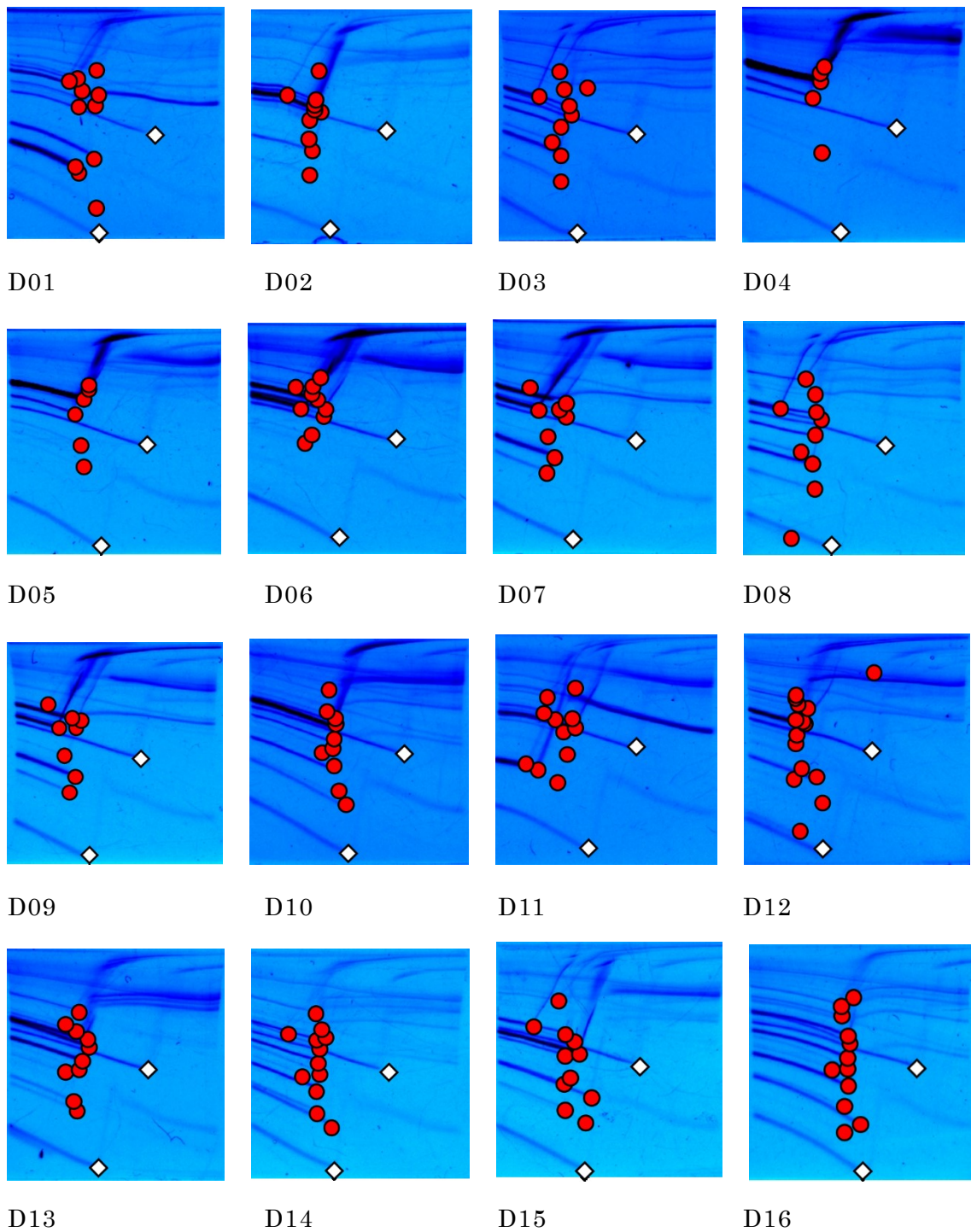


図 20a. 2013 年分離株における pFM12 プライマーの TGGE 泳動図

2013 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

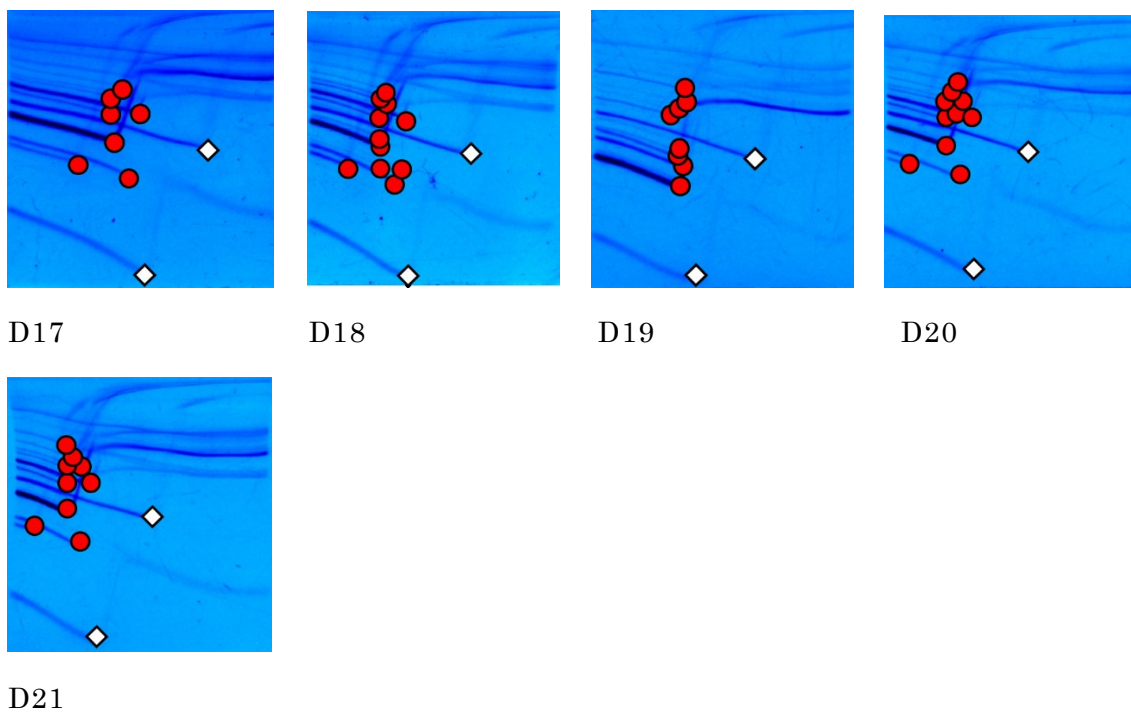


図 20b. 2013 年分離株における pfM12 プライマーの TGGE 泳動図

2013 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

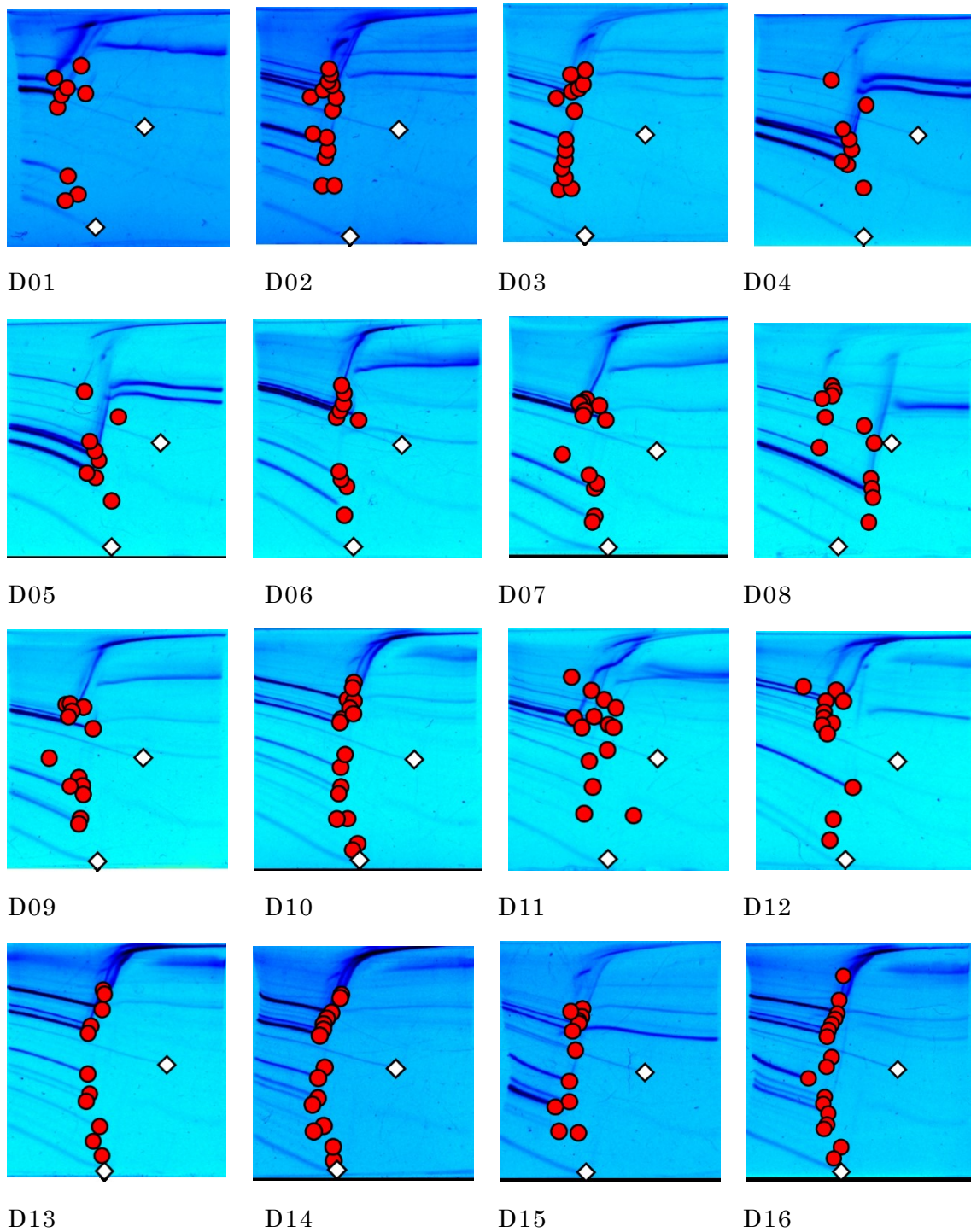


図 21a. 2013 年分離株における pM19 プライマーの TGGE 泳動図

2013 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

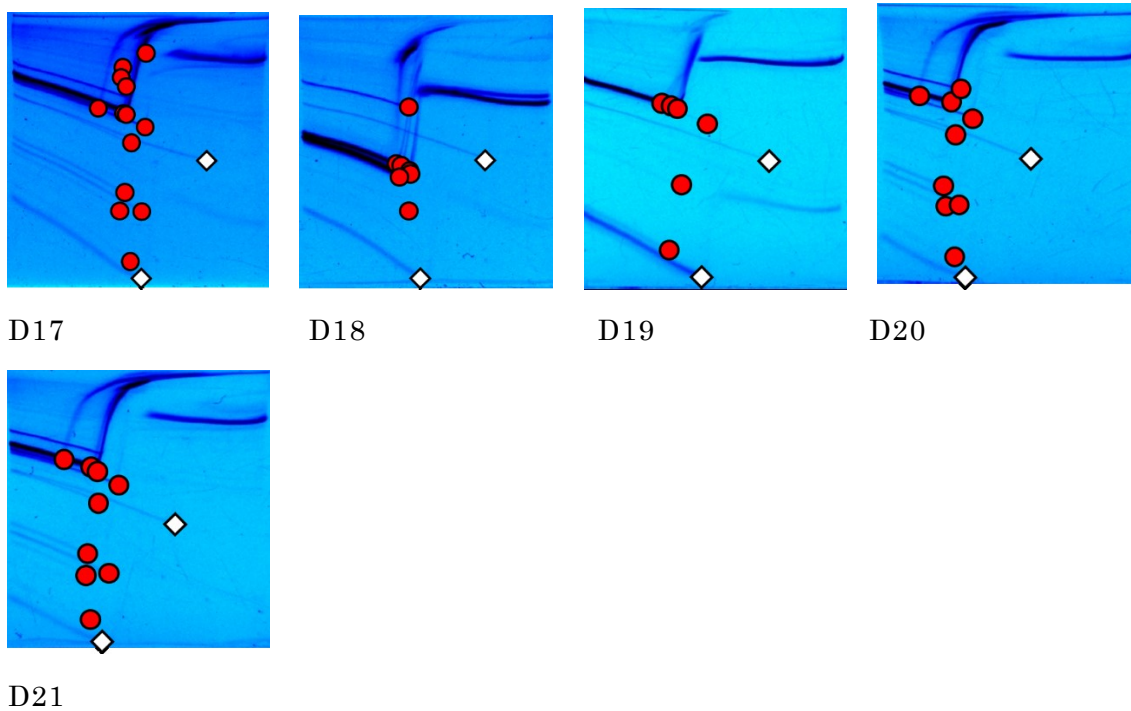


図 21b. 2013 年分離株における pM19 プライマーの TGGE 泳動図

2013 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp., 下: 200bp.)を表した。

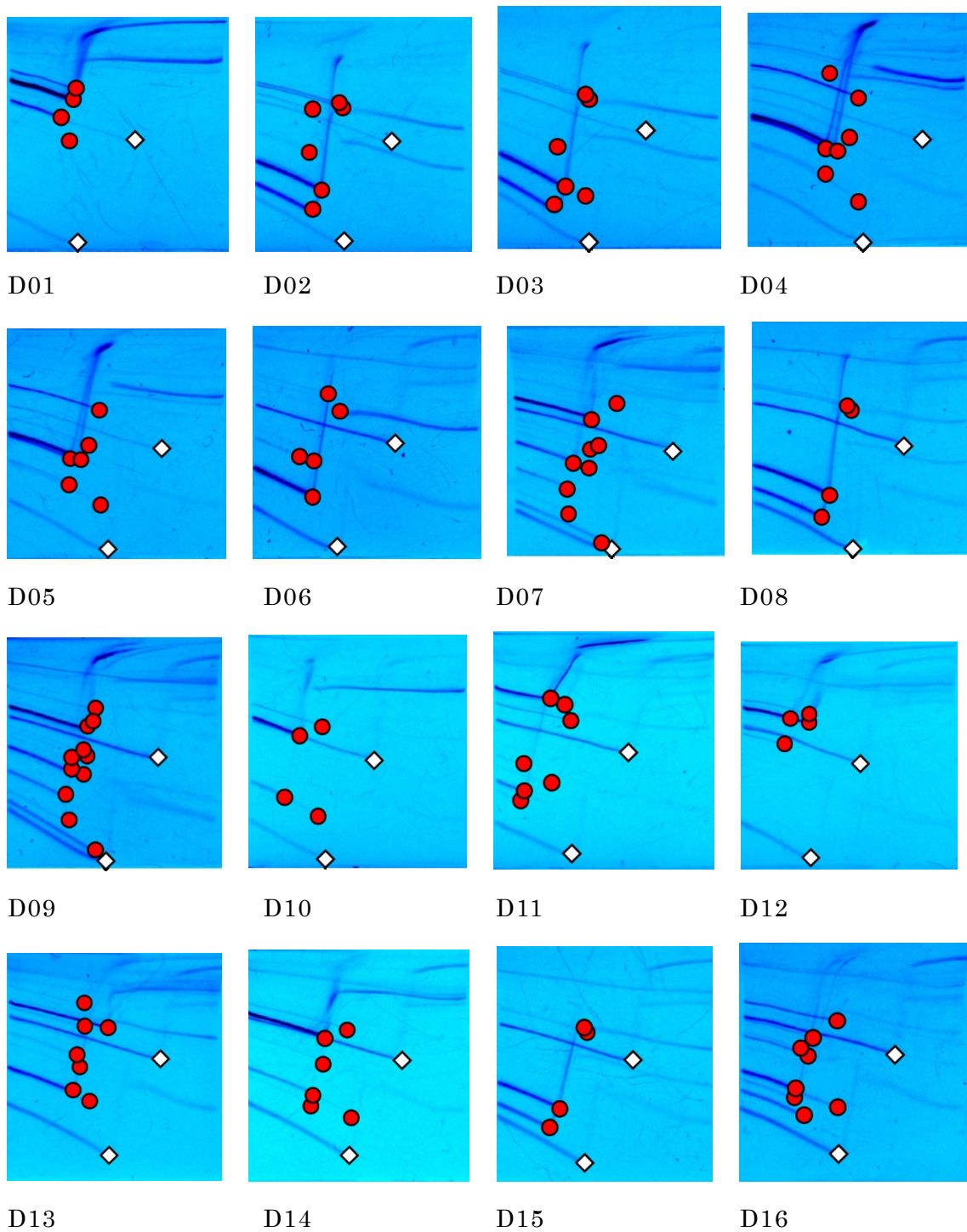
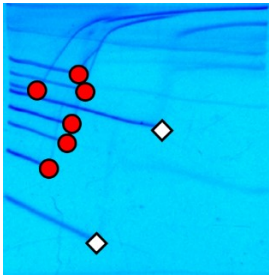
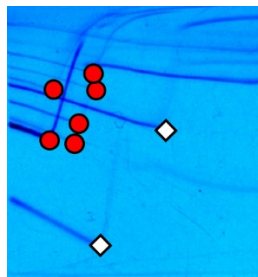


図 22a. 2013 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

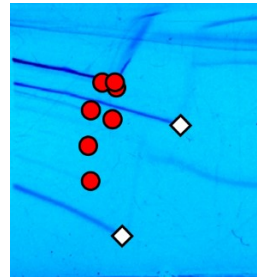
2013 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。



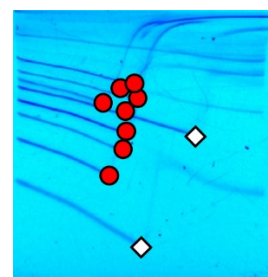
D17



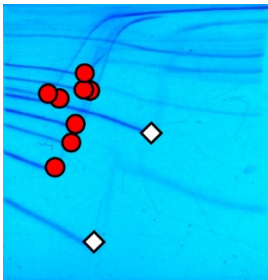
D18



D19



D20



D21

図 22b. 2013 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2013 年に分離された、21 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

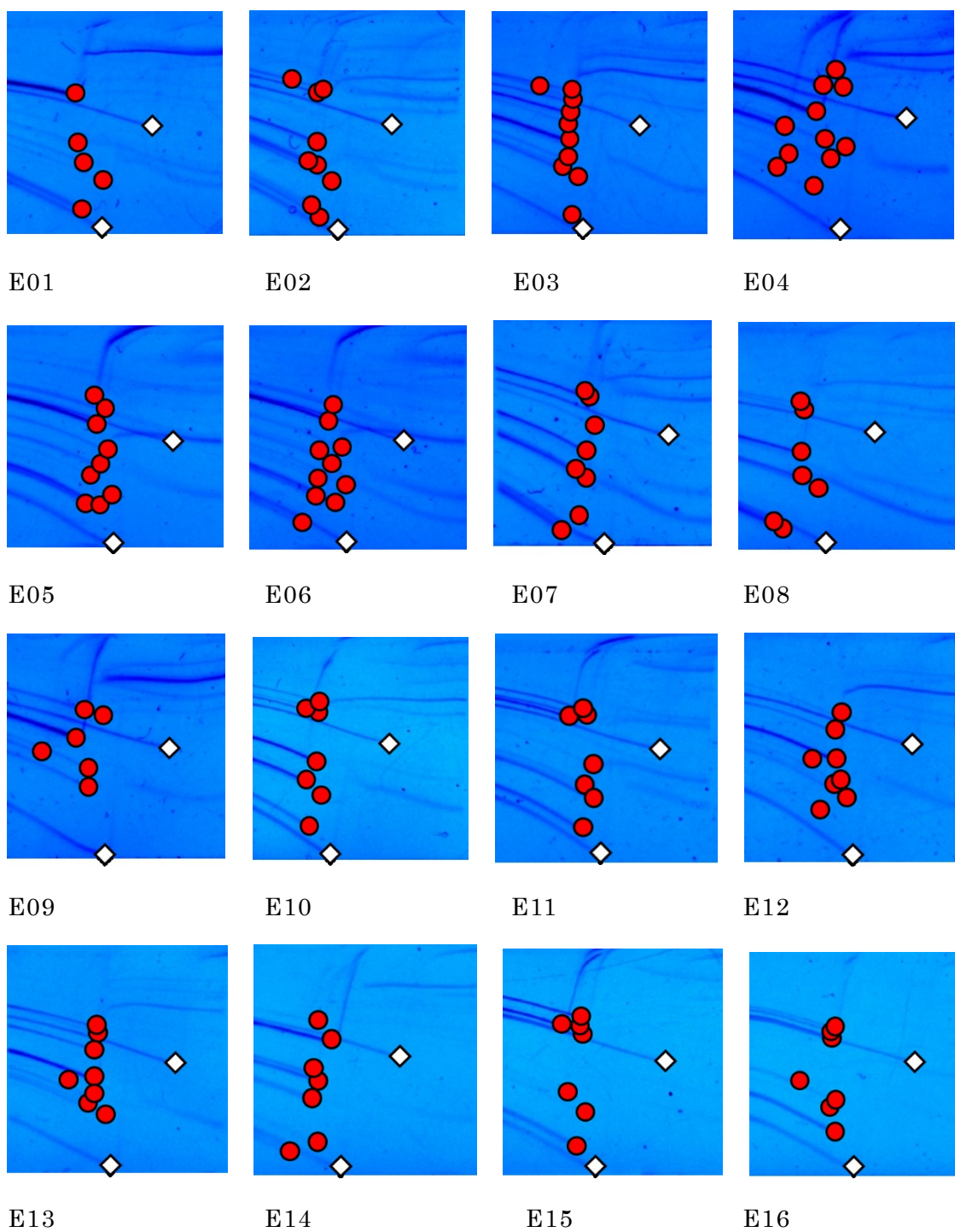


図 23a. 2014 年分離株における pfm12 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

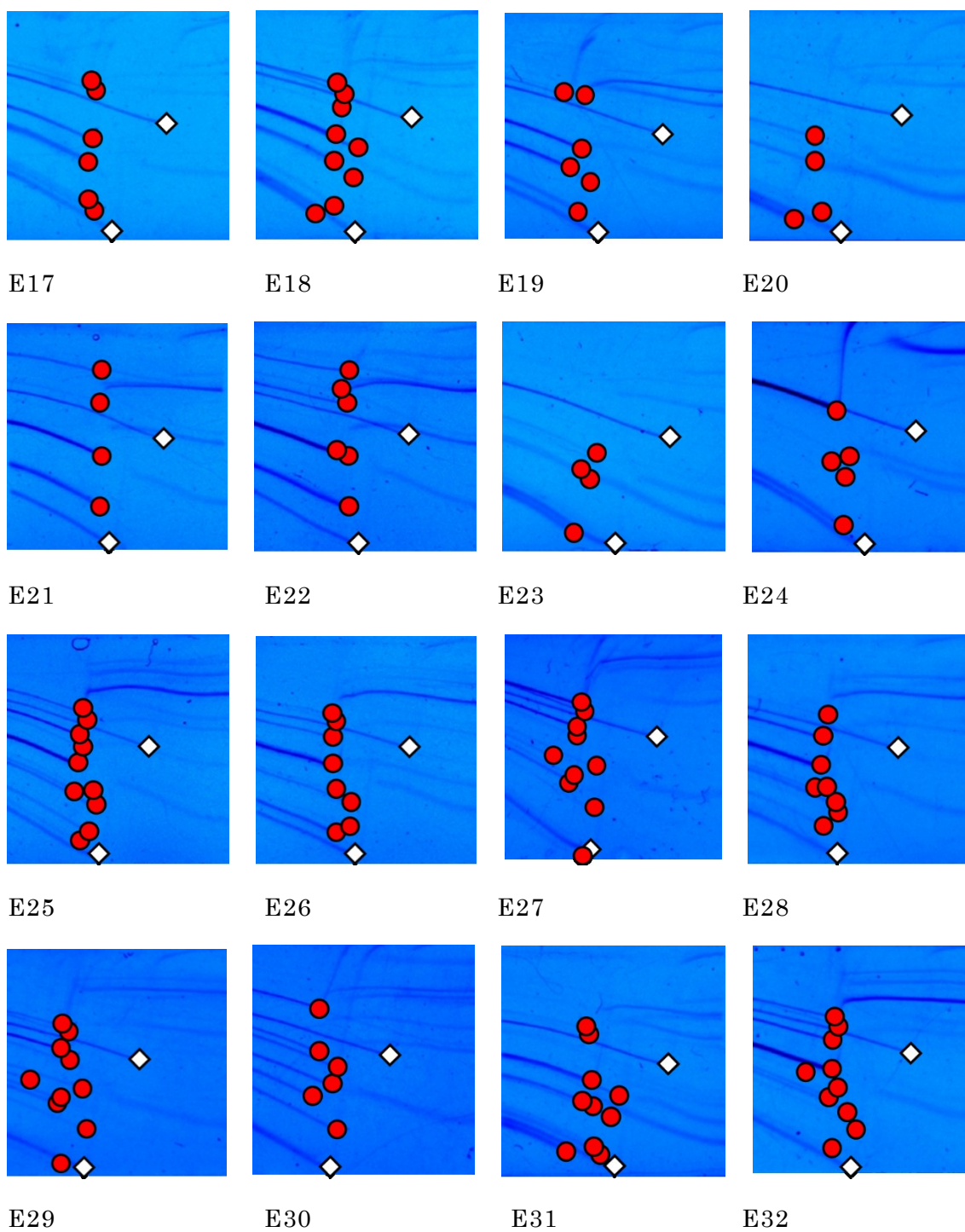


図 23b. 2014 年分離株における pfm12 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

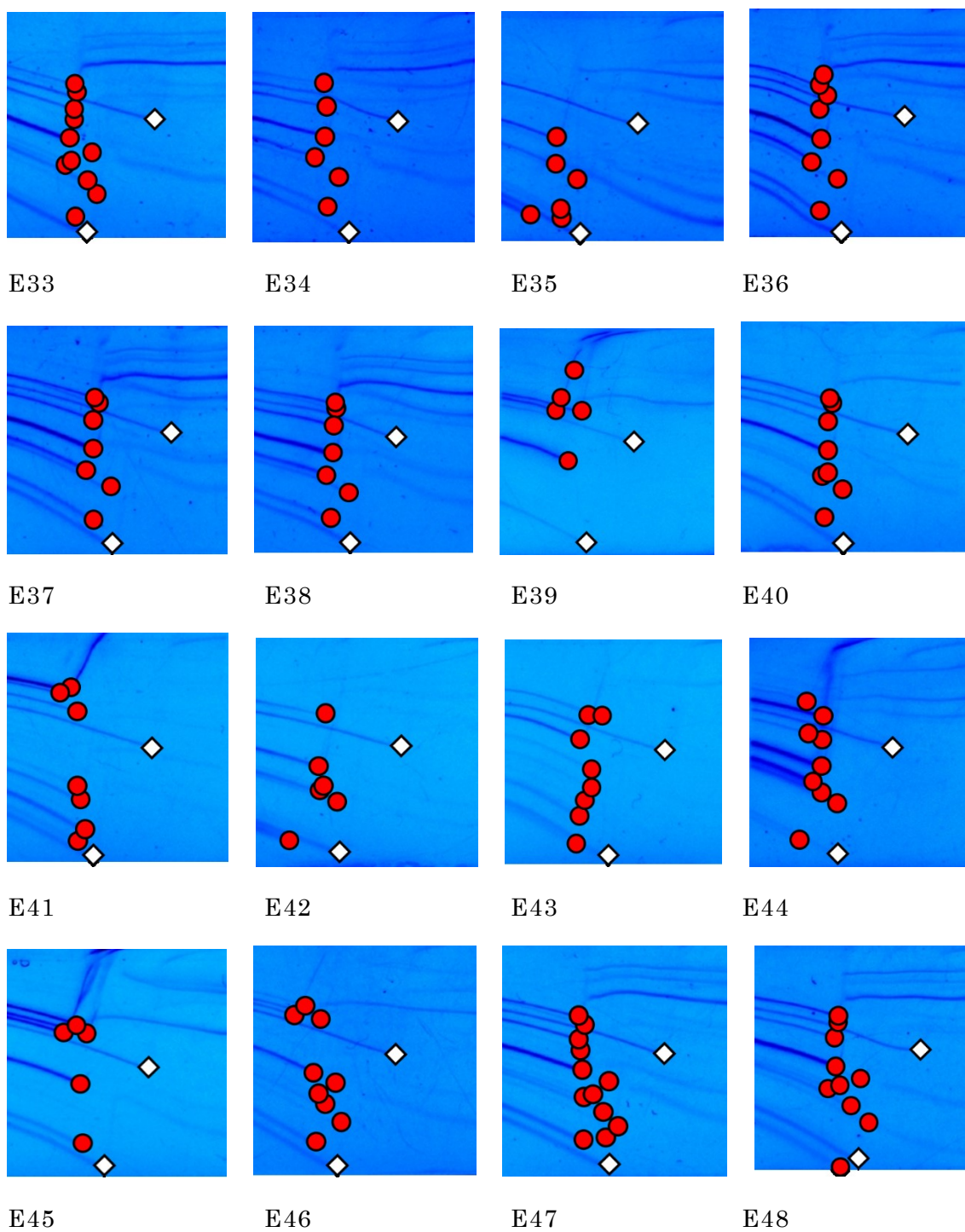


図 23c. 2014 年分離株における pfM12 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

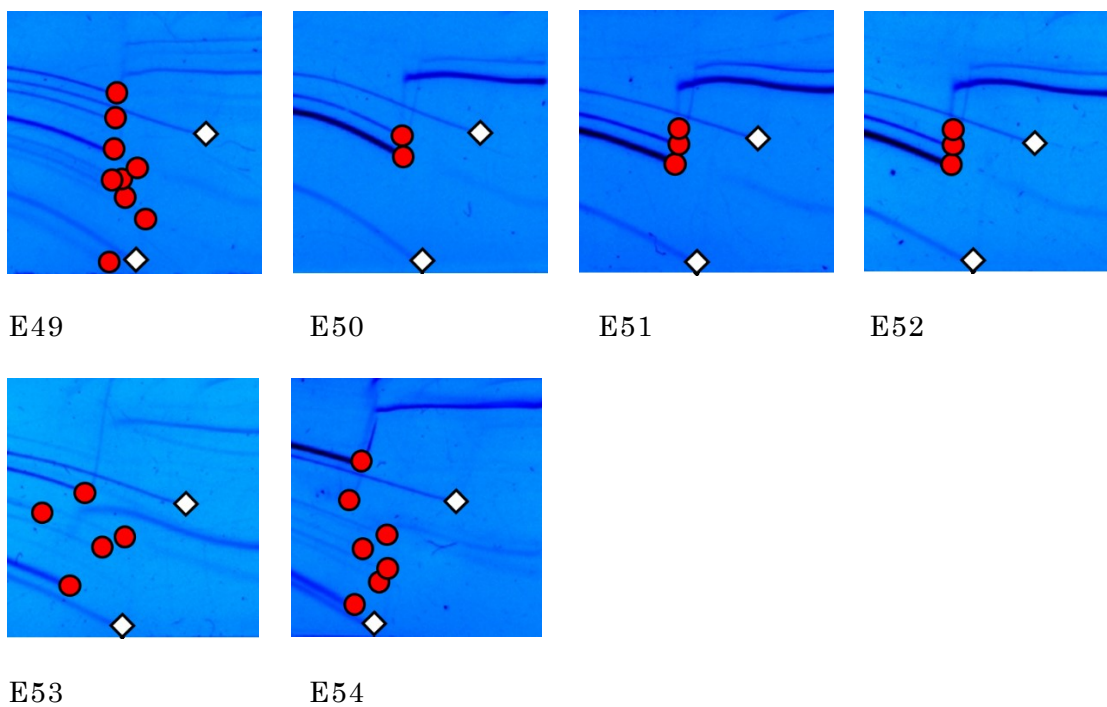


図 23d. 2014 年分離株における pM12 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp., 下: 200bp.)を表した。

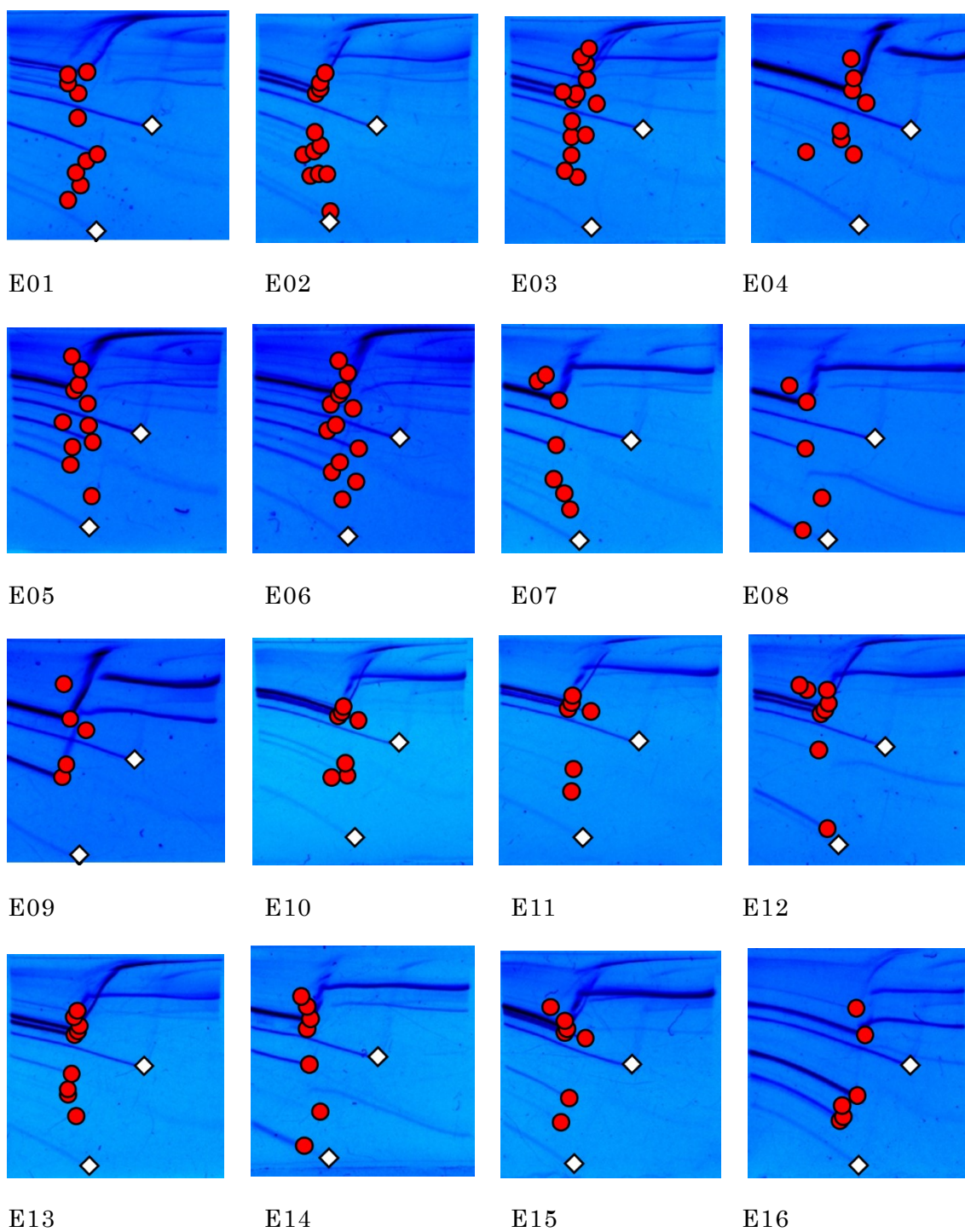


図 24a. 2014 年株における pFM19 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

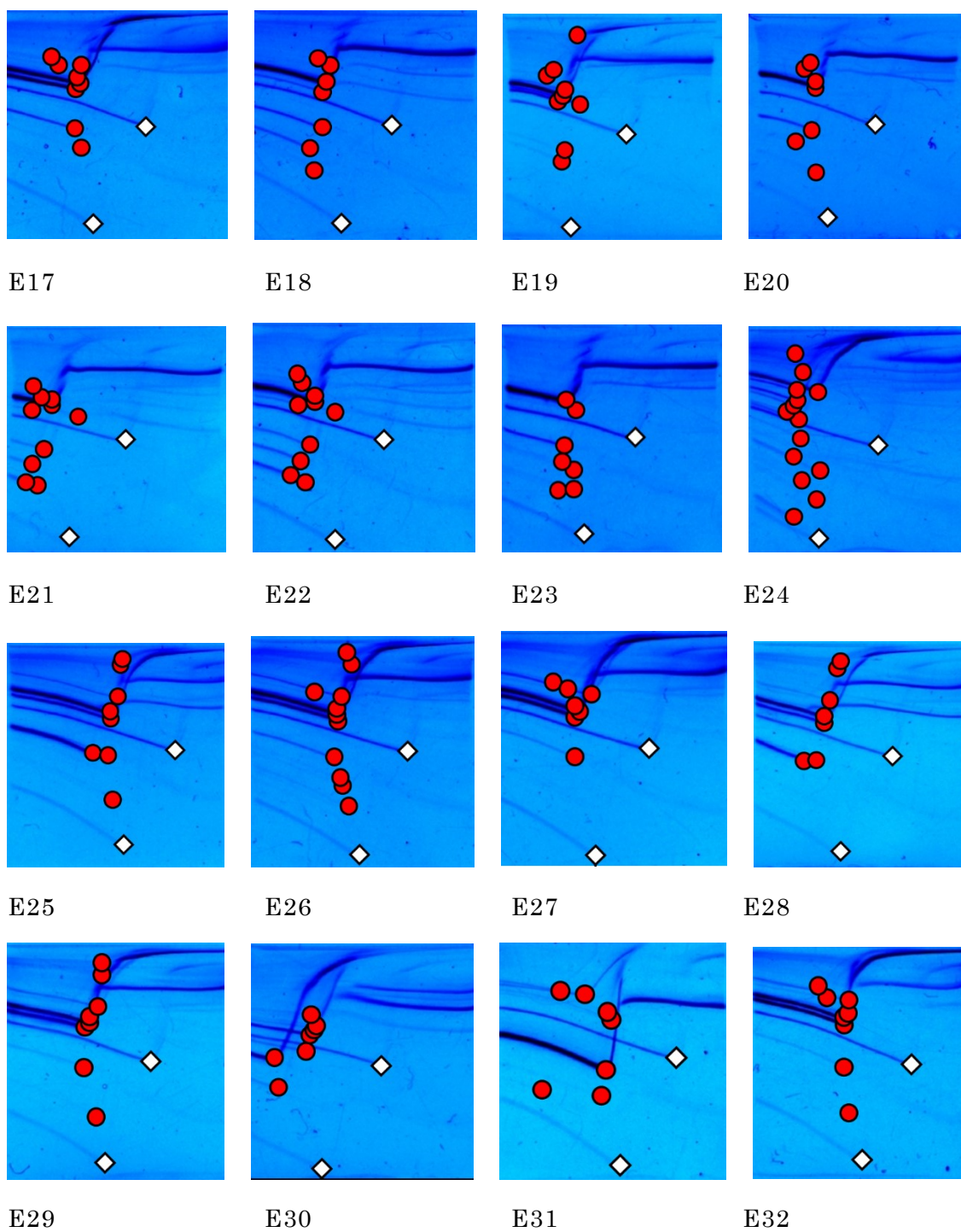


図 24b. 2014 年分離株における pFM19 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

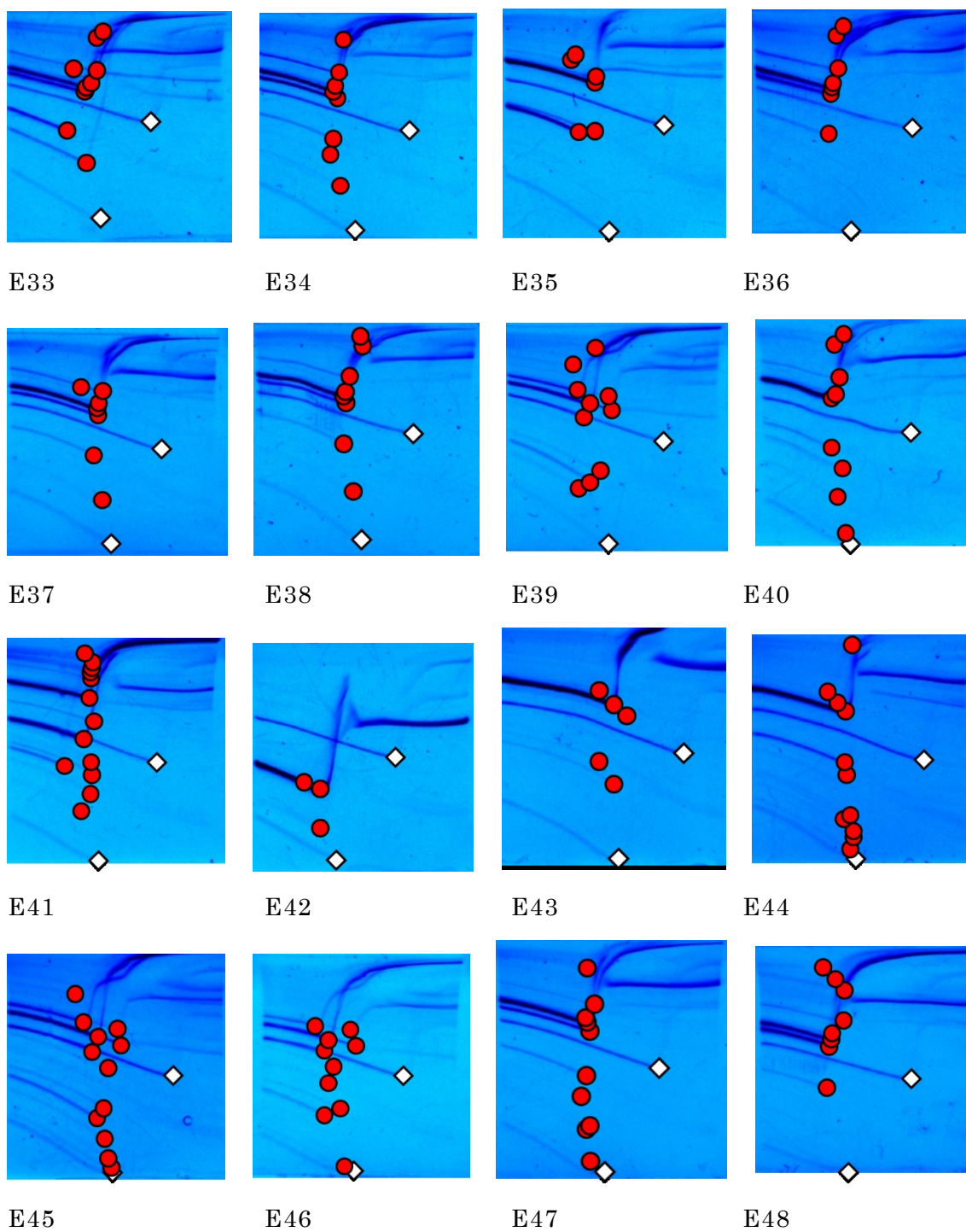


図 24c. 2014 年分離株における pfM19 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

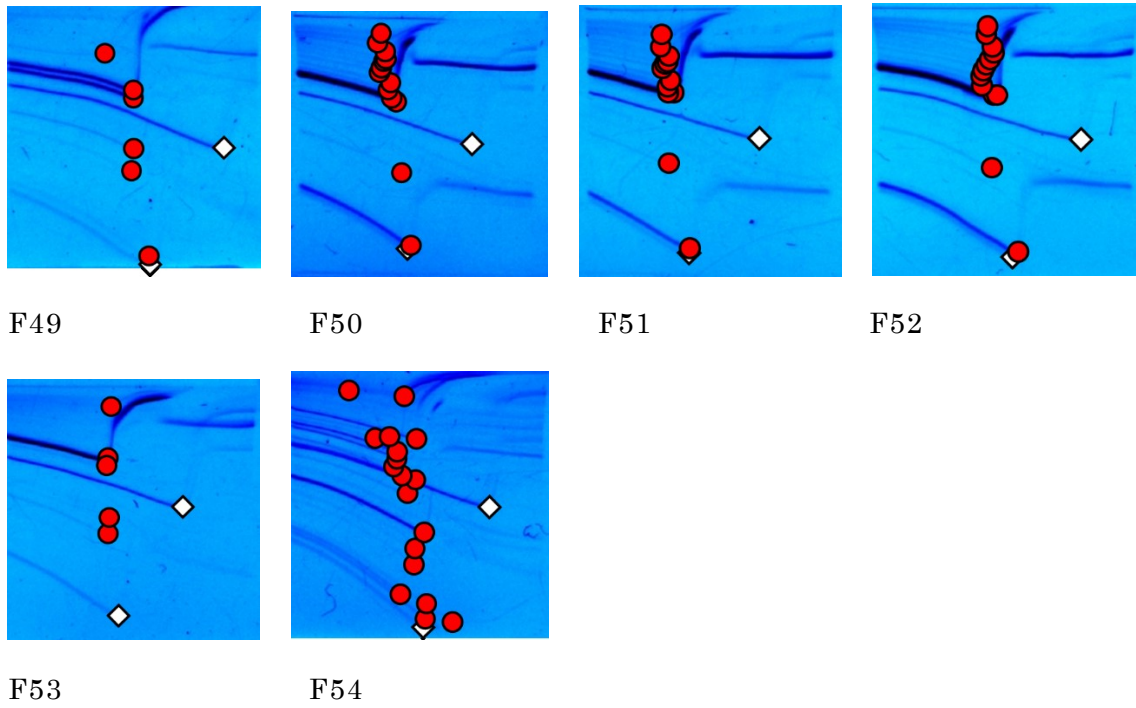


図 24d. 2014 年分離株における pM19 プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp., 下: 200bp.)を表した。

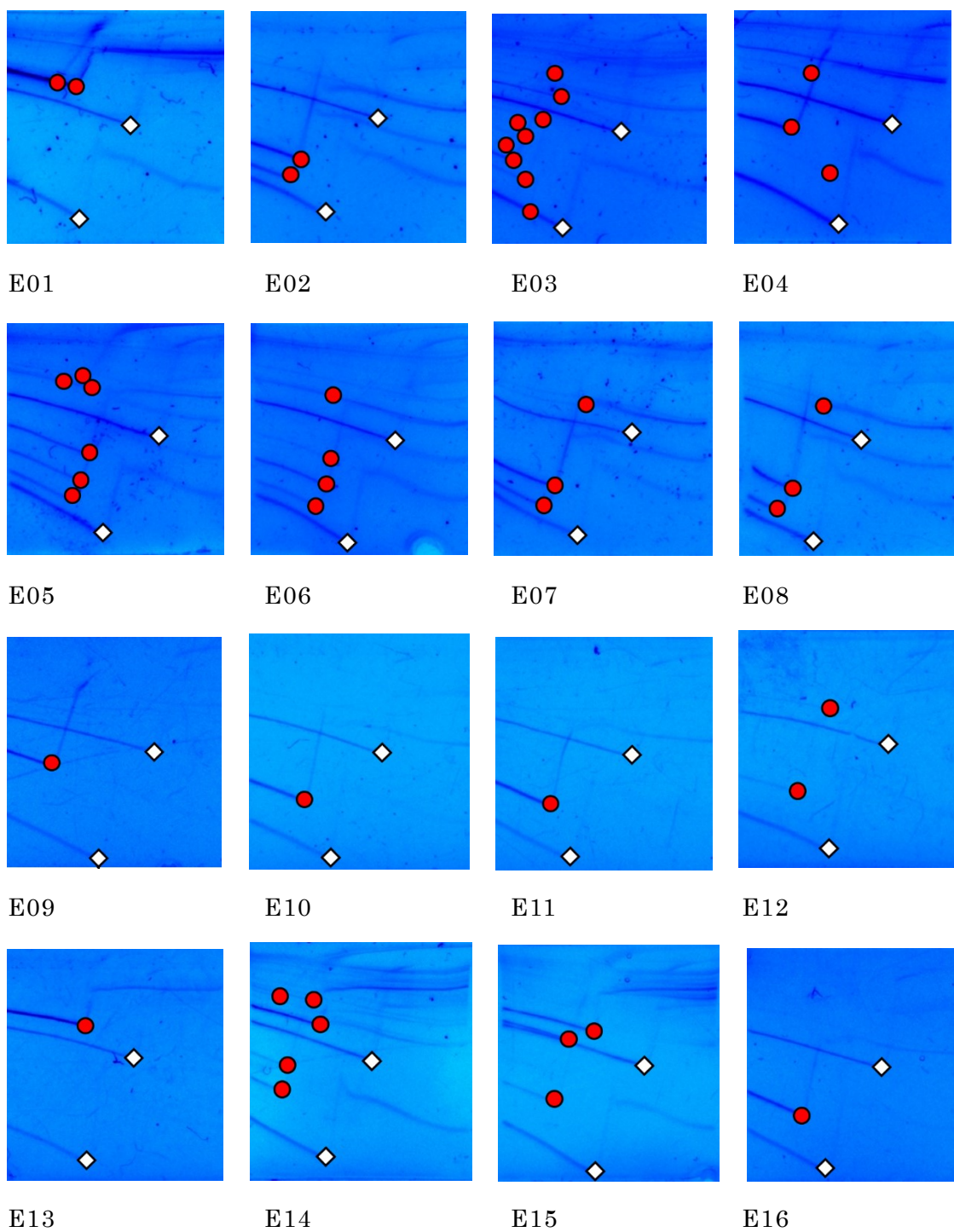


図 25a. 2014 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

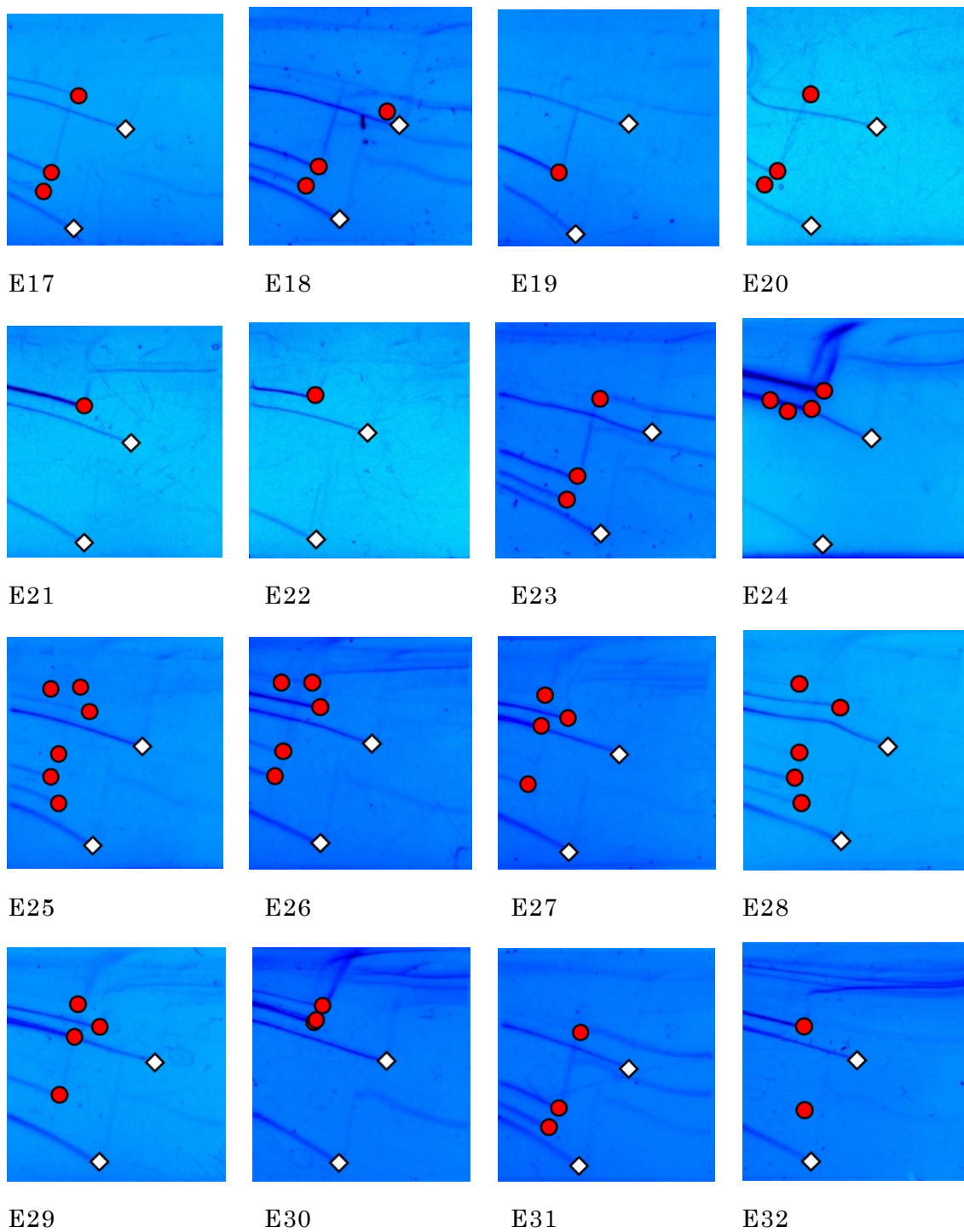


図 25b. 2014 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

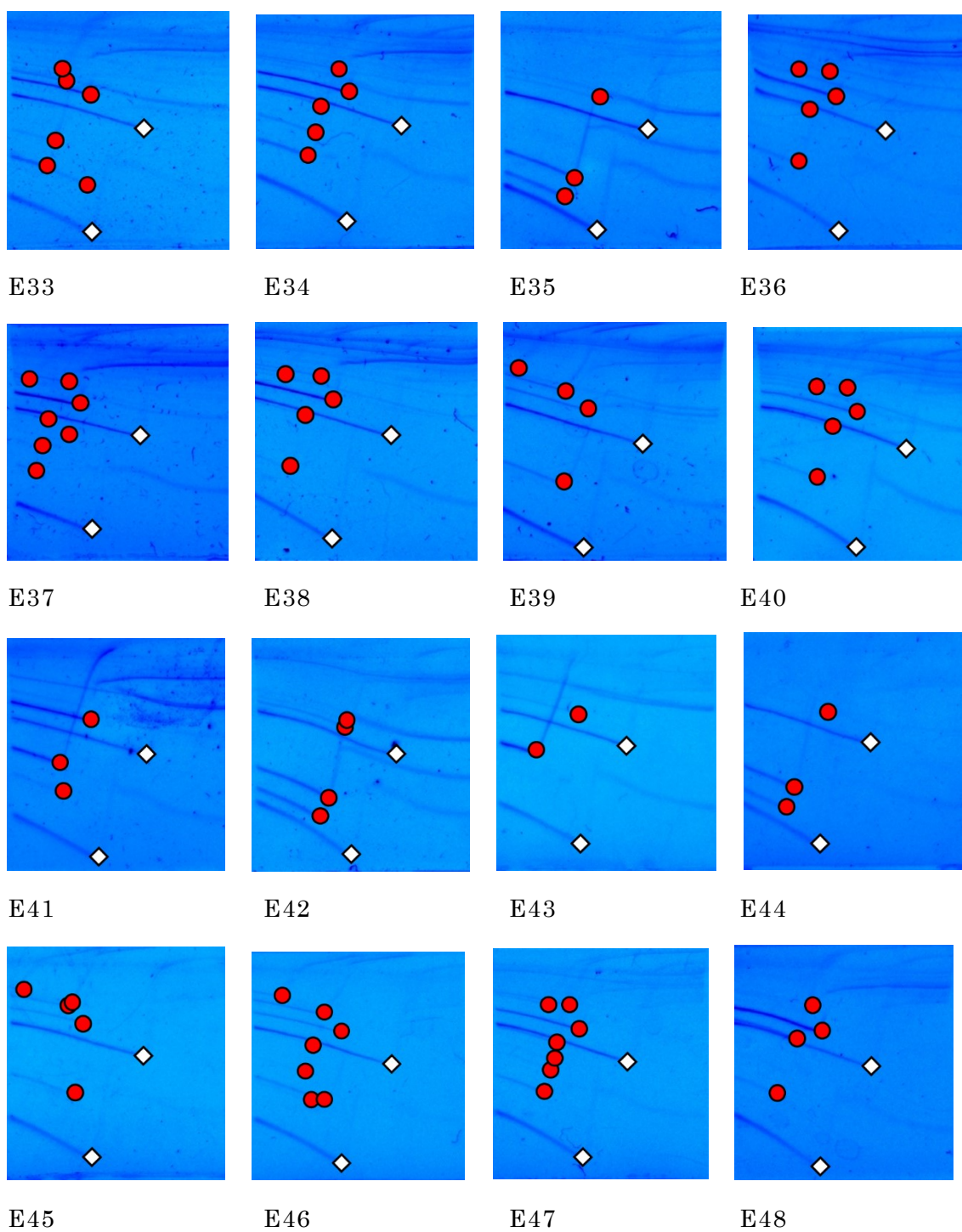


図 25c. 2014 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

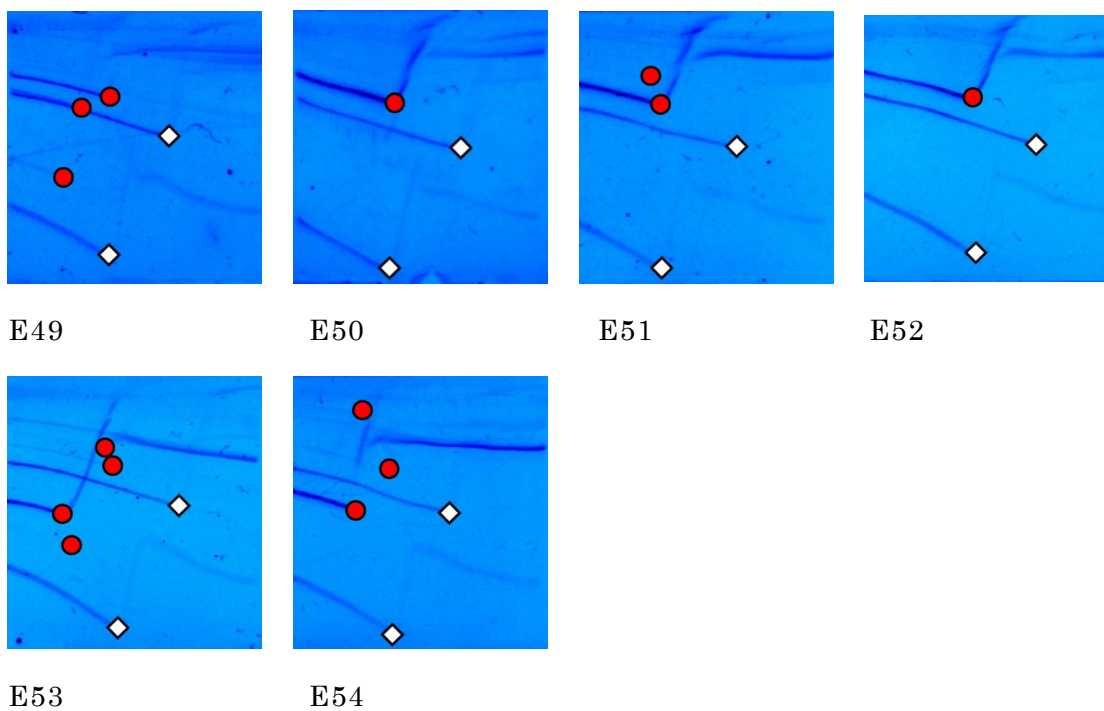


図 25d. 2014 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2014 年に分離された、54 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp.、下: 200bp.)を表した。

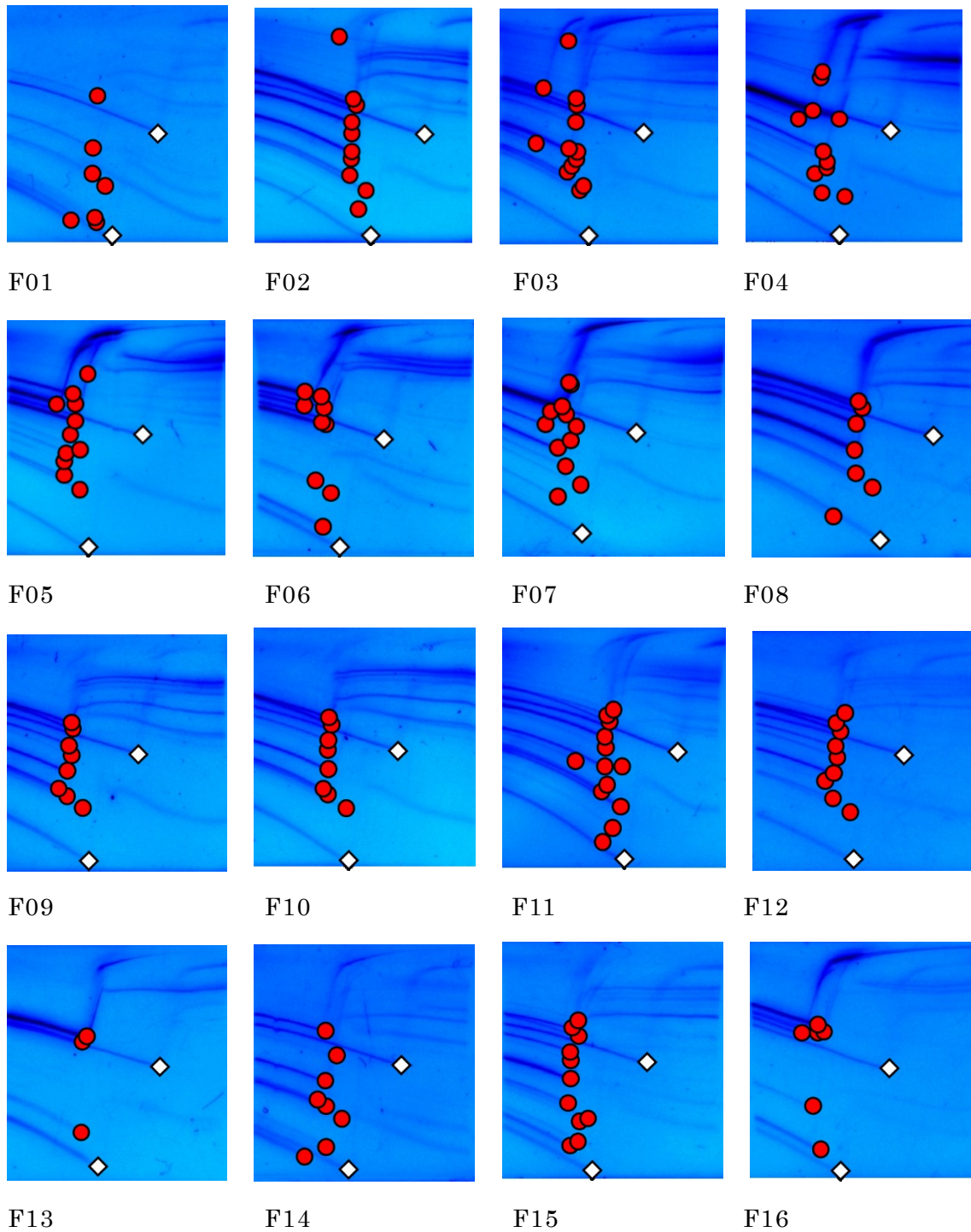


図 26a. 2015 年分離株における pfm12 プライマーの TGGE 泳動図

2015 年に分離された、32 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

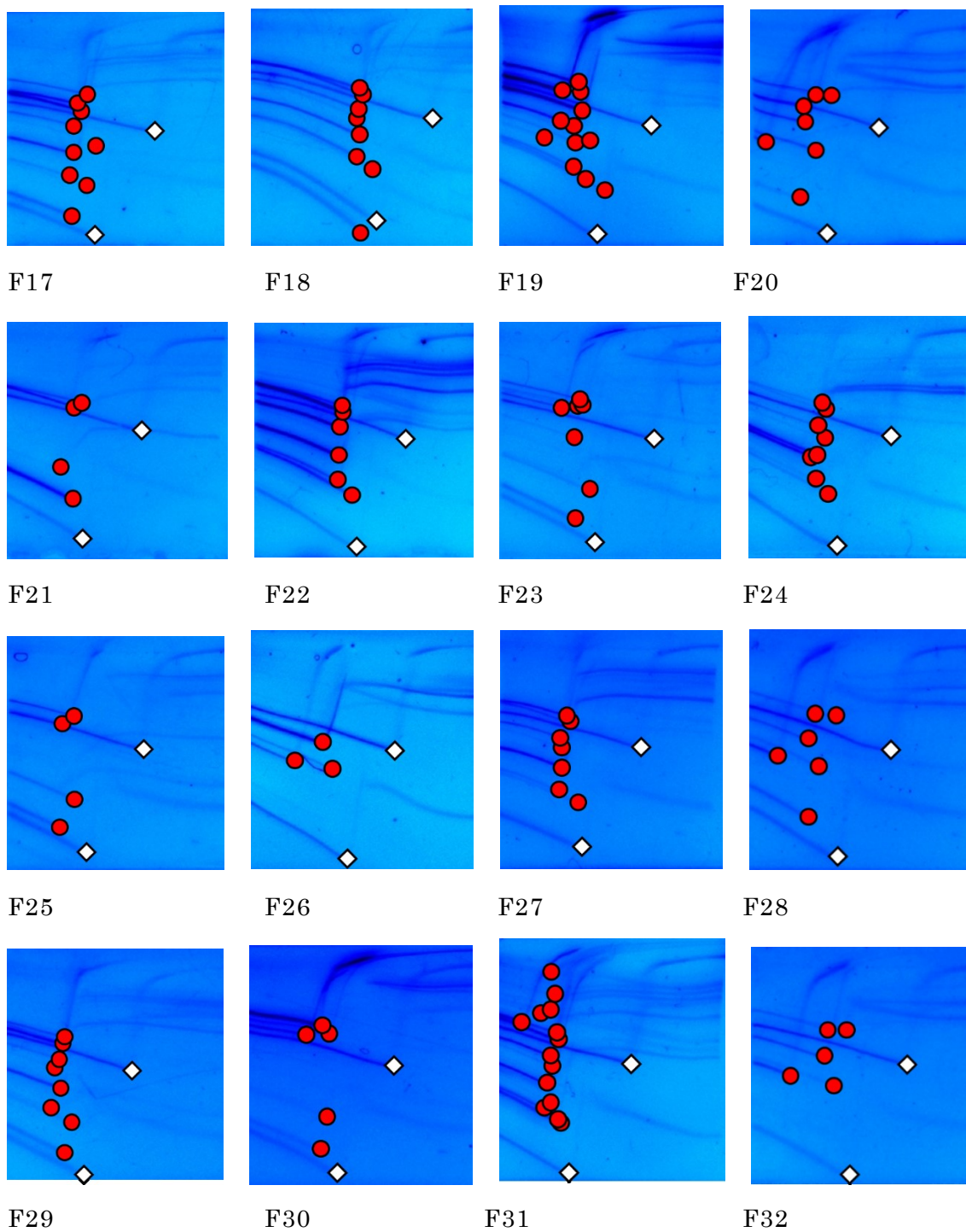


図 26b. 2015 年分離株における pFM12 プライマーの TGGE 泳動図

2015 年に分離された、32 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

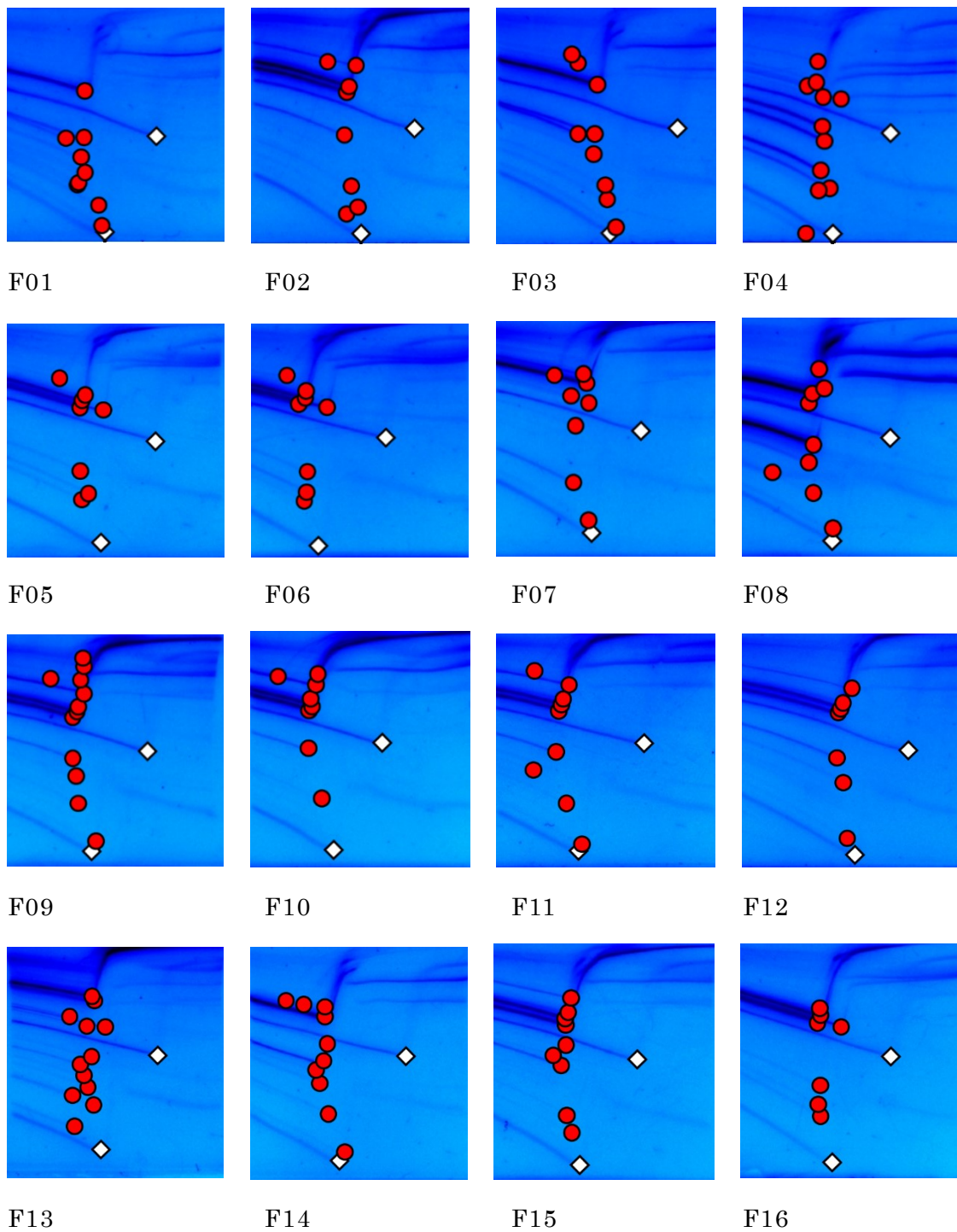


図 27a. 2015 年株における pFM19 プライマーの TGGE 泳動図

2015 年に分離された、32 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

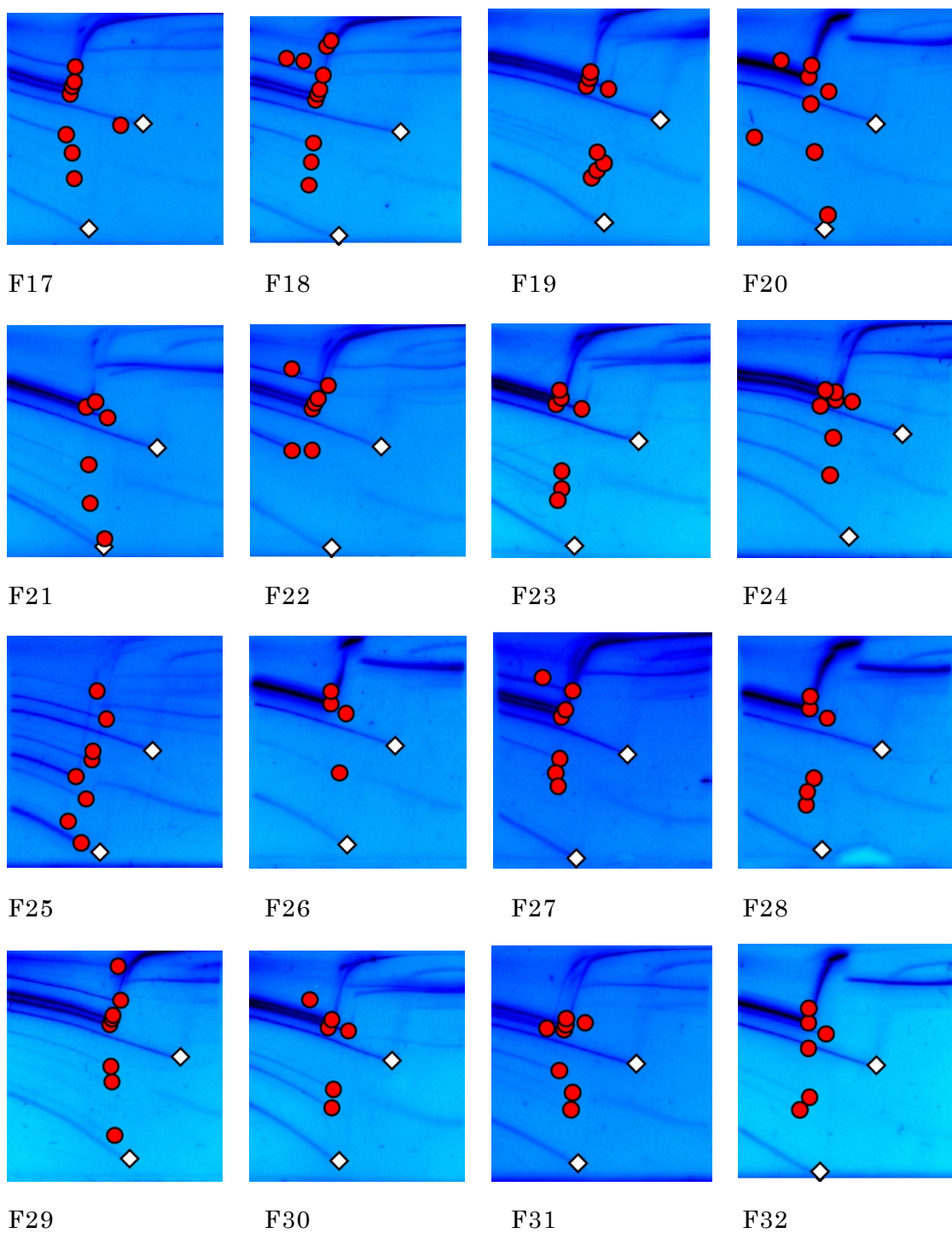


図 27b. 2015 年分離株における pM19 プライマーの TGGE 泳動図

2015 年に分離された、32 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

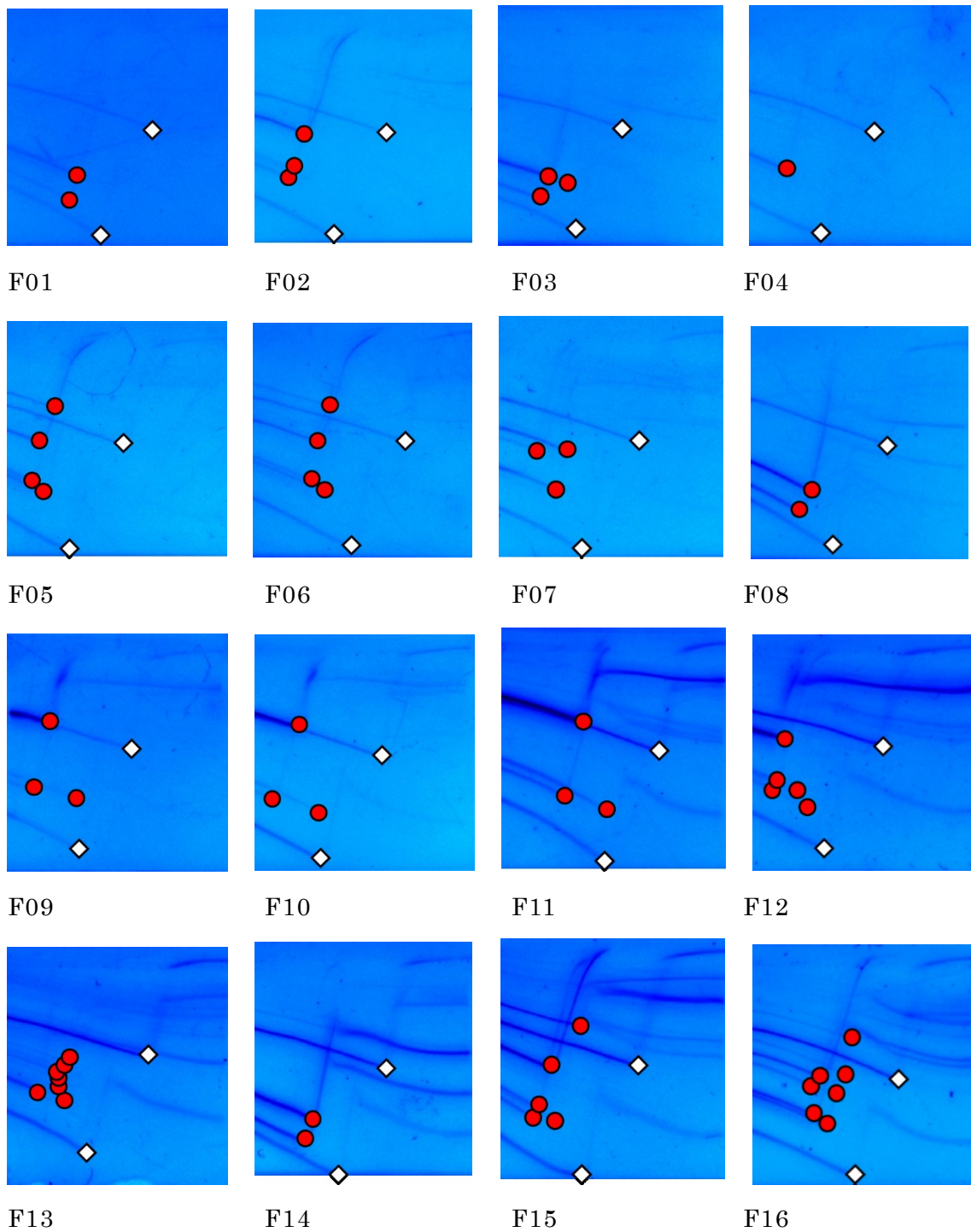


図 28a. 2015 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2015 年に分離された、32 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

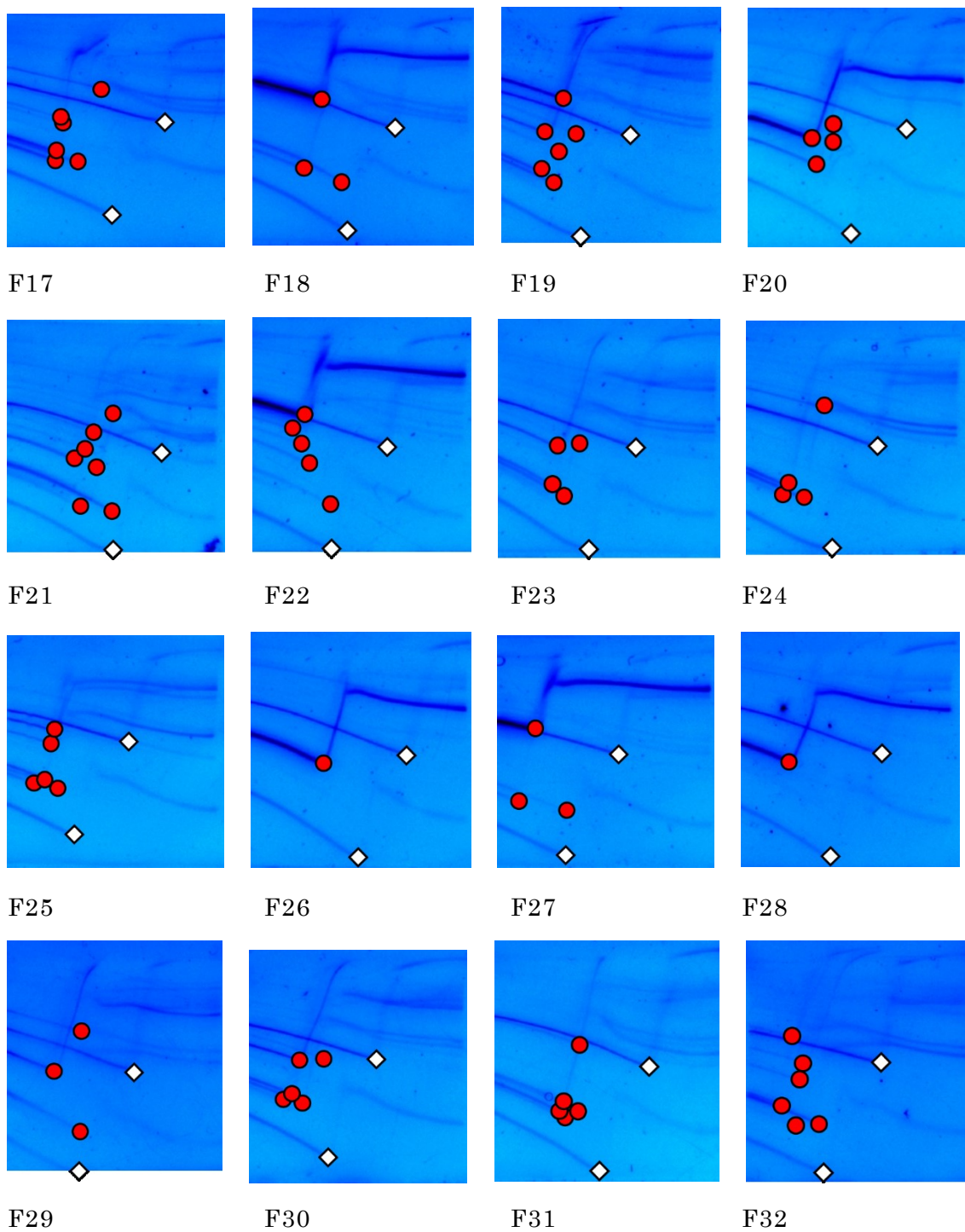


図 28b. 2015 年分離株における Hunt プライマーの TGGE 泳動図

2015 年に分離された、32 株の泳動図を表した。赤い丸は特徴点、白い菱形は参照点(上: 900bp、下: 200bp.)を表した。

表 6. 全 210 株において得られた *PaSS* の最大値、最小値、
 平均値および中央値

	<i>PaSS</i>	組み合わせ
最大値	0.981	B07 - B08
最小値	0.729	<i>yunnanensis</i> - <i>leesis</i>
平均値	0.905	
中央値*	0.909	E02 - <i>indiana</i>
		C05 - <i>mexicanensis</i>
		C09 - <i>cameroun</i>
		E33 - <i>cameroun</i>
		B17 - A20
		D21 - A18
		E13 - A28
		E54 - A28
		F32 - B12
		E39 - D03
		F10 - D19

*中央値は 210 株の *PaSS* を順に並べた時の中央にあたる
 数値を示した。

表7e. 全210株のプロパティから算出したPaSSの値

	1. <i>thuringensis</i>	2. <i>imrayensis</i>	3. <i>akashi</i>	4. <i>kuratai</i>	5. <i>sumiyoshimensis</i>	6. <i>hakubakensis</i>	7. <i>seto</i>	8. <i>kenyae</i>	9. <i>galloense</i>	10. <i>antimoniacidis</i>	11. <i>azawai</i>	12. <i>morrisoni</i>	13. <i>okawachi</i>	14. <i>dammsadakensis</i>	15. <i>komuroi</i>	16. <i>kujiyuharensis</i>
71-B-01	0.844	0.833	0.858	0.815	0.879	0.870	0.899	0.817	0.829	0.878	0.835	0.875	0.887	0.913	0.889	0.859
72-B-02	0.890	0.893	0.895	0.915	0.879	0.900	0.866	0.821	0.833	0.936	0.922	0.890	0.897	0.912	0.929	0.877
73-B-03	0.848	0.860	0.867	0.806	0.864	0.869	0.866	0.820	0.836	0.854	0.872	0.821	0.858	0.889	0.889	0.855
74-B-04	0.882	0.891	0.892	0.827	0.876	0.879	0.892	0.837	0.851	0.886	0.913	0.853	0.878	0.888	0.911	0.860
75-B-05	0.856	0.882	0.892	0.838	0.880	0.878	0.926	0.869	0.886	0.926	0.896	0.868	0.943	0.942	0.940	0.859
76-B-06	0.889	0.888	0.896	0.883	0.932	0.925	0.922	0.901	0.899	0.935	0.926	0.893	0.937	0.930	0.930	0.907
77-B-07	0.893	0.882	0.898	0.903	0.922	0.912	0.920	0.905	0.899	0.935	0.922	0.890	0.940	0.912	0.930	0.903
78-B-08	0.889	0.878	0.893	0.900	0.928	0.909	0.922	0.885	0.883	0.915	0.906	0.892	0.928	0.926	0.928	0.893
79-B-09	0.893	0.887	0.907	0.880	0.928	0.928	0.925	0.885	0.880	0.915	0.925	0.897	0.937	0.927	0.940	0.900
80-B-10	0.886	0.884	0.885	0.885	0.928	0.933	0.911	0.877	0.880	0.924	0.913	0.889	0.922	0.915	0.928	0.900
81-B-11	0.884	0.886	0.907	0.891	0.910	0.898	0.918	0.891	0.881	0.917	0.914	0.889	0.922	0.915	0.925	0.898
82-B-12	0.890	0.889	0.907	0.875	0.928	0.913	0.918	0.878	0.881	0.924	0.907	0.889	0.929	0.929	0.935	0.901
83-B-13	0.890	0.889	0.916	0.880	0.915	0.907	0.920	0.881	0.881	0.907	0.907	0.893	0.921	0.934	0.926	0.899
84-B-14	0.886	0.886	0.910	0.867	0.881	0.886	0.910	0.864	0.867	0.890	0.875	0.873	0.905	0.916	0.927	0.907
85-B-15	0.847	0.848	0.882	0.825	0.874	0.871	0.888	0.834	0.834	0.882	0.833	0.854	0.887	0.901	0.901	0.846
86-B-16	0.898	0.891	0.905	0.908	0.923	0.916	0.923	0.901	0.885	0.932	0.924	0.898	0.936	0.929	0.926	0.902
87-B-17	0.876	0.876	0.908	0.881	0.917	0.913	0.914	0.880	0.885	0.924	0.944	0.903	0.930	0.934	0.934	0.883
88-B-18	0.889	0.888	0.903	0.902	0.912	0.906	0.917	0.895	0.886	0.927	0.917	0.904	0.926	0.926	0.926	0.884
89-B-19	0.887	0.887	0.904	0.853	0.911	0.911	0.914	0.858	0.866	0.924	0.915	0.895	0.920	0.918	0.917	0.880
90-B-20	0.894	0.887	0.904	0.899	0.917	0.908	0.913	0.889	0.889	0.914	0.915	0.893	0.928	0.938	0.924	0.895
91-B-21	0.893	0.894	0.911	0.905	0.917	0.917	0.916	0.887	0.904	0.933	0.912	0.906	0.941	0.918	0.914	0.895
92-C-01	0.894	0.875	0.899	0.914	0.918	0.900	0.910	0.900	0.904	0.935	0.924	0.889	0.941	0.922	0.931	0.895
93-C-02	0.894	0.886	0.903	0.908	0.918	0.900	0.922	0.857	0.864	0.931	0.919	0.891	0.929	0.936	0.914	0.900
94-C-03	0.886	0.886	0.907	0.829	0.885	0.877	0.892	0.835	0.847	0.889	0.843	0.852	0.881	0.886	0.886	0.860
95-C-04	0.882	0.886	0.917	0.867	0.885	0.885	0.904	0.864	0.864	0.931	0.906	0.895	0.921	0.929	0.929	0.892
96-C-05	0.889	0.886	0.908	0.888	0.911	0.904	0.924	0.800	0.865	0.915	0.906	0.897	0.921	0.917	0.911	0.891
97-C-06	0.882	0.881	0.903	0.897	0.919	0.919	0.913	0.837	0.802	0.912	0.912	0.883	0.917	0.914	0.921	0.877
98-C-07	0.892	0.884	0.928	0.859	0.929	0.915	0.929	0.838	0.852	0.931	0.912	0.892	0.926	0.934	0.934	0.879
99-C-08	0.876	0.876	0.886	0.852	0.899	0.897	0.918	0.836	0.854	0.921	0.911	0.886	0.927	0.916	0.927	0.890
100-C-09	0.890	0.892	0.917	0.882	0.926	0.915	0.924	0.872	0.886	0.924	0.917	0.892	0.930	0.916	0.928	0.916
102-C-11	0.900	0.878	0.927	0.855	0.936	0.936	0.924	0.896	0.896	0.922	0.900	0.892	0.927	0.922	0.928	0.919
103-C-12	0.899	0.885	0.919	0.882	0.919	0.924	0.924	0.871	0.881	0.922	0.909	0.892	0.932	0.924	0.930	0.915
104-D-01	0.857	0.904	0.887	0.871	0.883	0.883	0.886	0.830	0.839	0.876	0.842	0.863	0.883	0.885	0.907	0.856
105-D-02	0.882	0.871	0.911	0.866	0.914	0.902	0.913	0.830	0.873	0.912	0.875	0.875	0.923	0.919	0.920	0.894
106-D-03	0.893	0.888	0.925	0.894	0.926	0.926	0.928	0.881	0.891	0.930	0.925	0.906	0.923	0.937	0.945	0.896
107-D-04	0.882	0.883	0.908	0.854	0.909	0.889	0.920	0.856	0.869	0.889	0.875	0.882	0.901	0.919	0.902	0.891
108-D-05	0.888	0.889	0.915	0.860	0.916	0.874	0.925	0.860	0.872	0.888	0.860	0.887	0.904	0.902	0.904	0.876
109-D-06	0.868	0.873	0.933	0.845	0.892	0.873	0.899	0.835	0.848	0.893	0.863	0.876	0.916	0.911	0.922	0.897
110-D-07	0.889	0.883	0.931	0.882	0.909	0.888	0.929	0.823	0.888	0.911	0.894	0.902	0.916	0.916	0.923	0.904
111-D-08	0.872	0.881	0.922	0.874	0.927	0.919	0.887	0.880	0.876	0.881	0.861	0.881	0.906	0.911	0.911	0.870
112-D-09	0.884	0.884	0.924	0.870	0.916	0.903	0.924	0.824	0.883	0.881	0.854	0.897	0.934	0.933	0.925	0.893
113-D-10	0.885	0.882	0.886	0.833	0.889	0.889	0.892	0.824	0.831	0.905	0.890	0.870	0.930	0.933	0.926	0.902
114-D-11	0.885	0.886	0.901	0.859	0.885	0.885	0.900	0.824	0.831	0.881	0.841	0.858	0.885	0.901	0.901	0.875
115-D-12	0.857	0.889	0.882	0.873	0.927	0.892	0.890	0.862	0.872	0.923	0.885	0.900	0.930	0.940	0.935	0.915
116-D-13	0.892	0.889	0.929	0.891	0.927	0.910	0.934	0.862	0.882	0.928	0.895	0.903	0.940	0.940	0.931	0.915
117-D-14	0.887	0.881	0.928	0.883	0.927	0.910	0.922	0.878	0.882	0.928	0.899	0.891	0.940	0.940	0.946	0.916
118-D-15	0.881	0.888	0.936	0.899	0.927	0.919	0.938	0.868	0.894	0.920	0.899	0.910	0.933	0.946	0.943	0.916
119-D-16	0.904	0.886	0.907	0.850	0.930	0.886	0.906	0.835	0.850	0.930	0.950	0.889	0.906	0.906	0.916	0.888
120-D-17	0.880	0.870	0.907	0.891	0.889	0.886	0.897	0.825	0.837	0.884	0.852	0.860	0.887	0.887	0.887	0.874
121-D-18	0.885	0.871	0.888	0.831	0.901	0.888	0.899	0.825	0.830	0.884	0.852	0.870	0.901	0.901	0.891	0.874
122-D-19	0.892	0.878	0.911	0.853	0.898	0.901	0.899	0.848	0.866	0.897	0.854	0.870	0.903	0.903	0.886	0.889
123-D-20	0.879	0.880	0.912	0.845	0.893	0.884	0.913	0.834	0.850	0.891	0.848	0.895	0.906	0.914	0.914	0.889
124-D-21	0.878	0.878	0.916	0.848	0.908	0.887	0.916	0.834	0.851	0.895	0.848	0.900	0.907	0.925	0.918	0.892
125-E-01	0.884	0.885	0.908	0.874	0.892	0.892	0.902	0.805	0.817	0.891	0.894	0.878	0.900	0.900	0.902	0.882
126-E-02	0.907	0.881	0.908	0.900	0.905	0.900	0.908	0.909	0.892	0.878	0.894	0.878	0.888	0.905	0.902	0.882
127-E-03	0.943	0.911	0.920	0.920	0.943	0.936	0.943	0.940	0.941	0.912	0.932	0.927	0.943	0.933	0.945	0.881
128-E-04	0.923	0.923	0.908	0.911	0.912	0.928	0.908	0.913	0.899	0.918	0.937	0.909	0.912	0.906	0.917	0.885
129-E-05	0.952	0.920	0.929	0.922	0.948	0.941	0.938	0.931	0.938	0.918	0.939	0.932	0.932	0.935	0.937	0.884
130-E-06	0.944	0.923	0.928	0.932	0.940	0.935	0.925	0.932	0.946	0.921	0.938	0.932	0.934	0.929	0.932	0.882
131-E-07	0.922	0.908	0.922	0.913	0.940	0.909	0.911	0.915	0.916	0.886	0.877	0.924	0.910	0.920	0.930	0.867
132-E-08	0.908	0.908	0.910	0.906	0.886	0.896	0.904	0.897	0.916	0.896	0.906	0.907	0.888	0.907	0.907	0.856
133-E-09	0.910	0.892	0.890	0.873	0.915	0.919	0.904	0.900	0.884	0.884	0.905	0.895	0.900	0.895	0.920	0.881
134-E-10	0.906	0.906	0.910	0.893	0.927	0.927	0.918	0.893	0.884	0.886	0.907	0.896	0.881	0.890	0.956	0.823
135-E-11	0.929	0.909	0.909	0.875	0.935	0.915	0.918	0.906	0.896	0.896	0.919	0.919	0.915	0.919	0.915	0.859
136-E-12	0.924	0.910	0.913	0.920	0.918	0.921	0.909	0.920	0.918	0.904	0.920	0.923	0.912	0.923	0.900	0.875
137-E-13	0.910	0.884	0.886	0.909	0.904	0.888	0.887	0.909	0.892	0.884	0.898	0.899	0.886	0.889	0.900	0.886
138-E-14	0.910	0.882	0.900	0.903	0.890	0.888	0.908	0.911	0.928	0.896	0.905	0.899	0.915	0.918	0.917	0.876
139-E-15	0.935	0.910	0.916	0.908	0.924	0.922	0.929	0.922	0.926	0.905	0.923	0.911	0.918	0.918	0.924	0.

表7E. 全210株のプログラムEから算出したPASSの値

71 B-01	0.828	0.836	0.859	0.885	0.810	0.881	0.829	0.888	0.881	0.829	0.888	0.796	0.843	0.887	0.818	0.860	0.838	0.878	0.904	0.825	0.854	0.911
72 B-02	0.905	0.910	0.879	0.908	0.886	0.925	0.916	0.908	0.935	0.908	0.912	0.912	0.912	0.914	0.909	0.936	0.921	0.923	0.923	0.923	0.924	0.924
73 B-03	0.823	0.823	0.879	0.846	0.787	0.787	0.801	0.808	0.836	0.838	0.838	0.789	0.812	0.914	0.816	0.878	0.837	0.883	0.884	0.884	0.884	0.884
74 B-04	0.841	0.839	0.878	0.878	0.801	0.889	0.838	0.889	0.858	0.841	0.900	0.854	0.885	0.900	0.854	0.885	0.887	0.911	0.911	0.911	0.911	0.911
75 B-05	0.830	0.831	0.879	0.833	0.837	0.878	0.834	0.839	0.853	0.836	0.884	0.834	0.885	0.884	0.834	0.885	0.882	0.882	0.882	0.882	0.882	0.882
76 B-06	0.835	0.836	0.879	0.837	0.834	0.827	0.819	0.819	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819
77 B-07	0.836	0.837	0.879	0.838	0.835	0.827	0.819	0.819	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819	0.816	0.852	0.819
78 B-08	0.837	0.838	0.879	0.839	0.836	0.828	0.820	0.820	0.853	0.820	0.817	0.853	0.820	0.817	0.853	0.820	0.817	0.853	0.820	0.817	0.853	0.820
79 B-09	0.838	0.839	0.879	0.840	0.837	0.829	0.821	0.821	0.854	0.821	0.818	0.854	0.821	0.818	0.854	0.821	0.818	0.854	0.821	0.818	0.854	0.821
80 B-10	0.839	0.840	0.879	0.841	0.838	0.830	0.822	0.822	0.855	0.822	0.817	0.855	0.822	0.817	0.855	0.822	0.817	0.855	0.822	0.817	0.855	0.822
81 B-11	0.840	0.841	0.879	0.842	0.839	0.831	0.823	0.823	0.856	0.823	0.818	0.856	0.823	0.818	0.856	0.823	0.818	0.856	0.823	0.818	0.856	0.823
82 B-12	0.841	0.842	0.879	0.843	0.840	0.832	0.824	0.824	0.857	0.824	0.819	0.857	0.824	0.819	0.857	0.824	0.819	0.857	0.824	0.819	0.857	0.824
83 B-13	0.842	0.843	0.879	0.844	0.841	0.833	0.825	0.825	0.858	0.825	0.820	0.858	0.825	0.820	0.858	0.825	0.820	0.858	0.825	0.820	0.858	0.825
84 B-14	0.843	0.844	0.879	0.845	0.842	0.834	0.826	0.826	0.859	0.826	0.821	0.859	0.826	0.821	0.859	0.826	0.821	0.859	0.826	0.821	0.859	0.826
85 B-15	0.844	0.845	0.879	0.846	0.843	0.835	0.827	0.827	0.860	0.827	0.822	0.860	0.827	0.822	0.860	0.827	0.822	0.860	0.827	0.822	0.860	0.827
86 B-16	0.845	0.846	0.879	0.847	0.844	0.836	0.828	0.828	0.861	0.828	0.823	0.861	0.828	0.823	0.861	0.828	0.823	0.861	0.828	0.823	0.861	0.828
87 B-17	0.846	0.847	0.879	0.848	0.845	0.837	0.829	0.829	0.862	0.829	0.824	0.862	0.829	0.824	0.862	0.829	0.824	0.862	0.829	0.824	0.862	0.829
88 B-18	0.847	0.848	0.879	0.849	0.846	0.838	0.830	0.830	0.863	0.830	0.825	0.863	0.830	0.825	0.863	0.830	0.825	0.863	0.830	0.825	0.863	0.830
89 B-19	0.848	0.849	0.879	0.850	0.847	0.839	0.831	0.831	0.864	0.831	0.826	0.864	0.831	0.826	0.864	0.831	0.826	0.864	0.831	0.826	0.864	0.831
90 B-20	0.849	0.850	0.879	0.851	0.848	0.840	0.832	0.832	0.865	0.832	0.827	0.865	0.832	0.827	0.865	0.832	0.827	0.865	0.832	0.827	0.865	0.832
91 B-21	0.850	0.851	0.879	0.852	0.849	0.841	0.833	0.833	0.866	0.833	0.828	0.866	0.833	0.828	0.866	0.833	0.828	0.866	0.833	0.828	0.866	0.833
92 C-01	0.851	0.852	0.879	0.853	0.850	0.842	0.834	0.834	0.867	0.834	0.829	0.867	0.834	0.829	0.867	0.834	0.829	0.867	0.834	0.829	0.867	0.834
93 C-02	0.852	0.853	0.879	0.854	0.851	0.843	0.835	0.835	0.868	0.835	0.830	0.868	0.835	0.830	0.868	0.835	0.830	0.868	0.835	0.830	0.868	0.835
94 C-03	0.853	0.854	0.879	0.855	0.852	0.844	0.836	0.836	0.869	0.836	0.831	0.869	0.836	0.831	0.869	0.836	0.831	0.869	0.836	0.831	0.869	0.836
95 C-04	0.854	0.855	0.879	0.856	0.853	0.845	0.837	0.837	0.870	0.837	0.832	0.870	0.837	0.832	0.870	0.837	0.832	0.870	0.837	0.832	0.870	0.837
96 C-05	0.855	0.856	0.879	0.857	0.854	0.846	0.838	0.838	0.871	0.838	0.833	0.871	0.838	0.833	0.871	0.838	0.833	0.871	0.838	0.833	0.871	0.838
97 C-06	0.856	0.857	0.879	0.858	0.855	0.847	0.839	0.839	0.872	0.839	0.834	0.872	0.839	0.834	0.872	0.839	0.834	0.872	0.839	0.834	0.872	0.839
98 C-07	0.857	0.858	0.879	0.859	0.856	0.848	0.840	0.840	0.873	0.840	0.835	0.873	0.840	0.835	0.873	0.840	0.835	0.873	0.840	0.835	0.873	0.840
99 C-08	0.858	0.859	0.879	0.860	0.857	0.849	0.841	0.841	0.874	0.841	0.836	0.874	0.841	0.836	0.874	0.841	0.836	0.874	0.841	0.836	0.874	0.841
100 C-09	0.859	0.860	0.879	0.861	0.858	0.850	0.842	0.842	0.875	0.842	0.837	0.875	0.842	0.837	0.875	0.842	0.837	0.875	0.842	0.837	0.875	0.842
101 C-10	0.860	0.861	0.879	0.862	0.859	0.851	0.843	0.843	0.876	0.843	0.838	0.876	0.843	0.838	0.876	0.843	0.838	0.876	0.843	0.838	0.876	0.843
102 C-11	0.861	0.862	0.879	0.863	0.860	0.852	0.844	0.844	0.877	0.844	0.839	0.877	0.844	0.839	0.877	0.844	0.839	0.877	0.844	0.839	0.877	0.844
103 C-12	0.862	0.863	0.879	0.864	0.861	0.853	0.845	0.845	0.878	0.845	0.840	0.878	0.845	0.840	0.878	0.845	0.840	0.878	0.845	0.840	0.878	0.845
104 D-01	0.863	0.864	0.879	0.865	0.862	0.854	0.846	0.846	0.879	0.846	0.841	0.879	0.846	0.841	0.879	0.846	0.841	0.879	0.846	0.841	0.879	0.846
105 D-02	0.864	0.865	0.879	0.866	0.863	0.855	0.847	0.847	0.880	0.847	0.842	0.880	0.847	0.842	0.880	0.847	0.842	0.880	0.847	0.842	0.880	0.847
106 D-03	0.865	0.866	0.879	0.867	0.864	0.856	0.848	0.848	0.881	0.848	0.843	0.881	0.848	0.843	0.881	0.848	0.843	0.881	0.848	0.843	0.881	0.848
107 D-04	0.866	0.867	0.879	0.868	0.865	0.857	0.849	0.849	0.882	0.849	0.844	0.882	0.849	0.844	0.882	0.849	0.844	0.882	0.849	0.844	0.882	0.849
108 D-05	0.867	0.868	0.879	0.869	0.866	0.858	0.850	0.850	0.883	0.850	0.845	0.883	0.850	0.845	0.883	0.850	0.845	0.883	0.850	0.845	0.883	0.850
109 D-06	0.868	0.869	0.879	0.870	0.867	0.859	0.851	0.851	0.884	0.851	0.846	0.884	0.851	0.846	0.884	0.851	0.846	0.884	0.851	0.846	0.884	0.851
110 D-07	0.869	0.870	0.879	0.871	0.868	0.860	0.852	0.852	0.885	0.852	0.847	0.885	0.852	0.847	0.885	0.852	0.847	0.885	0.852	0.847	0.885	0.852
111 D-08	0.870	0.871	0.879	0.872	0.869	0.861	0.853	0.853	0.886	0.853	0.848	0.886	0.853	0.848	0.886	0.853	0.848	0.886	0.853	0.848	0.886	0.853
112 D-09	0.871	0.872	0.879	0.873	0.870	0.862	0.854	0.854	0.887	0.854	0.849	0.887	0.854	0.849	0.887	0.854	0.849	0.887	0.854	0.849	0.887	0.854
113 D-10	0.872	0.873	0.879	0.874	0.871	0.863	0.855	0.855	0.888	0.855	0.850	0.888	0.855	0.850	0.888	0.855	0.850	0.888	0.855	0.850	0.888	0.855
114 D-11	0.873	0.874	0.879	0.875	0.872	0.864	0.856	0.856	0.889	0.856	0.851	0.889	0.856	0.851	0.889	0.856	0.851	0.889	0.856	0.851	0.889	0.856
115 D-12	0.874	0.875	0.879	0.876	0.873	0.865	0.857	0.857	0.890	0.857	0.852	0.890	0.857	0.852	0.890	0.857	0.852	0.890	0.857	0.852	0.890	0.857
116 D-13	0.875	0.876	0.879	0.877	0.874	0.866	0.858	0.858	0.891	0.858	0.853	0.891	0.858	0.853	0.891	0.858	0.853	0.891	0.858	0.853	0.891	0.858
117 D-14	0.876	0.877	0.879	0.878	0.875	0.867	0.859	0.859	0.892	0.859	0.854	0.892	0.859	0.854	0.892	0.859	0.854	0.892	0.859	0.854	0.892	0.859
118 D-15	0.877	0.878	0.879	0.879	0.876	0.868	0.860	0.860	0.893	0.860	0.855	0.893	0.860	0.855	0.893	0.860	0.855	0.893	0.860	0.855	0.893	0.860
119 D-16	0.878	0.879	0.879	0.880	0.877	0.869	0.861	0.861	0.894	0.861	0.856	0.894	0.861	0.856	0.894	0.861	0.856	0.894	0.861	0.856	0.894	0.861
120 D-17	0.879	0.880	0.879	0.881	0.878	0.870	0.862	0.862	0.895	0.862	0.857	0.895	0.862	0.857	0.895	0.862	0.857	0.895	0.862	0.857	0.895	0.862
121 D-18	0.880	0.881	0.879	0.882	0.879	0.871	0.863	0.863	0.896	0.863	0.858	0.896	0.863	0.858	0.896	0.863	0.858	0.896	0.863	0.858	0.896	0.863
122 D-19	0.881	0.882	0.879	0.883	0.880	0.872	0.864	0.864	0.897	0.864	0.859	0.897	0.864	0.859	0.897	0.864	0.859	0.897	0.864	0.859	0.897	0.864
123 D-20	0.882	0.883	0.879	0.884																		

表7.0. 全210株のデロイヤルから算出したPassの値

	36. Iseki	37. cameron	38. lewis	39. kondrich	40. hiro	41. A-01	42. A-02	43. A-03	44. A-04	45. A-05	46. A-06	47. A-07	48. A-08	49. A-09	50. A-10	51. A-11	52. A-12
141.E-17	0.902	0.880	0.849	0.885	0.892	0.900	0.918	0.927	0.901	0.937	0.904	0.910	0.908	0.884	0.910	0.903	0.885
142.E-18	0.867	0.847	0.812	0.866	0.886	0.892	0.911	0.927	0.890	0.866	0.887	0.904	0.892	0.866	0.881	0.910	0.881
143.E-19	0.861	0.835	0.802	0.859	0.878	0.885	0.898	0.906	0.869	0.863	0.887	0.905	0.887	0.861	0.887	0.910	0.881
144.E-20	0.882	0.839	0.815	0.875	0.891	0.899	0.916	0.900	0.881	0.882	0.909	0.918	0.878	0.883	0.901	0.884	0.880
145.E-21	0.882	0.885	0.868	0.870	0.881	0.880	0.887	0.890	0.867	0.882	0.889	0.881	0.885	0.882	0.885	0.881	0.885
146.E-22	0.880	0.887	0.848	0.863	0.879	0.872	0.887	0.896	0.866	0.879	0.864	0.889	0.885	0.880	0.889	0.880	0.889
147.E-23	0.885	0.846	0.817	0.870	0.903	0.905	0.887	0.912	0.892	0.882	0.894	0.887	0.891	0.887	0.899	0.880	0.889
148.E-24	0.915	0.874	0.847	0.870	0.884	0.884	0.885	0.910	0.894	0.876	0.887	0.898	0.885	0.892	0.895	0.890	0.889
149.E-25	0.922	0.902	0.866	0.911	0.900	0.914	0.921	0.933	0.906	0.914	0.921	0.916	0.921	0.913	0.913	0.884	0.880
150.E-26	0.932	0.904	0.872	0.896	0.900	0.924	0.938	0.933	0.914	0.906	0.921	0.912	0.911	0.911	0.913	0.884	0.880
151.E-27	0.921	0.889	0.864	0.894	0.886	0.908	0.922	0.910	0.893	0.905	0.922	0.912	0.911	0.913	0.913	0.884	0.880
152.E-28	0.917	0.889	0.867	0.894	0.902	0.925	0.942	0.922	0.908	0.908	0.920	0.912	0.911	0.913	0.913	0.884	0.880
153.E-29	0.920	0.886	0.865	0.894	0.902	0.929	0.942	0.929	0.931	0.922	0.930	0.926	0.926	0.926	0.926	0.900	0.885
154.E-30	0.900	0.869	0.844	0.869	0.897	0.911	0.917	0.925	0.888	0.883	0.908	0.927	0.912	0.916	0.916	0.884	0.880
155.E-31	0.888	0.891	0.861	0.881	0.878	0.908	0.913	0.925	0.892	0.892	0.916	0.917	0.906	0.917	0.917	0.889	0.889
156.E-32	0.912	0.898	0.854	0.880	0.906	0.908	0.913	0.925	0.898	0.898	0.917	0.920	0.906	0.920	0.910	0.884	0.880
157.E-33	0.925	0.909	0.878	0.907	0.918	0.941	0.925	0.928	0.925	0.925	0.925	0.920	0.928	0.933	0.933	0.892	0.892
158.E-34	0.914	0.914	0.870	0.907	0.905	0.939	0.943	0.944	0.915	0.915	0.925	0.918	0.918	0.920	0.920	0.874	0.874
159.E-35	0.938	0.845	0.818	0.881	0.905	0.939	0.943	0.902	0.887	0.887	0.904	0.927	0.917	0.915	0.915	0.888	0.889
160.E-36	0.928	0.877	0.845	0.877	0.897	0.931	0.931	0.933	0.902	0.887	0.911	0.927	0.917	0.917	0.917	0.883	0.889
161.E-37	0.934	0.904	0.879	0.887	0.903	0.930	0.933	0.934	0.915	0.920	0.926	0.918	0.918	0.920	0.920	0.873	0.873
162.E-38	0.923	0.911	0.872	0.894	0.915	0.942	0.938	0.928	0.911	0.920	0.915	0.912	0.910	0.915	0.915	0.884	0.884
163.E-39	0.933	0.921	0.902	0.902	0.914	0.932	0.938	0.935	0.913	0.920	0.925	0.909	0.916	0.916	0.916	0.884	0.884
164.E-40	0.930	0.907	0.872	0.886	0.910	0.942	0.938	0.926	0.913	0.916	0.925	0.909	0.916	0.916	0.916	0.887	0.887
165.E-41	0.915	0.905	0.866	0.886	0.897	0.917	0.921	0.935	0.906	0.896	0.922	0.912	0.912	0.905	0.905	0.885	0.885
166.E-42	0.900	0.886	0.846	0.862	0.908	0.930	0.929	0.916	0.908	0.908	0.909	0.897	0.911	0.907	0.907	0.884	0.884
167.E-43	0.910	0.894	0.862	0.885	0.908	0.900	0.905	0.921	0.882	0.882	0.906	0.909	0.908	0.911	0.911	0.884	0.884
168.E-44	0.904	0.892	0.862	0.885	0.908	0.900	0.905	0.921	0.882	0.882	0.906	0.909	0.908	0.911	0.911	0.884	0.884
169.E-45	0.930	0.902	0.882	0.908	0.910	0.913	0.926	0.931	0.914	0.916	0.917	0.926	0.918	0.918	0.918	0.887	0.887
170.E-46	0.931	0.912	0.889	0.910	0.916	0.931	0.931	0.930	0.928	0.928	0.918	0.926	0.918	0.918	0.918	0.887	0.887
171.E-47	0.936	0.908	0.879	0.917	0.930	0.932	0.932	0.935	0.919	0.919	0.922	0.923	0.919	0.919	0.919	0.888	0.888
172.E-48	0.917	0.907	0.876	0.885	0.908	0.924	0.920	0.916	0.907	0.907	0.922	0.916	0.916	0.916	0.916	0.887	0.887
173.E-49	0.909	0.887	0.864	0.893	0.903	0.928	0.932	0.923	0.912	0.912	0.929	0.923	0.912	0.912	0.912	0.889	0.889
174.E-50	0.877	0.846	0.820	0.877	0.894	0.903	0.932	0.935	0.914	0.914	0.922	0.916	0.916	0.916	0.916	0.880	0.880
175.E-51	0.836	0.813	0.841	0.835	0.859	0.854	0.854	0.858	0.831	0.831	0.854	0.851	0.831	0.831	0.831	0.782	0.782
176.E-52	0.838	0.811	0.836	0.829	0.851	0.854	0.854	0.858	0.831	0.831	0.854	0.851	0.831	0.831	0.831	0.787	0.787
177.E-53	0.839	0.812	0.836	0.829	0.851	0.854	0.854	0.858	0.831	0.831	0.854	0.851	0.831	0.831	0.831	0.787	0.787
178.E-54	0.821	0.821	0.782	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.821	0.782	0.782
179.E-54	0.823	0.823	0.784	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.785	0.785
180.E-52	0.912	0.912	0.880	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.912	0.885	0.885
181.E-53	0.924	0.924	0.886	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.887	0.887
182.E-54	0.916	0.916	0.887	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.886	0.886
183.E-55	0.925	0.925	0.889	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.886	0.886
184.E-56	0.920	0.902	0.867	0.887	0.922	0.929	0.929	0.929	0.911	0.911	0.922	0.929	0.929	0.929	0.929	0.886	0.886
185.E-57	0.914	0.881	0.852	0.882	0.914	0.920	0.920	0.920	0.902	0.902	0.926	0.920	0.920	0.920	0.920	0.882	0.882
186.E-58	0.957	0.882	0.790	0.892	0.892	0.886	0.899	0.925	0.892	0.892	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.882	0.882
187.E-59	0.915	0.888	0.850	0.889	0.902	0.945	0.925	0.925	0.902	0.902	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.882	0.882
188.E-60	0.920	0.889	0.852	0.889	0.906	0.938	0.928	0.928	0.906	0.906	0.938	0.928	0.928	0.928	0.928	0.882	0.882
189.E-61	0.918	0.901	0.872	0.891	0.919	0.951	0.938	0.938	0.911	0.911	0.951	0.938	0.938	0.938	0.938	0.882	0.882
190.E-62	0.901	0.872	0.839	0.891	0.907	0.926	0.926	0.926	0.904	0.904	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.884	0.884
191.E-63	0.894	0.870	0.830	0.891	0.917	0.918	0.918	0.918	0.894	0.894	0.918	0.918	0.918	0.918	0.918	0.884	0.884
192.E-64	0.897	0.887	0.850	0.891	0.916	0.918	0.918	0.918	0.897	0.897	0.918	0.918	0.918	0.918	0.918	0.884	0.884
193.E-65	0.922	0.909	0.866	0.909	0.919	0.948	0.948	0.948	0.922	0.922	0.948	0.948	0.948	0.948	0.948	0.889	0.889
194.E-66	0.919	0.880	0.844	0.889	0.902	0.923	0.923	0.923	0.902	0.902	0.923	0.923	0.923	0.923	0.923	0.886	0.886
195.E-67	0.919	0.880	0.844	0.889	0.902	0.923	0.923	0.923	0.902	0.902	0.923	0.923	0.923	0.923	0.923	0.886	0.886
196.E-68	0.910	0.883	0.844	0.889	0.905	0.926	0.926	0.926	0.905	0.905	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.886	0.886
197.E-69	0.918	0.885	0.844	0.889	0.905	0.926	0.926	0.926	0.905	0.905	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.886	0.886
198.E-70	0.912	0.885	0.844	0.889	0.905	0.926	0.926	0.926	0.905	0.905	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.886	0.886
199.E-71	0.916	0.885	0.844	0.889	0.905	0.926	0.926	0.926	0.905	0.905	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.886	0.886
200.E-72	0.919	0.885	0.844	0.889	0.905	0.926	0.926	0.926	0.905	0.905	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.886	0.886
201.E-73	0.919	0.885	0.844	0.889	0.905	0.926	0.926	0.926	0.905	0.905	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.886	0.886
202.E-74	0.909	0.879	0.840	0.890	0.900	0.924	0.924	0.924	0.900	0.900	0.924	0.924	0.924	0.924	0.924	0.884	0.884
203.E-75	0.902	0.868	0.821	0.868	0.884	0.903	0.923	0.923	0.884	0.884	0.903	0.923	0.923	0.923	0.923	0.884	0.884
204.E-76	0.909	0.880	0.852	0.890	0.902	0.925	0.925	0.925	0.880	0.880	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.884	0.884
205.E-77	0.916	0.883	0.846	0.889	0.903	0.923	0.923										

表7.1. 全210株のプロファイルから算出したPaSSの値

141-E-17	0.940	0.913	0.883	0.818	0.971	0.942	0.880	0.914	0.954	0.934	0.938	0.925	0.904	0.940	0.929	0.922	0.918	0.918
142-E-18	0.918	0.903	0.853	0.820	0.971	0.942	0.880	0.914	0.954	0.934	0.938	0.925	0.904	0.940	0.929	0.922	0.918	0.918
143-E-19	0.918	0.913	0.883	0.818	0.971	0.942	0.880	0.914	0.954	0.934	0.938	0.925	0.904	0.940	0.929	0.922	0.918	0.918
144-E-20	0.926	0.903	0.853	0.820	0.971	0.942	0.880	0.914	0.954	0.934	0.938	0.925	0.904	0.940	0.929	0.922	0.918	0.918
145-E-21	0.855	0.854	0.849	0.820	0.971	0.942	0.880	0.914	0.954	0.934	0.938	0.925	0.904	0.940	0.929	0.922	0.918	0.918
146-E-22	0.866	0.860	0.849	0.820	0.971	0.942	0.880	0.914	0.954	0.934	0.938	0.925	0.904	0.940	0.929	0.922	0.918	0.918
147-E-23	0.927	0.907	0.883	0.857	0.935	0.915	0.890	0.865	0.840	0.815	0.790	0.765	0.740	0.715	0.690	0.665	0.640	0.615
148-E-24	0.877	0.845	0.839	0.885	0.926	0.912	0.897	0.882	0.867	0.852	0.837	0.822	0.807	0.792	0.777	0.762	0.747	0.732
149-E-25	0.921	0.906	0.876	0.912	0.935	0.915	0.890	0.865	0.840	0.815	0.790	0.765	0.740	0.715	0.690	0.665	0.640	0.615
150-E-26	0.911	0.886	0.864	0.902	0.925	0.905	0.880	0.855	0.830	0.805	0.780	0.755	0.730	0.705	0.680	0.655	0.630	0.605
151-E-27	0.920	0.887	0.859	0.902	0.925	0.905	0.880	0.855	0.830	0.805	0.780	0.755	0.730	0.705	0.680	0.655	0.630	0.605
152-E-28	0.918	0.886	0.885	0.907	0.929	0.909	0.884	0.859	0.834	0.809	0.784	0.759	0.734	0.709	0.684	0.659	0.634	0.609
153-E-29	0.930	0.896	0.886	0.915	0.937	0.917	0.892	0.867	0.842	0.817	0.792	0.767	0.742	0.717	0.692	0.667	0.642	0.617
154-E-30	0.940	0.843	0.831	0.933	0.930	0.900	0.862	0.824	0.786	0.748	0.710	0.672	0.634	0.596	0.558	0.520	0.482	0.444
155-E-31	0.960	0.940	0.913	0.933	0.930	0.900	0.862	0.824	0.786	0.748	0.710	0.672	0.634	0.596	0.558	0.520	0.482	0.444
156-E-32	0.931	0.921	0.907	0.933	0.930	0.900	0.862	0.824	0.786	0.748	0.710	0.672	0.634	0.596	0.558	0.520	0.482	0.444
157-E-33	0.908	0.898	0.879	0.909	0.881	0.882	0.868	0.854	0.840	0.826	0.812	0.798	0.784	0.770	0.756	0.742	0.728	0.714
158-E-34	0.923	0.895	0.884	0.923	0.931	0.923	0.915	0.907	0.899	0.891	0.883	0.875	0.867	0.859	0.851	0.843	0.835	0.827
159-E-35	0.949	0.928	0.928	0.932	0.931	0.923	0.915	0.907	0.899	0.891	0.883	0.875	0.867	0.859	0.851	0.843	0.835	0.827
160-E-36	0.907	0.882	0.882	0.903	0.891	0.885	0.877	0.869	0.861	0.853	0.845	0.837	0.829	0.821	0.813	0.805	0.797	0.789
161-E-37	0.896	0.886	0.877	0.892	0.891	0.885	0.877	0.869	0.861	0.853	0.845	0.837	0.829	0.821	0.813	0.805	0.797	0.789
162-E-38	0.915	0.886	0.883	0.917	0.915	0.909	0.902	0.895	0.888	0.881	0.874	0.867	0.860	0.853	0.846	0.839	0.832	0.825
163-E-39	0.889	0.889	0.883	0.890	0.891	0.882	0.874	0.866	0.858	0.850	0.842	0.834	0.826	0.818	0.810	0.802	0.794	0.786
164-E-40	0.905	0.883	0.876	0.894	0.891	0.882	0.874	0.866	0.858	0.850	0.842	0.834	0.826	0.818	0.810	0.802	0.794	0.786
165-E-41	0.901	0.883	0.876	0.894	0.891	0.882	0.874	0.866	0.858	0.850	0.842	0.834	0.826	0.818	0.810	0.802	0.794	0.786
166-E-42	0.927	0.901	0.892	0.905	0.887	0.888	0.881	0.873	0.865	0.857	0.849	0.841	0.833	0.825	0.817	0.809	0.801	0.793
167-E-43	0.889	0.885	0.873	0.910	0.887	0.887	0.880	0.872	0.864	0.856	0.848	0.840	0.832	0.824	0.816	0.808	0.800	0.792
168-E-44	0.921	0.914	0.894	0.926	0.947	0.948	0.941	0.934	0.927	0.920	0.913	0.906	0.899	0.892	0.885	0.878	0.871	0.864
169-E-45	0.889	0.880	0.842	0.880	0.873	0.865	0.857	0.849	0.841	0.833	0.825	0.817	0.809	0.801	0.793	0.785	0.777	0.769
170-E-46	0.888	0.878	0.871	0.885	0.885	0.880	0.874	0.868	0.862	0.856	0.850	0.844	0.838	0.832	0.826	0.820	0.814	0.808
171-E-47	0.894	0.880	0.866	0.877	0.881	0.880	0.878	0.876	0.874	0.872	0.870	0.868	0.866	0.864	0.862	0.860	0.858	0.856
172-E-48	0.896	0.877	0.846	0.889	0.891	0.892	0.891	0.890	0.889	0.888	0.887	0.886	0.885	0.884	0.883	0.882	0.881	0.880
173-E-49	0.907	0.888	0.873	0.885	0.885	0.880	0.874	0.868	0.862	0.856	0.850	0.844	0.838	0.832	0.826	0.820	0.814	0.808
174-E-50	0.819	0.815	0.809	0.810	0.808	0.806	0.804	0.802	0.800	0.798	0.796	0.794	0.792	0.790	0.788	0.786	0.784	0.782
175-E-51	0.828	0.815	0.801	0.820	0.821	0.820	0.819	0.818	0.817	0.816	0.815	0.814	0.813	0.812	0.811	0.810	0.809	0.808
176-E-52	0.833	0.821	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
177-E-53	0.834	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
178-E-54	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
179-E-55	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
180-E-56	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
181-E-57	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
182-E-58	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
183-E-59	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
184-E-60	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
185-E-61	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
186-E-62	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
187-E-63	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
188-E-64	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
189-E-65	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
190-E-66	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
191-E-67	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
192-E-68	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
193-E-69	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
194-E-70	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
195-E-71	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
196-E-72	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
197-E-73	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
198-E-74	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
199-E-75	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
200-E-76	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
201-E-77	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
202-E-78	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824
203-E-79	0.833	0.823	0.820	0.824	0.824	0.824												

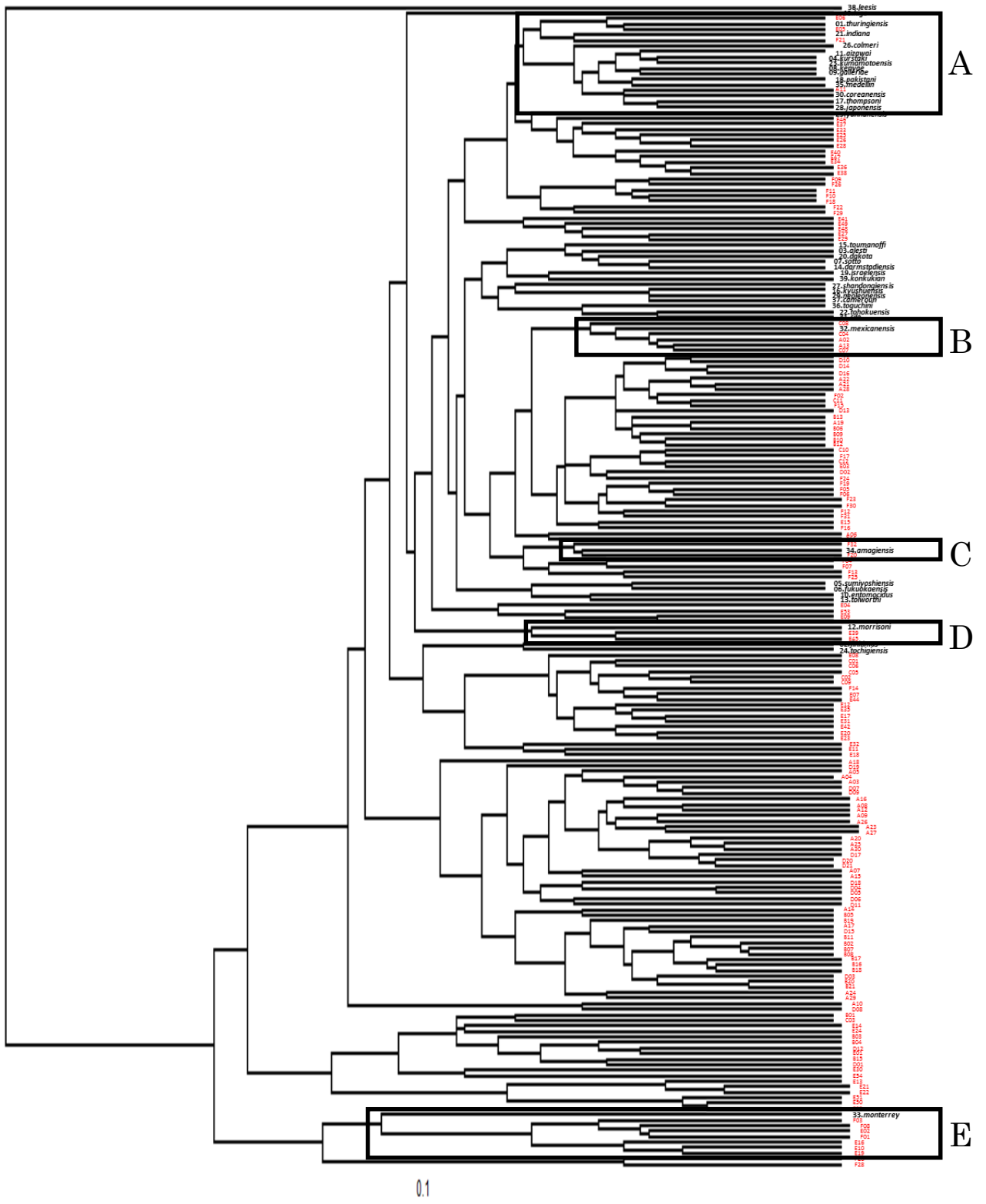


図 29. 全 210 株の GP 法による系統樹

分離株名は SSU rRNA 遺伝子配列解析の表 4、標準株名は表 5 に対応させた。分離株が標準株と隣接したクラスターを黒枠で囲み、アルファベットで表した。



図 30a. GP 法による系統樹の分割図

図 29 の A のクラスターを拡大した。A-F は 2010-2015 年の分離株を表した。



図 30b. GP 法による系統樹の分割図

図 29 の B のクラスターを拡大した。A-F は 2010-2015 年の分離株を表した。



図 30c. GP 法による系統樹の分割図

図 29 の C のクラスターを拡大した。A-F は 2010-2015 年の分離株を表した。



図 30d. GP 法による系統樹の分割図

図 29 の D のクラスターを拡大した。A-F は 2010-2015 年の分離株を表した。



図 30e. GP 法による系統樹の分割図

図 29 の E のクラスターを拡大した。A-F は 2010-2015 年の分離株を表した。

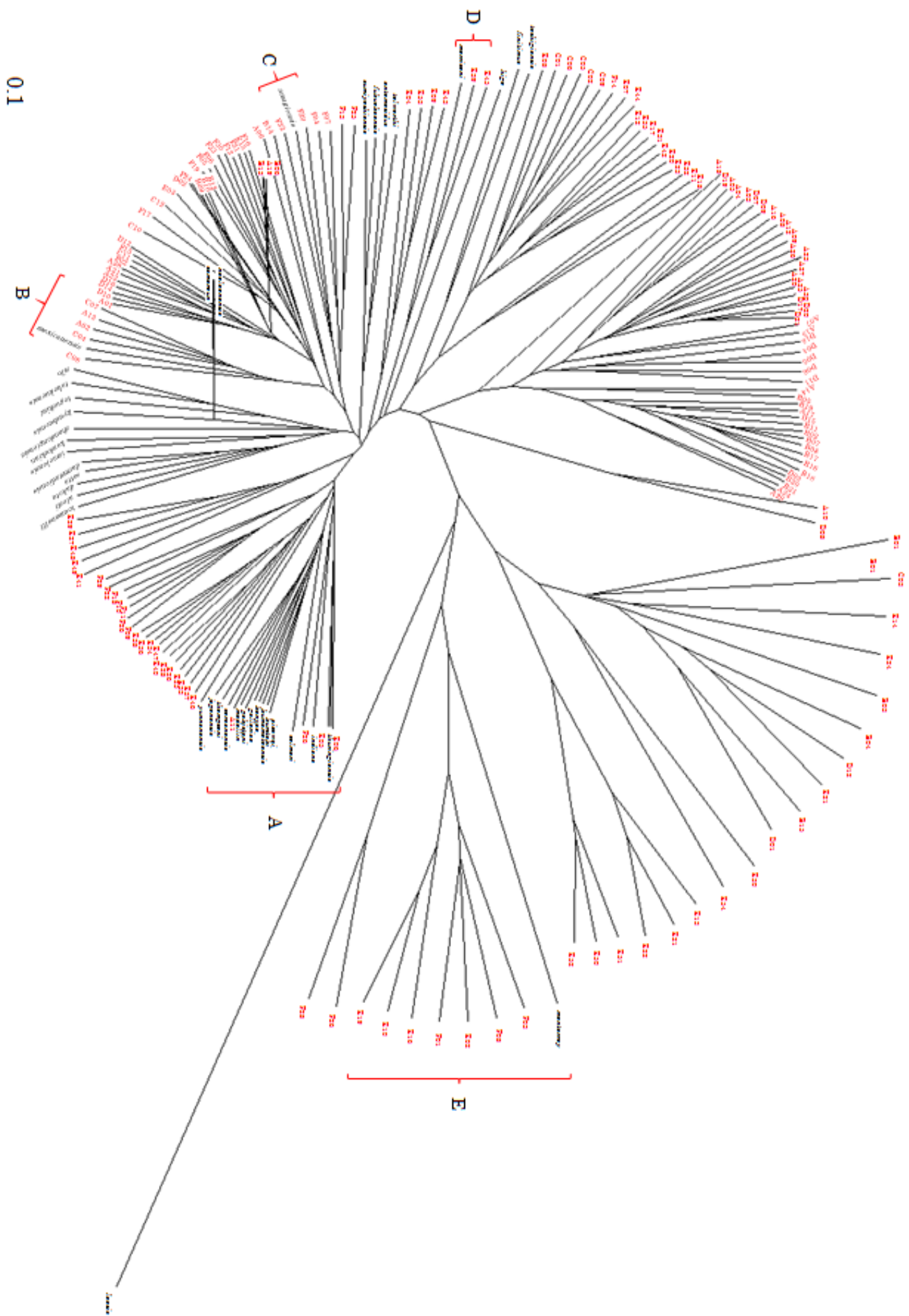


図31. 全210種のGE法による解糖系統樹

分枝標名はSST-FEN法遺伝子配列解析の素4、標準標名は素5と対応させた。分枝標は赤く表示した。フルクラマセットは、図29と同じクラスターを示した。

表 8. 標準株と分離株の対応

殺虫活性	標準株	クラスター	分離株
チョウ目	<i>thuringiensis</i>	A	E05、E06
ハエ目	<i>coreanensis</i>	A	A11
チョウ目	<i>mexicanensis</i>	B	C08、C04、A02、A13、C07
ハエ目	<i>morrisoni</i>	D	E39、E45
非殺虫	<i>indiana</i>	A	F21
非殺虫	<i>amagiensis</i>	C	F32、F20
非殺虫	<i>monterrey</i>	E	F03、F08、E02、F01、E16、E10、E19

図 29 においてクラスター内に包含された分離株を、殺虫活性を持つ標準株順に並べて表した。

4 考察

GP 法は、過去に植物、昆虫、魚類の系統解析(Kouduka et al., 2007)や昆虫病原微生物の系統解析(Hatakeyama et al., 2011 ; Oda et al., 2011 ; Oda et al., 2014)などに利用された実績がある。GP 法は特定領域の遺伝子を増幅する遺伝子解析法とは異なり、その供試生物種が有するゲノム全体を対象として解析することが可能な手法である。また、本研究では専用プライマーであるランダムプライマーを 3 つ使用し、1 株につき 3 プライマー分のプロファイルを取得した。これにより、プライマーごとのわずかな差異をなくすことで、より定性的な結果を導き出した。このプロファイルを、プライマーごとにそれぞれ 1 対全株で比較したところ、B02、B07、B08 の 3 株および B20、B21 の 2 株の組み合わせがそれぞれ類似したプロファイルを示していた(図 14-16)。これらの株の分離場所を見ると、B07 と B08 は分離場所が同じビオトープの水であるが、B02 は学生ホール横のベンチより分離した株である。このことから、分離場所が異なっても近縁な株を分離する可能性があることが示された。近縁な分離株が離れた場所に存在していた理由としては、ヒトや動物による微生物の移動や砂埃による物理的移動などが推察された。

TGGE で得られたプロファイルをプライマーごとに一つ一つ比較したところ、株間の類似度が *PaSS* という数値として得られた。*PaSS* は 0.986 ± 0.003 以上で同一株と判断される(Naimuddin et al., 2000)ため、この数値を下回った株の組み合わせは、分子生物学的には異なる株あるいは系統であることが示されている。また、*PaSS* を算出した結果、最大値は分離株である B07 と B08 間の 0.981 となった(表 6)。本研究において、最も類似している数値が同一株とみなす数値(0.986 ± 0.003)を下回っていたため、全株は異なる株あるいは別系統とみなされるので、それぞれの株は識別可能となった。また、*PaSS* の最小値は標準株である serovar

yuunanensis と serovar *leesis* の間で 0.729 であった。過去に *B. thuringiensis* と判明している標準株が最も類似していない株間となったことで、分離株は少なくともすべて *B. thuringiensis* であることが改めて確認された。

PaSS を基に UPGMA で解析を行うと、全株の系統樹が得られた。この系統樹では、標準株を中心としたクラスター群と、分離株を中心としたクラスター群に分かれた。さらに、標準株は大まかに 2 つのクラスターに分かれて収束していた。それぞれのクラスター内ではほとんど両系統が混在することはなかったが、5 つのクラスターでは標準株と分離株が隣接することがあった(図 30a-e)。A のクラスターにおいて E05 と E06 が serovar *thuringiensis* と隣接し、F21 が serovar *indiana* と隣接し、A11 が serovar *coreanensis* と隣接する位置に収束した(図 30a)。B のクラスターにおいては、C08、C04、A02、A13、C07 が serovar *mexicanensis* と同じクラスターに包含された(図 30b)。それ以外では F32、F20 の 2 株が serovar *amagiensis* と(図 30c)、E39、E45 の 2 株が serovar *morrisoni* と(図 30d)、F03、F08、E02、F01、E16、E10、E19 の 7 株が serovar *monterrey* と(図 30e)、それぞれ同じクラスター内に含まれた。A クラスターに包含された *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* は、国際文献上に明記された初めての *B. thuringiensis* の系統であり、チョウ目昆虫に毒性を示すことが知られている。H 血清型分類においても H1 という若い番号の抗原を持つ。serovar *indiana* は、我が国でも多く発見されており、特に北海道から多数の serovar *indiana* が確認されている(佐々木ら, 1994)。そのため、今回の分離実験において分離されたことも都市環境という特性を考慮すれば不思議ではない。serovar *coreanensis* は韓国で発見された株であり、同時期に serovar *leesis*、*konkukian*、*seoulensis*、*sooncheon*、*yosoo* の計 6 株が発見されている(Lee et al., 2004)。serovar *coreanensis* はカイコへの殺虫性はなく、アカイエカ(*Culex pipiens*)へ強い殺虫性が示されている。

B クラスターに包含された serovar *mexicanensis* は我が国でも比較的高頻度で確認される菌株であり(佐々木ら, 1994)、この分離株の一つである Btm27 株は、ハスモンヨトウ近縁種の *Spodoptera littoralis* に対して 2013 年までに発見された *B. thuringiensis* の中で最も強い殺虫性を示すことが知られている(Alfazairy et al., 2013)。C クラスターの serovar *amagiensis* は、これまでの研究で、他の *B. thuringiensis* 株とは異なる形質を持つことが判明している。*B. thuringiensis* は *B. cereus* と非常に近縁な細菌であり、遺伝的共通性を示す Bc-Rep-PCR pattern を持つが、この serovar *amagiensis* は *B. cereus* とは無関係ともいえるほどの差異を示している(Ramirez and Ibarra, 2005)。D クラスターの serovar *morrisoni* は、ハエ目、特にネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)へ強い殺虫性を示しており、*B. thuringiensis* の中でもハエ目に対する殺虫性が最も高い serovar *israelensis* と同レベルである(Ibarra and Federici, 1986 ; Choi et al., 2004)。E クラスターの serovar *monterrey* は、2008 年に Cachat らによって分離された株のひとつが炭そ菌として知られる *B. anthracis* と同一の 4 つの対立遺伝子を持っていると報告された(Cachat et al., 2008)。さらに、E クラスターは図 31 の無根系統樹においても他のクラスターが密集する場所とは明らかに異なる位置にあり、E クラスターに含まれる株群の特異性は高いと考えられる。

これらの知見から、標準株と近縁であると示唆された分離株は、*B. thuringiensis* の中でも非常に特異な特性を持っている可能性があると思われた。serovar *thuringiensis* や serovar *coreanensis* などのような殺虫性株と近縁であると判定された分離株は、今後の生物検定などによって殺虫性を評価することで、場合によっては有力な生物的防除資材になり得る可能性がある。また、serovar *amagiensis* と近縁な E11 株は、多くの *B. thuringiensis* と *B. cereus* が共通して保有する遺伝子に大きな差異があるため、*B. thuringiensis* と *B. cereus* の類

縁性の解明に貢献することができる可能性が存在する。

以上の分離株が、標準株と近縁と考えられる株であるが、これら 20 株の分離株が過去に発見された標準株と全く同じ形質を持つとは考えにくい。そのため、今後これらの分離株を対象に生物検定を行う場合には、殺虫活性だけにとどまらず新たな観点から調査を行うことが重要である。次に、2014 年に分離された株は、6 年間において最多となる 54 株であるが、系統樹上でも近隣にまとまる傾向が確認された。このため、似通った性質を持つ株を多く分離している可能性が考えられた。

最後に、標準株と異なるグループを形成した分離株であるが、これらの株は今回供試した *B. thuringiensis* の標準株の中では近縁な株が存在しなかったため、ほぼ独立したグループを構成したと思われた。これまでに *B. thuringiensis* は 69 種類以上の H 血清型によって分類されており (Lecadet et al., 1999)、現在も新たな血清型が発見されている (Roh et al., 2009)。このため、これらの菌株は今回供試しなかった他の血清型株と近縁である可能性もあり、さらに、未だ発見されていない新規株であるという 2 つの可能性が示唆された。

これまでに発見された多くの *B. thuringiensis* 分離株は、H 血清型によって分類されてきた。また、近年は殺虫性タンパク質である Cry タンパク質をコードする遺伝子 (*Cry* 遺伝子) の型式によって分類されることもある。有用形質の筆頭である *Cry* 遺伝子については、多くの研究結果が報告されているが、これまでにチョウ目、ハエ目、コウチュウ目以外の昆虫への強い殺虫性は残念ながら確認されていない。また、これら複数の昆虫目へ同時に殺虫性を示す株も報告されていない。本研究によって、既知株と異なる性質を持つ株がまだ多数存在していることが明らかとなったことから、今後の生物検定や性状解析によっては、未知の新たな特性を持つ *B. thuringiensis* の新株が発見されるかもしれない。

第5章 総合討論

1 新規 *B. thuringiensis* の有用性

我が国における現在の *B. thuringiensis* 研究は、殺虫性タンパク質である Cry タンパク質の解析や標的昆虫の受容体解明、さらに殺虫性以外の Cry タンパク質の機能などが主流である。これらはすべて応用研究であり、基礎研究は近年少ない傾向にある。それに対して、本研究は野外からの *B. thuringiensis* の分離株の検索という基礎研究と、分離株の系統解析の試みという応用研究を行っている。基礎研究と応用研究の併合によって、新たな知見や仮説が得られたことも示された。

既知報告では、野外から発見された *B. thuringiensis* には殺虫性株が少ないという報告がある。加えて、野外における *B. thuringiensis* 分離頻度は低率の傾向がある。しかしながら、これまでに有用株として認識されている殺虫性株やパラスポリン、トリコモナス原虫攻撃性の *B. thuringiensis* 株は、いずれも野外からの分離株である。これらの例は、強力な有用株は野外に存在している割合が少ないものの、まったく検出されないわけではないことを示している。つまり、分離率の向上によっては有用株が確保できる可能性がある。

2 *B. thuringiensis* は見つけにくい細菌なのか

1901年、石渡繁胤博士によって発見された我が国で最初の *B. thuringiensis* は、カイコ由来の菌株であった(石渡, 1901)。また、1915年に Berliner が発見した株は、ノシメマダラメイガ由来の菌株であった(Berliner, 1915)。石渡は、養蚕室において *B. thuringiensis* を分離しているため、我が国では主に養蚕室の死亡蚕や塵埃を対象とした分離実験が行われていた(鮎沢ら, 1961)。これが初期の都市環境からの分離であるといえる。この報告の中では、多数の *B. thuringiensis* 株が

分離されたが、分離源となったそれぞれの養蚕室におけるカイコ卒倒病の件数と *B. thuringiensis* の分離株数は比例関係ではないということも指摘されていた。このことから、カイコ卒倒病が多く発生する場所であっても、必ずしも *B. thuringiensis* を多数分離できるとは言えない。反対に、*B. thuringiensis* が土壌細菌であることから、感染可能な昆虫が分布していなくとも *B. thuringiensis* は分離可能であるといえる。また、佐々木ら(1994)は、北海道における分離検索を試みたところ、北海道から多く分離される serovar *indiana* と serovar *kurstaki* は多く分離されたものの、本州や九州で多く確認されている serovar *darmstadiensis* や serovar *kyusyuensis*、serovar *tohokuensis* は分離されなかったと報告している。このことから、*B. thuringiensis* の各系統の分布には、若干の地域差が存在していることが示唆された。しかしながら、輸送手段などが高速化した現在では、物資やヒトとともに微生物である *B. thuringiensis* が日本各地あるいは世界各地を行き来することは十分にあり得ると考えられる。このような移動は、ヒトや物資が到達しなければ不可能であるため、都市環境のようなヒトや物資の往来が激しい場所でこそ引き起こされる現象であると言える (Yamamoto et al., 2014)。このことから、*B. thuringiensis* の分離は分離場所の選定が非常に重要であることが示された。今回の分離結果からは、*B. thuringiensis* が人間生活に密接な関係があるトイレの床やベンチなどから高頻度で検出されたことから、*B. thuringiensis* は実際には身近な細菌であり、どこにでも存在し得る「見つけやすい細菌」であると考えられる。

3 都市環境における分離手法の評価

本分離手法による *B. thuringiensis* の分離率は、6年間合計の割合で 68.0%であった。土壌や河川の水、植物体表面からの分離率は 5%以下の低率である場合

が多く(百武・水城, 2008 ; Ichimatsu et al., 2000 ; Mizuki et al., 1999)、過去の報告と比較しても、本手法における分離結果は非常に高頻度であった。しかしながら、過去の知見では、1ヶ所あたりの *B. thuringiensis* 分離率には、大きなばらつきがある。たとえば、Ichimatsu et al. (2000)の報告では、1ヶ所あたりの分離率が 49.5%となった場所があると報告している。従って、これまでの分離実験では、*Bacillus* 属細菌数に対する *B. thuringiensis* 分離株数が低かったために分離率が低率となったと推察される。それに対して、本研究では *Bacillus* 属コロニーが発見された培地からは、多数の *B. thuringiensis* が検出される傾向が見られた。従って、都市環境における検索手法は 1 サンプルあたりの *B. thuringiensis* の分離率を高められる手法であったと言える。

4 都市環境における分離手法の将来性

本研究では、都市環境という雑多な空間を対象に分離実験を行った。そのため、有機物、無機物、屋内、屋外、固形物、水といったバリエーション豊富な分離源を対象とすることができた。このような環境から得られた *B. thuringiensis* 株は、殺虫活性の有無の他にも、多様な形質を持っている可能性がある。我が国では、温泉地の土壌から分離した *B. thuringiensis* 株が酸性の培地へ耐性を持っていたという報告がある(百武ら, 2008)。我が国の土壌は酸性土壌の割合が多いため、耐酸性を示す *B. thuringiensis* 株は、これからの BT 剤開発にとって重要な株の一つになる可能性が高い。生物的防除資材の材料となる微生物は、対象となる昆虫への病原毒性に加えて、環境への耐性や増殖能など、副次的な要素も重要となる。そのため、今後の *B. thuringiensis* 検索は、病原毒性の強弱だけにとらわれない要素を考慮することも重要となってくるだろう。

また、生物的防除資材の材料となる昆虫病原微生物は細菌だけではなく、糸状

菌類の存在も大きい。冬虫夏草として有名なシネンシストウチュウカソウ (*Cordyceps sinensis*)は、昆虫にとっては病原菌だが、人間にとって漢方薬になるなど、非常に有益な菌類の一つである。また、近年では、昆虫病原性糸状菌類 *Beauveria bassiana* や *Metarhizium anisopliae* がアザミウマやコナジラミなどの難防除害虫やカミキリムシなどの森林害虫に対する生物的防除資材として利用されている。

このように、昆虫病原微生物を用いた防除資材は、難防除害虫をはじめとした害虫防除に有効であり、さらなる研究開発が望まれている。本研究において確立された分離手法を応用することで、昆虫病原性糸状菌類の分離が実現されれば、生物的防除資材開発へさらなる貢献が可能となる。

5 分離株の解析方法の選定

これまでに、*B. thuringiensis* は様々な手法で解析が行われてきた。現在でも多くの比重を占める重要な解析手法は、H血清型分類である。この手法は、古くから行われてきた抗原抗体反応を利用した分類手法であり、現在発見されている亜種の株はこの手法に基づいて名付けられている。現在でも多くの株が発見されており、それらの株に対してもH血清型分類が行われている。一方、最近の *B. thuringiensis* の利用は、毒素タンパク質を用いた生物的防除資材をはじめとした農業分野が主流であり、毒素産生遺伝子である *Cry* 遺伝子の研究も多く行われている。高い殺虫性を持つ株は有用株として重要視される。そのため、現在では分離株を対象に、既知の *Cry* 遺伝子を調査することで有用株の選定を行う手法もとられている。また、実際に各種昆虫を用いて、殺虫性の力価を判定することも古くから行われてきた手法である。

本研究では、分離実験において得られた *B. thuringiensis* 群の中に、どれほど

の分子生物学的変異が存在するかを検証するため、SSU rRNA 遺伝子配列解析と GP 法による解析の 2 つの実験を行った。SSU rRNA 遺伝子配列解析は、これまでも多くの既知報告があり、*B. thuringiensis* の他にも *B. cereus* などの解析、あるいはそれらの種間の分類に用いられてきた。しかし、それらの報告は全て *B. thuringiensis* と *B. cereus* は分類不可能であるという結果を示していた(Chen and Tsen, 2002)。本研究において得られた SSU rRNA の遺伝子配列を比較しても、分離株間あるいは標準株や *B. cereus* との間で、明らかな差異は見受けられなかった。本研究の結果は、これら過去の知見を支持するものであり、改めて *B. thuringiensis* と *B. cereus* が非常に近縁な関係であることが再確認できた。つまり、本研究における SSU rRNA 遺伝子配列解析の結果においても、*B. thuringiensis* と *B. cereus* を明確に識別することはできなかった。しかし、この 2 つの細菌には crystal 産生能の有無ならびに昆虫病原微生物と食中毒菌という明確な差異があるが、これらの要素を含まない単一の遺伝子解析では、この 2 つの細菌を識別することは困難である。一方、Joung and Côté (2001)では、SSU rRNA 遺伝子配列を増幅後に制限酵素を用いて断片を切断する DNA フィンガープリンティング法を用いて *B. thuringiensis* の分類識別を試みている。この結果では、*B. thuringiensis* を血清型通りに分類することは不可能であったが、べん毛欠損株などを識別することが可能であったことを報告している。また、Punina et al. (2013)は、SSU rRNA 遺伝子配列解析や *gyrB* 遺伝子配列解析に加えて、AFLP 法の改良型である saAFLP や AP-PCR などの解析法を用い、*B. thuringiensis* や *Bacillus* 属細菌を分類している。この報告では、*B. thuringiensis* を含む *Bacillus* 属細菌は、単一の遺伝子配列解析法のみではなく、様々な手法を複合的に取り入れる方法によって分類識別が可能となることを示した。その一方、GP 法による解析では、分離株と標準株の多くは交わらず、分離株や標準株がそ

それぞれ異なるクラスターに収束する傾向があるということが判明した。この GP 法は、供試株のゲノム全体を対象とする解析方法であり、これまでに近縁生物の系統解析に用いられてきた。さらに近年、供試株数は少ないながらも *B. thuringiensis* を用いた解析が行われており、GP 法の有用性が示された(Oda et al., 2011)。GP 法は、AFLP 法のように単一のプライマーを用いた複数断片取得の取得が可能であり、得られた断片を GC 含量によって判別する手法である。これは、上記の既知報告で指摘されたような、複数手法を用いた解析の要素を兼ね備えた手法であると言える。このことにより、本研究で用いた GP 法による解析は、既知報告にあるような複数の解析法を用いた解析と同様の有用性を有していると考えられる。

6 これからの *B. thuringiensis* 分離研究

現在、*B. thuringiensis* を原料とする BT 剤は、生物的防除資材の出荷量の中でもトップシェアを保っている。この BT 剤の発展のためには、毒性を示す新規 Cry タンパク質の取得や殺虫メカニズムの解析が重要であり、我が国でも多くの研究・開発が行われている。本研究では、新たな *B. thuringiensis* 株を得るための分離実験の実施という基礎的な研究を行った。その結果、比較的簡単な操作で多くの *B. thuringiensis* の分離株の検索に成功した。分離した *B. thuringiensis* の実存性に関しても、GP 法を用いた解析法において確証を得た。本研究で用いた GP 法は、実験者の技術の練度が結果に大きく反映される。近年、H 血清型分類に基づく系統識別を可能とした遺伝子マーカーが開発された(Enomoto et al., 2015)。この遺伝子マーカーは、複数の株の中から一度の PCR で H1 型の *B. thuringiensis* のみを識別可能である。この技術によって、特定の血清型を持つ *B. thuringiensis* のみの検索が可能になったと考えられる。

これまで、*B. thuringiensis* は様々な場所から様々な性質を持つ株が発見されている (Argôlo-Filho and Loguercio, 2014)。本研究でも分離実験の結果から、多様な *B. thuringiensis* 株が分離された。これらの株の中には、既知の標準株と同系統と考えられる株だけでなく、未知の新しい特性を持っている可能性が示唆された。

第 6 章 摘要

昆虫病原微生物 *Bacillus thuringiensis* は、特定の昆虫に対して高い殺虫性を示すことから、現在では生物的防除資材に活用されている有用細菌の一つである。本菌の有用株はすべて野外からの分離株であるが、これまで自然界における分離率は非常に低い傾向にある。本研究は、*B. thuringiensis* の効率的な検索法の確立を目的とし、これまで分離場所としての報告が少なかった都市環境における検索実験を実施するとともに、その効率性を検証した。分離実験には、簡易検索キットを用い、2010年から2015年までの6年間で行った。その結果、6年間で合計210コロニーの *Bacillus* 属コロニーを分離し、その内170株の *B. thuringiensis* 株を単離した。分離率は6年間で平均68%であり、6年間の各年代でも50%を超え、高い分離率となった。このことから、本手法は長期間の分離実験においても安定的に *B. thuringiensis* を分離可能な手法であることが示唆された。また、得られた分離株の中の分子生物学的変異を検証するため、SSU rRNA 遺伝子配列解析とゲノムプロファイリング(GP)法の2つの分子生物学的解析手法を用いて系統解析を行った。その結果、SSU rRNA 遺伝子配列では、H血清型分類によって判明している既知 *B. thuringiensis* 標準株や *B. thuringiensis* と近縁な細菌である *Bacillus cereus*、さらに本研究で得られた分離株間の差異を明確に区別することはできなかった。これは、特定の共通遺伝子配列解析法では *B. thuringiensis* と *B. cereus* を判別することは不可能とする既知報告と同様の結果となった。一方、GP法による解析では、分離株と標準株に明らかな差異が検出された。加えて、分離株の中には多数の分子生物学的変異が存在していることも示唆された。

第 7 章 謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成に当たり、これまで終始的確なご助言・ご指導をいただきました日本大学生物資源科学部生命農学科応用昆虫科学研究室の岩野秀俊教授ならびに畠山吉則准教授に対し、深く御礼申し上げます。また、本論文の作成に際し、査読を賜りました生命農学科植物医科学研究室の藤田佳克教授ならびにくらしの生物学科くらしの微生物研究室の光澤浩教授に感謝申し上げます。

さらに、本研究で用いた標準株を分与していただいた大庭道夫前九州大学教授には、厚く感謝申し上げます。加えて、多くのご助言をいただきました北海道大学農学研究院の浅野眞一郎准教授には、深謝いたします。最後に、分離実験においてご助力いただきました応用昆虫科学研究室の室員の皆様ならびに共同研究者である宮崎雅浩氏と榎本和代氏をはじめとする 2011 年度から 2015 年度の卒業生の皆様にも、深く感謝申し上げます。

第 8 章 文献

- Agata, N., Ohta, M. and Yokoyama, K. (2002) Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 73:23-27.
- 鮎沢啓夫 (1978) わが国における *Bacillus thuringiensis* 製剤の開発と利用. 酵素工学, 56(5):676-683.
- 鮎沢啓夫・高須敏夫・倉田啓而 (1961) 養蚕家の塵埃より *Bacillus thuringiensis* の分離. 日蚕雑., 30(5):451-455.
- Alfazairy, A.A., El-Ahwany, A.M., Mohamed, E.A., Zaghloul, H.A. and El-Helow, E.R. (2013) Microbial control of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) by Egyptian *Bacillus thuringiensis* isolates. *Folia Microbiol.*, 58(2):155-62.
- Argôlo-Filho, R.C. and Loguercio, L.L. (2014) *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects*, 5:62-91.
- 有江力・国見裕久 (2010) 微生物農薬使用の現況と将来展望. バイオインダストリー, 27(9):7-17.
- Berliner, E. (1915) Über die Schlaffsucht der Mehlmottehrauqe (*Ephestia kaechniella*), und invent Erreger *Bacillus thuringiensis n. sp.* Zeischrift fur angewandttes. *Entomol.*, 2:29-56.
- Cachat, E., Barker, M., Read, T.D. and Priest, F.G. (2008) A *Bacillus thuringiensis* strain producing a polyglutamate capsule resembling that of *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 285(2):220-226.

- Carson, R. (1962) *Silent spring*. pp. 304. New York Fawcett Crest.
- Chen, M.L. and Tsen, H.Y. (2002) Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J. Appl. Microbiol.*, 92(5):912-919.
- Choi, Y.S., Cho, E.S., Je, Y.H., Roh, J.Y., Chang, J.H., Li, M.S., Seo, S.J., Sohn, H.D. and Jin, B.R. (2004) Isolation and Characterization of a Strain of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *morrisoni* PG-14 Encoding δ -Endotoxin Cry1Ac. *Curr. Microbiol.*, 48:47-50.
- Enomoto, K., Hatakeyama, H., Nishimoto, N., Miyake, S., Oda, H., Takahashi, M., Yamamoto, Y. and Iwano, H. (2015) Analysis of taxonomic inference of 40 serotypes *Bacillus thuringiensis* using genome profiling. *J. Insect Biotech. Sericol.*, 84(1):1-7.
- Hatakeyama, Y., Oda, H., Tsunoda, R., Imura, Y., Maeda, T., Xuan, T.T., Hai, T.V. and Iwano, H. (2011) Genome profiling implies high genetic diversity in microsporidia isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), in Vietnam. *Appl. Entomol. Zool.*, 46:489-496.
- Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. and Kolsto, A.B. (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6):2627-30.
- 姫野道夫 (1999) 微生物殺虫剤 (BT 剤) の改良と作用メカニズム. 日本微生物生態学会, 14(4):245-252.
- 百武稔郎・水城英一 (2008) 八重山諸島土壌からの新規 *Bacillus thuringiensis* の分離. 福岡県工業技術センター研究報告, No. 18:33-35.

- 百武稔郎・水城英一・樋口和彦・齋藤浩之 (2008) 温泉環境からの新規 *Bacillus thuringiensis* の分離と性状解明. 福岡県工業技術センター研究報告, No. 18:30-32.
- Ibarra, J.E. and Federici, B.A. (1986) Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 34:79-84.
- Ichimatsu, T., Mizuki, E., Nishimura, K., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K. and Ohba M. (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Curr. Microbiol.*, 40:217-220.
- Iizuka, T., Ishikawa, S., Asano, S., Bando, H., Zheng, Z. and Murai, N. (1994) Insecticidal activity of the *Cry1A(a)* and *Cry1B* deltaendotoxin 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.
- 石渡繁胤 (1901) 激烈なる一種の軟化病(卒倒病)に就て. 大日本蚕糸会報, 114:1-5.
- 岩田慶治 (1966) 日本文化のふるさと一東南アジア稲作民族を訪ねて. pp. 250. 角川書店.
- Joung, K.B. and Côté, J.C. (2001) Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars based on 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphisms. *J. Appl. Microbiol.*, 90(1):115-22.
- 菊田治典・黒岩学・高木龍一郎・飯塚 敏彦 (1999) 屋久島土壌から分離された *B. thuringiensis* II. 殺虫活性と *cry* 遺伝子. 日蚕雑., 68(3):225-235.

- Kondo, S., Mizuki, E., Akao, T. and Ohba, M. (2002) Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitol. Res.*, 88:1090-1092.
- Kouduka, M., Sato, D., Komori, M., Kikuchi, M., Miyamoto, K., Kosaku, A., Naimuddin, M., Matsuoka, A. and Nishigaki, K. (2007) A Solution for Universal Classification of Species Based on Genomic DNA. doi:10.1155/2007/27894.
- Kumar, S., Chandra, A. and Pandey, K.C. (2008) *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J. Environ. Biol.*, 29(5):641-653.
- 久馬一剛 (2013) 農業に於ける下肥(ナイトソイル)の利用. 肥料科学, 35:75-108.
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. and Thiéry, I. (1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 86(4):660-72.
- Lee, K.Y., Kwon, H.H., Kang, E.Y., Lee, M.J., Kim, E.N., Chu, D.W., Park, S.I. and Lee, H.H. (2004) Characteristics of Six New *Bacillus thuringiensis* Serovarieties: *B. thuringiensis* serovar. *coreanensis*, *leesis*, *konkukian*, *seoulensis*, *sooncheon*, and *yosoo*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14(3):509-514.
- 間瀬創・佐野千絵 (2008) コンクリート壁面における付着真菌の累積挙動. 保存科学, 47:197-202.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H. and Park, Y.S. (1999) Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.*, 86:477-486.

Mizuki, E., Park, Y.S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K. and Ohba, M. (2000) Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(4):625-634.

水城英一・和佐野直也・一松時生・樋口和彦 (2004) トリコモナス症に対する新規治療薬の開発. 福岡県工業技術センター研究報告, 14:31-34.

Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T. and Mizuki, E. (2010) Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74:494-498.

Naimuddin, M., Kurazono, T., Zhang, Y., Watanabe, T., Tamaguchi, M. and Nishigaki, K. (2000) Species-identification dots: a potent tool for developing genome microbiology. *Gene*, 261:243-250.

仲井まどか・大野和朗・田中利治 (2009) バイオロジカル・コントロール—害虫管理と天敵の生物学—. pp. 180. 朝倉書店.

波岡茂郎 (1996) 大腸菌あれこれ -とくにその病原性について-. *All about swine*, 10:2-6.

Nishigaki, K. and Sakuma, Y. (1994) Introduction of physicochemical properties termed stickiness and pseudostickiness to quantification of macromolecule-interaction and its application to the analysis of lambda genome DNA. *J. Chem. Soft.*, 2:96-107.

農林省振興局植物防疫課 (1960) 農薬のあゆみ. pp. 270. 株式会社小薬印刷所.

日本植物防疫協会 (2013) 農薬要覧<2013年版>. pp. 749. 日本植物防疫協会.

- Oda, H., Hatakeyama, Y. and Iwano, H. (2011) Phylogenetic relationships among *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae: Bacillales) strains based on a comparison of SSU rRNA sequences and genome profiling. *Appl. Entomol. Zool.*, 46(4):489-496.
- Oda, H., Hatakeyama, Y., Yamamoto, Y., Enomoto, K., Shigano, T. and Iwano, H. (2014) Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) isolated from Japan. *Appl. Entomol. Zool.*, 49:213-221.
- Ohba, M. and Aizawa, K. (1986) Frequency of Cry- spore forming *B. cereus* possessing flagellar antigens of Bt. *J. Basic Microbiol.*, 26:185-188.
- Ohba, M., Wasano, N. and Mizuki, E. (2000) *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan. *Microbiol. Res.*, 155:17-22.
- 岡本大二郎 (1993) 虫獣除けの原風景. 日本植物防疫協会. 120-136.
- Punina, N.V., Zotov, V.S., Parkhomenko, A.L., Parkhomenko, T.U. and Topunov, A.F. (2013) Genetic Diversity of *Bacillus thuringiensis* from Different Geographical Regions of Ukraine by Analyzing the 16S rRNA and *gyrB* Genes and by AP-PCR and saAFLP. *Acta Naturae*, 5(1):90-100.
- Radnedge, L., Agron, P.G., Hill, K.K., Jackson, P.J., Ticknor, L.O., Keim, P. and Andersen, G.L. (2003) Genome Differences That Distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5):2755-2764.

- Ramirez, A.R. and Ibarra, J.E. (2005) Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* Type Strains and Isolates by Using *Bacillus cereus* Group-Specific Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(3):1346-1355.
- Roh, J.Y., Liu, Q., Lee, D.W., Tao, X., Wang, Y., Shim, H.J., Choi, J.Y., Seo, J.B., Ohba, M., Mizuki, E. and Je, Y.H. (2009) *Bacillus thuringiensis* serovar *mogi* (flagellar serotype 3a3b3d), a novel serogroup with a mosquitocidal activity. *J. Invertebr Pathol.*, 102(3):266-8.
- 佐々木潤・浅野真一郎・伴戸久徳・飯塚敏彦 (1994) 北海道の土壌から分離した *Bacillus thuringiensis* 株の性状. 日蚕雑., 63(5):361-366.
- Sawamura, S. (1906) On the Micro-organisms of Natto, *Bulletin of the College of Agriculture. Tokyo Imperial University*, 7:107-110.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molecular Biol.*, 62(3):775-806.
- 世古智一・三浦一芸 (2013) 天敵の育種：飛翔能力を欠くテントウムシ系統の育成と品質管理. 応動昆., 57(4):219-234.
- Soufiane, B. and Côté, J.C. (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95:33-45.
- Takasaka, T., Sakurada, K., Akutsu, T., Nishigaki, K. and Ikegaya, H. (2011) Trials of the detection of semen and vaginal fluid RNA using the genome profiling method. *Leg. Med.*, 13:265-267.

- Wu, G.F. and Liu, X.H. (2007) Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, B 8(9):666-672.
- 矢野栄二 (1988) オンシツコナジラミとその寄生蜂 *Encarsia formosa Gahan* の個体群動態に関する研究. 野菜茶試研報, A2:143-200.
- Yamamoto, T. (1993) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins ; Recent advances in understanding its insecticidal activity *Advanced Engineered pesticides*, New York: Marcel Dekker, Inc., 3-42.
- Yamamoto, Y., Hatakeyama, Y., Enomoto, K., Shigano, T., Oda, H. and Iwano, H. (2014) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae: Bacillales) strains from an urban environment. *J. Insect Biotech. Sericol.*, 83(3):71-76.