

## 第1章 序 論

アブラムシは農作物の重要な害虫として広く知られている昆虫群である。アブラムシが重要な害虫となっている理由の一つにその増殖力の大きさがあげられる。単為生殖、胎生、あるいは無翅型（多産仔型）などの極めて特化した適応能力によりアブラムシは寄主植物上で大きな集団を形成して生活する。また、短期間で成熟雌に発育し一年に何度も世代を繰り返すことや、きわめて食性が広いことも増殖力を大きくする要因となっている。アブラムシが集団で植物体の汁液を吸収することによって、寄生された植物の生育には種々の悪影響が生ずる。アブラムシに寄生された葉や茎、あるいは果実などは生育が抑制され、縮葉、芯止まり、黄変、萎凋、さらには枯死、奇形果などの症状を呈し、減収や品質の低下が認められる（松崎, 1974; 佐藤ら, 1993; 鳥倉, 1994; 新山, 1997）。また、植物体の一部が異常成長して Gall を形成するものもある（秋元, 1991）。さらにアブラムシの出す液状の排泄物は茎葉や収穫物の表面に付着し、これにすす病が発生し植物の生理作用を阻害して植物を衰弱させるばかりでなく直接汚染果の原因にもなる。

アブラムシが重要な害虫となっているもう一つの理由は、アブラムシが多く植物ウイルス病を媒介することにある。昆虫によって媒介される植物ウイルス病の数は約 380 種あり、その内のほぼ半数にあたる 186 種をアブラムシが伝搬するといわれている（田中, 1976）。北海道においては、主要作物に発生する主なウイルス病は 67 種であるが、その内の約 78 % にあたる 52 種類をアブラムシが媒介する（萩田, 1995）。媒介アブラムシとしてはモモアカアブラムシ *Myzus persicae* (Sulzer)、ワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover、ジャガイモヒゲナガアブラムシ *Aulacorthum solani* (Kaltenbach) などが多くのウイルス病を媒介するが、中でもモモアカアブラムシは 113 種の植物ウイルスを伝搬するといわれている（佐古, 1983）。農作物がウイルス病に感染すると、一般にはモザイク、輪紋、えそ、萎縮、そう生などの症状を呈し、著しい減収や品質低下などが認められる。被害としてはむしろアブラムシの直接の吸汁害よりも大きなものになることが多い。

このように直接の吸汁害や植物ウイルスの伝搬などで、農作物に大きな被害をもたらすアブラムシに対しては、おのずと防除が必要になるが、その防除対策と

しては薬剤に大きく依存しているのが現状である。一般的にアブラムシは各種薬剤に感受性が高いため、従来防除にはあまり問題はなかった。しかし、近年薬剤を頻繁に使用する広食性のモモアカアブラムシとワタアブラムシで有機リン剤（浜, 1987; 西東, 1989）や合成ピレスロイド剤（森下・東, 1990; 西東, 1990）に対する抵抗性が顕在化し、農作物におけるこれらのアブラムシ防除は困難になってきている。

さらに、農薬の多用がかえって害虫の多発生を引き起こしてしまう、リサーチェンス現象がハダニ類（Debach and Rosen, 1991）やコナガ（根本, 1995）、あるいはトビイロウンカ（Heinrichs, 1994）などで知られているが、ジャガイモのワタアブラムシについても報告されている（鳥倉ら, 1989; 伊藤・中田, 1999）。リサーチェンスの原因としては農薬の施用によって標的害虫の天敵類、あるいは標的外生物の天敵類が排除されることがあげられている（根本, 1995）。ワタアブラムシの場合も、他のアブラムシ防除のためにアセフェート水和剤を散布することによって、アブラムシの天敵であるテントウムシ類が排除され、結果的にワタアブラムシが大量発生すると考えられている。

このようなアブラムシのリサーチェンスあるいは薬剤抵抗性の発達を回避するためには、化学農薬のみに依存するのではなく、いわゆる IPM (Integrated Pest Management, 総合的害虫管理) が重要であり、抵抗性品種や忌避資材の有効利用、あるいは天敵類の導入などを組み入れた総合的な防除体系の確立が必要である。

一方、近年環境保全型農業の推進が謳われ、環境に対し負荷の少ない病虫害の防除技術が求められており、とりわけ、生態系がもつ病虫害の制御力を活用した病虫害管理技術の開発の重要性が指摘されている。この中、生物的防除法としては病原微生物を利用した B T 剤 (*Bacillus thuringiensis*) の開発・実用化が成功しているが、アブラムシには有効ではなく、アブラムシにおいても生物的防除法の開発が望まれる。

これまでアブラムシの病原微生物として報告されているのは、*Conidiobolus obscurus*、*Neozygites fresenii*、*Zoophthora aphidis*、*Erynia neoaphidis*、*Entomophthora planchoniana* などの接合菌類や *Verticillium lecanii* などの不完全菌類などの糸状菌に関するものがほとんどである（Mackauer and Way, 1976; Latge and Papierok, 1988

；北沢ら，1984)。また、*Verticillium lecanii* によるワタアブラムシあるいはモモアカアブラムシに対する防除試験が行われており、アブラムシ類の防除にとって有力な素材になる可能性が示唆されている(西東，1988；増田ら，1992)。しかしながら糸状菌の場合、その感染成立に高温・高湿度条件が必要で、かつ感染してから死亡するまでに時間を要し、即効的な防除効果が期待できないことも指摘されている(Hall and Burges, 1979)。

糸状菌以外の病原微生物については、ある種のウイルスがアブラムシに感染するとその生存日数が短くなるという報告(Darcy et al., 1981)の他に、病原細菌の *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* がエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* に体腔内接種によって病原性を示すこと(Mackauer and Albright, 1973)が報告されているのみである。アブラムシのような吸汁型口器の昆虫は消化管に病原細菌を取り込む機会がごく少なく、経口感染する細菌病にはかかりにくいといわれている

(Mackauer and Albright, 1973；福原，1991；Tanada and Kaya, 1993) ため、アブラムシの病原細菌に関する研究は上記のようにほとんど行われていない。

本研究では、アブラムシの病原細菌の探索を行った。アブラムシの微生物防除を目的とする場合、体腔内に接種するよりも噴霧処理あるいは経口接種による効果を評価するような生物検定法の開発が植物を吸汁するというアブラムシの生態から考えて必要である。このため、パラフィルムを介した吸汁により経口接種する新しい生物検定法を開発し病原細菌の探索を行った。探索の結果、噴霧処理あるいは経口接種によりアブラムシに殺虫活性を示す細菌を複数発見した。また、それらの細菌の殺虫特性や殺虫活性物質の単離・同定を行い、本活性物質が従来殺虫活性の認められていない新規化合物であることを明らかにした。さらに、それらの細菌を使ってアブラムシの実用的防除についても検討した。本論文はこれらの結果をとりまとめたものである。

## 第2章 アブラムシ類に殺虫活性を示す細菌の検索

### 第1節 緒論

アブラムシのような吸汁型口器の昆虫は消化管に病原細菌を取り込む機会がごく少なく、経口的に感染する細菌病にはかかりにくいといわれている (Mackauer and Albright, 1973; 福原, 1991; Tanada and Kaya, 1993)。そのため、アブラムシの病原細菌に関する研究はほとんど行われておらず、報告されている細菌も限られている (Mackauer and Albright, 1973; 橋本, 1991)。そこで、植物を吸汁するというアブラムシの生態を考えて、噴霧処理あるいは経口接種による生物検定法を開発し病原細菌の探索を行った。その結果、アブラムシに殺虫活性を示す 12 菌株の細菌を分離し、これらの菌株の細菌学的性状を明らかにするとともに細菌の同定を試みたので、まずその結果を述べる。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 細菌の分離

1986 ~ 1990 年に北海道十勝支庁管内の芽室町など 18 市町村からアブラムシ類や他の昆虫、あるいはアブラムシ類の寄主植物の葉など昆虫及び寄主植物 617 個体のサンプルを採集した。サンプルは個体ごとに採集し、採集時に生存していたアブラムシ類は、実験室内 (16L-8D, 20 °C) で約 3 週間、個体飼育してから細菌分離に供試した。なお、飼育中に死亡した個体は、その時点で細菌分離に供試した。

採集した昆虫類は個体ごとに、また、植物については 1 cm 四方に切った葉を、それぞれ 9 ml の滅菌水の中ですりつぶし、この磨砕液を肉エキス平板培地 (肉エキス 10 g, NaCl 2 g, 寒天 10 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) に平板あたり 0.2 ml を流し込み、優勢に増殖してくる細菌のコロニーから順に分離株を得た。

#### 2. 殺虫活性の生物検定法の確立

##### 1) 噴霧処理法による選抜

北海道河西郡芽室町のエゾノギンギシ (*Rumex obtusifolius* L.) 葉上で採集したジャガイモヒゲナガアブラムシ *Aulacorthum solani* Kaltentbach とモモアカアブラムシ *Myzus persicae* Sulzer をエゾノギンギシを寄主として実験室内で累代飼育し生物検定に供試した。

細菌の培養は、分離菌株を肉エキスペプトン平板培

地に画線し、22 °C で 24 時間行った。なお、増殖の遅い菌株は平板全体に増殖するまで培養した。培養後ガラス棒で集菌し、平板あたり 9 ml の滅菌水で希釈したものを供試菌液とした。接種時の生菌数濃度は  $10^8 \sim 10^9$  cells / ml とした。

濾紙を敷いたペトリ皿 (径 9 cm, 深さ 2 cm) に、あらかじめ供試虫を定着させた寄主植物 (5 cm 四方に切葉したもの) を用意し、そこにペトリ皿あたり約 1 ml の供試菌液をクロマト用噴霧器で噴霧した。処理後はエゾノギンギシを寄主植物として恒温器内 (14L-10D, 20 °C) で飼育し、処理 12 日後まで供試虫の生死を調査した。

検定はステージの異なるジャガイモヒゲナガアブラムシに対し 3 回行った。すなわち、1 回目は 1 菌株に対しジャガイモヒゲナガアブラムシの無翅胎生雌成虫 (以後、成虫) を 13 ~ 14 頭供試し、2 ~ 3 回目には同種アブラムシの 4 齢期幼虫 (以後、幼虫) を 20 ~ 30 頭供試した。まず、3 回の検定を通して 70 % 以上の死虫率を示した菌株を選抜し、次に、それらの菌株を対象に同様の方法でモモアカアブラムシに対する殺虫活性検定を行った。検定には、1 菌株当たりモモアカアブラムシの幼虫 20 ~ 30 頭を供試した。

##### 2) 経口接種法による選抜

1989 ~ 1990 年に採集したサンプルから分離した細菌を対象に、経口接種法 (橋本, 1991) を用いて殺虫活性の検定を行った。すなわち、ペトリ皿 (径 4 cm, 深さ 1 cm) に供試昆虫を入れ、凹みをつけたパラフィルムで覆い、その上に蔗糖を 15 % 添加した供試菌液を 1 ml 滴下し、再びパラフィルムで覆い 24 時間 20 °C に放置した。これによる経口接種後、寄主植物を入れたペトリ皿 (径 9 cm, 深さ 2 cm) に移し換えて恒温器内 (14L-10D, 20 °C) で飼育し、接種 12 日後まで供試昆虫の生死を調査した。殺虫活性を示す菌株の選抜は 3 回行い、全ての実験で 70 % 以上の死虫率を示した菌株を選抜した。1 回目は、1 菌株に対しジャガイモヒゲナガアブラムシの成虫を 9 ~ 10 頭、2 ~ 3 回目は同種の幼虫を 13 ~ 28 頭供試し殺虫活性を示す菌株を得た。また、細菌培養は噴霧処理法における培養法と同様とした。

植物に対して病原性を示す可能性のある細菌をあらかじめ除くために、経口接種による 1 回目の検定で選抜した菌株を対象にジャガイモ塊茎の腐敗試験を行

った。腐敗試験は、1,000倍昇こう液で表面殺菌したジャガイモ塊茎を無菌的にスライスしたものを、さらにアルコール火炎殺菌した後、滅菌水を注入して湿室としたペトリ皿に置き、被検菌を穿刺して行った。接種2日後に腐敗の有無を調査した。腐敗試験において腐敗が認められなかった菌株を選抜し、経口接種による2回目以降の検定に供試した。

### 3) 温室における選抜菌株の噴霧処理

噴霧処理及び経口接種法による室内試験で選抜した菌株をキュウリに寄生するワタアブラムシに噴霧処理した。温室内での検定には、夕張郡長沼町北海道立中央農業試験場の温室内で栽培したキュウリに自然発生したワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover を供試した。

選抜菌株の培養は、キングB液体培地（プロテオゼペプトン 20 g, グリセリン 10 g,  $K_2HPO_4$  1.5 g,  $MgSO_4$  1.5 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) を用い、25℃で24時間振とう培養した。処理時の生菌数濃度は  $10^9$  cells/ml とした。

噴霧処理は園芸用のハンドスプレーでポット植えの4葉期のキュウリ全体に培養液を噴霧する方法で行った。あらかじめ標識したキュウリ葉に寄生するワタアブラムシ個体数を、処理前と処理3日後、6日後、10日後に調査した。1菌株に対してポット植えのキュウリを3ポット供試し、1ポットについて各1葉を調査した。なお、噴霧処理を行わない対照区 (Control) を設けた。

### 3. 選抜菌株の同定

水酸化カリウムによる簡易法 (近藤・河島, 1963) でグラム反応を検定した後、おおまかな属に分類するために、細菌細胞の形態学的観察、運動性検定、好気的条件下および嫌気的条件下での発育観察、カタラーゼ活性の検査、オキシダーゼ活性の検査、および糖の分解機序を明らかにする OF (Oxidation-Fermentation) 検定を行った。

形態学的観察は24時間培養した細菌をメチレンブルーで単染色して行った。その他の細菌学的性状の調査は、特に記載する以外は常法 (東大医科研究学会, 1976; Cowan, 1975) によった。また、特に記載する以外は、肉エキスペプトン斜面培地 (肉エキス 10 g, ポリペプトン 10 g, NaCl 2 g, 寒天 10 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) を用い、25℃で培養した48時間以内の菌体を検定に使用した。

種の同定の際には Bergey's Manual of Determinative

Bacteriology, 9th ed. (Holt et al., 1994) に従い検定を行った。すなわち、*Pseudomonas* 属の菌株に対しては、鞭毛の数、色素の産生、クエン酸の利用、PHB (Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) の菌体内蓄積、5℃および42℃における発育、レバン産生、アルギニンジヒドロラーゼ活性、硝酸塩存在下の嫌气的発育 (脱窒素)、ゼラチン液化、デンプン加水分解、糖・有機酸およびアミノ酸の利用、レシチナーゼ活性 (卵黄反応) の検定を行った。鞭毛染色は変法山中氏法 (白田・後藤, 1981) により染色し、その着生位置および数を調査した。

*Pantoea* に属する菌株に対しては、色素の産生、KCN培地における発育、クエン酸塩の利用、マロン酸塩の利用、ブドウ糖からのガス産生、糖・有機酸・アミノ酸の利用、アセトイン産生を証明する VP (Voges-Proskauer) 試験および酸の産生を証明する MR (Methyl-Red) 試験、エスクリン加水分解、インドールの産生、ゼラチン加水分解、ウレアーゼ活性、TSI (3糖鉄) 培地における硫化水素産生、アルギニン加水分解、リシンデカルボキシラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、フェニルアラニンジアミナーゼの活性、酒石酸塩の利用、硝酸塩の還元、DNase の産生の検定を行った。

*Xanthomonas* に属する菌株に対しては、シストの形成、鞭毛の着生位置、蛍光色素の産生、コロニーの色、ブドウ糖の利用、インドールの産生の検定を行った。

## 第3節 結果

### 1. 細菌分離

採集したサンプル数はアブラムシ類 437 個体、アブラムシ以外の昆虫 5 個体、寄主植物 175 個体、合わせて 617 検体である (Table 1)。

Table 1. List of samples for isolation of bacterial strains

| Kind of samples                            | No. of samples |
|--|----------------|
| Aphids                                     | 437            |
| <i>Aulacorthum solani</i> Kaltendbach      | 381            |
| <i>Myzus persicae</i> Sulzer               | 14             |
| <i>Rhopalosiphum padi</i> Linne            | 10             |
| <i>Macrosiphum akebiae</i> Shinji          | 7              |
| <i>Aphis gossypii</i> Glover               | 6              |
| <i>Aphis rumicis</i> Linne                 | 6              |
| Other aphids                               | 13             |
| Insects except aphid                       | 5              |
| Plant's leaf                               | 175            |
| <i>Trifolium</i> spp. (clover)             | 69             |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (kidney bean) | 60             |
| <i>Rumex obtusifolius</i> L. (dock)        | 41             |
| Other plants                               | 5              |
| Total                                      | 617            |

617 検体から 1,100 菌株の細菌を分離した。平均す

ると検体あたり 1.8 菌株の細菌を分離できたが、昆虫類からは平均で 2.0 菌株、植物からは平均で 1.3 菌株であり、昆虫類からの方がより多く細菌分離が可能であった。

## 2. 殺虫活性の生物検定法の確立

### 1) 噴霧処理法による選抜

1986～1988年に採集した339サンプルから分離した582菌株の細菌を対象に、噴霧処理による殺虫活性菌株の選抜を行った結果、ジャガイモヒゲナガアブラムシに対して強い殺虫活性を示す6菌株(HS菌株)が選抜された(Table 2)。選抜された菌株では、死亡虫が処理後短期間で認められ、早いものでは処理2日後に死虫率が100%に達した。その他の菌株についても、処理後2～4日間の短期間で死虫率がほぼ

最高値に達した。アブラムシの成虫と幼虫のステージの違いによる殺虫活性の発現に違いは認められず、両ステージの個体に対して強い活性を示した。死亡直後のアブラムシの体色は生存時の緑黄色のままであったが、時間が経過するにつれて薄い茶褐色に変化した。また、アブラムシは寄主植物に付着する形で死亡しており、こうした症状は成虫よりも幼虫の方が顕著であった。ジャガイモヒゲナガアブラムシを供試して選抜した6菌株は、モモアカアブラムシに噴霧処理しても強い殺虫活性が示された(Table 3)。死亡虫の出現時期も同様で、処理後2～4日間の短期間でほとんどの菌株の死虫率が最高値に達した。また、死亡個体の体色の变化も同様で、時間の経過に伴って生存時の赤色が赤褐色に変化し、モモアカアブラムシも寄主植物に付着する形で死亡する個体が多かった。

Table 2. Mortality of *Aulacorthum solani* sprayed by bacterial suspensions

| Bacterial isolates | <i>A. solani</i> stage | No. of aphids | Mortality(%)        |     |     |     |    |    |
|--------------------|------------------------|---------------|---------------------|-----|-----|-----|----|----|
|                    |                        |               | Days after spraying |     |     |     |    |    |
|                    |                        |               | 2                   | 4   | 6   | 8   | 10 | 12 |
| HS870031           | adult                  | 13            | 62                  | 100 | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 30            | 97                  | 100 | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 25            | 100                 | —   | —   | —   | —  | —  |
| HS870502           | adult                  | 13            | 85                  | 92  | 92  | 100 | —  | —  |
|                    | nymph                  | 20            | 100                 | —   | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 22            | 73                  | 91  | 91  | 91  | 91 | 91 |
| HS871792           | adult                  | 14            | 86                  | 93  | 93  | 93  | 93 | 93 |
|                    | nymph                  | 20            | 55                  | 100 | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 25            | 96                  | 96  | 96  | 96  | 96 | 96 |
| HS880681           | adult                  | 14            | 93                  | 93  | 93  | 93  | 93 | 93 |
|                    | nymph                  | 28            | 57                  | 68  | 79  | 79  | 79 | 79 |
|                    | nymph                  | 26            | 50                  | 54  | 58  | 85  | 85 | 85 |
| HS881022           | adult                  | 14            | 100                 | —   | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 25            | 100                 | —   | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 20            | 80                  | 85  | 100 | —   | —  | —  |
| HS881381           | adult                  | 14            | 100                 | —   | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 20            | 85                  | 100 | —   | —   | —  | —  |
|                    | nymph                  | 27            | 78                  | 100 | —   | —   | —  | —  |

### 2) 経口接種法による選抜

1989～1990年に採集した278のサンプルから分離した518菌株の細菌を対象に、経口接種による殺虫活性を示す菌株の選抜とジャガイモ塊茎腐敗試験を行った結果、ジャガイモに対して病原性がなく、ジャガイモヒゲナガアブラムシに対して強い殺虫活性を示す6菌株(HP菌株)が選抜された(Table 4)。これら6菌株は、噴霧処理によって選抜したHS菌株に比べ殺虫活性の発現が遅く、接種後死虫率が最高値に達する

までに8～10日間を要した。成虫と幼虫のHP菌株に対する感受性については、明瞭な違いは認められなかったが、幼虫でやや早くなり、かつ死虫率も高くなる傾向が認められた。死亡個体の体色の变化は、すでに死亡直後から認められ、生存時の緑黄色から茶褐色に変化していた。また、死亡個体が寄主植物に付着する症状は認められなかった。

### 3) 温室における選抜菌株の噴霧処理

ジャガイモヒゲナガアブラムシとモモアカアブラム

シに対して噴霧処理によって選抜した HS 菌株は、ワタアブラムシに対しても噴霧処理により強い殺虫活性を示した (Table 5)。死亡虫はジャガイモヒゲナガアブラムシやモモアカアブラムシの場合と同様に、処理後短時間で現れ、どの HS 菌株についても処理 3 日後の補正密度指数が一番低かった。しかし、アブラムシ寄生数が減少していたのは処理 3 日後の調査時のみ

で、その後は増加した。死亡虫の体色は生存時の濃緑色から黒褐色に変化しており、キュウリ葉に付着したまま死亡している個体が多く認められた。

一方、経口接種によって選抜した HP 菌株の中には、無処理区と比べてワタアブラムシの増殖率を低下させる菌株もあったが、ほとんどの HP 菌株は噴霧処理では殺虫活性を示さなかった (Table 5)。

Table 3. Mortality of *Myzus persicae* sprayed by bacterial suspensions

| Bacterial isolates | <i>M.persicae</i> stage | No. of aphids | Mortality (%)       |    |     |    |    |    |
|--------------------|-------------------------|---------------|---------------------|----|-----|----|----|----|
|                    |                         |               | Days after spraying |    |     |    |    |    |
|                    |                         |               | 2                   | 4  | 6   | 8  | 10 | 12 |
| HS870031           | nymph                   | 30            | 97                  | 97 | 97  | 97 | 97 | 97 |
| HS870502           | nymph                   | 20            | 95                  | 95 | 95  | 95 | 95 | 95 |
| HS871792           | nymph                   | 25            | 96                  | 96 | 96  | 96 | 96 | 96 |
| HS880681           | nymph                   | 25            | 68                  | 88 | 100 | —  | —  | —  |
| HS881022           | nymph                   | 25            | 100                 | —  | —   | —  | —  | —  |
| HS881381           | nymph                   | 27            | 78                  | 78 | 78  | 78 | 78 | 78 |

Table 4. Mortality of *Aulacorthum solani* after peroral inoculation of bacterial suspensions

| Bacterial isolates | Inoculated stage | No. of aphids inoculated | Mortality (%)                  |    |     |     |     |    |
|--------------------|------------------|--------------------------|--------------------------------|----|-----|-----|-----|----|
|                    |                  |                          | Days after peroral inoculation |    |     |     |     |    |
|                    |                  |                          | 2                              | 4  | 6   | 8   | 10  | 12 |
| HP890972           | adult            | 10                       | 0                              | 20 | 20  | 80  | 80  | 80 |
|                    | nymph            | 22                       | 0                              | 36 | 73  | 100 | —   | —  |
|                    | nymph            | 19                       | 0                              | 95 | 100 | —   | —   | —  |
| HP891192           | adult            | 9                        | 0                              | 0  | 78  | 78  | 78  | 78 |
|                    | nymph            | 24                       | 0                              | 4  | 71  | 96  | 96  | 96 |
|                    | nymph            | 19                       | 0                              | 5  | 74  | 95  | 100 | —  |
| HP891592           | adult            | 10                       | 0                              | 0  | 0   | 20  | 90  | 90 |
|                    | nymph            | 15                       | 0                              | 7  | 80  | 80  | 80  | 87 |
|                    | nymph            | 13                       | 0                              | 8  | 69  | 100 | —   | —  |
| HP891632           | adult            | 10                       | 0                              | 0  | 20  | 70  | 80  | 80 |
|                    | nymph            | 18                       | 0                              | 0  | 33  | 50  | 83  | 94 |
|                    | nymph            | 16                       | 0                              | 0  | 25  | 44  | 100 | —  |
| HP891941           | adult            | 10                       | 0                              | 20 | 40  | 80  | 80  | 80 |
|                    | nymph            | 22                       | 0                              | 0  | 41  | 59  | 73  | 73 |
|                    | nymph            | 15                       | 0                              | 27 | 87  | 87  | 87  | 87 |
| HP892182           | adult            | 10                       | 0                              | 0  | 10  | 90  | 100 | —  |
|                    | nymph            | 28                       | 0                              | 20 | 75  | 75  | 75  | 75 |
|                    | nymph            | 15                       | 0                              | 13 | 67  | 73  | 80  | 80 |

Table 5. Effect of spraying by bacterial cultures against numbers of *Aphis gossypii* in greenhouse

| Bacterial isolates | Days after spraying |           |           |           |
|--------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
|                    | 0                   | 3         | 6         | 10        |
| HS870031           | 121                 | 18 ( 8)   | 59 ( 14)  | 210 ( 26) |
| HS870502           | 57                  | 0 ( 0)    | 13 ( 6)   | 87 ( 23)  |
| HS871792           | 78                  | 3 ( 2)    | 49 ( 18)  | 105 ( 20) |
| HS880681           | 122                 | 8 ( 4)    | 29 ( 7)   | 143 ( 17) |
| HS881022           | 58                  | 12 ( 11)  | 27 ( 13)  | 65 ( 17)  |
| HS881381           | 44                  | 7 ( 9)    | 27 ( 17)  | 55 ( 19)  |
| HP890972           | 43                  | 73 ( 93)  | 134 ( 87) | 179 ( 62) |
| HP891192           | 55                  | 108 (108) | 198 (101) | 401 (108) |
| HP891592           | 37                  | 86 (127)  | 115 ( 87) | 351 (141) |
| HP891632           | 56                  | 154 (151) | 193 ( 97) | 414 (110) |
| HP891941           | 51                  | 62 ( 67)  | 145 ( 80) | 448 (131) |
| HP892182           | 34                  | 64 (103)  | 84 ( 69)  | 248 (109) |
| Control            | 49                  | 89 (100)  | 175 (100) | 329 (100) |

Numbers in parentheses indicators rate of increase (%) of aphids per cucumber leaf compared with control

$$(\%) = \frac{Ta \times Cb}{Tb \times Ca} \times 100$$

Ta : Numbers of aphids per treatment leaf after spraying,

Tb : Numbers of aphids per treatment leaf before spraying,

Ca : Numbers of aphids per control leaf after spraying,

Cb : Numbers of aphids per control leaf before spraying.

#### 4) 分離源

Table 6 に選抜菌株の分離源を示した。噴霧処理により選抜した HS 菌株と経口接種により選抜した HP

菌株は、ジャガイモヒゲナガアブラムシと植物から分離された菌株である。選抜菌株の 12 菌株中、75 %にあたる 9 菌株がアブラムシ由来の細菌であった。

Table 6. List of samples for isolation of bacterial strains

| Bacterial isolates | Samples                   | Stage  | Date collected | Town <sup>a</sup> where sample collected |
|--------------------|---------------------------|--------|----------------|--|
| HS870031           | aphid <sup>b</sup>        | adult  | 1987.5.4       | Memuro                                   |
| HS870502           | aphid                     | adult  | 1987.5.10      | Memuro                                   |
| HS871792           | aphid                     | adult  | 1987.12.4      | (rearing)                                |
| HS880681           | aphid                     | adult  | 1988.8.24      | Memuro                                   |
| HS881022           | aphid                     | adult  | 1988.12.10     | (rearing)                                |
| HS881381           | kidney bean <sup>c</sup>  | (leaf) | 1988.8.20      | Memuro                                   |
| HP890972           | red clover <sup>d</sup>   | (leaf) | 1989.7.11      | Memuro                                   |
| HP891192           | aphid                     | adult  | 1989.11.17     | (rearing)                                |
| HP891592           | aphid                     | adult  | 1989.11.24     | (rearing)                                |
| HP891632           | aphid                     | adult  | 1989.10.2      | Memuro                                   |
| HP891941           | white clover <sup>e</sup> | (leaf) | 1989.10.2      | Shikaoui                                 |
| HP892182           | aphid                     | nymph  | 1989.10.3      | Hiroo                                    |

<sup>a</sup> Towns : In Tokachi district.

<sup>b</sup> aphid : *Aulacorthum solani*.

<sup>c</sup> kidney bean : *Phaseolus vulgaris* L.

<sup>d</sup> red clover : *Trifolium pratense* L.

<sup>e</sup> white clover : *T. repens* L.

## 3. 分離菌株の同定

## 1) HS 菌株

グラム陰性の桿菌で孢子形成を行わず、鞭毛をも

ち運動性があり、カタラーゼとオキシダーゼに陽性で、糖を酸化的に利用することから HS 菌株の 6 菌株は *Pseudomonas* 属細菌と同定した (Table 7)。

Table 7. Characteristics of bacterial isolates with insecticidal activity against aphids

| Characteristics  | S-1            | S-2 | S-3 | S-4 | S-5 | S-6 | P-1            | P-2 | P-3 | P-4 | P-5 | P-6 |
|------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gram stain       | —              | —   | —   | —   | —   | —   | —              | —   | —   | —   | —   | —   |
| Shape of cells   | R <sup>a</sup> | R   | R   | R   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   |
| Motility         | +              | +   | +   | +   | +   | +   | +              | +   | +   | +   | +   | +   |
| Aerobic growth   | +              | +   | +   | +   | +   | +   | +              | +   | +   | +   | +   | +   |
| Anaerobic growth | —              | —   | —   | —   | —   | —   | +              | +   | +   | +   | +   | +   |
| Catalase         | +              | +   | +   | +   | +   | +   | +              | +   | +   | +   | +   | +   |
| Oxidaze          | +              | +   | +   | +   | +   | +   | —              | —   | —   | —   | —   | —   |
| OF test          | O <sup>b</sup> | O   | O   | O   | O   | O   | F <sup>c</sup> | —   | —   | —   | F   | F   |

S-1 : HS870031, S-2 : HS870502, S-3 : HS871792, S-4 : HS880681, S-5 : HS881022,  
S-6 : HS881381, P-1 : HP890972, P-2 : HP891192, P-3 : HP891592, P-4 : HP891632,  
P-5 : HP891941, P-6 : HP2182.

<sup>a</sup>R : Rod.

<sup>b</sup>O : Oxidization.

<sup>c</sup>F : Fermentation.

*Pseudomonas* 属細菌の中で PHB を蓄積せず、蛍光色素を産生し、アルギニンジヒドロラーゼ活性が陽性の菌種としては、*P. aeruginosa*、*P. fluorescens*、*P. chlororaphis*、*P. aureofaciens*、*P. putida* が知られている (Norbert, 1984)。分離された HS 菌株はいずれも鞭毛が 1 ~ 4 本あり、蛍光青色色素 (pyocyanin) を産生しないが、レバンを産生し、また、5 °C で発育するが 40 °C で発育せず、さらに炭素源としてサッカロースとキシロースを利用する点で *P. aeruginosa* と異なる。また、*P. chlororaphis* とは緑色色素 (chlororaphin) を産生しないこと、Tween 80 を分解せず、炭素源としてキシロースを利用する点で異なる。さらに *P. chlororaphis* と異なる性状としては橙色色素 (phenazine-1-carboxylate) を産生しないこと、硝酸塩を還元し、炭素源としてキシロースを利用することがあげられる。一方、レバンを産生し、ゼラチンを液化し、硝酸塩を還元する点で *P. putida* と異なる。以上の結果から HS 菌株の 6 菌株は *P. fluorescens* と同定された (Table 8)。

## 2) HP 菌株

グラム陰性の桿菌で孢子形成を行わず、鞭毛もち運動性があり、黄色の色素を産生し、カタラーゼ陽性でオキシダーゼ陰性、糖を発酵的に利用し、インドールを産生せず、VP テストが陽性、アルギニン加水分解陰性、硫化水素を産生せず、KCN 陽性であるこ

とから HP 菌株の 3 菌株 (HP890972, HP891941, HP892182) は *Pantoea* 属細菌と同定した (Table 7 および Table 9)。

*Pantoea* 属細菌には *P. agglomerans* と *P. dispersa* の 2 菌種が知られている (Holt et al., 1994) が、フェニルアラニンジアミナーゼが陽性、マロン酸塩およびサリシンを利用し、エスクリンを加水分解することからこの 3 菌株を *P. agglomerans* と同定した (Table 9)。

HP 菌株の他の 3 菌株 (HP891192, HP891592, HP891632) は、グラム陰性の桿菌で孢子形成を行わず、極鞭毛もち運動性があり、コロニーが黄色で、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性、PHB を蓄積しないことから *Xanthomonas* 属細菌と同定された (Table 7 および Table 10)。

*Xanthomonas* 属細菌には 8 菌種が知られている (Holt et al., 1994) が、鞭毛の数が 2 本以上あり、培地中に黄色色素を産生せず、リシンデカルボキシラーゼが陽性であることから、この 3 菌株を *X. maltophilia* と同定した (Table 10)。

## 第4節 考 察

採集サンプルから細菌を分離した際、植物からよりも昆虫からの方が分離される菌株数がより多かったが、これは、植物に比べ昆虫には腸内細菌などの共生



Table 8. Characteristics of HS- isolates and *Pseudomonas fluorescens*

| Characteristics              | S-1 <sup>a</sup> | S-2 <sup>b</sup> | S-3 <sup>c</sup> | S-4 <sup>d</sup> | S-5 <sup>e</sup> | S-6 <sup>f</sup> | <i>P. fluorescens</i> <sup>g</sup> |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------------|
| Number of flagellar          | 1~3              | 1~3              | 1~2              | 1~3              | 1~2              | 1~2              | >1                                 |
| Fluorescent pigments :       |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                                    |
| pyocyanin                    | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| pyoverdin                    | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| chlororaphin                 | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| Other pigment                | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| Citrate (Simmons)            | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| PHB accumulation             | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| Growth at 42 °C              | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| at 5 °C                      | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| Levan formation from sucrose | -                | -                | +                | +                | +                | -                | + or -                             |
| Arginine dihydrolase         | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| Denitrification              | -                | -                | -                | -                | -                | -                | + or -                             |
| Gelatin liquefaction         | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| Starch hydrolysis            | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| Utilization of :             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                                    |
| Glucose                      | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| Inositol                     | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| Lactose                      | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| Maltose                      | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| D-Mannitol                   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| Salicin                      | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                                  |
| Sucrose                      | -                | -                | W <sup>h</sup>   | -                | -                | -                | + or -                             |
| Trehalose                    | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| D-Xylose                     | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |
| Lecithinase (egg yolk)       | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                                  |

<sup>a</sup> S-1 : HS870031, <sup>b</sup> S-2 : HS870502, <sup>c</sup> S-3 : HS871792, <sup>d</sup> S-4 : HS880681,

<sup>e</sup> S-5 : HS881022, <sup>f</sup> S-6 : HS881381,

<sup>g</sup> *P. fluorescens* : Cited from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. (Holt et al., 1994).

<sup>h</sup> W : weak reaction.

細菌が多く存在する (Bucher, 1981) ためと考えられる。また、昆虫類では、生存個体よりも死亡個体からより多くの種類の細菌が分離されたが、昆虫が死亡すると微生物の侵入や増殖に対する生体防衛機能を失い (Bucher, 1981 ; 福原, 1991)、死因となった昆虫病原細菌の他に細菌が侵入し、そのため死亡個体からより多くの菌株を分離できたと考えられる。

昆虫病原細菌には、摂食によって経口的に消化管に取り込まれ、そこで病原性を発現する *Bacillus thuringiensis* のような細菌と何らかの方法で血体腔中に侵入し、そこで増殖して敗血症を引き起こす潜在性

病原細菌群 (*Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*) とが報告されている (Bucher, 1960)。一方、アブラムシのような吸汁型口器の昆虫は消化管に病原細菌を取り込む機会がごく少なく、細菌病にはかかりにくいといわれている (Mackauer and Albright, 1973 ; 福原, 1991 ; Tanada and Kaya, 1993)。そのため、アブラムシの病原細菌に関する研究はほとんど行われておらず、報告されている細菌も限られている (Mackauer and Albright, 1973 ; 橋本, 1991)。しかし、本実験では噴霧処理 (spraying) または経口接種 (peroral inoculation) による選抜によって、アブラムシに殺虫

Table 9. Characteristics of HP- isolates and *Pantoea agglomerans*

| Characteristics              | HP-<br>890972 | HP-<br>891941  | HP-<br>892182 | <i>P. agglomerans</i> <sup>a</sup> |
|------------------------------|---------------|----------------|---------------|------------------------------------|
| Yellow pigment               | +             | W <sup>b</sup> | +             | +                                  |
| KCN growth                   | +             | W              | +             | [+] <sup>c</sup>                   |
| Citrate (Simmons)            | -             | -              | -             | +                                  |
| Malonate utilization         | +             | +              | +             | +                                  |
| D-Glucose, gas production    | -             | -              | -             | -                                  |
| D-Glucose, acid production   | +             | +              | +             | +                                  |
| Acid production :            |               |                |               |                                    |
| D-Adnitol                    | -             | -              | -             | -                                  |
| L-Arabinose                  | +             | +              | +             | +                                  |
| Cellobiose                   | +             | W              | -             | d <sup>d</sup>                     |
| Dulcitol                     | -             | -              | -             | -                                  |
| Glycerol                     | -             | -              | -             | -                                  |
| <i>myo</i> -Inositol         | +             | -              | +             | -                                  |
| Lactose                      | -             | -              | -             | [-] <sup>e</sup>                   |
| Maltose                      | +             | +              | +             | +                                  |
| D-Mannitol                   | +             | +              | +             | +                                  |
| D-Mannose                    | +             | +              | +             | +                                  |
| Melibiose                    | +             | +              | +             | +                                  |
| $\alpha$ -Metyle-D-glucoside | -             | -              | -             | -                                  |
| Raffinose                    | -             | -              | -             | -                                  |
| L-Rhamnose                   | +             | +              | +             | +                                  |
| Salicin                      | +             | +              | +             | +                                  |
| D-Sorbitol                   | -             | -              | -             | -                                  |
| Sucrose                      | +             | -              | +             | +                                  |
| Trehalose                    | +             | +              | +             | +                                  |
| D-Xylose                     | +             | +              | +             | +                                  |
| Voges-Proskauer              | +             | W              | +             | +                                  |
| Methyl red                   | +             | +              | +             | d                                  |
| Esculin hydrolysis           | +             | +              | +             | +                                  |
| Indole production            | -             | -              | -             | -                                  |
| Gelatin hydrolysis, 22 °C    | -             | -              | -             | -                                  |
| Urea hydrolysis              | +             | -              | +             | -                                  |
| Hydrogen sulfide production  | -             | -              | -             | -                                  |
| Arginine dihydrolase         | -             | -              | -             | -                                  |
| Lysine decarboxylase         | -             | -              | +             | -                                  |
| Ornithine decarboxylase      | -             | -              | +             | d                                  |
| Phenylalanine deaminase, 24h | +             | +              | +             | [+]                                |
| Tartrate, Jordans            | -             | -              | -             | -                                  |
| Nitrate reduction            | +             | +              | -             | +                                  |
| Deoxyribonuclease, 25 °C     | -             | -              | -             | -                                  |

<sup>a</sup> *Pantoea agglomerans* : Cited from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. (Holt et al., 1994).

<sup>b</sup> W : weak reaction.

<sup>c</sup> [+ ] : 76-89% positive.

<sup>d</sup> d : 26-75% positive.

<sup>e</sup> [- ] : 11-25% positive.

Table 10. Characteristics of HP- isolates and *Xanthomonas maltophilia*

| Characteristics                | HP-<br>891192 | HP-<br>891592 | HP-<br>891632 | <i>X. maltophilia</i> <sup>a</sup> |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------------|
| Gram stain                     | —             | —             | —             | —                                  |
| Shape of cells :               |               |               |               |                                    |
| Rods                           | +             | +             | +             | +                                  |
| Cocci                          | —             | —             | —             | —                                  |
| Cysts or cyst-like forms occur | —             | —             | —             | —                                  |
| PHB accumulation               | —             | —             | —             | —                                  |
| Motility in liquid media       | +             | +             | +             | +                                  |
| Number of flagellar            | 1~2           | 1~2           | 1~2           | >1                                 |
| Flagellar arrangement :        |               |               |               |                                    |
| Polar                          | +             | +             | +             | +                                  |
| Lateral                        | —             | —             | —             | —                                  |
| Fluorescent pigment            | —             | —             | —             | —                                  |
| Xanthomonadins produced        | —             | —             | —             | —                                  |
| Yellow colonies                | +             | +             | +             | +                                  |
| Red or orange colonies         | —             | —             | —             | —                                  |
| Violet colonies                | —             | —             | —             | —                                  |
| Lysine decarboxylate           | +             | +             | +             | +                                  |
| Oxidase                        | —             | —             | —             | —                                  |
| Acid from glucose              | —             | —             | —             | + or —                             |
| Indole from tryptophan         | —             | —             | —             | —                                  |

<sup>a</sup> *Xanthomonas maltophilia* : Cited from Bergey's Manual of Determinated Bacteriology , 9th ed. (Holt et al., 1994).

活性を示す細菌が 12 菌株得られた。

HS 菌株は噴霧処理によってジャガイモヒゲナガアブラムシ、モモアカアブラムシ、およびワタアブラムシに対して強い殺虫活性を示したが、アブラムシに対してこのような活性を示す細菌は今までに認められていない。ただし、口針の探り挿入時 (probing) などに植物の表面に噴霧された HS 菌株が取り込まれた可能性も完全には否定できない。また、3 種アブラムシに対して安定した活性を示したこと、実験室や温室などの異なる環境下でも安定した活性を示したこと、さらに、HP 菌株に比べ HS 菌株が短時間で殺虫活性を示したことなど、いわば殺虫剂的な活性を示したことから、HS 菌株の殺虫活性には細菌が産生する殺虫活性物質が関与している可能性が考えられた。

HP 菌株は経口接種によって選抜された菌株であるが、今までに経口接種によってアブラムシに対して病原性が確認された細菌は *Pseudomonas fluorescens* の 1 菌種のみである (橋本, 1991)。本実験では、死亡個体における接種細菌の再分離を行っていないので、アブラムシ体内での接種細菌の増殖は確認していないが、死亡個体の体色の変化などから、アブラムシ体内での細菌の増殖が推察される。HP 菌株の *Pantoea*

*agglomerans* は *Enterobacter agglomerans* や *Erwinia herbicola* を整理して提案された菌種 (Gavini et al., 1989) であるが、昆虫病原細菌としての報告は今まで行われていない。また、*Xanthomonas maltophilia* は *Pseudomonas maltophilia* から新たに提案された菌種 (Swings et al., 1983) であるが、この菌種についても昆虫病原細菌としての報告はない。このように新たな病原細菌が発見されたのは、パラフィルムを利用した経口接種法を開発し、アブラムシのような吸汁性の昆虫に対しても経口接種が可能になったためと思われる。ただし、実験的に経口接種した場合、接種細菌がアブラムシの腸管内から体腔内へ侵入し増殖することを助長する可能性のあるいくつかの要因が考えられる。例えば、室内実験であるため太陽光による細菌の不活化が起らず、また、過湿などの飼育条件がストレスとして働き、細菌の体腔内への侵入に対するアブラムシの抵抗力が減少する (福原, 1991) 可能性が考えられる。また、高濃度の菌液を長時間接種することによりアブラムシの腸管内から体腔内へ侵入する機会が増えることなども経口接種における感染助長要因になり得ることが考えられよう。

## 第5節 要約

アブラムシに対して殺虫活性を示す細菌の検索を行い12菌株の細菌を分離した。また、これら菌株の細菌学的性状を明かにし細菌の同定を試みた。

1) 1986～1990年に北海道十勝支庁管内で採集した617個体のアブラムシ類、寄主植物から1,100菌株の細菌を分離した。

2) 1,100菌株中582菌株を対象に噴霧処理による殺虫活性菌株の選抜を行った結果、ジャガイモヒゲナガアブラムシとモモアカアブラムシに対して強い殺虫活性を示す6菌株(HS菌株)が選抜された。

3) 1,100菌株中518菌株を対象に経口接種とジャガイモ塊茎腐敗試験による選抜を行った結果、ジャガイモに対して病原性がなくジャガイモヒゲナガアブラムシに対して強い殺虫活性を示す6菌株(HP菌株)が選抜された。

4) 選抜されたHS菌株とHP菌株はすべてジャガイモヒゲナガアブラムシと植物から分離された菌株であった。

5) 噴霧処理におけるHS菌株の殺虫活性は短期間(処理後2～4日後)で発現したが、経口接種におけるHP菌株の殺虫活性の発現は接種後8～10日間を要した。

6) HS菌株とHP菌株を温室内のキュウリに寄生するワタアブラムシに対して噴霧処理した結果、HS菌株はワタアブラムシに対して強い殺虫活性を示したが、HP菌株はほとんど殺虫活性を示さなかった。

7) HS菌株はグラム陰性の桿菌で*Pseudomonas*属細菌と同定された。また、PHBを蓄積せず、蛍光色素を産生し、アルギニンジヒドロラーゼ活性が陽性で、鞭毛が1～4本あり、レバンを産生し、炭素源としてサッカロースとキシロースを利用するなどの性状からHS菌株の6菌株をすべて*Pseudomonas fluorescens*と同定した。

8) HP菌株の3菌株(HP890972, HP891941, HP892182)は、グラム陰性の桿菌で*Pantoea*属細菌であると同定された。また、フェニルアラニンジアミナーゼ陽性、マロン酸塩・サリシンを利用し、エスクリンを加水分解することからこの3菌株を*Pantoea agglomerans*と同定した。

9) HP菌株の他の3菌株(HP891192, HP891592, HP891632)は、グラム陰性の桿菌で*Xanthomonas*属細菌と同定された。また、鞭毛が2本以上あり、培地中に黄色色素を産生せず、リシンデカルボキシラーゼ陽性であることからこの3菌株を*Xanthomonas maltophilia*と同定した。

## 第3章 殺虫活性を有する分離2菌株の殺虫特性

### 第1節 緒 論

昆虫に対して細菌は経口的に感染し、腸管あるいは体腔内で増殖し殺虫活性を示す例が知られている。しかし、本実験に供試した HS 菌株は培養液の噴霧処理によってアブラムシ類に対して殺虫活性を示し、また、実験室や温室などの異なる環境下でもその活性は安定していた。さらに噴霧処理は経口接種に比べ短時間で殺虫活性を示した。これらの結果から、本菌が示す病原性には培地中に産生される殺虫活性物質が関与している可能性が考えられた。そこで、菌の培養液中における殺虫活性物質の存在を確認するために、HS 菌株培養液の上清と沈殿それぞれの殺虫活性調査を行った。さらに、菌の培養時間と培養液上清の殺虫活性との関連性についても検討した。

一方、HP 菌株は経口接種によって殺虫活性を示す菌株であることから、アブラムシ体内での細菌増殖を確認するために、接種菌液濃度を異にした実験区を設定し、接種直後と死亡直後のアブラムシ体内の細菌数を計測した。これらの実験結果から HS 菌株と HP 菌株における殺虫活性の特性についていくつかの知見が得られたので以下に述べる。

### 第2節 材料および方法

#### 1. HS菌株培養液の上清と沈殿の噴霧処理による殺虫活性調査

HS 菌株の中から噴霧処理によりジャガイモヒゲナガアブラムシ等のアブラムシ類に対して最も安定して強い殺虫活性を示した HS870031 菌株を供試した。

供試菌株は、肉エキスペプトン液体培地（肉エキス 10 g、ペプトン 10 g、食塩 1 g、蒸留水 1,000 ml、pH 7.0）100 ml において、25℃、24 時間振とう培養した後、培養液を遠心分離（8,000 rpm、10 分）して、上清と沈殿とに分別しそれぞれの殺虫活性を調査した。上清は滅菌フィルター（0.2 μm メッシュ）により菌体を完全に除去し、沈殿は滅菌水を加えて 100 ml の菌体浮遊液〔生菌数（colony forming unit, cfu） $10^{10}$ /ml〕を調製した。

噴霧処理は以下のようにして行った。すなわち、濾紙を敷いたペトリ皿（径 9 cm、深さ 2 cm）に、あらかじめ供試虫であるジャガイモヒゲナガアブラムシ

*Aulacorthum solani* (Kaltenbach) 成虫を 10～20 頭定着させたエゾノギシギシ *Rumex obtusifolius* L. を用意した。そこにペトリ皿あたり 1 ml の供試液をクロマト用噴霧器で噴霧した。供試虫は処理後エゾノギシギシを寄主植物として恒温器内（14L-10D、15℃）で飼育し、12 日間その生死を調査した。

#### 2. 経時的に採取したHS870031菌株培養液上清の噴霧処理による殺虫活性調査

供試菌株は肉エキスペプトン液体培地（200 ml）で、25℃、24 時間振とう培養した。振とう培養中 4 時間ごとに培養液の一部を取り出し、遠心分離（8,000 rpm、10 分）を行い上清と沈殿とに分別した。上清は滅菌フィルター（0.2 μm）で菌体を完全に除去したのちに、エゾノギシギシに定着させたジャガイモヒゲナガアブラムシ成虫および 4 齢幼虫それぞれ 20 頭に噴霧した。処理後供試虫はエゾノギシギシを寄主植物として恒温器内（14L-10D、15℃）で飼育し、10 日間その生死を調査した。また、培養液の 4 時間ごとの生菌数（cfu）を計測した。

#### 3. 経口接種したHP菌株のアブラムシ体内での増殖調査

供試菌株は、HP 菌株の中で経口接種によりジャガイモヒゲナガアブラムシに対して最も強い殺虫活性を示した HP890972 菌株を用いた。なお、接種細菌を再分離するために、供試菌株は馴養培養によりリファンピシンとナリジキシン酸耐性とした（橋本、1996）。

経口接種は以下の方法を用いて行った。すなわち、ジャガイモヒゲナガアブラムシ成虫を入れたペトリ皿（径 4 cm、深さ 1 cm）を、凹みをつけたパラフィルムで覆い、その上にしょ糖を 15% 添加した供試液の 1 ml を滴下した。これをさらにパラフィルムで覆い一定時間 15℃ でアブラムシに吸汁させた。経口接種後供試虫はエゾノギシギシを入れたペトリ皿（径 9 cm、深さ 2 cm）に移し換えて恒温器内（14L-10D、15℃）で飼育し、その生死を調査した。

供試菌株を肉エキスペプトン平板培地に画線し、22℃ で 24 時間培養した。接種菌液の生菌数は、 $10^6$ 、 $10^8$ 、 $10^{10}$  cfu/ml の 3 段階になるように滅菌水を加え調整し、また接種時間は 6 時間、12 時間、24 時間とした。各区、ジャガイモヒゲナガアブラムシ成虫 10 頭を供試し、経口接種後ただちに 10 頭の虫体内

における生菌数を計測した。虫体内の生菌数は、虫体を 9 ml の滅菌水中で磨砕し、その磨砕液を段階希釈後平板培養して求めた。

上記 3 濃度の菌液を用いて 24 時間経口接種したジャガイモヒゲナガアブラムシ成虫 10 個体をエゾノギシギシを入れたペトリ皿で飼育し (14L-10D, 15 °C)、接種後 11 日間生死を調査した。飼育中に死亡した個体については発見後ただちに、また実験終了時まで生存した個体は実験終了時に虫体内の生菌数を計測した。接種細菌の再分離にはリファンピシンとナリジキシン酸を添加した肉エキスペプトン平板培地を用いた。

### 第3節 結果

#### 1. HS870031 菌株培養液の上清と沈殿の噴霧処理による殺虫活性調査

供試菌株培養液の上清と沈殿の噴霧処理による供試

アブラムシの死虫率は Fig.1 に示した。噴霧処理によって強い殺虫活性を示したのは上清であり、処理 2 日後にはすでに死虫率は 100 % に達した。一方、沈殿の噴霧処理では、処理 8 日後までに死亡する個体が認められたが、死虫率は低く実験終了時の処理後 12 日目でも約 30 % であった。

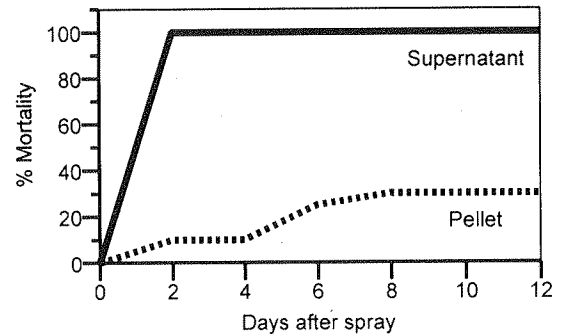


Fig.1 Mortality of the foxglove aphid, *Aulacorthum solani*, sprayed with supernatant or pellet from the culture of the bacterial strain HS870031

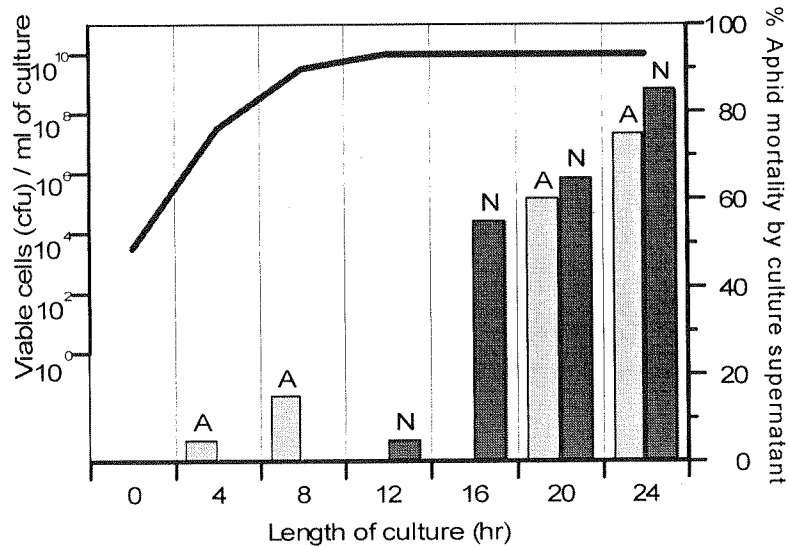


Fig.2 Change in aphid-killing activity of the culture supernatant during the growth of strain HS870031.

The activity was tested by a spray method against the aphid, *Aulacorthum solani*.

A:adults, N:nymphs.

#### 2. 経時的に採取したHS870031 菌株培養液上清の噴霧処理による殺虫活性調査

培養液中の生菌数の変化と経時的に採取した上清の噴霧処理による供試アブラムシの死虫率を Fig.2 に示した。生菌数は培養開始時の 10<sup>4</sup> cfu / ml から 4 時間で 10<sup>7</sup> cfu / ml に、また 12 時間で最高濃度の 10<sup>10</sup> cfu / ml に達したが、それ以降は一定であった。

上清の殺虫活性は培養 12 時間までは認められなかったが、16 時間培養上清は幼虫に対して 50 % 以上の死虫率を示した。20 時間培養上清は幼虫および成虫いずれに対しても 50 % 以上の死虫率を示した。殺虫活性は 24 時間培養上清において最も強く、死虫率は成虫で 75 %、幼虫で 85 % に達した。なお、供試虫の死亡は処理後 2 日以内に認められた。

### 3. 経口接種したHP890972菌株のアブラムシ体内での増殖調査

#### 1) 虫体内における生菌数

虫体内における生菌数は、接種菌液濃度が高くなるに従って、また、接種時間が長くなるに従って増加した (Fig.3)。 $10^6$  cfu/ml の菌液を 6 時間経口接種した場合、供試虫の 90 % において生菌は検出されなかった (陰性)。しかし接種時間を 12 時間にすると 60 % の個体から細菌 ( $10^1 \sim 10^3$  cfu/個体) が分離された (陽性)。さらに 24 時間経口接種した場合、70 % の個体から接種細菌の再分離が可能となり、その菌数は  $10^3 \sim 10^4$  cfu/個体に達した。

$10^8$  cfu/ml の菌液を使用した場合、6 時間経口接種区では半数の個体が陰性であり、また陽性の個体に

おける生菌数は  $10^3 \sim 10^4$  cfu/個体であった。12 時間経口接種区では、陰性の個体の割合は減少したものの、陽性の個体における生菌数のレベルは低く、 $10^1 \sim 10^4$  cfu/個体であった。24 時間接種区では陰性の個体も認められたが、60 % の供試虫から  $10^5$  cfu/個体の生菌が検出された。

$10^{10}$  cfu/ml の 6 時間経口接種区においては生菌が再分離されない個体も認められたが、60 % の供試虫から  $10^4$  cfu/個体の細菌が分離された。12 時間経口接種区ではすべての供試虫から接種細菌が再分離され、その生菌数は  $10^3 \sim 10^5$  cfu/個体であった。接種時間が 24 時間になると、生菌数はさらに増大し、 $10^4 \sim 10^6$  cfu/個体に達した。

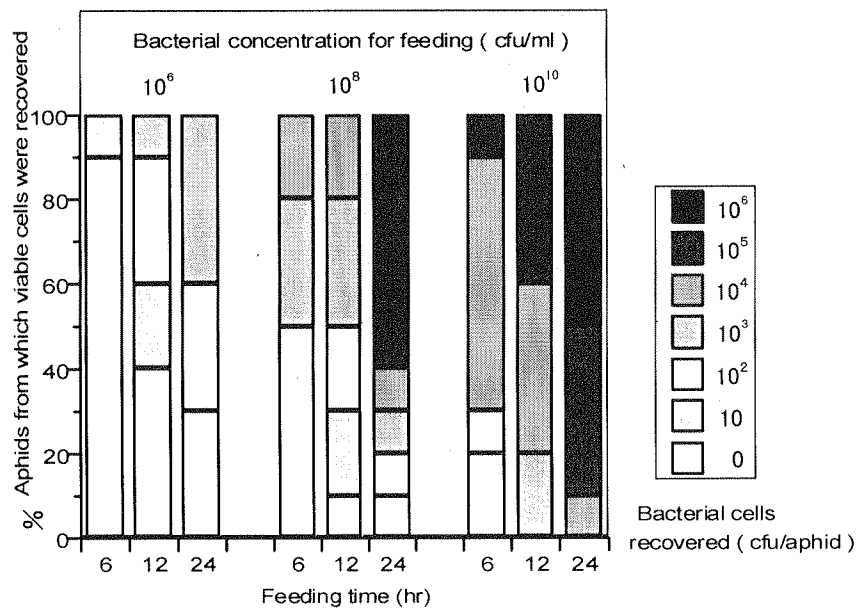


Fig.3 Number of viable cells recovered from aphid, *Aulacorthum solani*, orally inoculated with the three cell concentrations of HP890972.

#### 2) 死亡虫体内での接種菌の増殖

濃度が  $10^6$ 、 $10^8$ 、 $10^{10}$  cfu/ml の細菌浮遊液を用いて 24 時間経口接種した場合の死虫率を Fig.4 に示した。接種菌液濃度が高いほど、供試虫の死亡までに要する日数は短く、 $10^{10}$  cfu/ml の菌液を使用した場合の死虫率は接種後 2 日で 50 % 以上、また接種後 5 日では 100 % であった。 $10^8$  cfu/ml 接種区では、接種後 5 日で 50 % の供試虫が死亡し、 $10^6$  cfu/ml では接種後 8 日に死虫率が 50 % を越えた。しかし、最終的な累積死虫率は  $10^8$ 、 $10^6$  cfu/ml のいずれを使用した場合でも 90 % であった。また、死亡直

後の個体における生菌数は Fig.5 に示した。死亡供試虫の生菌数は死亡時期や接種菌液の濃度とは関係なくほとんどの場合  $10^7$  cfu/個体であった。 $10^{10}$  cfu/ml の接種菌液濃度では、接種直後の生菌数が  $10^6$  cfu/個体であったので、死亡するまでに細菌は約 10 倍増殖したことになる。また  $10^8$  cfu/ml 接種区では約 100 倍、 $10^6$  cfu/ml 接種区では約 1,000 倍の増殖が認められた。

経口接種 12 日後においても生存した 2 個体について調べたところ、両個体からそれぞれ  $10^4$  及び  $10^2$  cfu の細菌が検出された。

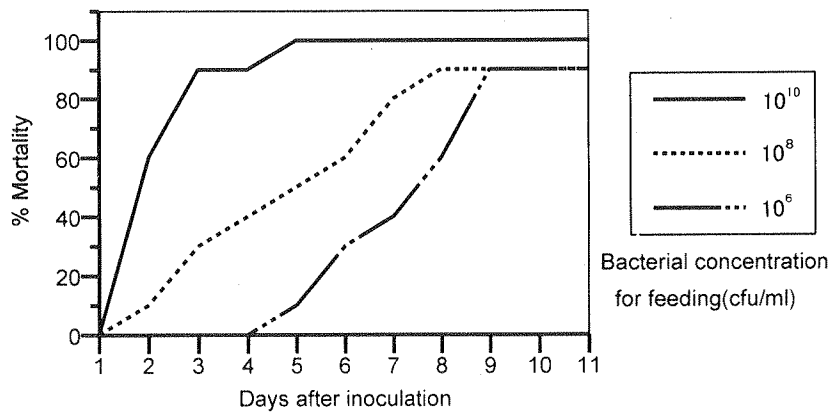


Fig.4 Mortality of *Aulacorthum solani* fed on HP890972 cells for 24h.

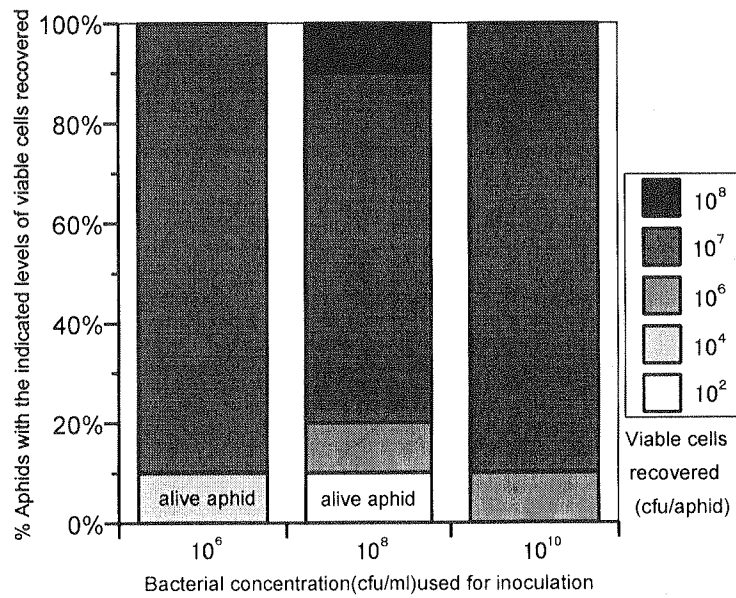


Fig.5 Recovery of viable cells from cadavers of *Aulacorthum solani* adults orally inoculated with HP890972 cells.

第4節 考察

HS870031 菌株培養液を上清と沈殿に分けて噴霧処理した結果、供試虫に対して強い殺虫活性を示したのは上清であった。上清には菌体は含まれないので、この結果は、菌体外に産生される殺虫活性物質が存在することを強く示唆している。昆虫病原細菌は、経口的に宿主の消化管に侵入することによって病原性を示す場合が一般的であるが (Bucher, 1960)、*Bacillus thuringiensis* の産生するβ-外毒素がナガカメムシ科の一種 *Geocoris punctipes* (Hemiptera:Lygaeidae) の幼生に対し局所施用によって経皮的に殺虫活性を示すこと

が報告されている (Herbert and Harper, 1986)。しかし、培養上清が噴霧処理によって殺虫活性を示すような細菌についての報告は本研究以外にはない。

つぎに、培養時間と上清の殺虫活性レベルの関係であるが、供試幼虫に対する殺虫活性は培養 16 時間以後に認められた。本細菌は培養 12 時間ですでに生菌数が最高値の 10<sup>10</sup> cfu / ml に達していたので、細菌濃度と上清の殺虫活性レベルとはパラレルの関係ではなく時間的な差が認められた。このことから、細菌濃度が最大値に達したのちに、急速に殺虫活性物質が産生されるものと考えられる。また、上清に含まれる活性物質はアブラムシの成虫に対するよりも幼虫に対



して強い活性を示したことから、虫体の大きさやクチクラの強度などの物理的要因が活性に関与する可能性もある。

アブラムシのように吸汁型口器を有する昆虫は消化管に病原細菌を取り込む機会がごく少なく、細菌病にはかかりにくいといわれるが（Mackauer and Albright, 1973；福原, 1991；Tanada and Kaya, 1993）、HP890972 菌株はアブラムシに対して経口接種すると強い病原性を示すことが本研究で明らかになった。本菌株が経口的に侵入して増殖する機会は、接種細菌濃度が高いほど、また、接種時間が長いほど増大する結果が得られた。10<sup>10</sup> cfu/ml の細菌浮遊液を 12 時間経口接種した場合、すべての供試虫体内で本菌の増殖が認められた。また 10<sup>6</sup>～10<sup>8</sup> cfu/ml の 24 時間接種においては、接種直後には生菌を検出できない個体が認められたものの、以後生死にかかわらずすべてのアブラムシから生菌が検出されたことから、供試虫すべてにおいて細菌の侵入と増殖が起こったものと考えられる。また、接種菌液濃度に関わらず、死亡個体からは 10<sup>7</sup> cfu の生菌が検出されたことから、これが本分離菌株のジャガイモヒゲナガアブラムシ成虫体内における増殖限界であると考えられる。一方、供試虫の死亡までに要する日数は接種細菌の濃度によって

異なったが、これは菌の増殖が致死レベルに達するまでに要する日数の違いによるものと思われる。

## 第5節 要約

アブラムシ類に病原性を示す細菌の接種試験を行い、以下のような殺虫活性の特性を明らかにした。

1) 噴霧処理によって HS870031 菌株の培養上清はジャガイモヒゲナガアブラムシに対して強い殺虫活性を示した。一方沈殿部の殺虫活性は低かった。

2) HS870031 菌株培養上清におけるジャガイモヒゲナガアブラムシに対する殺虫活性は幼虫に対しては培養 16 時間以後に、成虫に対しては 20 時間以後に認められた。

3) HP890972 菌株をジャガイモヒゲナガアブラムシに経口接種したところ、接種菌液濃度が高いほど、また接種時間が長いほど虫体内から再分離される生菌数は多くなった。

4) HP890972 菌株の接種菌液濃度が高くなるほどジャガイモヒゲナガアブラムシの死亡までに要する日数は短くなった。また、死亡個体中の生菌数は、死亡時期や接種菌液の濃度とは関係なくほぼ一定のレベルであった。

## 第4章 殺虫活性物質の単離・同定

### 第1節 結論

昆虫病原細菌は、経口的に宿主の消化管に侵入することによって病原性を示す場合が一般的である (Bucher, 1960)。しかし、HS870031 菌株培養液上清は噴霧処理によってアブラムシに対して強い殺虫活性を示した。上清には菌体は含まれていないので、この結果は菌体外に産生される殺虫活性物質が上清中に存在することを強く示唆している。そこで、本章では HS870031 菌株培養液上清に含まれる殺虫活性物質の単離・同定を HPLC 分析および MS 分析によって行ったのでその結果について述べる。

### 第2節 材料および方法

#### 1. HS870031 菌株培養液上清の分離

天然窒素源の添加が HS870031 菌株の殺虫活性の発現に好適であることが別の実験から判明したため、本実験では窒素源に富んだ TB (Terrific Broth) 培地 (A 液: グリセリン 5 g, トリプトン 12 g, 酵母エキス 24 g, 超純水 900 ml, B 液:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  12.5 g, 超純水 100 ml, A 液: B 液 = 9:1 で無菌的に混合) を用いた。HS870031 菌株を前培養として TB 培地 10 ml を用い 30℃ で 10 時間、振とう培養 (250 stroke/min.) した後、同様に TB 培地を用い 30℃ で 16 時間、ミニジャーフェーマンター (3.0l 容, 攪拌回転数: 300 ~ 700 rpm, 通気量: 0.4 l/min.) で培養した。培養後培養液を遠心分離 (8,000 rpm, 60 min., 4℃) して、供試上清とした。

#### 2. 殺虫活性検定

あらかじめワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover の成虫 30 頭を定着させたポット植えの 1 葉期キュウリに、ポットあたり 10 ml の培養上清および各画分溶液を噴霧処理した。処理後は 24℃ の恒温器内で飼育し、処理 6 日後にアブラムシの生死を調査した。なお、殺虫活性は調査データから死虫率を算出し、次の 5 段階で評価した (評価値 0: 死虫率 0-29%, 評価値 1: 死虫率 30-59%, 評価値 2: 死虫率 60-89%, 評価値 3: 死虫率 90-99%, 評価値 4: 死虫率 100%)。

#### 3. 殺虫成分の精製

##### 1) 硫酸沈殿

HS870031 菌株培養液上清 200 ml に 10% 硫酸を添加し、4℃ で 1 時間攪拌した後、8,000 rpm で 10 分間遠心分離した。分離した上清に硫酸を添加し 30% に調整して、4℃ で 1 時間攪拌した後、同様に遠心分離した。各沈殿は 20 ml の脱塩水に溶解した。硫酸沈殿の溶解液 (10 倍濃縮) と硫酸上清は Hiprep desalting カラム (ファルマシア社製) で脱塩処理を行って後、殺虫活性の検定を行った。活性は両方の沈殿にみられたが、最終的な上清には活性がなかった。

##### 2) アセトン処理

HS870031 菌株培養液上清に 4 倍容アセトンを添加し、-20℃ で一晩静置後、10,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清と沈殿をそれぞれエバポレーターで乾固した後、脱塩水に溶解し、殺虫活性検定に供した。殺虫活性の主要な部分は上清にみられた。

##### 3) 逆相カラムによる分別溶出

アセトン上清中のタンパク含量が少なかったため硫酸分画は不要と判断し、HS870031 菌株培養液上清 100 ml のアセトン処理上清を乾固し、脱塩水 10 ml に溶解させたサンプルを 5 ml ずつ SepPack C18 カラム (Waters 社製) に注入した。サンプル注入後に、滅菌水、20% メタノール、40% メタノール、60% メタノール、80% メタノール、100% メタノール溶液をそれぞれ 5 ml で溶出した。各溶出画分はエバポレーターで乾固し、脱塩水で溶解させて殺虫活性の検定を行った。主たる活性は 60-80% メタノール溶出画分に見出された。

##### 4) 殺虫成分の精製

1) から 3) の予備的実験の結果から、殺虫活性の認められた画分を得る方法を組み合わせて殺虫成分の精製を行った。すなわち、HS870031 菌株培養液上清 200 ml に 30% 硫酸を添加し、2 時間攪拌した後 8,000 rpm で 10 分間遠心し、その沈殿を脱塩水 10 ml に溶解した。Hiprep desalting (ファルマシア社製) を用いて脱塩処理後、4 倍容のアセトンを添加した。-20℃ で一晩静置した後、10,000 rpm で 15 分間遠心上清を回収した。上清はエバポレーターで乾固し、脱塩水 30 ml に溶解させてサンプル液とした。SepPack C18 カラム (Waters 社製, 充填剤量 360 mg / cartridge) にサンプル液 5 ml を注入し、脱塩水 3 ml で 2 回洗った。その後、60% メタノール 3 ml で 3 回洗い、

さらに 80%メタノール 3 ml で 2 回溶出し、60-80%メタノール溶出画分 5 mg を得た。この溶出画分をエバポレーターで乾固し、殺虫活性の検定を行った。

#### 4. 殺虫成分の単離・同定

##### 1) 殺虫成分の HPLC 分析

SepPackC18 カラムに吸着、洗浄後溶出して得られた HS870031 菌株培養液上清の 60-80%メタノール溶出サンプルの HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 分析を行った。逆相カラム (Wakosil-II 5 カラム, 4.6 × 150 mm) を用い、溶出は 10 mM リン酸アンモニウムバッファー:アセトニトリル (50:50) から 10 分後に (0:100) となるグラジエントを用い、流速は 2.0 ml/min、カラム温度は室温、検出波長は 210 nm 吸収とした。

##### 2) HPLC による殺虫成分の分取

HS870031 菌株培養液上清のメタノール 60-80% 溶出サンプルを 2 mg ずつ逆相カラム (Sumipax OA-5, 20 × 250 mm) に注入した。溶出は、脱塩水:0.06% TFA を含むアセトニトリル (30:70) から 64 分後に (6:94)、75 分後に (0:100)、85 分後に (30:70) となるグラジエントを用い、流速は 8.0 ml/min、カラム温度は室温、検出波長は 210 nm とした。分取 HPLC を 4 回行い、各ピークを分取した。乾固後それぞれを脱塩水 10 ml に溶解し、殺虫活性の検定を行った。また、メジャーピークの濃度別の殺虫活性の評価を行い、以下の分析条件でメジャーピークの純度検定を行った。カラム: Sumpax ODS A-212 (6 × 150 mm), 流速

: 1.0 ml/min., カラム温度: 35 °C, 移動相: A:脱塩水 B:0.06% TFA /アセトニトリル 0-20 min.:A/B = 20/80, 検出波長: 210 nm, サンプル注入量: 10 μl。

##### 3) MS 分析による殺虫成分の同定

HS870031 菌株培養液上清の 60-80%メタノール溶出サンプルを用いて MS (Mass Spectrum) 分析および MS / MS 分析を行い殺虫成分を同定した。分析条件は以下に示す。質量分析計: HX / HX110A, イオン化法: FAB (positive), スキャン質量範囲:  $m/z$ 100-2,000 / 15sec, 加速電圧: 10 kV, 質量分解能: 1,000, matrix: glycerol / thioglycerol = 1 / 1, 導入試料の調製: 部分精製サンプルを混合溶媒 (AcOH/H<sub>2</sub>O/MeOH=1/50/50) で溶解 (1 mg / ml) し、その 0.5 μl と matrix 0.5 μl を混合。

### 第3節 結果

#### 1. 殺虫活性の検定

HS870031 菌株培養液上清に硫酸を添加し、遠心して得られた画分を殺虫活性検定に供したところ殺虫活性を示した画分は 0-30%硫酸沈殿画分であった (Table 11)。HS870031 菌株培養液上清にアセトンを添加して得られた画分では、アセトン処理上清画分がワタアブラムシに対して殺虫活性を示した (Table 12)。アセトン処理上清を逆相カラムに供し、20%から 100%までのメタノール溶液で溶出して得られた画分では、60-80%メタノール溶液溶出画分が高い殺虫活性を示した (Table 13)。

Table 11. Mortality score of ammonium sulfate extractable fraction from supernatant of HS870031 against *Aphis gossypii*

| fraction                                | volume ratios <sup>1)</sup> | score <sup>2)</sup> |
|---|-----------------------------|---------------------|
| A (supernatant of HS870031)             | × 1/2                       | 3                   |
|   | × 1/5                       | 3                   |
|   | × 1/10                      | 2                   |
| 0-10% ammonium sulfate pellet from A    | × 5                         | 4                   |
|   | × 2                         | 3                   |
|   | × 1                         | 1                   |
| 10-30% ammonium sulfate pellet from A   | × 5                         | 4                   |
|   | × 2                         | 3                   |
|   | × 1                         | 2                   |
| 30% ammonium sulfate supernatant from A | × 1/2                       | 0                   |
|   | × 1/5                       | 0                   |

1) volume ratios : fraction / culture applied

2) score : percent mortality (6 days after spraying)

0 : 0-29%, 1 : 30-59%, 2 : 60-89%, 3 : 90-99%, 4 : 100%

Table 12. Mortality score of acetone fractionation  
of supernatant of HS870031 against *Aphis gossypii*

| fraction                       | volume ratios <sup>1)</sup> | score <sup>2)</sup> |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| A (supernatant of HS870031)    | × 1/2                       | 3                   |
|                                | × 1/5                       | 3                   |
|                                | × 1/10                      | 2                   |
| 80% acetone supernatant from A | × 2.5                       | 4                   |
|                                | × 1/2                       | 2                   |
| 80% acetone pellet from A      | × 2.5                       | 1                   |
|                                | × 1/2                       | 1                   |

1) volume ratios : fraction / culture applied

2) score : percent mortality (6 days after spraying)

0 : 0-29%, 1 : 30-59%, 2 : 60-89%, 3 : 90-99%, 4 : 100%

Table 13. Mortality score of SepPack C18 column fraction against *Aphis gossypii*

| fraction                  | volume ratios <sup>1)</sup> | score <sup>2)</sup> |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------|
| unadsorbed and washings   | × 10                        | 0                   |
|                           | × 2                         | 0                   |
| eluate with 20% methanol  | × 10                        | 0                   |
|                           | × 2                         | 0                   |
| eluate with 40% methanol  | × 10                        | 0                   |
|                           | × 2                         | 0                   |
| eluate with 60% methanol  | × 10                        | 3                   |
|                           | × 2                         | 0                   |
| eluate with 80% methanol  | × 10                        | 4                   |
|                           | × 2                         | 4                   |
| eluate with 100% methanol | × 10                        | 3                   |
|                           | × 2                         | 0                   |

1) volume ratios : fraction / culture applied

2) score : percent mortality (6 days after spraying)

0 : 0-29%, 1 : 30-59%, 2 : 60-89%, 3 : 90-99%, 4 : 100%

## 2. 殺虫成分の精製

殺虫活性が高かった画分を得る方法を組み合わせて殺虫成分の精製を行った。200 ml の培養液から 5 mg 得られた 60-80 %メタノール溶液溶出サンプルの濃度別の殺虫活性の検定結果は、サンプル濃度が 400 ppm から高い殺虫活性を示した (Table 14)。60-80 %メタノール溶液溶出サンプルの HPLC 分析を行った結果、注入後 9.033 分に 210 nm の吸光度でのメインピークが見られ、そのメインピークの純度はエリア面積比で 68.7 %であった (Fig.6)。

## 3. HPLCによる殺虫成分の分取

HS870031 菌株培養上清の 60-80 %メタノール溶出サンプルの HPLC 分析の結果、8 つの大きなピークが認められ (Fig.7.)、各ピークに対応する成分を分取して生物検定を行った結果、その中でもメインピークである No.18 (2. で得られた部分精製物 8 mg から 2.8mg が得られた) に殺虫活性が認められた (Table 15)。分取した No.18 ピークの濃度別の殺虫活性検定では 200 ppm から高い殺虫活性が認められた (Table 16)。また、メインピーク (No.18) の純度検定の結果、純度はエリア面積比で 98 %であった。

Table 14. Mortality score of eluate with 80% methanol fraction against *Aphis gossypii*

| concentration | score <sup>1)</sup> |
|---------------|---------------------|
| 12.5 ppm      | 0                   |
| 25 ppm        | 0                   |
| 50 ppm        | 1                   |
| 100 ppm       | 0                   |
| 200 ppm       | 2                   |
| 400 ppm       | 4                   |
| 800 ppm       | 3                   |

1) score : percent mortality (6 days after spraying)

0 : 0-29%, 1 : 30-59%, 2 : 60-89%, 3 : 90-99%, 4 : 100%

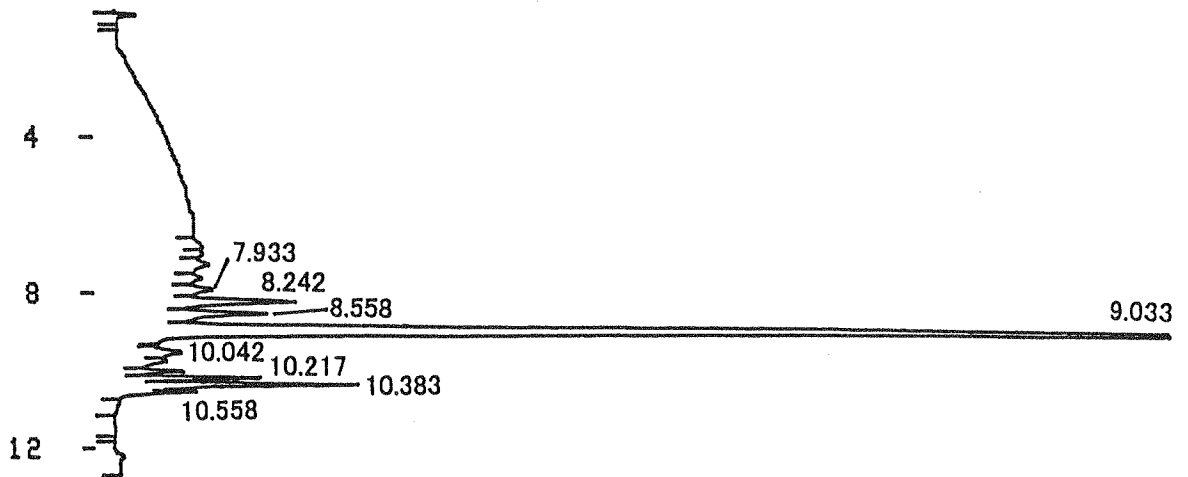


Fig. 6 HPLC profile (at 210nm) of eluate with 80% methanol fraction

#### 4. MS分析による殺虫成分の同定

SepPack 60-80%メタノール溶出サンプル（純度 68.7%）を用いて MS 分析を行った結果を Fig. 8 に示した。純度 98%の試料でも同様の結果であった。分子イオンが 1125.7 ( $MH^+$ : 1126.7) に基準ピークとして認められた。これは、*Pseudomonas fluorescens* が産生する抗菌性物質 viscosin の分子量 (Laycock et al., 1991) と一致した。次に、分子イオン ( $MH^+$ : 1126.7) をさらに MS/MS 分析した結果を Fig. 9 に示した。各メジャーピークは viscosin の構成アミノ酸が順次開裂した場合に生成が予想されるフラグメント (Laycock et al., 1991) に一致していた。

HS870031 菌株培養液上清に硫酸を添加し、遠心して得られた画分の中で殺虫活性を示した画分が 0-30%硫酸沈殿画分であったことから、殺虫成分にはタンパク質が含まれることが推察された。さらに、80%アセトン処理上清画分が殺虫活性を示したことで殺虫成分に脂質が含まれることも推察された。精製した高い殺虫活性を示す画分の MS 分析を行った結果、分子量が 1125.7 ( $MH^+$ : 1126.7) で、MS/MS 分析によって生成した各メジャーピークのフラグメント質量も一致することから HS870031 菌株が産生する殺虫成分は viscosin であろうと結論した。Viscosin は *Pseudomonas viscosa* (*Pseudomonas fluorescens* の biotype) の培養濾

#### 第4節 考 察

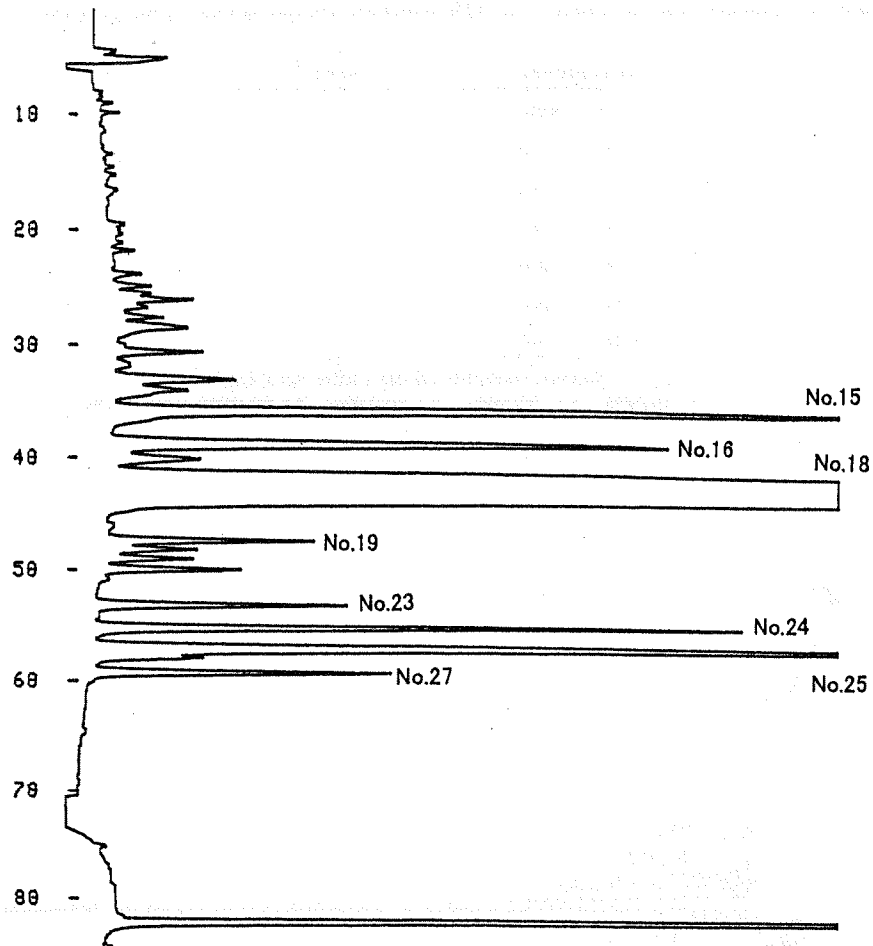


Fig. 7 HPLC separations of eluate with 80% methanol fraction using Sumipax OA-5 column  
(No.15-No.27 : major peaks)

Table 15. Mortality score of HPLC separations of eluate with 80% methanol fraction against *Aphis gossypii*

| No. of major peaks<br>of HPLC separations | score <sup>1)</sup> |
|---|---------------------|
| No. 15                                    | 0                   |
| No. 16                                    | 0                   |
| No. 18                                    | 3                   |
| No. 19                                    | 0                   |
| No. 23                                    | 0                   |
| No. 24                                    | 0                   |
| No. 25                                    | 0                   |
| No. 27                                    | 0                   |

1) score : percent mortality (6 days after spraying)  
0 : 0-29%, 1 : 30-59%, 2 : 60-89%, 3 : 90-99%, 4 : 100%

Table 16. Mortality score of the major peak (No.18) in HPLC separations of eluate with 80% methanol fraction against *Aphis gossypii*

| concentration<br>of the major peak (No.18) | score <sup>1)</sup> |
|--|---------------------|
| 10 ppm                                     | 0                   |
| 20 ppm                                     | 0                   |
| 50 ppm                                     | 1                   |
| 100 ppm                                    | 2                   |
| 200 ppm                                    | 3                   |
| 300 ppm                                    | 3                   |
| 400 ppm                                    | 3                   |

1) score : percent mortality (6 days after spraying)  
 0 : 0-29% 1 : 30-59% 2 : 60-89% 3 : 90-99% 4 : 100%

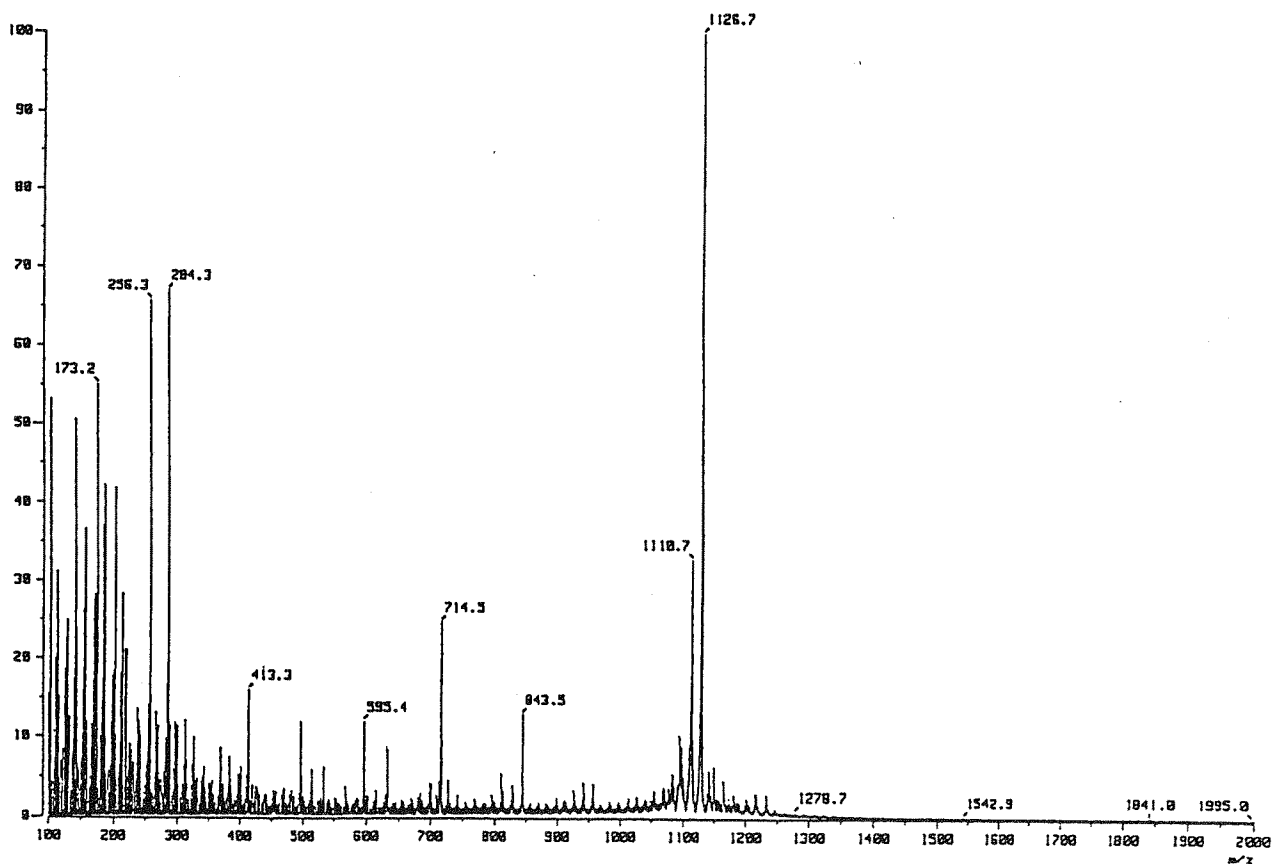


Fig. 8 MS spectrum (FAB) of the major aphid killing principle from supernatant of HS870031

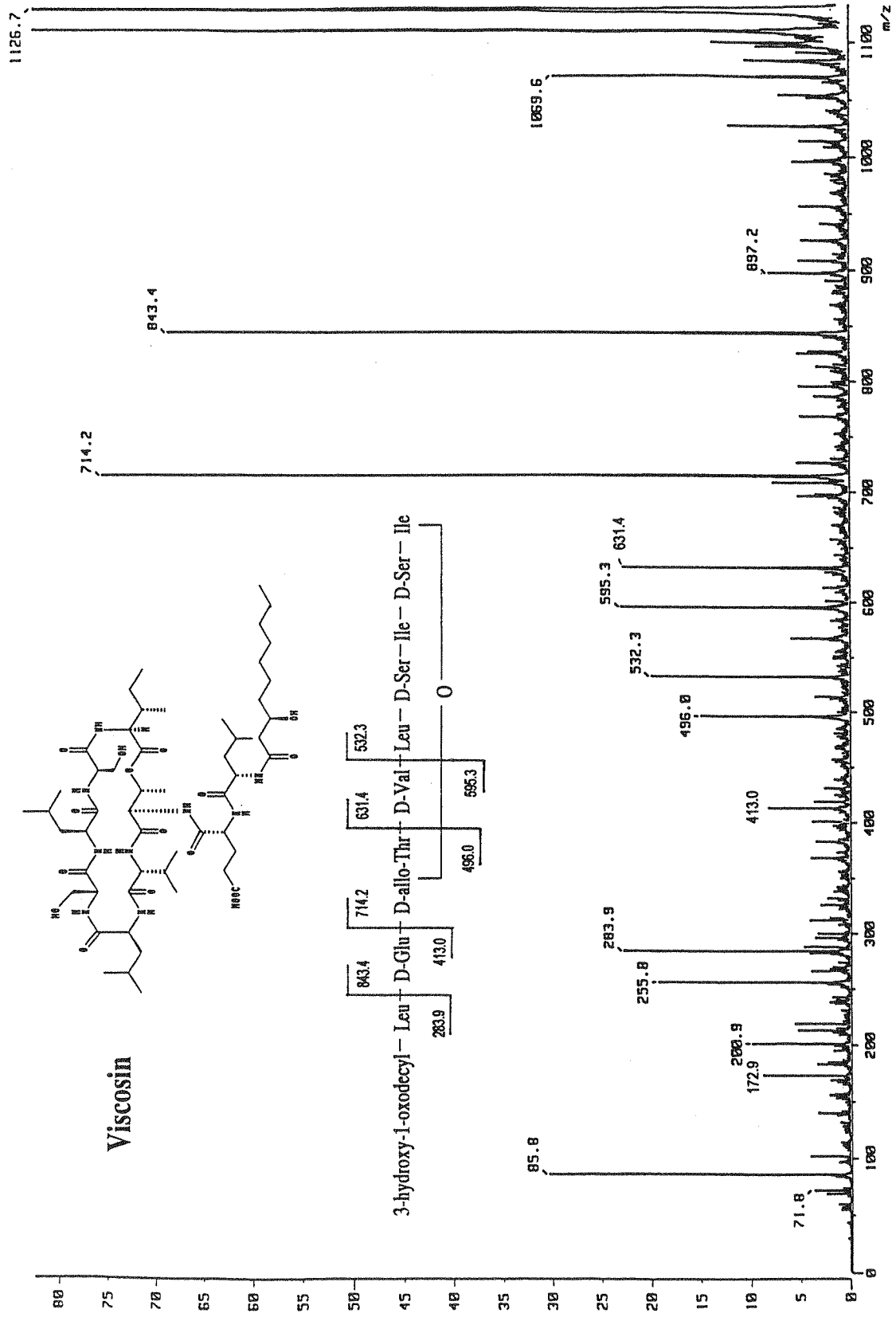


Fig. 9 MS/MS analysis of the main peak (MH<sup>+</sup>: 1126.7) in eluate with 80% methanol and the structure of viscosin



液から分離された抗菌性物質で、酸性ポリペプチドであり加水分解によって油状脂肪酸混合物とアミノ酸混合物に分かれ、アミノ酸組成はロイシン、バリン、セリン、スレオニン、グリシンからなること(大島ら, 1953; 土岐・大島, 1954)、また、結核性疾患並びに濾過性ウイルスによる疾患の治療に有効な物質であることが報告されている(東風, 1951)。さらに、viscosin は分子量が 1126.7 の環状デプシペプチドで、界面活性作用を有することが報告されている(Laycock et al., 1991; Neu et al., 1990)。上記のように viscosin は *Pseudomonas fluorescens* の産生する抗菌性物質として知られていたが、殺虫活性を示すという報告はいままでされていない。本試験の MS 分析結果では各アミノ酸の絶対配置と脂肪酸の構造異性体、一部の配列は限定できないが、HS870031 菌株が *Pseudomonas fluorescens* であることから本殺虫活性物質を viscosin であろうと結論した。

本殺虫活性物質は 200 ppm ほどの微量でアブラムシに対して殺虫活性を示したが、その作用機作については本実験からは明らかにできなかった。Viscosin と同様の環状デプシペプチドである surfactin (*Bacillus subtilis* 産生物質) が抗菌活性と corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata* に対する殺虫活性を有することが報告されている(Heins et al., 1998) が、その殺虫活性の作用機作についても解明されていない。Viscosin と同様に界面活性作用を有する糖エステル sucrose octanoate がキジラミの一種, *Psyllidae* sp. に対

して殺虫活性を示すことが報告されている(Puterka and Severson, 1995) ので、界面活性作用が殺虫活性と何らかの関係を持つと推察される。しかし、他の界面活性剤(ドデシル硫酸ナトリウム)をアブラムシに処理しても殺虫効果を示さないことから、界面活性作用だけでは殺虫活性を説明しきれないところがある。Viscosin の殺虫活性の作用機作解明には今後の更なる研究が必要と思われる。

## 第5節 要約

HS870031 菌株培養液上清に含まれる殺虫活性物質の単離・構造解析を HPLC 分析と MS 分析を用いて行った。

- 1) HS870031 菌株培養液上清の 60-80 %メタノール溶液溶出画分がアブラムシに対して強い殺虫活性を示した。
- 2) 60-80 %メタノール溶液溶出画分を HPLC 分析した結果、8 つのピークが認められたが、殺虫活性を示したのは最大成分(No.18)であった。
- 3) No.18 の成分を MS 分析した結果、 $m/z$ 1126.7 (MH<sup>+</sup>) 分子イオンピークが基準ピークとして認められ、これは viscosin の分子量と一致した。
- 4) 分子量 1125.7 のメインピークを MS/MS 分析した結果、メジャーピークがいくつか認められ、それらは viscosin の構成アミノ酸が順次開裂した場合に生成が予想されるフラグメントに一致していた。