

氏名(本籍)	まつもと のぶ ひろ 松本 信弘(千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第3004号
学位授与年月日	平成14年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	BT製剤の殺虫活性に影響を及ぼす要因の解明と生物検定法に関する研究
主査	筑波大学教授 農学博士 河野 義明
副査	筑波大学教授 農学博士 柿 嵐 真
副査	筑波大学助教授 農学博士 本 田 洋
副査	筑波大学教授 農学博士 白 井 健 二

論文の内容の要旨

BT製剤は、昆虫に対して特異的に作用する毒素を生産する細菌、*Bacillus thuringiensis*、に由来する殺虫剤で、作物や森林保護等のために世界中で広範に使用されている。この殺虫剤は種特異性が高く、環境への影響が少ないことを特徴としている。その力価は生物検定で決められており、決められた標準のBT製剤と製品の致死活性との比較によって示される。鱗翅目昆虫に活性をもつBT製剤は、生物検定にカイコを用いている。本研究の材料である*B.thuringiensis*の δ -内毒素CryICは*B.thuringiensis* serovar *aizawai*に由来し、*B.thuringiensis* serovar *kurstaki*由来のCryIAaと比べ、ハスモンヨトウに卓効を示し、抵抗性の発現頻度が低い利点を持つと言われるが、生物検定時の変動が大きいとも言われている。本研究では生物検定の実施にあたり問題となる、BT製剤の活性(力価)に影響を及ぼす緒要因について検討し、今後の品質管理のあり方について論じた。

1系統からなるBT製剤は、全暗、5℃下における、10年以上の長期保存によっても、ほとんど活性が低下しないが、*B.thuringiensis* serovar *aizawai*とserovar *kurstaki*の2系統からなる混合剤においては有意な生物活性上の劣化が認められた。しかし、この混合剤における劣化は、全暗、-80℃下で保管した場合には発生しなかった。製剤サンプルをSDS-PAGEによって分析した結果、劣化した製剤では δ -内毒素前駆体量が有意に減少していた。また、劣化した製剤サンプルを、走査式電子顕微鏡で観察すると、その表面構造に物理的な劣化の兆候が認められた。生物検定の際に用いられるカイコの人工飼料成分である乾燥ダイズ粉末の違いが、BT製剤の殺虫活性に影響を与えることが明らかになった。これはダイズ粉末中に含まれる蛋白質の中に、殺虫成分である δ -内毒素と結合能を有するものが存在するためである。また、同様に市販の人工飼料中に混合されることのあるプロピオン酸類もBT剤の殺虫活性を低下させることが明らかになった。

B.thuringiensis δ -内毒素結合性蛋白の1種とされる炭酸脱水素酵素(CA)を人工飼料中に添加すると、BT製剤の LC_{50} は有意に低下し、加えたCAの濃度(CA/BT)と活性低下には相関が認められた。このようにCAやダイズ蛋白中の δ -内毒素結合性蛋白は、本来のBT受容体に比べると δ -内毒素に対する親和性は低いものであるが、 δ -毒素の受容体への結合を阻害し、活性に影響を及ぼすと考えられた。カイコの飼育条件も生物検定結果に大きな影響を与える要因になることが明らかになった。発育の斉一化のために推奨される全暗飼育によって得られたカイコを検定に使用するとBT剤の活性(LC_{50})が約2/3に低下した。さらに、生物検定時に添加する検定希釈液の温度(5~40℃)によってもBT剤の活性に影響をあることが示された。このように現行の生物検定手法は、

製剤に含まれる δ -内毒素の種類や性質、補助剤の種類、使用する人工飼料やカイコの飼育条件など多くの要因によって、製剤の殺虫活性が影響を受け、正當に力価を評価できない欠点があることが明らかになった。生物検定法の実施に伴う、このような欠点を補うために、化学・物理的手法や形態学的手法等の非生物学的な手法についても検討した。その結果、BT製剤の δ -内毒素の含有量はSDS-PAGEによって検出できたが、単一系統でも複数の δ -内毒素をもつ場合が多く、カイコに対する活性はSDS-PAGEによる δ -内毒素量とは必ずしも一致せず、 δ -内毒素間の競合や相乗効果の影響が示唆された。

一方で、低真空走査型電子顕微鏡 (LV-SEM) の利用によって、より簡便に劣化の有無や、剤種の識別が出来る可能性が示唆されたことから、力価検定に当たっては本研究で明らかになった諸要因について十分に留意し、SDS-PAGEやLV-SEM等による非生物学的な手法を組み合わせたより精度の高い方法を採用することが重要であると結論された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

標的となる害虫以外の生物に対する毒性や環境への影響の少ない殺虫剤が求められている中で、昆虫病原菌 *Bacillus thuringiensis* の生産する δ 内毒素を主成分としたBT剤は種特異性が高いために、このような問題の少ない殺虫剤であり、広く害虫防除に使用されている。新たに開発されたBT剤の登録や品質管理には生物検定による活性の評価が不可欠である。本研究はBT製剤の殺虫活性を生物検定する際にさまざまな要因が活性評価に影響を与えることを明らかにし、各要因の影響を解析したものである。

ひとつの問題は製剤の保存による活性の低下である。特に、生物検定のための標準品は長期間保存されるものであるために、保存による活性低下は許されない。本研究から明らかになった点は、1系統の細菌由来の製剤は5℃の保存によって10年以上安定であるが、*B.thuringiensis* serovar *aizawai* と *B.thuringiensis* serovar *kurstaki* の2系統の細菌由来の毒素を含んだ製剤は5℃での保存では不安定であり、保存期間が長くなるに従って殺虫活性が低下する。このような製剤の保存は-80℃で行う必要がある。

次に、検定材料であるカイコを飼育したり、検定に使う人工飼料に含まれるプロピオン酸やダイズ蛋白がBT剤の殺虫活性を低下させることが見出された。プロピオン酸は防腐剤として使用されているものであり、ダイズ蛋白は栄養成分として飼料に添加されているダイズ粉末に含まれる。これらの発見は人工飼料の材料についても吟味する必要があることを示し、今後の生物検定法の改善に大いに役立つものである。また、この現象は活性本体である毒素の作用機作の本質に関わるものと考えられ、なぜこのような物質が毒素の活性を弱めるかを解明することは毒素の作用機作そのものを明らかにすることでもあり、今後の研究の発展も期待される。

本研究では、その他にもカイコの飼育環境や検定時の温度の影響なども明らかにしている。

以上の成果は、BT剤の殺虫活性評価法を信頼性の高いものに改良するための指針になるとともに、その評価法がBT剤製造時の品質管理や登録時の活性検定に広く利用されると考えられる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。