

氏 名 プランピス ルクサナニル
Plearnpis Luxananil
学 位 の 種 類 博 士 (工 学)
学 位 記 番 号 論 工 博 第 3785 号
学位授与の日付 平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目 Studies on mosquito bio-control bacteria
(殺蚊細菌に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 今 中 忠 行 教 授 青 山 安 宏 教 授 森 泰 生

論 文 内 容 の 要 旨

蚊が媒介する病気、デング熱、マラリア、フィラリア、日本脳炎、は熱帯地方に特有である。殺虫剤として使われる DDT などの化学薬剤は人体の健康への悪影響や環境問題を引き起こす可能性がある。そこで化学薬剤に代わるものとして微生物殺虫剤に期待が寄せられている。現在、*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* や *Bacillus sphaericus* が各種の蚊の幼虫の殺虫剤として世界中で使用されているのが実状である。しかし、自然環境中での定着性、安定性、効果の点で問題があり、これらの細菌の使用は限られている。これらの不利な点を克服するため、(1) 幅広い種類の蚊の幼虫に対し殺虫効果があり、(2) 自然環境中で安定に生存し、(3) 人体に悪影響を及ぼさないような細菌が望まれている。

本論文は、蚊の幼虫の腸管に自然に住み着いている細菌を多数分離し、その中で安定に生息する細菌を宿主として外来殺虫タンパク遺伝子を発現させ、分離菌自体が保持する毒素遺伝子の特性を明らかにするなど、新規微生物殺虫剤の開発に関する研究をまとめたものであり、緒論、要約、1～5 章、結論からなっている。

第 1 章では、蚊の幼虫の腸内からの細菌の分離について述べている。すでに分離されているコレクションに加え、タイ国内の多くの地域において自然に生息している蚊の幼虫を収集し、それらの腸管内から細菌の分離を試みた。多くの株を形態、グラム染色、抗生物質感受性、生化学的特性により分別した。形態学的観察により細菌は 23 タイプに分けられた。その中の主たるものは *Bacillus* 属細菌であった。しかし *Anopheles dirus* の幼虫の腸内からは *Enterobacter amnigenus* が得られた。医学的に重要な 3 種の蚊である *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, および、*Anopheles dirus* の幼虫を対象に、いくつかの主たる分離細菌株を再度幼虫に与えてその保持率などの特性を検討した。その結果、*E. coli* や *Bti* c4Q2-72 はどの幼虫の腸管内にも定着しなかったが、本研究で分離した細菌は定着性を示した。主要な細菌 3 種、*Bacillus cereus* Ae10 (Ae 10/2 G1), *B. cereus* Cx5 (Cx5 27/5 G1), *E. amnigenus* An11 (An 11/2 G1), は蚊の幼虫に対する殺虫タンパクを生産するための望ましい宿主としての特性を有していることが認められた。

第 2 章では、*Anopheles dirus* から分離した細菌 *E. amnigenus* An11 における殺虫遺伝子の発現について述べている。*E. amnigenus* An11 は幼虫の腸内で驚異的な定着性を示しているが、この細菌に *Bti* 由来の殺虫タンパク遺伝子 *cry4B* や *B. sphaericus* 由来の殺虫遺伝子を導入した。これらの形質転換株は殺虫タンパク遺伝子を発現し、蚊の幼虫に対し高い殺虫活性を示した。また *cry4B* を含む組換えプラスミド pMU388 は宿主菌内で 23 世代後でも安定に保持されていた。同様に、*B. sphaericus* 由来の殺虫タンパク遺伝子を保持する組換えプラスミド pMEx-5142 も安定に保持されることが判明した。さらに *E. amnigenus* An11 をマウスに食させたが特別の問題は生じず、本菌をウサギの皮膚の傷口に接触させたが炎症は認められなかった。これらの結果から、*E. amnigenus* An11 は、*Anopheles dirus* 蚊の幼虫をターゲットにした殺虫タンパク生産菌として有望であることが明らかになった。

第 3 章では、*Aedes aegypti* と *Culex quinquefasciatus* の腸管から分離された細菌を宿主とした殺虫遺伝子の発現について述べている。*B. cereus* Ae10 株と Cx5 株がそれぞれ *Aedes aegypti* と *Culex quinquefasciatus* の腸管から分離された優先

株であった。これらの株は、医学的に重要な3種の蚊である *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, および *Anopheles dirus* の幼虫においても高い定着性を示した。従って、これらの細菌は *E. amnigenus* An11 と違って幅広い種類の蚊に対して利用できると考えられる。これらの細菌に *Bti* 由来の殺虫タンパク遺伝子 *cry4B* や *B. sphaericus* 由来の殺虫遺伝子を導入したところ、殺虫タンパクを効率的に発現した。これらの遺伝子組換え株は、元株である *B. sphaericus* よりも遥かに高い殺虫活性を示した。プラスミド pBS373 や pMUB2 は宿主細菌内で安定に保持されていた。従ってここで使用された *B. cereus* Ae10 株と Cx5 株は宿主菌として有望であると考えられた。

第4章では、*B. cereus* がヒトに対する毒素を生産するため、その毒素構造遺伝子について検討を加えている。PCR法により7つの毒素遺伝子が存在することを明らかにした。また複合酵素遺伝子はクラスターを形成していた。また *entFM* 遺伝子は単独での存在が認められた。また *nheA* 遺伝子産物についての免疫学的検定で、2種の *B. cereus* 株には *Bti* 株と同様に *nheA* 遺伝子が存在することも明らかになった。これらの細菌は溶血活性、ペロ毒素活性が認められた。これらの細菌をマウスに与えても異常はなく、皮膚炎症実験でも結果は否定的であった。

第5章では、*B. cereus* Cx5 株の毒素遺伝子 (*entCx5*) を破壊して、本遺伝子と細胞毒性や溶血活性との相関について検討している。温度感受性ベクター (pUCTV2) に変異 *entCx5* 遺伝子を組み込んだプラスミド p Δ TentCx5TV2 を構築し、これを *B. cereus* Cx5 に導入した。Single crossover による相同組換え株 (*entCx5* 破壊株) が得られたが、この株のペロ毒素活性と溶血活性は野生株と比較して劇的に低下していた。この結果は *entCx5* の遺伝子産物が細胞毒性と溶血活性に重要な役割を果たしていることを示している。また、当該毒素遺伝子の破壊が可能であることも明らかになった。

結論では、将来的に *B. cereus* の細胞毒性遺伝子を破壊し、蚊の幼虫に対する殺虫タンパク遺伝子を付与することにより、蚊の幼虫腸管内で安定に定着し、人類に安全で殺虫活性が強力な微生物殺虫剤の開発が可能であることを述べている。

論文審査の結果の要旨

蚊が媒介する病気、デング熱、マラリア、フィラリア、日本脳炎、は熱帯地方に特有である。また殺虫剤として使われる各種化学薬剤は人体の健康への悪影響や環境問題を引き起こす可能性があるため、これらに代わるものとして微生物殺虫剤に期待が寄せられている。

本論文は、(1) 幅広い種類の蚊の幼虫に対して殺虫効果があり、(2) 自然環境中で安定に生存し、(3) 人体に悪影響を及ぼさないような細菌の開発を目的とし、実際に蚊の幼虫の腸管に自然に住み着いている細菌を多数分離し、その中で安定に生息する細菌を宿主として外来殺虫タンパク遺伝子を発現させ、分離菌自体が保持する毒素遺伝子の特性を明らかにするなど、新規微生物殺虫剤の開発に関する研究をまとめたものであり、得られた主な結果は次のとおりである。

1. まず各種蚊の幼虫の腸内から多数の細菌を分離したことを述べている。分離細菌は23タイプに分けられた。微生物実験に用いられる標準株 *Escherichia coli* や微生物殺虫剤の標準株 *Bacillus thuringiensis* はどの幼虫の腸管内にも定着しなかったが、本研究で分離した細菌は高い定着性を示した。主要な細菌3種、*Bacillus cereus* Ae10 (Ae 10/2 G1), *B. cereus* Cx5 (Cx5 27/5 G1), *Enterobacter amnigenus* An11 (An 11/2 G1) は蚊の幼虫に対する殺虫タンパクを生産するための望ましい宿主としての特性を有していることが認められた。

2. *B. cereus* Ae10 株と Cx5 株は、医学的に重要な3種の蚊である *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, および *Anopheles dirus* の幼虫においても高い定着性を示した。これらの細菌に *Bt* 由来の殺虫タンパク遺伝子 *cry4B* や *B. sphaericus* 由来の殺虫遺伝子を導入したところ、殺虫タンパクを効率的に発現した。これらの遺伝子組換え株は、元株である *B. sphaericus* よりも遥かに高い殺虫活性を示した。プラスミド pBS373 や pMUB2 は宿主細菌内で安定に保持されていた。従ってここで使用された *B. cereus* Ae10 株と Cx5 株は宿主菌として有望であると考えられた。

3. *B. cereus* の有する毒素構造遺伝子についても検討を加えている。これらの細菌には溶血活性、ペロ毒素活性が認められたが、これらの細菌をマウスに与えても異常はなく、ウサギを用いた皮膚炎症実験でも炎症は認められなかった。さらに、*B. cereus* Cx5 株の毒素遺伝子 (*entCx5*) を破壊した株は、細胞毒性や溶血活性が低下していた。従って、他の毒素遺伝子も破壊することにより、人畜無害で殺虫活性の高い微生物の開発が可能であることが明らかになった。

以上要するに、蚊の幼虫腸管内で安定に定着し、人類に安全で殺虫活性が強力な微生物殺虫剤の開発が可能であることを

述べており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は、博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また平成16年1月22日、論文内容とそれに関する事項について試問を行った結果、合格と認めた。