

Metarhizium 属糸状菌のカイコに対する病原性に関する研究

笹栗 頌子¹⁾・飯山和弘²⁾・青木智佐²⁾・清水 進²⁾

¹⁾九州大学大学院生物資源環境科学府, ²⁾九州大学大学院農学研究院

(2008年12月8日受付; 2009年1月14日受理)

The pathogenicity of the genus *Metarhizium* against *Bombix mori*

SHOKO SASAGURI, KAZUHIRO IYAMA, CHISA YASUNAGA-AOKI and SUSUMU SHIMIZU

Among the entomopathogenic fungi, genus *Metarhizium* is often used as biological control agent. In this study, we investigated pathogenetic characteristics of *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain EC2 and var. *majus* strain 1946 in silkworm. In order to examine association with pathogenicity, rates of conidial germination and fungal mycelium length were measured by a thin layer low-agar method using hemolymph from 24 races of silkworm. We observed the significant difference in the length of mycelium in 1946, but not in EC2. On virulence examination, smeaion assay showed the difference of LC₅₀ values between EC2 and 1946 presumably by mean of their different ability of penetration. We also examined MCL1 (*Metarhizium* collagen-like protein 1), known as virulence factor related to evade insect immune responses, in these strains. While *Mcl1* gene exists in EC2 and 1946, there is a frameshift mutation related in the stop codon. It suggests that EC2 and 1946 don't possess the functional MCL1. On the other hand, analysis of calcofluor white staining raise the possibility that the blastospore in hemolymph of silkworm is covered with the other proteins.

Keywords : *Metarhiziumanisopliae*, Silkworm, Pathogenicity, Virulence

緒 言

Metarhizium 属糸状菌は、多様な宿主域と特異性を持ち、多くの害虫の防除に利用されている昆虫病原性糸状菌である。本糸状菌は、その形態学的な特徴から 3 種に分けられており、さらに分生子の長さによって亜種が存在し、世界中に広く分布している。昆虫病原性糸状菌の病原性としては、宿主体腔内での分生子の発芽や blastospore の増殖との関連 (荒武, 1961; 青木, 1951), プロテアーゼやデストラキシンなどの virulence factor の存在など、多くの研究がなされているが、*Metarhizium* 属糸状菌における病原性や性状、また、宿主との相互関係には、未だに不明な点が存在する。そこで本研究では、宿主域の異なる 2 種の *Metarhizium* 属糸状菌を用いて、それらの病原性や性状をより明らかにすることを目的として、遺伝的にも生化学的にもよく研究されており、多数の品種が存在するカイコをモデル昆虫として、実験を行った。

材料と方法

供試菌：広い宿主範囲をもつ *M. anisopliae* var. *anisopliae* EC2 株と、台湾カブトムシ *Oryctes rhinoceros* に特異的である *M. anisopliae* var. *majus* 1946 株を供試菌として、実験を行った。

供試虫：以下に示すカイコ 25 品種を使用した。日本種 (p20 赤熟, p21 千代鶴, p22 日本錦, p24 日 124 号, p50 大造, k01 白かすり), 中国種 (p44 支 101 号, p62 支 108 号, c40 支那黄脚 3 眼, d18

朝鮮緑繭, e15 支 4 号), 熱帯種 (601 アンナン, 602 カンボージュ固定, 603 カンボージュ多化, 604 マイソール, 605 ピュアマイソール, 606 輪月), 欧州種 (519 西班牙, 504 バグダット, 510 伊黄繭, 517 ローザー, 522 トルコ黄繭, 502 アスコリー)

Metarhizium 属糸状菌のカイコ体液中での発芽：カイコ 25 品種の体液中における分生子の発芽率と発芽管の長さを、KOBAYASHI et al. (1985) によって提唱された thin-layer agar-plate method により測定した (Fig. 1)。すなわち、スライドガラスにビニールテープを巻き、そこに 1.25×10^6 /ml に調整した分生子懸濁液を含む低融点ゲルの層を作製した。そのゲル層を細分化して、カイコ体液 30 μ l とともに 96 穴タイタープレートに入れ、高湿度、25 °C で、0 時間から 24 時間まで、6 時間ごとのタイムコースをとり培養した。その後、顕微鏡下でそれぞれ 50 菌株以上、発芽の有無と発芽管の長さを測定した。

Metarhizium 属糸状菌の病原力：カイコ 4 品種に対して塗布接種と注射接種を行い、10 日間保護した後、LD₅₀ 値と LC₅₀ 値を算出した。さらに、カイコ体腔内での増殖を調べるために、カイコ 4 品種に対して注射接種を行い、毎日、カイコ体液を採取した後、血球計算盤で blastospore の数を算定した。

PCR とダイレクトシーケンス：WANG and St. LEGER (2006) の論文に基づいて、*Metarhizium* collagen like 1 (*Mcl1*) の ORF 領域を含む位置にプライマーを設計し、PCR を行った。さらに、PCR で増幅した部分をダイレクトシーケンスするこ

^{1), 2)} 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
Tel: 092-642-3031, Fax: 092-642-4421
連絡先: sshimizu@grt.kyushu-u.ac.jp

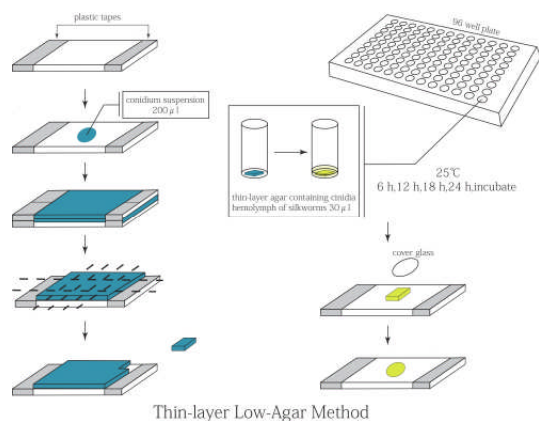


Fig. 1. Thin-layer low-agar method.

とによって、*Mcl1* の全塩基配列を決定した。

蛍光染色：染色には、LB 成分、SDB 成分、およびカイコ体液の 3 つの異なる培地によって培養した blastospore を用いた。カイコ体液は p50 から採取した。それぞれの培地 5 ml に対して分生子 1.0×10^6 /ml を植菌し、25 °C で 2 日間振盪培養した。脱脂綿による濾過を行った後、calcofluor white と blastospore を懸濁して細胞壁染色を行い、405 nm の蛍光顕微鏡下で観察を行った。

結 果

Metarhizium 属糸状菌のカイコ体液中における発芽

各種カイコ体液中における両糸状菌の発芽管の長さは、ピュアマイソールの体液中で最も長く、EC2 株は 19.20 µm、1946 株は 47.04 µm であった。最も短かった体液は両菌株ともにローザーで、EC2 株は 8.26 µm、1946 株は 8.52 µm であった。しかし、EC2 株の発芽管の長さは、蚕品種間での差異は小さかったのに対して、1946 株の発芽管の長さには大差が認められた (Fig. 2)。



Fig. 2. The length of fungus mycelium in hemolymph of the silkworms. Mycelium were cultured for 18 h by thin-layer low-agar method.

Metarhizium 属糸状菌の病原性

病原性については、EC2 株では、注射接種と塗布接種において、いずれも大きな差異が見られなかった。一方、1946 株では、注射接種において差異が見られなかったのに対して、塗布接種において大きな差異が認められた (Table 1)。

Table 1 The virulence of *Metarhiziumanisopliae*

	EC2		1946	
	LC ₅₀ (CFUs/ml) smearing	LD ₅₀ (CFUs/頭) injection	LC ₅₀ (CFUs/ml) smearing	LD ₅₀ (CFUs/頭) injection
p50	8.3×10^4	4.0	2.3×10^4	5.5
P61	4.2×10^3	≤ 2.0	2.3×10^5	≤ 2.2
P44	2.1×10^4	7.0	$\geq 7.3 \times 10^6$	≤ 2.8
k01	≤ 1.3×10^3	4.0	9.1×10^3	≤ 3.1

Metarhizium collagen-like protein 1 (MCL1) の発現

mcl1 遺伝子は、PCR においてその存在が確認されたので、ダイレクトシーケンスによって推定される全塩基配列を決定した。アミノ酸配列において、N 末端側と C 末端側は保存されていたものの、途中でストップコドンを生じており、その配列に変異が生じていた。さらに、calcofluor white による染色を行ったところ、LB 培地や SDB 培地など nutrient-rich な条件下では蛍光が見られないのに対して、カイコ体液中では弱い蛍光が確認された (Fig. 3)。

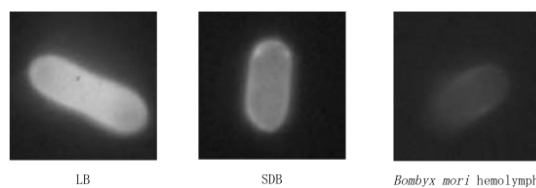


Fig. 3. Calcofluor white staining of blastospores.

考 察

昆虫病原性糸状菌のカイコ体液中の発芽は、病原性と密接に関連していると報告されている (荒武, 1961)。また、昆虫病原性糸状菌のカイコ体液中の発芽の差異は、カイコ体液中存在する発芽抑制物質と、発芽に必要な栄養源の差が関連しているという報告もある (青木, 1951)。そこで、thin-layer low-agar method を用いて、*Metarhizium* 属糸状菌の発芽管の長さを測定したところ、EC2 株ではそれほど大きな差異が見られなかったのに

対して、1946 株では大きな差異が認められた。これは、カイコ品種間に存在する発芽抑制物質、または生長に必要な栄養源の差異であると考えられる。病原力については、塗布接種において、EC2 株と 1946 株の間に大差が認められた。しかし、注射接種においては差異が見られなかったことから、両者の差は侵入に関する何らかの要因の差によるものであると考えられる。さらに、塗布接種の結果から、支 101 号 (p44) は完全抵抗性品種である可能性が示唆された。

病原性に関与する virulence factor として報告されている MCL1 タンパク質は、細胞壁を覆うことによって自身の表面を親水性にすること、電荷を変えること、さらに、Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) として知られている β グルカン を覆うことによって宿主の免疫機構の活性化を抑制していることが報告されている (WANG and St. LEGER, 2006)。そこで、両菌株においても MCL1 が存在しているかどうかを調べるために、PCR を行った。つづいて、Mcl1 遺伝子の存在が確認されたので、その部分の塩基配列をダイレクトシーケンスによって決定した。その結果、MCL1 タンパク質はその配列に変異が生じており、1946 株と EC2 株において、完全長の MCL1 タンパク質は翻訳されていないと推察された。コラーゲン様配列を持つドメイン B と GPI アンカーを含むドメイン C が欠失していることから、MCL1 タンパク質はおそらくその機能を保持していないと考えられる。また、calcofluor white による染色を行ったところ、カイコ体液中の blastospore で弱い蛍光が認められたことから、他のコラーゲン様タンパク質が発現している可能性が示唆された。

摘 要

Metarhizium 属糸状菌の病原性やその性状について、より明らかにする事を目的として、宿主範囲の異なる 2 菌株 (*M. anisoplae* var. *anisoplae* EC2

株および var. *majus* 1946 株) を用いて、以下の実験を行った。カイコ体液中での発芽に関する調査では、EC2 株の発芽管の長さには差が見られなかったのに対して、1946 株の発芽管の長さには、カイコ品種間での大差が見られた。続いて、接種実験によって、両糸状菌の病原性を評価した。注射接種と EC2 株の塗布接種においては、品種間に差が認められなかった。しかし、1946 株の塗布接種においてはカイコ品種間の差異が見られ、支 101 号 (p44) は完全抵抗性品種である可能性が示唆された。さらに、宿主免疫からの回避に関与する virulence factor として着目した *mcl1* 遺伝子の存在が PCR によって確認されたが、ダイレクトシーケンスを行ったところ、その配列は変異していた。その一方で、蛍光染色による結果から、カイコ体液中での blastospore において、MCL1 タンパク質とは異なった、宿主の免疫系に関与するタンパク質が発現している可能性も示唆された。

文 献

- 青木 清 (1951) 糸状菌と昆虫との関係に就いて (II) 二、三硬化病菌の病原性及び昆虫体液中に於ける発芽発育(1). *日蚕雑*, **20**, 431-438.
- 荒武義信 (1961) 家蚕硬化病罹病性の遺伝学的解析 I. 白きょう病罹病性の染色体分析. *蚕糸試験場報告*, **17**, 155-165.
- KOBAYASHI, I., OHKUMA, T., ISHIZAKI, H. and KUNOH, H. (1985) Hardness of culture media affecting regeneration and reversion of *Pyricularia oryzae* protoplasts and a thin-layer agar-plate method devised for numerical evaluation of regeneration and reversion. *Exp. Mycol.*, **9**, 161-169.
- WANG, C. and St. LEGER, R. J. (2006) A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisoplae* to evade insect immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 6647-6652.