

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-154265

(P2019-154265A)

(43) 公開日 令和1年9月19日(2019.9.19)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/14 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/14	4 B 0 6 5
<b>A O 1 N 63/04 (2006.01)</b>	A O 1 N 63/04	4 H O 1 1
<b>A O 1 N 63/02 (2006.01)</b>	A O 1 N 63/02	B
<b>A O 1 P 7/04 (2006.01)</b>	A O 1 P 7/04	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2018-42104 (P2018-42104)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地
(22) 出願日	平成30年3月8日(2018.3.8)	(72) 発明者	相内 大吾 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内
		(72) 発明者	松崎 優 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内
		Fターム(参考)	4B065 AA58X BB29 CA48 4H011 AC02 BB21

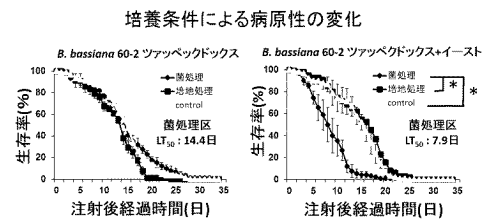
(54) 【発明の名称】 ハマダラカに対する昆虫寄生菌由来の二次性代謝産物

(57) 【要約】

【課題】 本発明は昆虫に対して有効な致死活性をもつ昆虫寄生菌培養液を提供するものである。

【解決手段】 マラリアなどの病気を媒介する昆虫の駆除を目的とし、昆虫寄生菌のポーベリア パシアナ 60-2株(受領番号N I T E A P - 0 2 6 6 4)をイースト抽出物を含むチャベックドックス液体培地で培養して得られる培養液を殺虫剤として用いる。

【選択図】 図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

昆虫寄生菌のボーベリア バシアナ 60 - 2 株 (受領番号 N I T E A P - 0 2 6 6 4 ) をイースト抽出物を含むチャペックドックス液体培地で培養して得られる培養ろ液。

## 【請求項 2】

昆虫に対して致死活性を持つ、請求項 1 に記載の培養ろ液。

## 【請求項 3】

昆虫がハマダラカである、請求項 2 に記載の培養ろ液。

## 【請求項 4】

請求項 1 または請求項 2 に記載の培養ろ液を含むことを特徴とする、請求項 2 または請求項 3 に記載の昆虫の昆虫防除剤。 10

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の昆虫防除剤をマイクロインジェクションまたは散布する、請求項 2 または請求項 3 に記載の昆虫の防除方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、昆虫病原性微生物 (昆虫寄生菌) であるボーベリア バシアナ (*Beauveria bassiana*) の二次代謝産物を含む培養ろ液であって、昆虫に対して致死性の活性を持つ害虫防除剤およびそれを用いた害虫防除方法に関する。 20

## 【背景技術】

## 【0002】

マラリアは熱帯から亜熱帯に広く分布する原虫感染症であって、マラリア原虫をもった蚊 (ハマダラカ属) に刺されることで感染する。高熱や頭痛、吐き気などの症状を呈し、悪性の場合には脳マラリアによる意識障害や腎不全などを起こし死亡する。全世界で年間 1 . 2 ~ 2 . 8 億人の患者が発生し、死者数は年間 3 6 ~ 7 5 万人に上る。

## 【0003】

マラリア治療薬としてはキニーネ、クロロキン、メフロキン、ファンシダール、プリマキン等が知られているが、いずれも強い副作用が現れることがあり、さらに薬剤に対して耐性を示す原虫も出現してきている。 30

## 【0004】

従来、感染症の防除には合成化学殺虫剤による媒介昆虫の駆除が行われてきた。マラリアを媒介するハマダラカの駆除もマラリアの感染防除に有効な手段である。しかしながら近年では合成化学殺虫剤に対して抵抗性を持つハマダラカが蔓延してきたことから、代替防除技術の開発が望まれているところである。

## 【0005】

農業分野においては、昆虫寄生菌は微生物防除資材として一般的に利用されてきている (非特許文献 1)。昆虫寄生菌は宿主昆虫の表皮を通して感染し致死させることから、蚊などの吸血性昆虫に対しても有効である (非特許文献 2)。このような微生物防除資材の使用方法として、昆虫寄生菌の培養ろ液を殺虫剤として用いる方法が幾つか報告されている。例えば非特許文献 3 は、*Metarhizium anisopliae* または *Beauveria caldonica* の培養ろ液と *Candida albicans* のいずれかを共注入したハチミツガの幼虫死亡率は有意に増加したが、ボーベリア バシアナの培養ろ液を注入した幼虫では認められなかったことを報告している。また、非特許文献 4 はボーベリア バシアナの培養ろ液に含まれる赤色色素がシロバエに対する殺虫性を有することを記載している。 40

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献 1】 Steven Arthurs and Surendra K. Da 50

ra., J. Inverteb. Pathol. 2018, in press

【非特許文献2】Blandford S. et al., Science. 2005, 308: 1638 - 1641

【非特許文献3】Louise Mc Namara. et al., Journal of Insect Physiology. 2017, 100: 82 - 92

【非特許文献4】AMIN Gamil A. et al., World J Microbiol Biotechnol. 2010, 26: 2263 - 2268

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

しかしながら、薬剤耐性を獲得したハマダラカに対して有効な致死性を有する昆虫寄生菌の培養液は知られていない。発明者らは、これまでに野外の成虫蚊から昆虫寄生菌の分離を試み、ハマダラカに対して高い病原性を示すポーベリア バシアナ60 - 2株（以下、本菌株ということがある。）の分離に成功した。

【0008】

本菌株を様々な培養条件で培養し、その培養液をマイクロインジェクションによりハマダラカに注入した。その結果、該培養液がハマダラカに対して致死性を有することを明らかにしたことにより、本発明を完成させた。

【課題を解決するための手段】

【0009】

20

(1) 昆虫寄生菌のポーベリア バシアナ60 - 2株（受領番号NITE AP - 02664）をイースト抽出物を含むチャベックドックス液体培地で培養して得られる培養液。

(2) 昆虫に対して致死活性を持つ、(1)に記載の培養液。

(3) 昆虫がハマダラカ属である、(2)に記載の培養液。

(4) (1)または(2)に記載の培養液を含むことを特徴とする、(2)または(3)に記載の昆虫の昆虫防除剤。

(5) (4)に記載の昆虫防除剤をマイクロインジェクションまたは散布することを特徴とする、(2)または(3)に記載の昆虫の防除方法。

【発明の効果】

30

【0010】

マラリアを媒介するハマダラカを駆除するために多量の化学農薬が散布されてきた結果、薬剤に耐性を持つハマダラカが蔓延してきている。前記の培養液は、ハマダラカに対しても致死性を有することから、マラリアを防除するための新規な方法を提供できる。本発明の培養液は従来の化学農薬とは作用メカニズムが異なることから、耐性を獲得したハマダラカに対しても有効であると期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】野外の成虫蚊から分離した昆虫寄生菌のハマダラカに対する致死性を示すグラフである。分離した60 - 2株のLT50は5.8日であり、調べた中で最大の病原性を示した。

40

【図2】培地組成の違いによる致死活性の変化を検討したグラフである。チャベックドックス液体培地にイースト抽出物を添加することにより活性が増加することが確認できた。

【図3】培養液に含まれる活性物質の耐熱性を調べた図である。加熱により失活することから、活性本体はタンパク質であることが推定された。

【図4】培養液を3kDaの限外ろ過により分画した時の各画分の活性を示す。このデータは分子量3kDa以下の活性物質も含まれていることを示している。

【発明を実施するための形態】

【0012】

ハマダラカ属はマラリアをはじめ、様々な感染症を媒介する。従来、感染症の制御は合

50

成化学殺虫剤による媒介昆虫の駆除により実施されてきた。しかしながら、近年では合成化学殺虫剤に抵抗性を持つハマダラカが蔓延してきたことにより、代替防除技術の開発が急務とされている。

#### 【0013】

生物防除資材の一つである昆虫寄生菌は経皮感染が可能であることから、吸血性昆虫に対しても有効である。昆虫寄生菌は宿主の表皮に付着してクチクラ層を貫通し、血体腔内で二次代謝産物の産生や増殖をするという複雑な感染機構を有する。この感染過程で昆虫寄生菌は宿主組織への侵入と二次代謝産物が複合的に作用することにより宿主を致死させる。

#### 【0014】

発明者らはこれまでに野外の成虫蚊から昆虫寄生菌の分離を試み、ハマダラカに高い病原性を示す本菌株の分離に成功した(図1)。本菌株に感染したハマダラカでは、宿主頭部での菌体の増殖と脳への侵入が早期致死要因となっている。

#### 【0015】

一方で、二次代謝産物の致死要因としての寄与度は明らかになっていない。そこで二次代謝産物を含む本菌株の培養濾液をハマダラカの血体腔内へインジェクションすることでその致死性を評価した。様々な菌培養条件の検討の結果、チャペックドックス液体培地で培養した本菌株の培養濾液は致死性を示さないのに対し、チャペックドックス液体培地にイースト抽出物を添加することでハマダラカに対して高い致死性を示すことが明らかになった(図2)。

#### 【0016】

前記の菌培養ろ液を熱処理したところ致死性が喪失したことから、本菌株の致死因子の一部はタンパク質由来であることが示唆された(図3)。

#### 【0017】

さらに、3 k D a の限外ろ過フィルターにより前記培養ろ液を分画したところ、3 k D a 以上の画分だけでなく、3 k D a 以下の低分子画分もハマダラカに対して致死活性を持つことを確認した(図4)。ポーベリア属菌はタンパク質やペプチドに加え、低分子の有機化合物等を殺虫成分として産生することが報告されており(Biocontrol Science and Technology, 2007, 17: 553-596)、本データはこれを裏付けるものである。

#### 【実施例】

#### 【0018】

以下、本発明を実施例に基づき、より具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0019】

実験室内で27℃、16時間明期：8時間暗期条件下で累代飼育したハマダラカ(*Anopheles stephensi*)を用いた。飼育中は餌として10%スクロース水を与えた。ポテトデキストロース寒天培地(PDA)上で*Beauveria bassiana* 602を24℃、暗条件下で10-15時間培養したものをを用いた。*B. bassiana* 602培養ろ液は、チャペックドックス液体培地に10%イースト抽出物(Difco)を添加したもの(1L当たり：スクロース30g、硝酸ナトリウム3g、リン酸水素二カリウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.5g、塩化カリウム0.5g、硫酸第一鉄0.01g、イースト抽出物100g)で培養し、作製した。

#### 【0020】

PDA上に叢生した*B. bassiana* 60-2の含菌寒天を切り出し、25mLの液体培地に移植した。暗条件下、24℃、200rpmで1週間培養した後、ガーゼでろ過し、10,000G、5分間で遠心分離した。上清を2µmポアサイズのシリンジフィルターでフィルターろ過したものを、マイクロインジェクションに用いた。培養ろ液の熱処理は、オートクレーブを用い、121℃、15分、0.212MPaで処理した。限外濾過はAmicon Ultra-4(ミリポア)を用い、メーカーの配布するプロト

10

20

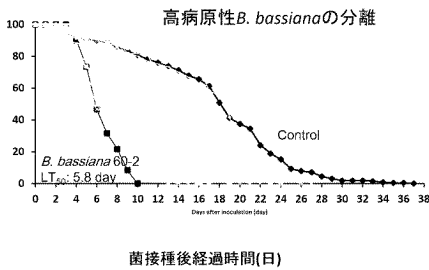
30

40

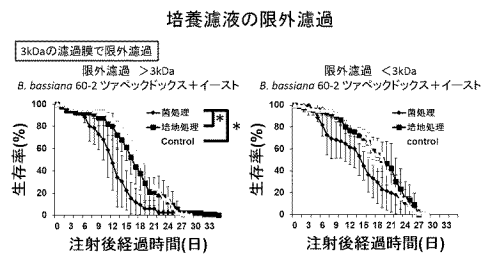
50

コールに従ってろ過した。先端を鋭化した微細ガラス管をマイクロインジェクターに設置し、65 nLの培養ろ液を、炭酸ガス麻酔した*A. stephensi*成虫の中胸背板下部にインジェクションした。それらを、27℃、相対湿度80%16時間明期：8時間暗期条件下のインキュベータ内で飼育した。死個体は全個体が致死するまで毎日回収し、継続的な生存率を算出した。

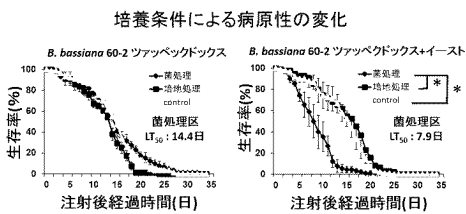
【図1】



【図4】



【図2】



【図3】

