

環動昆

原 著

- 板倉修司・益田貴文・田中裕美・榎 章郎：大腸菌を用いたシロアリ由来
エンドグルカナーゼの発現 113
- 大類幸夫：タバコシバンムシ *Lasioderma serricorne* (Fabricius) に対する
殺虫剤（クロルピリホスメチル）を処理した段ボールテープ剤
の防除効果 119
- 角田邦夫・檜皮佳信・松岡宏明・吉村 剛：各種昆虫病原性糸状菌に対す
るイエシロアリの生体防御（英文） 125

解 説

- 頭山昌郁：気候条件から見たアルゼンチンアリの分布—日本での分布拡大
の可能性についての検討— 131
- 丸山 潔：安曇野のオオルリシジミを守る 137

- 第15回環境アセスメント参加印象記 139
- 会 報 141
- 投稿規程 142

Vol. 16

3

2005

日本環境動物昆虫学会

大腸菌を用いたシロアリ由来エンドグルカナーゼの発現

板倉 修司・益田 貴文・田中 裕美・榎 章郎

近畿大学農学部

受領：2005年5月13日；受理：2005年7月8日

Expression of endo- β -1,4-glucanase from the termite *Coptotermes formosanus* Shiraki with *Escherichia coli*. Shuji Itakura, Takafumi Masuta, Hiromi Tanaka, Akio Enoki. (Department of Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan).

Abstract

Endo- β -1,4-glucanase (EG) proteins of the termite, *Coptotermes formosanus* and the symbiotic protists, *Pseudotrichonympha grassii* and *Holomastigotoides hartmanni* were subjected to expression in *Escherichia coli*. EG activity of the recombinant protein was investigated by zymogram analysis. Halos, formed around the colonies of *E. coli* with cDNA from the termite and *P. grassii*, were found on LB agarose plates with sodium carboxymethylcellulose. Recombinant EG protein constructed from cDNA from salivary glands of *C. formosanus* (Cf-EG) was purified by HiTrap chelating HP (Ni^{2+}) affinity chromatography. EG activity of the purified Cf-EG was 20.4 mU/mg-protein.

Key words : *Coptotermes formosanus*, Endo- β -1,4-glucanase, Salivary glands

大腸菌を用いてイエシロアリと共生原生生物 (*Pseudotrichonympha grassii*, *Holomastigotoides hartmanni*) エンドグルカナーゼの発現を試みた。組換えタンパク質のエンドグルカナーゼ活性を指標にし、組換え体をスクリーニングした。シロアリの cDNA ならびに *P. grassii* の cDNA を含有する大腸菌コロニーの周辺で、培地に添加したカルボキシメチルセルロースの低分子化に由来するハロ (白色透明部分) が観察された。イエシロアリの唾液腺から得られた cDNA を基に構築した組換えエンドグルカナーゼタンパク質 (Cf-EG) を、HiTrap chelating HP (Ni^{2+}) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製 Cf-EG のエンドグルカナーゼ活性は 20.4 mU/mg-protein であった。

はじめに

イエシロアリ *Coptotermes formosanus* は木材セルロースを効率的に消化する。例えば、イエシロアリの職蟻によりアカマツの主要な構成単糖であるグルコースが 72~78 % 消化されると報告されている (Itakura *et al.*, 1995)。セルロースの消化は主に後腸内に共生する原生生物の体内で起こるといわれてきた。実際のシロアリ組織抽出物と後腸抽出物による結晶性セルロースからの還元糖の生成速度の比は、反応時間にもよるが約 48 : 52 (Itakura *et al.*, 1997) あるいは 23 : 77 (Nakashima *et al.*, 2002b) であった。このことは、後腸での結晶性セルロースの消化速度の方が前腸と中腸における消化速度よりも約 1.1~3.3 倍早い、後腸だけでなく前腸や中腸においても結晶性セルロースが消化されることを示している。また、シロアリの消化管内に取り込まれた木材は、シロアリの咀嚼により 50 μm 以下まで断片化さ

れる。この結果、二次壁のセルロース表面が露出するため、リグニン分解酵素なしにセルラーゼ単独で木材セルロースが消化される (Itakura *et al.*, 1995)。

最近の分子生物学的手法の発展により、シロアリならびに共生原生生物で発現している多くのセルラーゼ遺伝子が同定された。イエシロアリの唾液腺と中腸では Glycoside Hydrolase Family (GHF) 9 (Nakashima *et al.*, 2002b)、共生原生生物 *Pseudotrichonympha grassii* と *Holomastigotoides hartmanni* (分子生物学の分野では *H. mirabile* と呼称されている) では GHF 7 (Nakashima *et al.*, 2002a ; Watanabe *et al.*, 2002), *Spirotrichonympha leidy* では GHF 5 (Inoue *et al.*, 2005) に属するエンドグルカナーゼ (EG ; endo- β -1,4-glucanase) が発現している。なお、シロアリにより生成される GHF 9 に分類されるセルラーゼは EG と、共生原生生物により生成される GHF 7 に分類されるセルラーゼは EG (Watanabe *et al.*, 2002) あるいは CBH (cellobiohydrolase)

(Nakashima *et al.*, 2002a) と呼称される。

シロアリの EG ならびに共生原生生物の EG あるいは CBH に関するアミノ酸配列や塩基配列などの情報が明らかにされたが、唾液腺で発現する EG の作用で効率よく木材セルロースが糖化される機構は明らかにされていない。またイエシロアリ以外の下等シロアリでは中腸での EG 発現は報告されておらず、下等シロアリ中腸での EG 発現についてまだ十分に検証されていない。本研究では、EG の作用だけでセルロースが高効率に糖化される機構の解明を目指し、大腸菌を用いてイエシロアリの唾液腺 EG (Cf-EG) と原生生物 *P. grassii* と *H. mirabile* の EG (Pg-EG, Hm-EG) の大量発現を試みた。

材料と方法

1. シロアリ

研究室で約 5 年間維持した巣からイエシロアリ *Coptotermes formosanus* Shiraki の職蟻を採集した。アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. *et* Zuss.) を餌として飼育したシロアリを、採集後 1 日以内に解剖した。

2. シロアリと原生生物の cDNA 合成

イエシロアリの職蟻 (20 頭) を解剖し、唾液腺と後腸 (原生生物を含む) を摘出した。QuickPrep micro mRNA purification kit (Amersham Bioscience) を用いて、製造会社のプロトコルに従って、唾液腺と後腸から mRNA を抽出した。エタノール沈殿で濃縮・精製した mRNA に、500 ng のオリゴ (dT) 12-18 (Invitrogen), 0.5 mM dNTP (0.5 mM dATP, 0.5 mM dGTP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dTTP 混合溶液) と滅菌蒸留水 7 μ l を加え (全液量; 12 μ l), 65°C で 5 分間加熱した後にすばやく氷上で冷却した。First-strand buffer (pH 8.3, 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM μ gCl₂), 10 mM DTT (dithiothreitol), RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units, Invitrogen)

を添加し 42°C で 2 分間静置した。Superscript II reverse transcriptase (200 units, Invitrogen) を加え 42°C で 50 分間反応させた。反応溶液を 70°C で 15 分間加熱して cDNA 合成に用いた酵素を失活させた。得られた唾液腺ならびに後腸の cDNA ライブラリーを PCR による遺伝子増幅の鑄型とした。

3. イエシロアリと原生生物のエンドグルカナーゼ遺伝子増幅用プライマーの設計

DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に公開されているイエシロアリ唾液腺 EG 遺伝子 (Cf-EG), 共生原生生物 *P. grassii* と *H. mirabile* の EG 遺伝子 (Pg-EG, Hm-EG) の塩基配列を基に、各 EG の 3' 末端側の終止コドン (taa) を除いた全長を増幅できるように 3 組のプライマー対を設計した。Forward プライマーの 5' 末端に制限酵素 Bam H I 認識配列を、reverse プライマーの 5' 末端に制限酵素 Nco I 認識配列を付加した (表 1)。

4. エンドグルカナーゼ遺伝子の増幅と発現ベクターへの組込み

表 1 の 3 組のプライマー対を用いて、唾液腺あるいは後腸 cDNA ライブラリーを鑄型とし、Cf-EG, Pg-EG および Hm-EG を、Takara EX Taq Hot Start Version (2.5 units) (宝酒造) を用いた PCR により増幅した。PCR では、94°C で 30 秒間の熱変性、各アニーリング温度 (Cf-EG; 58°C, Pg-EG; 56°C, Hm-EG; 63°C) での鑄型 DNA 鎖とプライマーの会合 (30 秒間), 72°C で 1 分間の延伸反応を 25 サイクル行い目的とする各 EG 遺伝子を増幅した。PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動で解析した (図 1)。Cf-EG (1.4 kbp), Pg-EG (1.0 kbp), Hm-EG (1.0 kbp) の各 DNA のバンドをゲルから切出し、DNA extraction from agarose gels (Qiagen) を用いて DNA を精製した。Cloning kit dual promoter (Invitrogen) を用いて、製造会社のプロトコルに従い、TA クローニング (Taq polymerase

表 1 イエシロアリ唾液腺および原生生物のエンドグルカナーゼ遺伝子増幅用プライマー

プライマー	T _m (°C)	配列 (5' → 3')
イエシロアリ唾液腺エンドグルカナーゼ (1347 bp) - 終止コドン (3 bp)		
Cf-EG forward	65.5	cgcgatccaatgagggtctctt
Cf-EG reverse	67.2	tttccatggtcagcctgccttg
<i>P. grassii</i> エンドグルカナーゼ (987 bp) - 終止コドン (3 bp)		
Pg-EG forward	66.5	cgcgatccaatgttggggctg
Pg-EG reverse	62.2	tttccatggtgatgtcgaatcc
<i>H. mirabile</i> (<i>H. hartmanni</i>) エンドグルカナーゼ (981 bp) - 終止コドン (3 bp)		
Hm-EG forward	68.5	cgcgatccaatgctggtcgactg
Hm-EG reverse	67.9	tttccatggtgtacgtcgagtcgt

アンダーライン部分: Bam H I 認識配列 (ggatcc), Nco I 認識配列 (ccatggt)

太字部分: Cf-EG, Pg-EG, Hm-EG のセンス鎖配列あるいはアンチセンス鎖配列

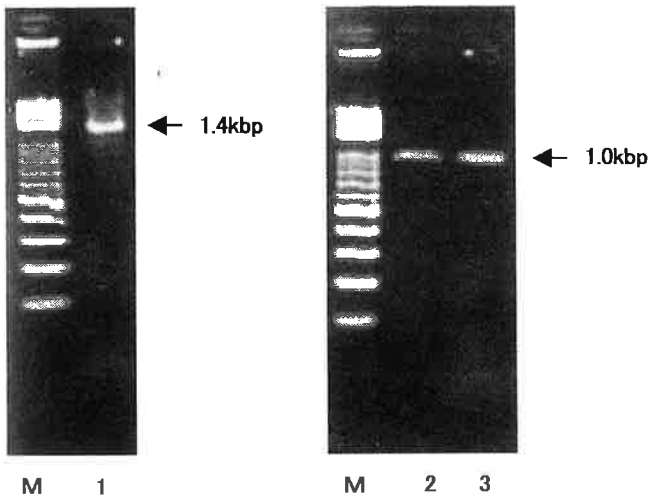


図1 イエシロアリ唾液腺 cDNA と共生原生動物 cDNA の PCR 増幅産物。
M, マーカー, 1; 唾液腺; 2, *P. grassii*; 3, *H. mirabile* (*H. hartmanni*)。

により PCR 増幅産物の両末端に付加されたアデニン (A) 1 塩基突出とチミン (T) の 1 塩基突出を両末端にもつプラスミドとのセルフライゲーションを利用したクローニング法) ならびにプラスミド pCR II へのサブクローニングを行い、大腸菌 INV a F' 株へ形質転換した。この形質転換体を SOC 液体培地 (pH 7.0, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose, 2% tryptone, 0.5% yeast extract) を用いて 37°C で 1 晩培養した後に、プラスミドをアルカリ SDS・フェノールクロロホルム法を用いて抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素 *Nco* I と *Bam*H I で処理し目的とする各 EG 遺伝子 (*Cf-EG*, *Pg-EG*, *Hm-EG*) を切出した。製造会社のプロトコルに従い、発現ベクター pRSET (Invitrogen) に組み込み、大腸菌 BL 21 株の形質転換を行った。発現ベクターに正しい方向で各 EG 遺伝子が組み込まれているか確認するため、DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Bioscience) と ABI3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を解析した。

5. 組換え体からのエンドグルカナーゼ活性の検出

1% CMC-Na (カルボキシメチルセルロースナトリウム塩), 0.01% アンピシリンおよび 0.5 mM IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) を含有する LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 寒天培地で、組換え体を 37°C で 1 週間培養した。CMC 分解活性を指標として、EG を発現している組換え体をスクリーニングした (Tokuda *et al.*, 1999) (図2)。CMC 分解活性をもつ組換え体を、0.01% アンピシリンを添加した SOB (pH 7.0, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2% tryptone, 0.5% yeast extract) 液体培地で培養した。タンパク質合成を誘導するため IPTG を培養液に添加した後、1 時間ごとに培養液の一部 (5 ml) を回収した。遠心分離で回収した組換え体に sonication buffer (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を加え超音波ホモジナイ

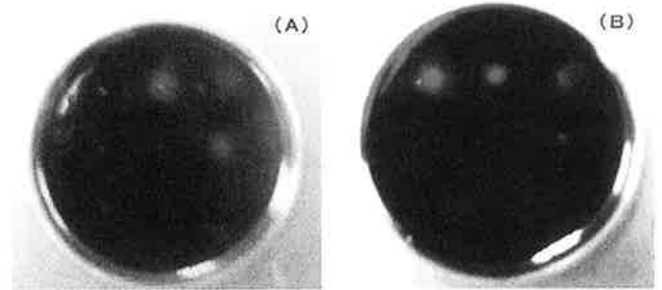


図2 大腸菌 BL-21 株で発現させたエンドグルカナーゼ組換え体の CMC 分解。
(A), pRSET-*CfEG*; (B), pRSET-*PgEG*

ザーで破碎した。破碎液を SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動) で解析した (Laemmli, 1970) (図3, 4)。さらに、発現したタンパク質が大腸菌内で凝縮し封入体として存在している可能性も考えられたことから、不溶性画分に 8 M 尿素を加え懸濁したのち、4M 尿素, 2M 尿素で各 1 時間透析した後に、sonication buffer で 1 晩透析した。透析膜内の液を遠心分離し、上澄み液を可溶性酵素溶液として回収した。破碎ならびに透析は 4°C で行った。培養上澄み液、大腸菌破碎液、大腸菌破碎後の不溶性画分、および封入体の可溶性酵素溶液の EG 活性を常法に従い測定した (Itakura *et al.*, 1997)。

6. エンドグルカナーゼ組換えタンパク質の精製

EG 活性の検出された封入体可溶性酵素溶液を、HiTrap chelating HP (Ni²⁺) カラム (Invitrogen) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。吸着液 (pH 7.4, 20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole) でタンパク質をカラムに吸着させ、溶出液 (pH 7.4, 20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole) でヒスチジンタグ融合タンパク質 (*Cf-EG*) を精製した (図5)。0.1% の CMC を含むポリアクリルアミドゲルを用いて native-PAGE を行い、精製タンパク質が EG 活性を示すか検討した (図6)。

7. セルラーゼ活性の測定

EG 活性; 抽出液あるいは画分 (20 μ l) を 2% CMC-Na を含む 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0, 480 μ l) とともに 30°C で 1 時間振とうし、生成した還元糖を Somogyi 法 (1951) で定量した。

結晶性セルロース分解活性; 抽出液あるいは画分 (250 μ l) を 2% アビセル (フナセル SF 薄層クロマトグラフィー用, フナコシ) を含む 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0, 250 μ l) とともに 30°C で 20 時間振とうした。遠心分離によりアビセルを取除いた上澄み液中に含まれる還元糖を Somogyi 法により定量した。

β -グルコシダーゼ活性; 抽出液あるいは画分 (10 μ l) を 20 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Sigma) を含む 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0, 490 μ l) とともに 30°C で 30 分間反応させ、生成した *p*-nitrophenol を定量した (Itakura *et al.*, 1997)。

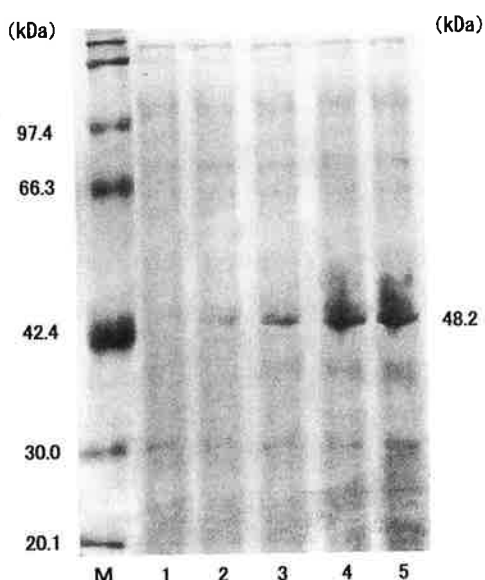


図3 pRSET-CfEG 組換え体の大腸菌 BL-21 株での発現。
M, マーカー; 1-5, 培養時間 (0, 1, 2, 3, 4 h).

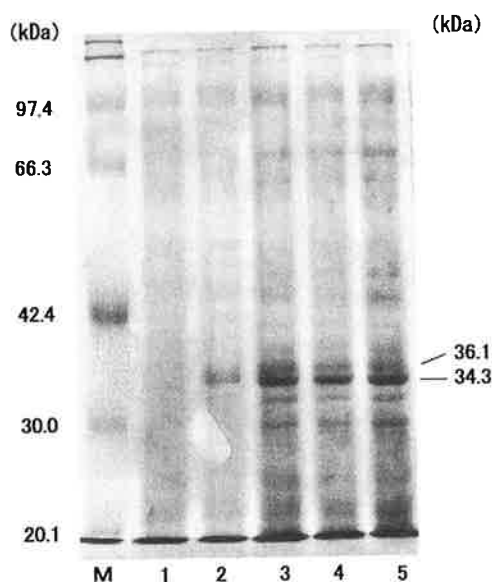


図4 pRSET-PgEG 組換え体の大腸菌 BL-21 株での発現。
M, マーカー; 1-5, 培養時間 (0, 1, 2, 3, 4 h).

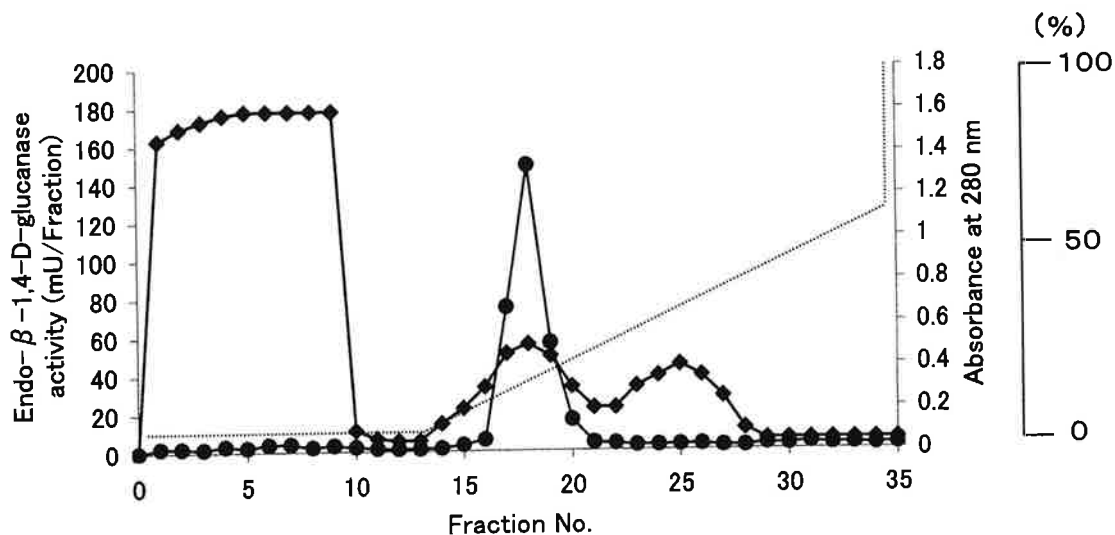


図5 Cf-EG 組換えタンパク質のHiTrap chelating HP (Ni²⁺) カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによる精製。
吸着バッファー, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.5 M NaCl と 5mM イミダゾールを含む); 溶出バッファー, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.5 M NaCl と 500 mM イミダゾールを含む); 溶出速度, 1 ml/min;
●, エンドグルカナーゼ活性; ◆, 吸光度 (280 nm); ……., 溶出バッファー (%)

1分間に 1 μ mol のグルコースに相当する還元糖あるいは *p*-nitrophenol を生成する酵素量を 1 unit とした。

結 果

Cf-EG プライマー対を用いイエシロアリ唾液腺から構築した cDNA ライブラリーを鋳型とし PCR を行った結果、唾液腺 EG 遺伝子の全長 (1347 bp) から終止コドン (3 bp) を除いた 1344 bp の両端に制限酵素認識配列 (20 bp) を付加した 1364 bp に相当する DNA のバンドが、アガロースゲル電気泳動で確認された。同様に *Pg-EG* および *Hm-EG* プライマー対を用いて後腸の cDNA ライブラリーを鋳型とした PCR で、各々 1004 bp と 998 bp に相当する DNA のバンドが確認された (図1)。

発現ベクター pRSET と各 EG 遺伝子との組換え体 (pRSET-*CfEG*, pRSET-*PgEG*, pRSET-*HmEG*) の塩基配列を解析した結果、PCR 増幅時に塩基置換などのエラーが起こっていないことを確認した。これらの組換え体の EG 活性を CMC を基質とした活性染色で検討した。pRSET-*CfEG* と pRSET-*PgEG* 組換え体で培地中の CMC の低分子化に由来するハロ (halos, 図2 の白色部分) が見られ EG 活性が認められた。しかし pRSET-*HmEG* 組換え体では EG 活性を示すコロニーは観察されなかった。EG 活性の見られた pRSET-*CfEG* 組換え体を培養し IPTG により誘導される発現タンパク質の経時変化を SDS-PAGE で追跡したところ、唾液腺エンドグルカナーゼ (*Cf-EG*) の分子量 (48.9 kDa) に近い分子量 (48.2 kDa) をもつタンパク質の増加が確認された (図3)。pRSET-*PgEG* 組換え体では *Pg-EG* の分子

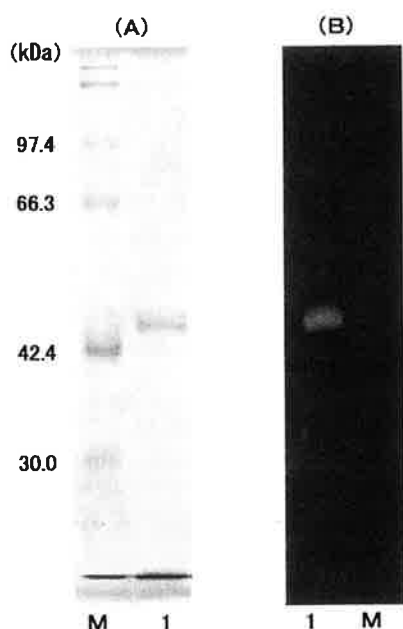


図6 精製 Cf-EG タンパク質の native-PAGE ならびに Zymography.
M, マーカー; 1, 精製 Cf-EG タンパク質; (A), native-PAGE; (B), Zymography.

量 (36.3 kDa) よりも小さな分子量をもつタンパク質の発現が誘導された (図4)。しかしながら, pRSET-CfEG と pRSET-PgEG 組換え体の培養上澄み液, 大腸菌破砕液ならびに大腸菌破砕後の不溶性画分からは EG 活性が検出されなかった。これは, 発現タンパク質が大腸菌内で凝集し, 封入体として存在しているためと考えられる。尿素処理で不溶性画分を可溶化したところ, pRSET-CfEG 組換え体で EG 活性を検出することができた (表2)。

尿素処理で可溶化した Cf-EG 組換えタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製したところ, 画分 18 に EG 活性が検出された (図5)。この画分 18 には, 結晶性セルロース分解活性ならびに β -グルコシダーゼ活性は検出されなかった。一方, 尿素処理で可溶化した Pg-EG 組換えタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで溶出した場合には, 分取されたすべての画分で EG 活性が検出できなかった。精製された Cf-EG 組換えタンパク質 (画分18) を native-PAGE で泳動し Zymography による活性染色を行った結果, CMC の低分子化が観察され, 精製 Cf-EG 組換えタンパク質が EG 活性をもつことが示された (図6)。大腸菌 (pRSET-CfEG 組換え体) 破砕液の不溶性画分を可溶化した粗酵素液ならびにアフィニティークロマトグラフィーによる精製酵素液の EG 活性を表2に示した。

考 察

組換え体の EG 活性を CMC 含有寒天培地の活性染色で検討した結果, pRSET-CfEG と pRSET-PgEG 組換え体には EG 活性が認められたのに対し, pRSET-HmEG 組換え体では EG 活性を示すコロニーが観察されなかった。これら3種類の組換え体に含有されるプラスミドの塩基配列を解析したところ, PCR による増幅の際に DNA 上で塩基の置換が起こっていないこと, および PCR により増幅された EG 遺伝子と発現ベクターとの間でアミノ酸の読取枠がずれていないことが確認された。pRSET-HmEG 組換え体で EG 活性が認められなかった可能性として, EG の発現が大腸菌に対して大きな負荷となり, 大腸菌によるタンパク質生産を阻害していることが考えられる。通常の組換え実験では, 大腸菌におけるタンパク質発現は 1~2 日間の培養で活性が現れることが多いが, シロアリ由来の EG の場合 1 週間培養を続けることで辛うじて pRSET-CfEG と pRSET-PgEG 組換え体の EG 活性を検出することができた。pRSET-HmEG 組換え体による大腸菌に対する負荷が, pRSET-CfEG と pRSET-PgEG 組換え体による負荷よりも大きかったため, pRSET-HmEG 組換え体で EG 活性を検出できなかったものと推測される。

アフィニティークロマトグラフィーで Pg-EG 組換えタンパク質を精製した際に, EG 活性が消失した。セルラーゼなどの酵素は希薄な溶液中では不安定となる。アフィニティークラムへの吸着ならびに溶出により Pg-EG 組換えタンパク質が希釈されたために, EG 活性測定法によって検出できないレベルまで活性が低下したものと推測される。Cf-EG 組換えタンパク質の精製においても, EG 活性の回収率は約 47% (表2) と低く, クロマトグラフィーによる精製の間に EG 活性の低下が起こっていることが示唆される。

これまでにシロアリの EG 組換えタンパク質の活性が確認されたのは, タカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis*) の EG (Nt-EG) を大腸菌で発現させ Zymography で EG 活性を確認した報告 1 件のみである (Tokuda *et al.*, 1999)。イエシロアリでは, 共生原生生物の Pg-EG 組換えタンパク質 (Nakashima *et al.*, 2002a) ならびに Hm-EG 組換えタンパク質 (Watanabe *et al.*, 2002) を大腸菌で発現させ Zymography で EG 活性を確認した報告はあるが, シロアリの EG (Cf-EG) は遺伝子が解析されたのみで (Nakashima *et al.*, 2002b), Cf-EG 組換えタンパク質として発現した例は報告されていない。また, これまでに報告されている Nt-EG, Pg-EG および Hm-EG 組換えタンパク質の EG 活性は Zymography で確認されただけで, 精製タンパク質で EG

表2 組換え Cf-EG タンパク質の精製

精製過程	総タンパク質 (mg)	総EG活性 (mU)*	比活性 (mU/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
大腸菌破砕液 (可溶化後)	53.98	318.0	5.89	100	-
アフィニティー精製	7.30	148.8	20.4	46.8	3.5

* 1 分間に 1 μ mol のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を 1 Unit とした。

活性が検出できるかどうか検討されていない。これは、本研究の Pg-EG 組換えタンパク質のように、Zymography でハロが確認されても、精製すると EG 活性が消失してしまうためと推測される。この理由の一つとして、培養時間と EG 活性の関係が考えられる。すなわち、Zymography では寒天培地上に植菌した大腸菌を 1 週間程度培養することで、徐々に培地中の CMC の低分子化を引き起こすことが可能である。このような CMC の低分子化は、大腸菌から弱い EG 活性をもつ組換えタンパク質が 1 週間に渡り継続的に放出されることによって生じる。この時、培養開始直後に培地上に放出された EG 活性をもつタンパク質が数日間 EG 活性を保ち続ける必要はない。これに対し、組換え EG タンパク質をカラムクロマトグラフィーなどで精製する場合には、液体培地を用いて数時間で EG 活性をもつ組換えタンパク質を大腸菌に生産させることが必要となる。仮に、37°C の液体培地で 1 週間組換え体を培養したとすると、培養開始直後に生産された EG タンパク質は培養開始数日後には培地中で分解され失活するものと予測される。

本研究で精製した Cf-EG 組換えタンパク質の EG 比活性 (表2) は、シロアリから抽出した粗酵素液の EG 比活性 (357.4 mU/mg) (Itakura *et al.*, 1998) の約 1/18 であった。本研究の目的である「EG の作用だけでセルロースが高効率に糖化される機構の解明」のためには、封入体の可溶化方法や組換えタンパク質のリフォールディング (タンパク質立体構造の再構築) など更なる実験方法の改良が必要である。

引用文献

- Inoue, T., S. Moriya, M. Ohkuma and T. Kudo (2005) Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. *Gene*. 349 : 67-75.
- Itakura, S., A. Enoki and H. Tanaka (1998) Partial purification of cellulases from *Coptotermes formosanus* Shiraki and characterization of hydrolysis products from crystalline cellulose by the cellulases (in Japanese). *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* 9 : 148-157.
- Itakura, S., H. Tanaka and A. Enoki (1997) Distribution of cellulases, glucose and related substances in the body of *Coptotermes formosanus*. *Mat. Org.* 31 : 17-29.
- Itakura, S., K. Ueshima, H. Tanaka and A. Enoki (1995) Degradation of wood components by subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Mokuzai Gakkaishi*. 41 : 580-586.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680-685.
- Nakashima, K., H. Watanabe and J.-I. Azuma (2002a) Cellulase genes from the parabasal symbiont *Pseudotriconympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite *Coptotermes formosanus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 : 1554-1560.
- Nakashima, K., H. Watanabe, H. Saitoh, G. Tokuda and J.-I. Azuma (2002b) Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32 : 777-784.
- Somogyi, M. (1951) Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19-23.
- Tokuda, G., N. Lo, H. Watanabe, M. Slaytor, T. Matsumoto and H. Noda (1999) Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. *Biochim. Biophys. Acta*. 1447 : 146-159.
- Watanabe, H., K. Nakashima, H. Saito and M. Slaytor (2002) New endo- β -1,4-glucanases from the parabasal symbionts, *Pseudotriconympha grassii* and *Holomastigotoides mirabile* of *Coptotermes termites*. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 : 1983-1992.

タバコシバンムシ *Lasioderma serricornis* (Fabricius) に対する殺虫剤 (クロルピリホスメチル) を処理した段ボールテープ剤の防除効果

大類 幸夫

日本たばこ産業株式会社 葉たばこ研究所
現在：福島県郡山市

受領：2005年6月1日；受理：2005年9月5日

Effects of a corrugated paper tape formulation of the insecticide (chlorpyrifos-methyl) for controlling the cigarette beetle, *Lasioderma serricornis* (Fabricius). Yukio Orui (Leaf Tobacco Research Center, Japan Tobacco Inc. Oyama, Tochigi 323-0808, Japan). Present address : Koriyama, Fukushima 963-8061, Japan.

Abstract

The effectiveness of a corrugated paper tape (CP tape) formulation of chlorpyrifos-methyl EC (250 mg AI/m²) for controlling adult *Lasioderma serricornis* was evaluated in a room (2.6×5.3 m, and 2.5 m in height). CP tape formulations (2 cm in width) were pasted in the form of a single line (CP tape treatment) on vinyl floor tiles along the walls of the room. As a positive control, chlorpyrifos-methyl EC (250 mg AI/m²) was directly sprayed in lines 15 cm in width (spray treatment) in another room. [KAG1] Effects were evaluated at 4 days after releasing adults from the center of the room. Death rates of adults captured at one day and one month after treatment were 96.4% and 85.2%, respectively, for the CP tape treatment, and 34.9% and 6.2%, respectively, for the spray treatment. In subsequent experiments, four cardboard boxes (27 cm×37 cm, 15 cm in height) containing flue-cured tobacco leaves, were placed in the four corners of the room; CP tape formulations were pasted on the floor around two of the boxes that faced diagonally out (CP tape treatment), but no CP tape formulation was pasted on the floor around the other two (control). The preventive efficacy of the CP tape treatment was evaluated at 2 days after releasing adults from the center of the room. The ratios of the number of the adults invaded into the boxes in the CP tape treatment to that in the control at one day and one month after treatment were 24.5% and 37.4%, respectively. Death rates of adults remained outside of and round the boxes in the CP tape treatment were more than 95% at both one day and one month after treatment. These results show that the effectiveness of CP tape treatment is higher than that of spray treatment, and that the preventive efficacy of CP tape treatment on adult invasion into the source of attraction, here tobacco leaves, is also high.

Key words : *Lasioderma serricornis*, Cigarette beetle, Insecticide, Control, Corrugated paper

タバコシバンムシ成虫に対するクロルピリホスメチル乳剤 (250 mg AI/m²) を処理した段ボールテープ (CPテープ) 剤の防除効果を評価した。部屋 (2.6 m×5.3 m, 高さ 2.5 m) の壁際のPタイル床に、この2 cm幅のCPテープ剤を一直線状に貼りめぐらす処理 (CPテープ処理) と対照として15 cm幅でクロルピリホスメチル乳剤 (250 mg AI/m²) を散布する処理 (噴霧処理) を行った。部屋の中央から成虫を放飼し、放飼4日後に捕獲して生死を調べた結果、処理1日および1か月後の死亡率は、CPテープ処理区ではそれぞれ96.4% および85.2%であったのに対し、噴霧処理区ではそれぞれ34.9% および6.2%であった。次に、部屋の4つのコーナーに各々葉たばこを入れた4個の段ボール箱 (27 cm×37 cm, 高さ15 cm) を配置し、4個のうち対角線に位置する2個の箱周囲の床面にCPテープ剤を貼る処理 (CPテープ処理) をし、残りの2個を無処理とした。部屋の中央から成虫を放飼し、放飼2日後に箱周囲と箱内の成虫を捕獲して生死を調べた結果、CPテープ処理区の箱内への侵入成虫数は無処理区に対して処理1日後で24.5%、1か月後で37.4%に抑制され、CPテープ処理区の箱周辺の死亡率は処理1日後および1か月後とも95%を超えた。以上の結果より、タバコシバンムシ成虫に対するCPテープ処理は噴霧処理より防除効果が高く、誘引源への成虫の侵入阻止効果も高いことが示された。

はじめに

タバコシバンムシ *Lasioderma serricorne* (Fabricius) は、世界中に広く分布し、貯蔵中の葉たばこ、製品たばこ、穀物粉および加工食品の最も重要な害虫の一つである。タバコシバンムシは、主に施設改善、衛生管理およびくん蒸により防除されている。

殺虫剤の噴霧処理は、この害虫に対する総合的害虫管理において適用可能な防除手段の一つである。クロルピリホスメチル、ピリミホスメチルおよびフェニトロチオンなどの殺虫剤は、タバコシバンムシ成虫に対して高い殺虫力を示した (大類, 1993)。また、殺虫剤を処理した材質によって、イエバエ、チャバネゴキブリ、チャタテムシおよびタバコシバンムシなどの各種昆虫の成虫に対する殺虫力の残効性は異なることが報告されている (Chadwick, 1985; Collins *et al.*, 2000; Orui, 2004)。さらに、タバコシバンムシ成虫に対するクロルピリホスメチルの殺虫力は、さまざまな処理材質表面において時間の経過とともに急激に低下することが知られている (Orui, 2004)。

タバコシバンムシ成虫は段ボール断面の波形の隙間に容易に潜入し、そこに長時間定着する。この定着行動と殺虫剤を処理した段ボールを組み合わせた防除方法が考案されている。この方法は、殺虫剤を処理した段ボールと成虫との接触時間を長く確保でき、殺虫力を長期間にわたり維持できることが示された (Orui, 2004)。しかし、この試験は昆虫ケージを用いた小規模な試験であったため、室内においても殺虫剤を処理した段ボールをテープ状に処理する方法がタバコシバンムシ成虫の防除に有効であることを証明する必要がある。そこで、タバコシバンムシ成虫に対してクロルピリホスメチルを処理した段ボールテープ剤の防除効果を床面への噴霧処理の防除効果と比較するとともに、乾燥葉たばこを入れた段ボール箱の中への成虫の侵入阻止効果で評価した。

材料と方法

試験は、2000～2003年に日本たばこ産業株式会社 葉たばこ研究所内の部屋において行った。

供試昆虫

試験に供したタバコシバンムシは、葉たばこ研究所で継代飼育している系統を用いた。飼育は恒温恒湿室内 (27℃, 60% RH および 16L8Dの明暗条件) において、トウモロコシ粉と乾燥酵母 (10:1 w/w) を混合した 200 g の餌を入れた 900 ml のプラスチック容器 (直径 13 cm, 高さ 5.5 cm) で行った。試験には、餌表面に出現した 2 日以内の成虫を用いた。

供試薬剤

薬剤は、市販殺虫剤のレルダン25 乳剤 (有効成分 クロルピリホスメチル 25%, 日産化学工業株式会社) を使用した。

殺虫剤処理段ボールテープの作成法

殺虫剤を処理した段ボールテープは以下の方法で作成した。段ボール (段高 5 mm, 長さ 30 cm 当たり段山数 34±2) を波形コルゲーションに対し直角に 2 cm 幅のテープ状に切断した。次に、クロルピリホスメチルのアセトン希釈溶液を 250 mg AI/m²の薬量割合になるように、この段ボールテープ (長さ 112 cm, 幅 2 cm) にピペットで長さ 8 cm 当たり 0.6 ml を処理した。その後、室温で 1 晩乾燥させ、幅 2 cm の両面テープを段ボールテープの片面に貼りつけて殺虫剤処理段ボールテープ (以下、CPテープ剤) とした。

室内壁際の床面へのCPテープ処理と噴霧処理の防除効果

部屋 (2.6 m×5.3 m, 高さ 2.5 m) の壁際のPタイル床に Fig. 1A に示したように処理当日に作成したCPテープ剤を両面テープで貼った (以下、CPテープ処理)。対照として同一の部屋で日を変えて Fig. 1B に示したようにクロルピリホスメチルの水希釈液を 250 mg AI/m²になるように壁際に面するPタイル床に 15 cm 幅で噴霧器を用いて散布した (以下、噴霧処理)。その後、室内は散布した溶液を乾かすために一晩放置した。

成虫が室内から逃亡するのを防止するため、部屋のドアと流し台の隙間はビニールテープで塞いだ。試験期間中は室内を 27℃, 16L8D の明暗条件で管理し、湿度調整しなかった。それぞれの処理法の防除効果は、処理 1 日後および 1 か月後に部屋の中央の床面から 4000 頭の成虫を放飼し、放飼 4 日後に床から捕獲した成虫の死亡率で評価した。生死の判定は正常に歩行できない個体を死亡とした。試験は一つの部屋を用いて日を変えて行い、それぞれの処理を 3 回繰り返した。

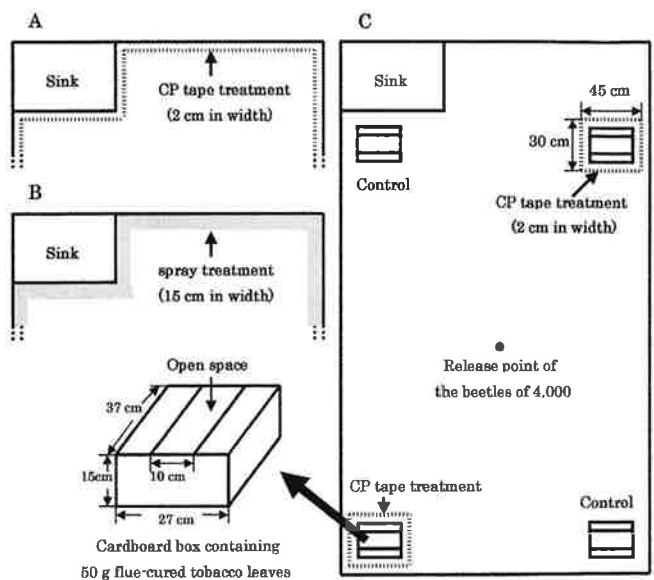


Fig.1 Examination methods against adults *Lasioderma serricorne* using the room (2.6 m×5.3 m, 2.5 m in height) of vinyl floor tiles. A: Examination of effect of CP tape treatment. B: Examination of effect of spray treatment. C: Preventive efficacy examination of CP tape treatment.

CPテープ処理による乾燥葉たばこを入れた段ボール箱内への成虫の侵入阻止効果

誘引源として 50 gの乾燥葉たばこ（品種：つくば2号）をナイロン網（30メッシュ）のカバーのついたプラスチック容器（26 cm×32 cm×12 cm）に入れ、この容器をさらに上面に 10×37cm の隙間を開けた段ボール箱（27 cm×37 cm、高さ 15 cm）に入れた。この段ボール箱を Fig.1C に示したように部屋（2.6 m×5.3 m、高さ 2.5 m）の各コーナーに 1 個ずつ 4 つのコーナーに置いた後、対角線上の 2 個の段ボール箱のまわりの床に処理当日に作成した CP テープ剤を両面テープで貼り（CP テープ処理）、残りの 2 個は無処理とした。CP テープ処理による箱内への成虫の侵入阻止効果は、処理 1 日後に部屋の中央の床面から 4000 頭の成虫を放飼し、放飼 2 日後に箱の中心から直径 60 cm 以内の箱の周囲と箱の中にいた成虫を捕獲して生死を判定し、評価した。また、処理 1 か月後の侵入阻止効果は、殺虫剤を処理した直後に 27℃、60% RH、16L8D の明暗条件の部屋に 1 か月間保存した CP テープ剤を用い、上述した試験方法により評価した。

部屋の構造の影響を除去するために CP テープ処理区と無処理区のそれぞれのコーナーを試験ごとに入れ替えた。2 か所の CP テープ処理区と 2 か所の無処理区の成虫の合計数を 1 反復のデータとして扱い、これらのデータを t 検定で比較した。試験は一つの部屋を用いて日を変えて行い、それぞれの処理を 4 回繰り返した。

結果と考察

室内壁際の床面への CP テープ処理と噴霧処理の防除効果

CP テープ処理および噴霧処理による防除効果の評価結果を Fig.2 に示した。処理 1 日後の死亡率は、CP テープ処理で 96.4%、噴霧処理で 34.9%であり、CP テープ処理の防除効果は噴霧処理よりも顕著に高かった。処理 1 か月後の死亡率は、CP テープ処理で 85.2%、噴霧処理で 6.2%であった。CP テープ処理は処理 1 か月後でも 85% を超える死亡率が維持され、噴霧処理の死亡率は顕著に低下した。また、処理 1 か月後の CP テープ処理の死亡率は処理 1 日後の噴霧処理より顕著に高かった。

CP テープ処理と噴霧処理における顕著な防除効果の差異は、次のような成虫の行動様式と殺虫剤の有効成分の消失によるものと推察される。部屋の床面の中央で放飼したタバコシバンムシ成虫の大部分は、床面を放飼点からほぼ同心円に歩行で広がり、一部の成虫は飛翔した。成虫が歩行により壁の近くに到達したとき、CP テープ処理では、成虫の大部分が CP テープ剤の中に潜り込み定着したが、噴霧処理では、成虫の大部分が床と壁の境目で停止することなく壁を登り、天井に向けて歩行した。CP テープ処理で処理 1 か月後でも高い防除効果を維持できた要因は、成虫の段ボールへの潜り込みおよび定着行動によるものと推定される。一方、25℃でのタバコシバンムシ成虫が 15 cm の距離を歩行するのに必要な時間は 12.5 秒（大類、未発表）と短い。噴霧処理では、15 cm 幅で処理された殺虫剤と歩行成虫の接触時間が短いために防除効果が低くなったと考

えられる。

噴霧処理では処理 1 か月後に防除効果が顕著に低下した。殺虫剤の有効成分の消失は、蒸散、光分解、化学分解、清掃による除去、昆虫による持ち去りおよび表面への吸収作用から起こる（Chadwick, 1985）。噴霧処理において処理 1 か月後の防除効果が低くなった要因は、主に殺虫剤の有効成分の蒸散および分解であると推定される。

本試験において CP テープ処理に使った殺虫剤の薬量は、噴霧処理の 2/15 であったが、処理 1 か月後の CP テープ処理の死亡率は処理 1 日後の噴霧処理よりも約 2.5 倍高かった。つまり、CP テープ処理は噴霧処理より著しく少ない薬量で、噴霧処理より著しく高い防除効果を長期間にわたって維持できることが証明された。

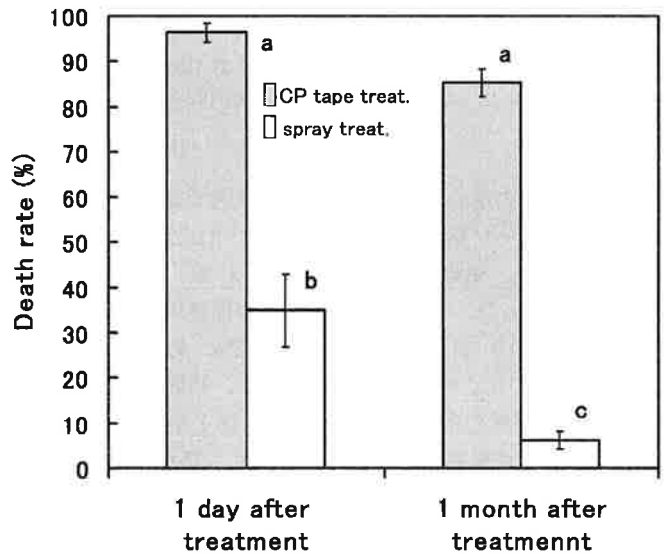


Fig.2 Comparison of death rates against adults *Lasioderma serricorne* between CP tape treatment and spray treatment in the room. Death rates were subjected to the arcsine square root-transformation before analysis. Bars with the different letters are significantly different at the 5% level by the Turkey's test. Values are means \pm standard errors of three replications.

CPテープ処理による乾燥葉たばこを入れた段ボール箱内への成虫の侵入阻止効果

CP テープ処理による段ボール箱内への成虫の侵入阻止効果の評価した結果を Table 1 に示した。箱の中への侵入成虫数は、処理 1 日後の CP テープ処理区で 100.3 頭、無処理区で 408.8 頭であり、CP テープ処理区では侵入成虫数が顕著に少なかった。また、同様に処理 1 か月後においても CP テープ処理区で 140.5 頭、無処理区で 375.8 頭であり、CP テープ処理区では侵入成虫数が少なかった。無処理区の侵入成虫数に対する CP テープ処理区の侵入成虫数の割合は、処理 1 日後で 24.5%、1 か月後で 37.4%であった。このことは、処理 1 か月後でも CP テープ処理が箱の中への成虫の侵入を明らかに抑制したことを示している。また、CP テープ処理区において箱の中に侵入した成虫の死亡率は、処理 1 日後で 18.9%、処理 1 か月後で 13.2% であり、無処理区の死亡率よりも高かった。

Table 1 Preventive efficacy of corrugated paper tape formulation (2 cm in width) of chlorpyrifos-methyl (250 mg AI/m²) on the invasion of adults *Lasioderma serricorne*¹⁾ into the cardboard boxes containing flue-cured tobacco leaves in the room.

Days after treating with the insecticide	Total No. of adults captured ²⁾	adults invaded into the cardboard box		adults remained outside of and round the cardboard box		Death rate in the total No. of adults captured (%)
		No.	death rate (%)	No.	death rate (%)	
1 day after:						
CP tape treatment	1,432.6	100.3 **	18.9	1,332.3 **	98.0	92.5
control	509.1	408.8	1.2	100.3	7.5	2.4
CP tape treatment/control		24.5 %		13.3		
1 month after:						
CP tape treatment	1,158.8	140.5 **	13.2	1,018.3 **	95.6	85.6
control	469.6	375.8	1.2	93.8	11.7	3.3
CP tape treatment/control		37.4 %		10.9		

Data shown are the mean of four experiments. The means significantly different from control by the paired t-tests are indicated ** $p < 0.01$

1) The adults of 4,000 were released at the center of the room floor.

2) Total No. of adults captured in a circle with ca. 60 cm diameter at the center of the cardboard box.

段ボール箱の中心から直径 60 cm 以内で捕獲された成虫数は、CPテープ処理区の処理 1 日後で 1,332.3 頭、その死亡率は 98.0%、処理 1 か月後で 1,018.3 頭、その死亡率は 95.6% であった。一方、無処理区での捕獲成虫数は、処理 1 日後で 100.3 頭、その死亡率は 7.5%、処理 1 か月後で 93.8 頭、その死亡率は 11.7% であった。箱周辺で捕獲した成虫数および死亡率は処理 1 日後および 1 か月後とも CP テープ処理区が無処理区より著しく多く、高かった。

無処理区の箱周辺や箱内に死亡個体が存在していたことは、CPテープ剤に接触した個体が無処理区の箱の方に移動して死亡したことを示している。また、CPテープ処理区の箱周囲で捕獲成虫数が著しく多かったのは、箱周辺に近づいてきた大部分の成虫が CP テープ剤に定着し、その殺虫効果で死亡したためと考えられる。CPテープ処理により箱周囲での死亡率が 95% を超えたことから、大部分の成虫は箱へ侵入する前に CP テープ剤により死亡し、箱内への侵入数が著しく少なくなったと推測される。

箱内への成虫の侵入を CP テープ処理で完全に抑えきれなかった原因としてタバコシバンムシ成虫が飛翔により直接箱に到達した可能性がある。また、歩行によって箱へ侵入した場合でも CP テープ剤に定着しなかった成虫は殺虫剤との接触時間が短く、致死に至らなかった可能性がある。ただし、CPテープ処理において箱内に侵入した成虫の死亡率は処理 1 日後で 18.9% および処理 1 か月後 13.2% を示しており、箱内へ侵入した個体でも CP テープ剤との接触時間の長さに応じて遅効的に死亡したと思われる。本試験の結果、CPテープ処理は葉たばこなどの誘引源に誘引されたタバコシバンムシ成虫を長期にわたり侵入阻止して被害を軽減できることを示している。

CPテープ剤の最大の特徴は、噴霧処理に比べて少量の薬剤で顕著な防除効果が期待できることである。また、CPテープ剤は噴霧処理より長い残効性を示し、CPテープ剤は殺虫剤を浸透・吸着させているため噴霧処理のような薬剤飛散のリスクが少ない。必要に応じて CP テープ剤を

移動できるため薬剤が直接原料や商品に触れるリスクが少なく、限定された場所への CP テープ剤の利用が可能である。さらに、必要に応じて CP テープ剤を除去できるなどのメリットがある。

ヒラタコクヌストモドキ、ヒメカツオブシムシおよびマダラカツオブシムシは段ボールの構造を好むことから、段ボールがトラップの材料として用いられている (DeCoursey, 1931; Barak and Burkholder, 1976)。CPテープ剤は、これらの昆虫種の防除においても有効と思われる。今後は、CPテープ処理する方法として両面テープに代わる技術を開発し、CPテープ処理の設置労力を軽減させるとともに、適用場所を拡大していく必要がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多くのご助言をいただいた日本たばこ株式会社 葉たばこ研究所の原田晴康氏に感謝申し上げます。

引用文献

- Barak, A. V. and Burkholder, W. E. (1976) Trapping studies with dermestid sex pheromones. *Environ. Entomol.* 5: 111-114.
- Chadwick, O. R. (1985) Surfaces and other factors modifying the effectiveness of pyrethroids against insects in public health. *Pestic. Sci.* 16: 383-391.
- Collins, P. J., Nayak, M. K. and Kopittke, R. (2000) Residual efficacy of four organophosphate insecticides on concrete and galvanized steel surfaces against three Liposcelid psocid species (Psocoptera: Liposcelidae) infesting stored products. *J. Econ. Entomol.* 93: 1357-1363.
- DeCoursey, J. D. (1931) A method of trapping the confused flour beetle, *Tribolium confusum* Duval. *J. Econ. Entomol.*

24 : 1379-1381.
大類幸夫 (1993) タバコシバンムシの殺虫剤感受性および数
種殺虫剤の殺虫特性. 葉たばこ研究所報告 3 : 125-134.
Orui, Y. (2004) Method for increasing the residual efficacy

of insecticides on the cigarette beetle, *Lasioderma
serricorne* (F.) (Coleoptera Anobiidae) using adult
settling behavior. *Appl. Entomol. Zool.* 39 : 107-112.