HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	北海道の土壌から分離された Bacillus thuringiensis : 喜茂別町、蘭越町、ニセコ町からの分離株
Author(s)	菊田, 治典; KIKUTA, Harunori; 浅野, 真一郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(4), 383-389
Issue Date	1989-09-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12113
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(4)_p383-389.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農邦文紀要 16(4): 383～389, 1989

北海道の土壌から分離された *Bacillus thuringiensis*

―― 喜茂別町，蘭越町，ニセコ町からの分離株 ――

菊田治典
(北海道文理科短期大学)

浅野真一郎・飯塚敏彦
(北海道大学農学部蚕学講座)

(平成元年6月3日受理)

Isolates of *Bacillus thuringiensis* from soil at Hokkaido

—Strains from Kimobetsu-cho, Rankoshi-cho and Niseko-cho—

Harunori KIKUTA
(Experimental Station, Hokkaido College of Arts and Science, Ebetu 069)

Shinichiro ASANO and Toshihiko IIZUKA
(Laboratory of Sericology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

I. 緒　　言

Bacillus thuringiensis はグラム陽性の桿状菌で対数成長末期の胞子形成期に結晶タンパク質を産生する。この結晶を昆虫が経口的に消化管内に取り入れたとき，消化液中でアルカリ分解，酵素分解をうけはじめて腸管麻痺ならびに全身麻痺をともなう殺虫活性を示すことから δ-endotoxin と呼ばれる[9]。

B. thuringiensis の産生する結晶タンパク質は，一般にダイヤモンド型 (diamond-shaped)，重ピラミッド形 (bipyramidal)，偏菱型立方体 (rhomboidal) と呼ばれる形態をしている。結晶タンパク質は芽胞のう内で，芽胞とならんで形成され，芽胞のうの時期を経て芽胞とともに菌体外に遊離する[8]。

B. thuringiensis の分類は DE BARJAC and BONNEFOI[5] の提案による鞭毛抗原 (H-antigen) に基づいて行なわれており，serotype 23 までの亜種ならびに鞭毛抗原をもたない *wuhanensis* 亜種とあわせて24亜種(33菌株)が報告されている[17]。しかし，同じ serotype の中にも異なる性質をもった菌株が見いだされている[11,12,20,28]。

B. thuringiensis の各菌株の産生する結晶タンパク質は，一般に鱗翅目昆虫に対して選択的に殺虫活性を示すことで知られていた。しかし，近年，通常の重ピラミッド形結晶タンパク質以外に，不定形立方体の結晶を産生する菌株が報告されるなど，結晶形態が通常の重ピラミッド形とは異なる不定形立方体 (irregular)，ならびに，立方体形 (cuboidal) をした亜種が次々と見いだされた[2,22,23]。これらの中には，蚊の幼虫に強い殺虫活性を示す菌株も報告された[4,7,28]。さらに，通常，1芽胞当り1個の結晶タンパク質が形成されるが，1芽胞当り2個ないし3個形成される菌株も発見された[24]。

本毒素は易分解性のポリペプチドであることから環境を汚染しない微生物農薬 (BT 剤) としてすで実用化されている。*B. thuringiensis* の結晶タンパク質遺伝子 (Crystal Protein gene : CP gene) は通常菌体内の複数のプラスミド DNA にコードされており，すでにいつかの亜種で結晶タンパク質遺伝子がクローニングされ，塩基配列も決定されている[11,12]。さらにクローニングされた CP gene を植物体に移入する研究が盛んに行われ，タバコ等いくつかの植物において成功例が報告されている[30]。そのため，より殺虫性の高い遺伝子の検索が強く望まれている。

B. thuringiensis は自然環境の中に多数存在すると考

えられ，わが国でも調査報告が多数ある。しかし，養蚕保護からの報告が多く，*B. thuringiensis* の自然環境中における増殖過程など不明な点が多い[2]。

本報は北海道の自然環境での菌の分布を明らかにするとともに各地の土壌から優れた殺虫活性を持つ *B. thuringiensis* の検索を目的として実験し，いくつかの新しい知見を得たので報告する。

II. 材料および方法

1) 供試土壌

1988年秋に渡島支庁管内喜茂別町，蘭越町，ニセコ町からそれぞれ採集地を選び土壌を採集した。

喜茂別町は中山峠付近のイタドリ密集地 (NKY 1) およびカエデ科樹下 (NKY 2) の2地点から土壌採集を行った。採集土壌はイタドリ密生地では礫が多く含まれ堆積物も少なかった。カエデ科樹下は流土の流れ込み付近で肥沃だった。

蘭越町は自然環境の良く保存されている昆布温泉郷の5地点で土壌の採集を行った。即ち，桜樹下 (KNB 1)，笹密生地 (KNB 2, KNB 3)，カエデ科樹下 (KNB 4, KNB 5) いずれの地点も堆積物が豊富で肥沃な土壌だった。

ニセコ町は五色温泉の2地点で土壌を採集した。即ち，ナナカマド樹下 (GSK 1) および白樺樹下 (GSK 2) であり，土壌の状況はいずれも火山礫，火山灰の土壌であった。

2) *B. thrungiensis* の分離

採集された土壌は 10 mg ずつ秤量し，滅菌した三角フラスコに入れ 10 mℓ の滅菌蒸留水を注入し 30 分間振盪した後，暫時静置した。その上澄み液 2 mℓ を採り直ちに 98°C で 10 分間加熱した。加熱液は 10 倍，100 倍の2段階希釈し，各々 1 mℓ を普通培地 (肉エキス 0.3%，ペプトン 0.3%，寒天 1.5%，pH 7.0) と共に 9 cm のペトリ皿で，30°C，24～48 時間培養した。得られたコロニーはすべて普通斜面培地に植え 30°C 4日～6日間培養し，結晶タンパク質の形成を待ち，芽胞と結晶の識別染色を行なった後，位相差顕微鏡により結晶タンパク質産生の有無を観察した。結晶タンパク質の認められた菌株は，さらに走査電子顕微鏡観察を行い結晶形態を詳細に観察した。

3) 電子顕微鏡用試料の作成

走査電子顕微鏡観察のための試料作成は IIZUKA *et al.*,[14] を改変した。即ち，普通斜面培地に移植後 30°C で 4日～6日間培養した菌株を1白金耳とり滅菌蒸留水に浮遊混和させ，結晶タンパク質と芽胞の浮遊液を作成した。浮遊液は 1 cm のガラス円盤の試料台にのせ自然乾燥させ，カーボンおよび金蒸着の後，走査電子顕微鏡 (日本電子 JSM-SI) で観察した。

4) 結晶タンパク質の精製

B. thuringiensis は結晶タンパク質のほかに，培地中に溶出してくる菌体外毒素 β-exotoxin を含んでいる。この毒素を除くため以下の処理を行なった。寒天培地で培養した細菌に 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を加え集菌し遠心分離 (10,000 rpm/15 min.) して *B. thuringiensis* のペレットを得た。さらに溶出してくる夾雑物と胞子の除去のために，YAMAMOTO *et al.*,[31] にしたがいペレットに 1 M 食塩を加え，浮遊液を強く振盪し発泡させ表面に浮遊してくる芽胞が多数含まれる泡を除去，再び遠心分離して上澄み液を捨てる一連の手順を3回繰り返した。つづいて，滅菌蒸留水で洗浄，遠心分離の後デシケータで7日から10日間乾燥し *B. thuringiensis* の一部芽胞を含む結晶タンパク質の粉末を得た。この方法で芽胞は約50%除去された。

5) カイコに対する殺虫活性試験

分離された *B. thuringiensis* のカイコに対する活性試験は1988年11月下旬に行なった。1 mℓ の滅菌蒸留水に対し，前述の方法で精製した *B. thuringiensis* の粉末 10 mg を混和浮遊させた。この浮遊液に 6% sucrose 液になるようショ糖を加え段階希釈し，各段階希釈液をマイクロシリンジで直接カイコに 2 μℓ 経口投与した。

カイコの死亡の判定は48時間飼育の後ガラス棒で物理的刺激を加え，反応を示さないものを死亡とした。

供試カイコは北海道大学農学部蚕学教室保存の日140号×支140号の五齢起蚕とし，50% 桑葉を含む人工飼料で飼育し実験に供した。

6) SDS-polyacrylamide gel (8% gel) 電気泳動法 (SDS-PAGE)

本実験における結晶タンパク質の分析は IIZUKA *et al.*,[16,17] にしたがい 8% の SDS-PAGE で行なった。SDS-PAGE における試料の調整は上記の方法で得た *B. thuringiensis* の粉末 10 mg に 2% 2-MeEtOH 1 mℓ を加え浮遊混和させ pH 10.0 に調整した後，氷中に 30 分間放置した。これに 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) を加え 6 M HCl で pH 8.0 に調整の後 10% SDS を加え 100°C 2分間加熱して SDS-PAGE に供した。

電気泳動用試料 (25 μℓ) は等量の sample buffer (26 mM Tris (pH 8.0)-2% SDS-5% 2-mercaptoethanol-10% glycerol-0.1% bromophenol blue) と混合し，7

mA で約 20 時間泳動した。この際，タンパク質分子量の指標として molecular weight standard-High (Bio-Rad) を用いた。

電気泳動後の gel は Coomassie blue 染色液 (0.1% Coomassie blue R-250, 7.5% acetic acid, 40% methanol) 40 分間染色の後，脱色液 (10% acetic acid-45% methanol) でで脱色し泳動パターンを観察した。

III. 結果および考察

日本における *B. thuringiensis* の分離は，養蚕農家の連作の原因として調査された[21]。従って分離源は養蚕農家のホコリを中心に行なわれ，subspp. *sotto*, *dendrolimus* ほか数多くの亜種が得られている。その後，OHBA, *et al.*,[24,25] は養蚕農家のホコリのみならず，土壌からも新しい *B. thuringiensis* を分離して subspp. *tohokuensis*, *kumamotoensis*, *kyushuensis* を得た。しかし北海道からの *B. thuringiensis* の分離の報告がないため，著者らは北海道各地の土壌ならびに死亡昆虫から本菌の分離を行なった。

ニセコ町，蘭越町，喜茂別町の 3 町 9 調査地点から採集した土壌から分離された *B. thuringiensis* は Table 1 に示した。ニセコ町五色温泉の調査地 (GSK 1 および GSK 2) からは各々 2 株，計 4 株分離された。蘭越町昆布温泉調査地 KNB 1 からは 4 株，KNB 2 および KNB 3 から各々 1 株，KNB 4 から 4 株，KNB 5 から 3 株，計 13 株が分離された。また喜茂別町中山峠調査地 NKY 1 から 3 株，NKY 2 から 6 株分離された。分離された菌株数は，調査地点による顕著な差異はなかった。このことは，*B. thuringiensis* は土壌中において栄養条件や競合微生物によって栄養細胞の増殖が起こりにくいとしている報告[1,2,29] を裏付ける結果となった。

Table 1. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil in the forest

Location	Spots in the forest	No. of Isolates
Niseko-cho	GSK 1	2
Gosiki hot spring	GSK 2	2
	KNB 1	4
	KNB 2	1
Rankosi-cho Konbu hot spring	KNB 3	1
	KNB 4	4
	KNB 5	3
Kimobetu-cho	NKY 1	3
Nakayama pass	NKY 2	6
Total	9	26

B. thuringiensis の各菌株の結晶タンパク質は特に突然変異を誘起させる選抜を行わないかぎりこの産生能は失われない。またその形態も継代を重ねる中で変異しない *B. thuringiensis* の固有遺伝形質と考えられ，1 つの分類学的群をなしている[11,12,14]。

B. thuringiensis の産生する結晶タンパク質について，は電子顕微鏡観察による各亜種の比較検討は多数報告されている[6,14]。それらによると大きく 4 タイプに大別できる。即ち，重ピラミッド形 (bipyramidal) 結晶，立方体形 (cuboidal) 結晶，不定形立方体 (irregular) 結晶および芽胞と結晶の付着形であり，これらの単体か組合せで構成されている。本実験でも 1 例を除き同様の結果を

Table 2. Insecticidal activity of isolates against 5th-instar silkworm larvae

Strains	LD 50 μg	Identification by protein type**
GSK 1-1	4.00	*kurstaki* HD 1-variation
GSK 1-2	(—)*	*dakota*
GSK 2-1	(—)	irregular
GSK 2-2	(—)	*indiana*
KNB 1-1	0.62	*kurstaki* HD 1
KNB 1-2	(—)	*indiana*
KNB 1-3	(—)	*indiana*
KNB 1-5	0.62	untypable
KNB 2-2	(—)	*dakota*
KNB 3-2	4.00	*kurstaki* HD 1
KNB 4-1	(—)	*dakota*
KNB 4-3	2.67	*kurstaki* HD 1
KNB 4-4	(—)	*indiana*
KNB 4-6	(—)	*darmstadiensis*
KNB 5-1	8.00	*kurstaki* HD 1-variation
KNB 5-2	(—)	untypable
KNB 5-3	(—)	*finitimus*
NKY 1-1	(—)	irregular
NKY 1-2	(—)	*dakota*
NKY 1-3	0.36	*kurstaki* HD 1
NKY 2-1	4.00	untypable
NKY 2-2	(—)	*finitimus*
NKY 2-5	0.62	*kurstaki* HD 1
NKY 2-6	(—)	*finitimus*
NKY 2-9	4.00	*kurstaki* HD 1
NKY 2-10	(—)	irregular

* (—) shows in no activity against the silkworm.
** The characterization was shown in Table 3.

得た。

結晶タンパク質の形態と殺虫活性は密接に関係していることから走査電子顕微鏡による観察と SDS-PAGE による解析およびカイコに対する殺虫性検定は結晶タンパク質毒素利用の面から分離株選抜の有効な手段であると考えられる。即ち，これらの手法を併用することによって鞭毛抗原による従来の分類方法では得られない同じ亜種内の殺虫活性の強い菌株の選抜が可能になる。また同定にも有効であった。(Table 2)

SDS-PAGE 解析の利用は，すでに報告されている[17] 鱗翅目に殺虫活性を有する 130～145 kdal と 65 kdal の protoxin，ならびに 130～135 kdal, 65 kdal, 28 kdal の蚊の幼虫（双翅目）に殺虫活性を有する protoxin との比較が可能になる。従って分離されたすべての菌株について結晶タンパク質を走査電子顕微鏡で観察し Plate I～Plate IV に，同様に全ての菌株について SDS-PAGE で結晶タンパク質の解析を行い，その泳動パターンは Plate V ～VIII に示した。

これらの各菌株は SEM による結晶形態をもとに大別され，Table 3 に示した。group 1 (a), (b) は bipyramidal 結晶と cuboidal 結晶をともに産生する群である。この群は subsp. *kurstaki* HD-1 および subsp. *kenyae* に属する[17]。しかし，Plate V に示した SDS-PAGE によるタンパク質パターンは，飯塚，寺江 (1989)[19] の subsp. *kurstaki* HD-1 に一致した。この中の 1-(b) に属する GSK 1-1 と KNB 5-1 は SEM ならびに SDS-PAGE の結果 bipyramidal 結晶より cuboidal 結晶の方が多いため subsp. *kurstaki* の中では新しい株とした。なお，NKY 2-1, KNB 5-2, KNB 1-5 は結晶形態ならびに SDS-PAGE によるタンパク質パターンが subsp. *kurstaki* HD-1 に一致しないため untypable とした。

Group 2 は bipyramidal 結晶のみを産生する群であるがタイプ亜種のタンパク質パターンの結果（飯塚，木村，未発表）と比較し subspp. *indiana*, *dakota* に別れた。group 3 の polyploidy bipyramidal に属する KNB 4-6 は結晶形態が従来のどの亜種にも属しないため serotype による同定を行った[18]。その結果 subsp. *darmstadensis* としてすでに報告されている[27,15] 74 E-37-14 株にやや結晶形態が似ているため SDS-PEGE を行って比較した (Plate IX)。この結果，タンパク質パターンはそれぞれ異なっていたため，KNB 4-6 は新しい株と認めた。ONO *et al.*,[26] は日本国内から分離される *B. thuringiensis* は subsp. *alesti* が多いことを報告している。また，OHBA *et al.*,[21] も東北から沖縄まで詳細に調査し subspp. *alesti*, *aizawai*, *kenyae*, *kurstaki* など bipyramidal 結晶の他に cuboidal および irregular 結

Table 3. Classification of isolates in *Bacillus thuringiensis* from soil at Niseko-cho, Rankoshi-cho, and Kimobetsu-cho

Group	Crystal shape	Identification by protein type	Strains	Number of strains
1	bipyramidal & cuboidal			
	(a) bipyramidal>cuboidal	*kurstaki* HD-1	NKY 1-3, NKY 2-5, NKY 2-9 KNB 1-1, KNB 3-2, KNB 4-3	6
	(b) bipyramidal<cuboidal	*kurstaki* HD-1		
		new type	KNB 5-1, GSK 1-1	2
		untypable	NKY 2-1, KNB 5-2	2
		untypable	KNB 1-5	1
2	bipyramidal	*indiana*	KNB 1-2, KNB 1-3, KNB 4-4, GSK 2-2	4
		dakota	NKY 1-2, KNB 2-2, KNB 4-1, GSK 1-2	4
3	polyploidy bipyramidal	*darmstadiensis**	KNB 4-6	1
4	bipyramidal attached with spore	*finitimus*	NKY 2-2, NKY 2-6, KNB 5-3	3
5	irregular	Untypable	NKY 1-1, NKY 2-10, GSK 2-1	3

* KNB 4-6 was identified as subsp. *darmstadiensis* by H-serotype.

晶を持つ group を数多く分離している。

本試験でも bipyramidal 結晶および cuboidal 結晶を持つ group 1 が最も多く分離されたが，タンパク質パターンで subsp. *kurstaki* HD-1 タイプ6株および subsp. *kurstaki* HD-1 タイプ新変異2株株をタイプ分けし，ONO, *et al.*,[26] とは異なった。

Group 2 の bipyramidal 結晶だけを持つ一群は，全菌株の約30%の8株分離された。bipyramidal 結晶を持つ亜種は *thuringiensis, sotto, indiana, dakota, kumamotoensis* および *dendrolimus* など多数あり，それら各 subsp. は結晶タンパク質形態からは識別できない。しかし，タンパク質パターンによると2種に大別された。

PADUA, *et al.*,[27] によると 74-E-37-14 株はコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus*, チカイエカ *C. molestus*, ネッタイシマカ *Aedes aegypti*, カイコ *Bombyx mori*, アメリカシロシトリ *Hyphantria cunea* に殺虫活性を示さないことが報告されている。KNB 4-6 も種々の昆虫で活性試験を行う必要があり，本試験においてはカイコに殺虫活性を示さなかった。

Group 4 は subsp. *finitimus* タイプで結晶タンパク質が芽胞に付着している。これはマメコガネの milky disease の病原菌 *Bacillus popilliae* と類似した形態をしており，きわめて特徴的で光学顕微鏡でも容易に識別された。この3株の SDS-PAGE は特に処理することなく付着している状態のままで行ったが 135 kdal のタンパク質が認められた。

Group 5 は結晶タンパク質形態が irregular 形をしているタイプで，これらのタイプには subspp. *israelensis, aizawai, ostriniae, kyushuensis* 等があり，結晶タンパク質形態では NKY 1-1 および GSK 2-1 が subsp. *israelensis* に結晶形態が類似していた。しかし，NKY 2-10 は極めて球に近く，他の菌株とは異なる形態が観察された。この3株でタンパク質パターンは共通性が得られなかった。殺虫活性試験ではいずれもカイコに活性を示さなかった。

IV. 摘　　要

1) 喜茂別町，蘭越町およびニセコ町の山林の土壌から *B. thuringiensis* を 26 株分離した。

2) 結晶タンパク質の形態と SDS-PAGE 解析結果は密接に関連し，SDS-PAGE と SEM による形態観察を併用することによって *B. thuringiensis* を大別することができた。

3) 本試験で分離した *B. thuringiensis* 26 株を SEM と SDS-PEGE 泳動パターンで5 group に大別した。

4) bipyramidal および cuboidal 結晶を持つ group 1 に属する菌株が全体の分離株の中で優位を占めた。

5) group 1 に属する菌株がカイコに対し殺虫活性を示し他の group は活性を示さなかった。

6) bipyramidal 変形の結晶を持つグループ3に属する KNB 4-6 は H-serotype によるで同定を行い subsp. *darmstadensis* とされ，カイコに殺虫活性を示さず，74-E-37-14 株と結晶形態は類似したが SDS-PEGE の解析パターンが異なった。グループ 1-(b) に属する株は結晶形態が明らかに bipyramidal より cuboidal が多い subsp. *kurstaki* HD-1 の新しいタイプであった。

文　　献

1. 秋葉芳夫・関島安隆・鮎沢啓夫・藤吉宣男： *Bacillus thuringiensis* に関する微生物生態学的研究 II. 滅菌土壌中における *Bacillus thuringiensis* 菌数の消長． 応動昆 **21**: 41-46. 1977
2. 秋葉芳夫： *Bacillus thuringiensis* に関する微生物生態学的研究 VII. カイコおよびアメリカシロヒトリの体内における *B. thuringiensis* の消長. 応動昆 **30**: 99-105. 1986
3. BONNEFOI, A. and DE BARJAC, H.: Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la determination de l'antigene flagellaire. Entomophaga **7**: 221-229. 1963
4. DE BARJAC, H.: Toxicite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelens is* pour lrs larver *d'Aedes aegypti* et *d'Anopheles stephansi*. Compt Rend. Acad. Sci (Paris) **286**: 1175-1178. 1978
5. DE BARJAC, H. and BONNEFOI, A.: Essai de classification biocimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga **7**: 5-31. 1962
6. FAUST, R. M., ADAMS, J. R., ABE, K., IIZUKA, T. and BULLA, L. A.: Comparative morphology and size distribution of the parasporal crystals from various subspecies of *Bacillus thuringiensis*. J. Sericult. Sci. (Japan) **51**: 316-324. 1982
7. HALL, I. M., ARAKAWA, K. Y., DULMAGE, H. D. and CORREA, J. A.: The pathogenicity of strains of *Bacillus thuringiensis* to larvae of *Aedes* and *Culex mosquitoes*. Mosquito news **37**: No. 2. 1977
8. HANNAY, C. L.: Crystalline inclusion in aer-

obic spore-forming bacteria. Nature, **172**: 1004. 1953

9. HEIMPEL, A. M.: A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev., Entomology. **12**: 287-322. 1967
10. IIZUKA, T. and GOTO, C.: Toxic effect of crystal protein from *Bacillus thuringiensis* on *Bombyx mori* and *Mamestra brassicae*. J. Sericult. Sci. (Japan) **56**: (5), 379-384. 1987
11. IIZUKA, T., FAUST, R. M. and TRAVERS, R. S.: Detection and characterization of naturally occurring plasmids in *Bacillus cereus* isolation by agarose gel electrophoresis. J. Fac. Agri. Hokkaido Univ. **60**: 143-151. 1981
12. IIZUKA, T., FAUST, R. M. and TRAVERS, R. S.: Isolation of covalently closed circular DNA from *Bacillus thuringiensis* subspp. *tohokuensis*, *kumamotoensis* and *tochigiensis*. J. Sericult. Sci. (Japan) **50**: 120-133. 1981
13. 飯塚敏彦: *Bacillus thuringsensis* subsp. *darmstadiensis*. 結晶性毒素の形態とプラスミド. 東北蚕糸研究報告 No. **7**: 5. 1982
14. 飯塚敏彦・石埜正穂・中島敏夫: 昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* の結晶性毒素の形態とプラスミド DNA. 北大農邦文紀要 **13**: (3) 423-431. 1982
15. IIZUKA, T., FAUST, R. M., OHBA, M.: Comparative profiles of plasmid DNA and morphology of parasporal crystals in four stains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. Appl. Ent. Zool. **18**(4): 486-494. 1983
16. IIZUKA, T. and YAMAMOTO, T.: Possible location of the mosquitocidal protein in the crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.: FEMS microbiology Letters **19**: 187-192. 1983
17. 飯塚敏彦: 殺虫性タンパク質とその利用. 化学と生物. **27**(5): 287-302. 1989
18. IIZUKA, T., ASANO, S., KIKUTA, H. and OHBA, M.: Identification and characterization of non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* against the silkworm. Proc. of XXII Annual Meeting of SIP (in print). 1989
19. 飯塚敏彦・寺江尚子: *Bacillus thuringiensis* 結晶タンパク質の SDS-PAGE 解析. 日蚕雑 **58**, (印刷中). 1989
20. KRYWIENCZYK, J., DULMAGE, H. T. and FAST, P. G.: Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var *kurstaki*.: J. Invertebr. Pathol. **31**: 372-375. 1978
21. OHBA, M., and AIZAWA K.: Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. **32**: 303-309. 1978
22. OHBA, M. and AIZAWA, K.: A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* posessing 11a: 11c flagellar antigenetic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*.: J. Invertebr. Pathol. **33**: 387-388. 1979
23. 大庭道夫・鮎沢啓夫: *Bacillus thuringiensis* subsp. *ostriniae* および subsp. *wuhanensis* の性状に関する若干の知見. 九州病害虫研究会報 **25**: 125-128. 1979
24. OHBA, M., AIZAWA, K. and SHIMIZU, S.: A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* (serotype 17).: J. Invertebr. Pathol. **38**: 307-309. 1981
25. OHBA, M., ONO, K., AIZAWA, K. and IWANAMI, S.: Two new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (serotype 18) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* (serotype 19).: J. Invertebr. **38**: 184-190. 1981
26. 小野恵子・渡辺 仁: わが国における *Bacillus thuringiensis* の地域分布について. 日蚕雑 **52**: (1), 47-50. 1983
27. PADUA, L. E., OHBA, M. and AIZAWA, K.: The isolates of *Bacillus thuringiensis* Serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae.: J. Invertebr. Pathol. **36**: 180-186. 1980
28. REEVES, E. L. and GARCIA, JR. C.: Pathogenicity of bicrystalliferous *Bacillus* isolate for *Aedes aegypti* and other aedine mosquito larvae. Proc. IV International Colloquium on Insect pathol.: College Park, Maryland USA. 219-228. 1970
29. 関島安隆・秋葉芳男・小野恵子・鮎沢啓夫・藤吉宣男: *Bacillus thuringiensis* に関する微生物生態学的研究 I. 桑園土壌へ散布した *Bacillus thuringiensis* 菌数の消長. 応動昆 **21**: 35-40. 1977
30. VAECK, M., REYNAERTS, A., HÖFTE, H., JANSENS, S., DE BEUCKELEER, M., DEAN, C., ZABEAU, M., VAN MONTAGU, M., LEEMANS, J.: Transgenic plants protected from insect

attack. Nature, **328**: No. 6128, 33–37. 1987
31. 山本敬司・飯塚敏彦： *Bacillus thuringiensis* の生産する殺虫性菌体内毒素. 蛋白質核酸酵素 **29**: 444–454. 1984

Summary

1) 26 strains of *Bacillus thuringiensis* were isolated from soil of 9 points in the forest at Kimobetsu-cho, Rankoshi-cho, and Niseko-cho in Hokkaido.

2) The crystal shape of these strains were observed by Scanning Electron Microscope and crystal protein was analyzed by SDS-PAGE.

3) By the above mentioned, the 26 strains of *B. thuringiensis* were classified into following 5 groups.

4) The number of strains belong to group 1 which produces the bipyramidal and cuboidal form crystals occupied common strains in the total numbers of isolates.

5) Only strain belongs to group 1 was toxic against the silkworm.

6) The strain belongs to the group 3, KNB 4-6 produces polyploidy bipyramidal form crystal and was identified as subsp. *darmstadiensis* by H-serotype. This strain was non-toxic activity against the silkwom. The crystal shape of this strain has resembled to 74-E-37-14, but peptide pattarn on SDS-PAGE was different with 74-E-37-14. Group 1-b was the strains that produce much numbers of cuboidal form crystals than bipyramidal form crystals. This group was the new type within subsp. *kurstaki* HD-1.

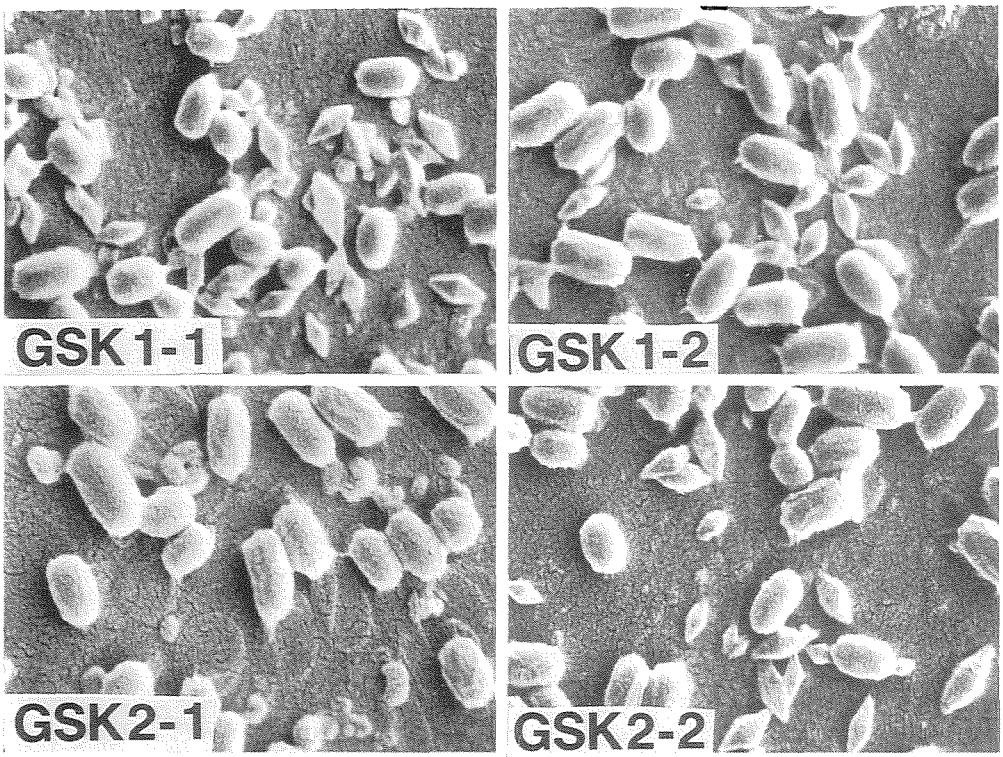

Plate I. Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *Bacillus thuringiensis*. (×10,000)

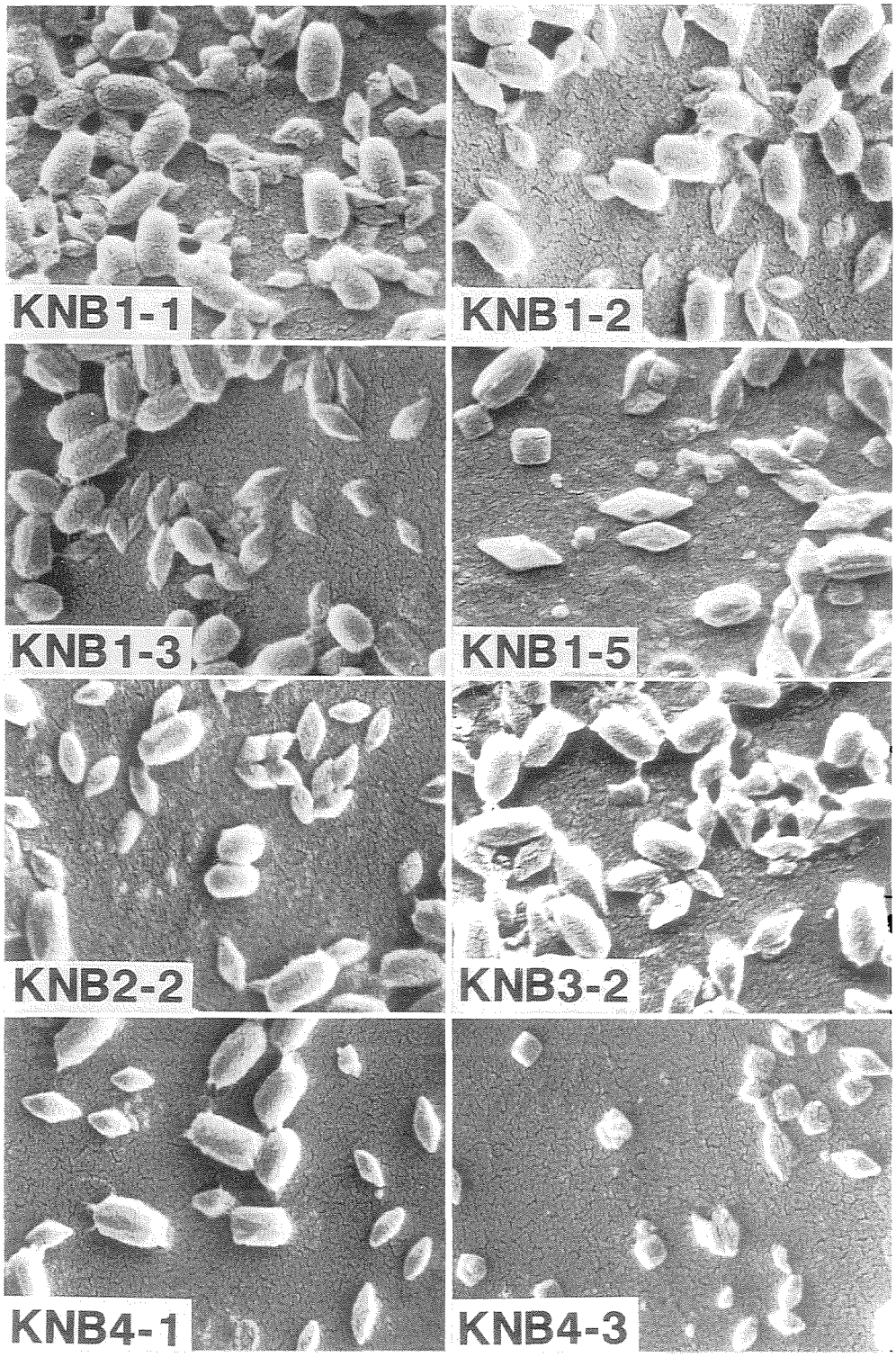

Plate II. Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *B. thuringiensis.* (×10,000)

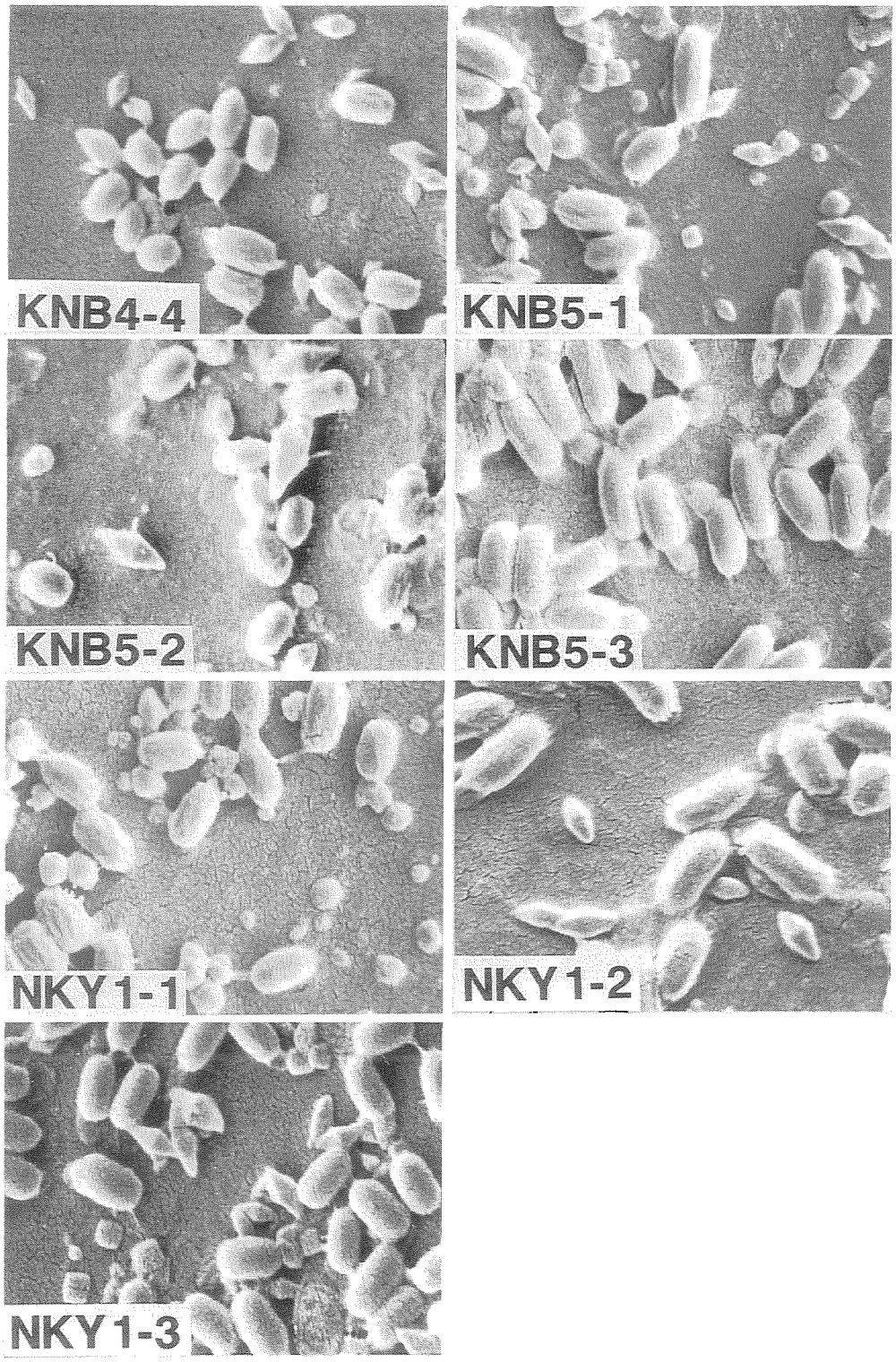

Plate III. Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *B. thuringiensis*. (×10,000)

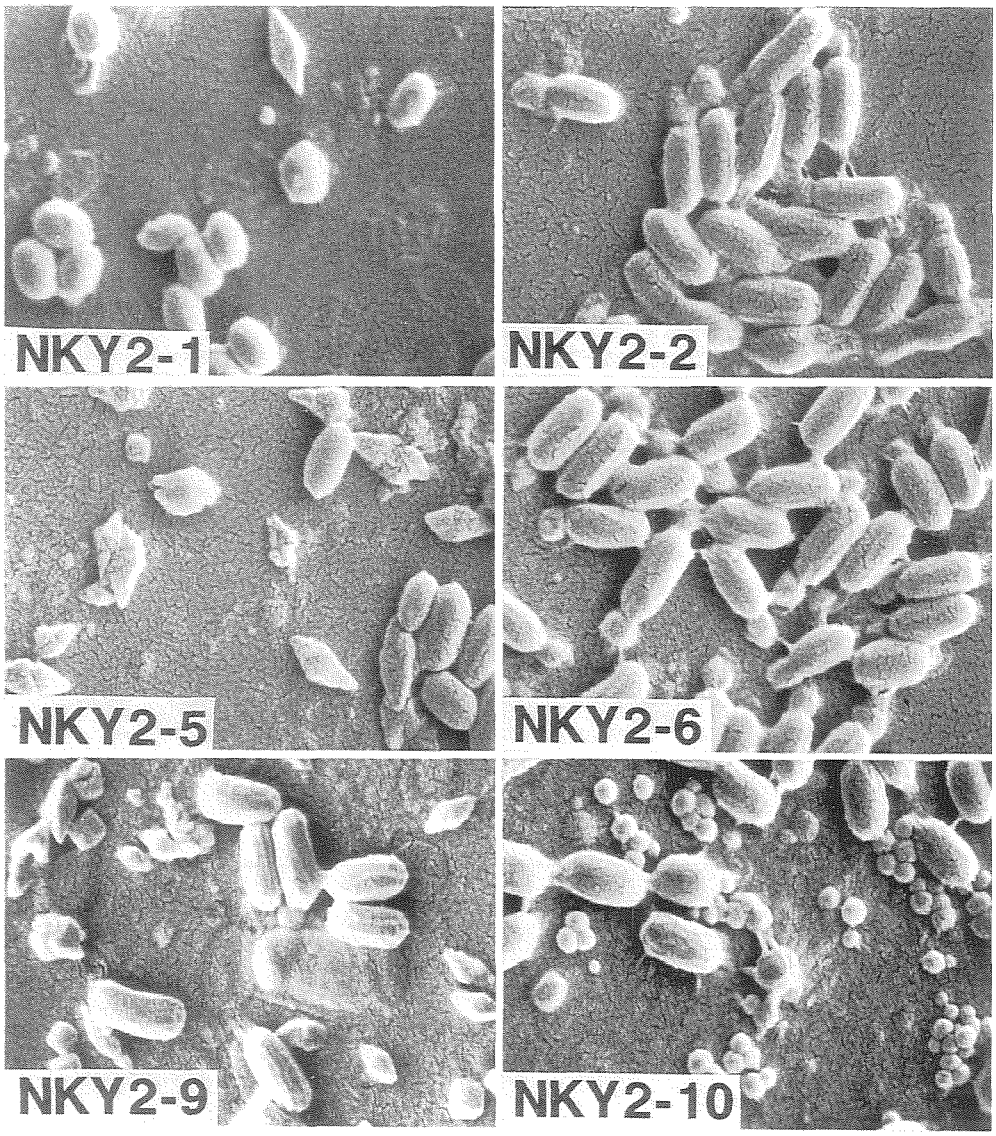

Plate IV. Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *B. thuringiensis*. (×10,000)

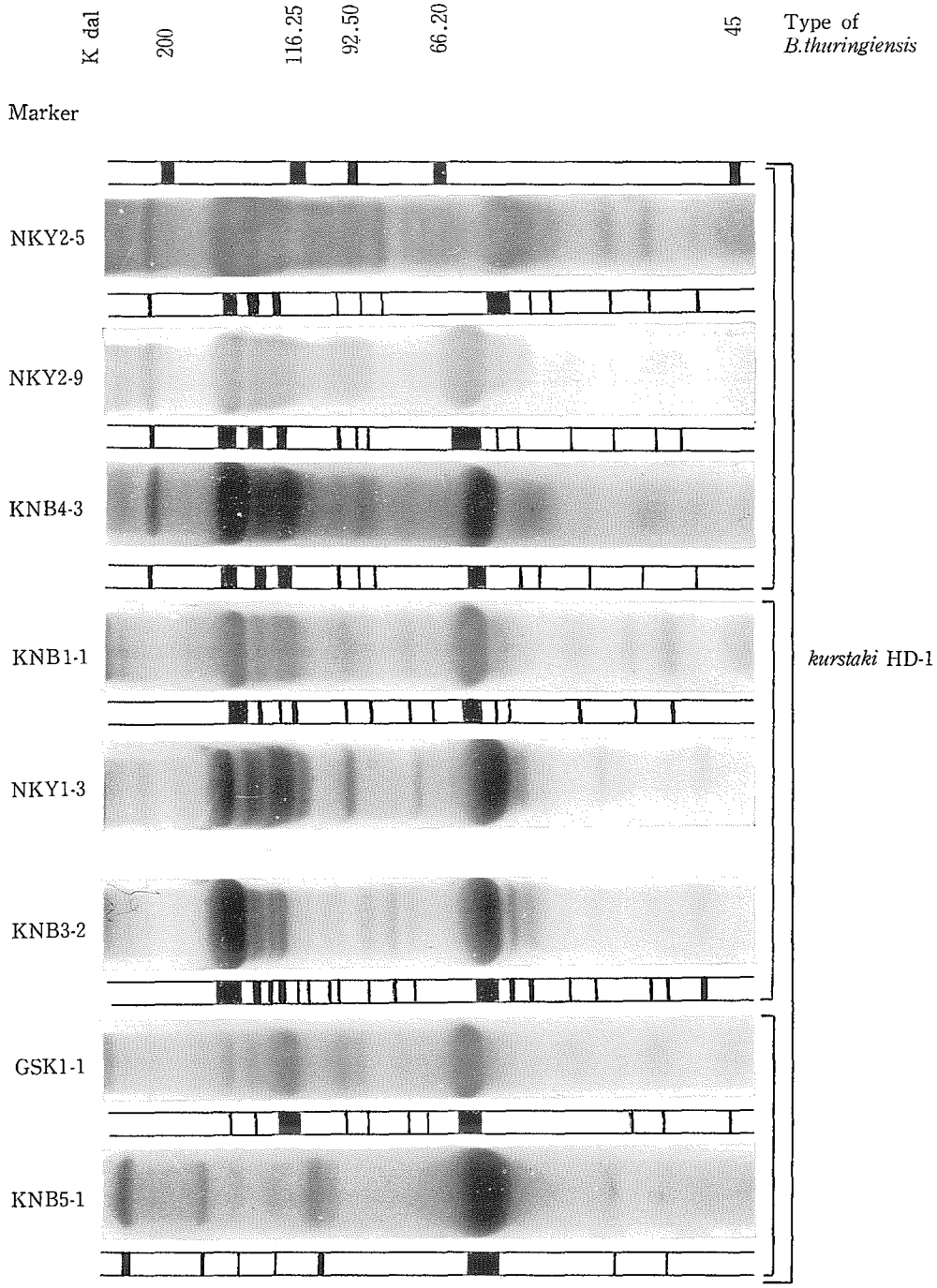

Plate V. Analysis of crystal protein in the isolates by sodium dodecyl sulphite (SDS)-polyacryl amide gel electrophresis (PAGE).

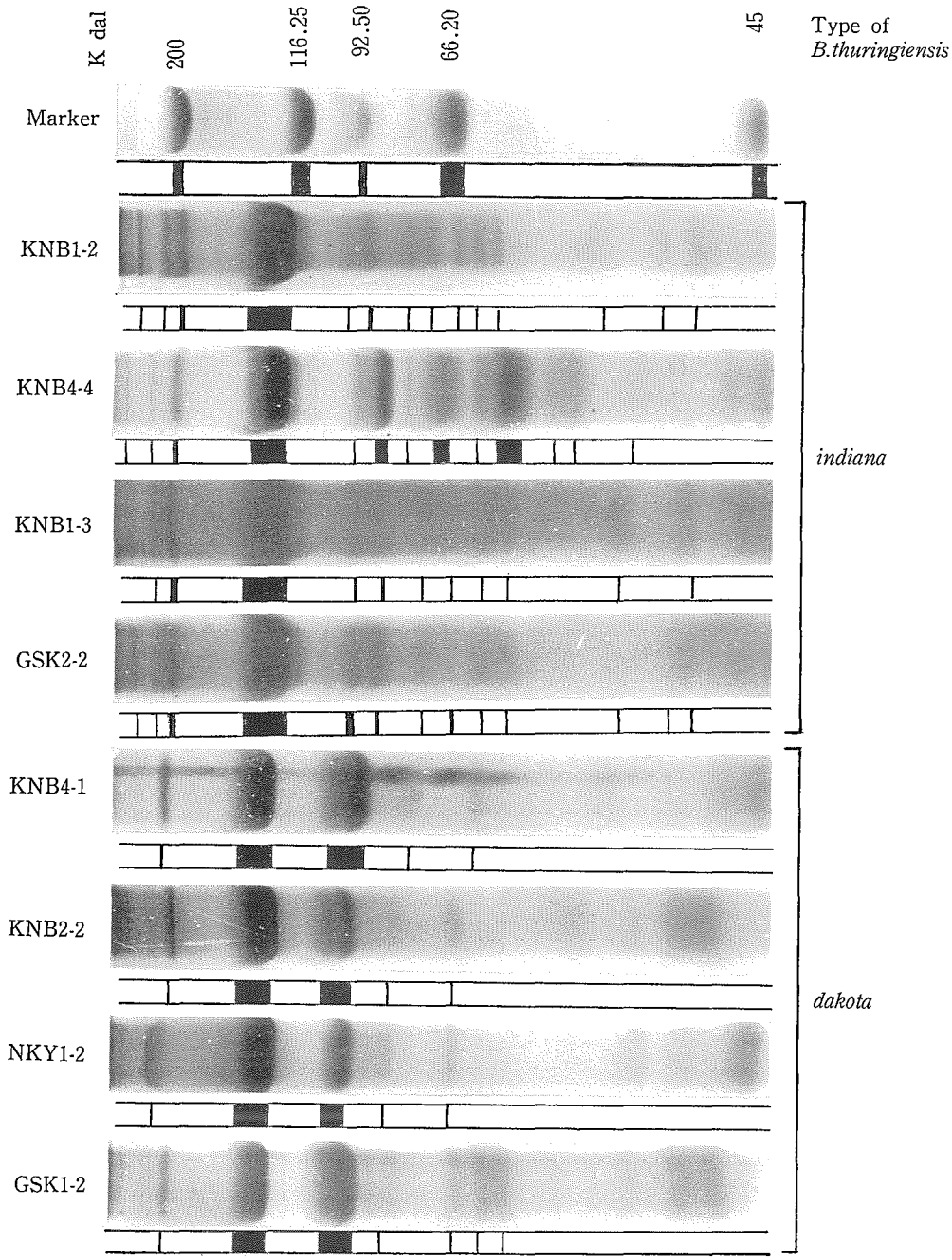

Plate VI. Analysis of crystal protein in the isolates by SDS-PAGE.

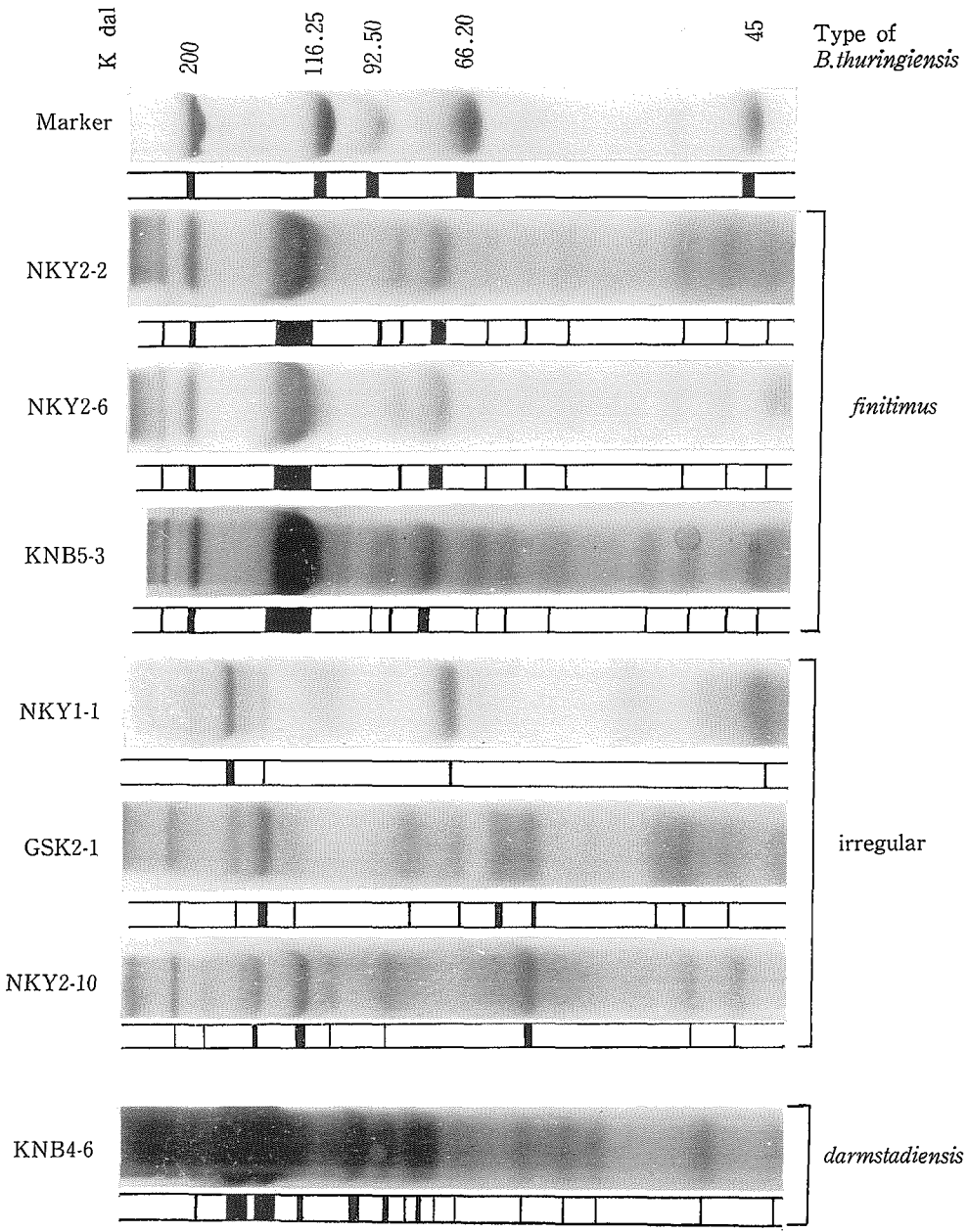

Plate VII. Analysis of crystal protein in the isolates by SDS-PAGE.

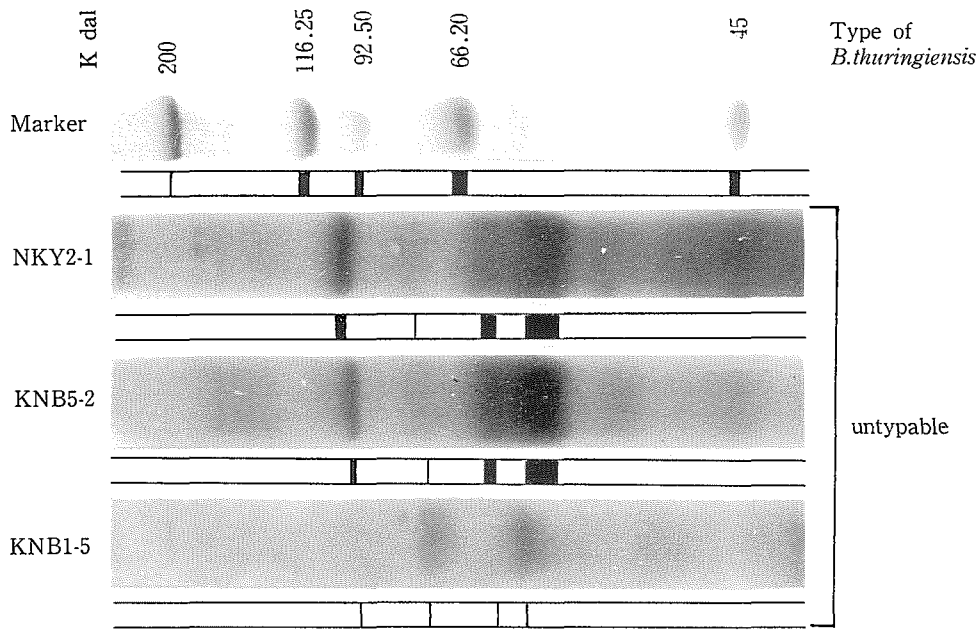

Plate VIII. Analysis of crystal protein in the isolates by SDS-PAGE.

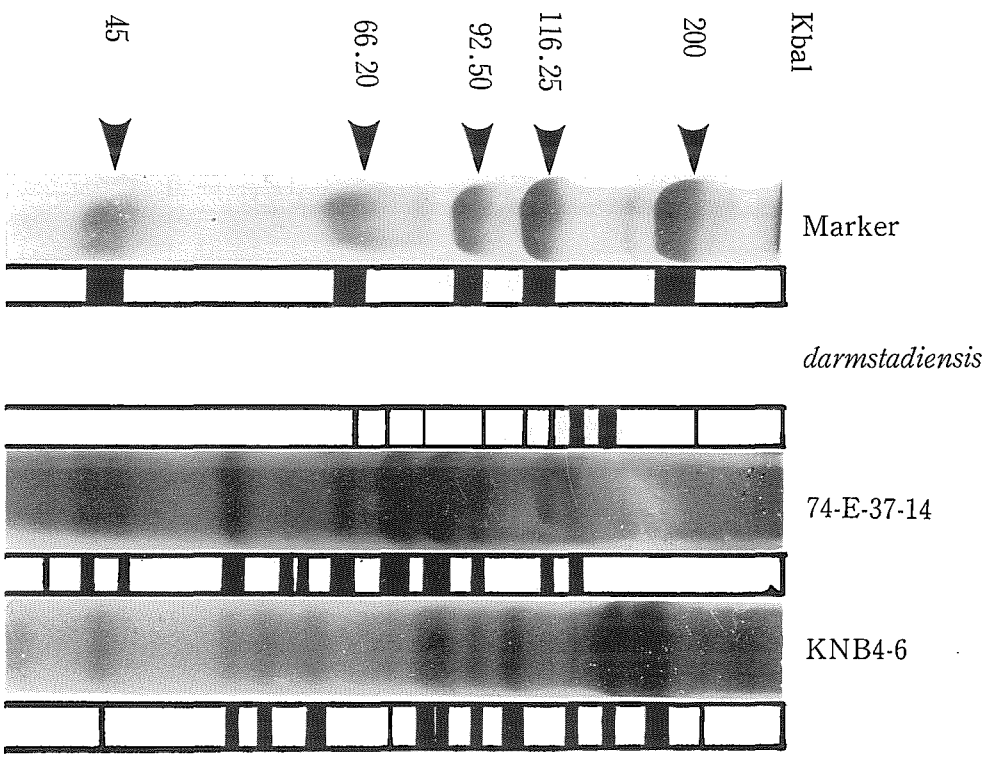

Plate IX. Analysis of crystal protein in subsp. *darmstadiensis*, 74 E-37-14, and KNB 4-6 by SDS-PAGE.