

学位論文題名

Bacillus thuringiensis 株の分離・同定ならびに新規
B. thuringiensis 株の有する *cry* 遺伝子の解析

学位論文内容の要旨

*B. thuringiensis*は、鱗翅目・双翅目・鞘翅目等の昆虫に特異的殺虫活性を示す結晶タンパク質を産生する。この性質から*B. thuringiensis*は、微生物農薬として利用されている。近年、Bt製剤の利用の増加とともに、新しいBt製剤の開発という面から、自然界から新しい殺虫活性を有する株の検索が盛んに行われている。本研究では、北海道およびインドネシアの土壌から多数の*B. thuringiensis*を分離するとともに、菊田(1990)が報告した、結晶タンパク質の性状による*B. thuringiensis*の分類法、ならびに浅野(1995)が報告したPCRによる*cry*遺伝子検索法を用い、さらに従来行われている鞭毛抗原型による分類も併せて行うことで、新しい性状を有する*B. thuringiensis*株あるいは新しいタイプの*cry*遺伝子を発見することを目的とした。その結果、興味深い性質を有する serovar *kurstaki* INA-02と serovar *sotto* SKW01-10.2-06(SKW株)を得た。これら新規*B. thuringiensis*株については、各菌株の保有する*cry*遺伝子を解析することにより、新たな知見を得たので以下に報告する。

1. 新規 serovar *kurstaki* INA-02の性状

INA-02株は、コナガ、ハスモンヨトウ等の鱗翅目と、鞘翅目昆虫であるニジュウヤホシテントウに対して殺虫活性を示す株として選抜された。しかしPCRによる*cryI*~*cryIV*遺伝子の検索では、*cryIA(a)*遺伝子のみが検出された。INA-02株の*cryIA(a)*遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させて殺虫活性を調べたところ、この発現タンパク質はハスモンヨトウやニジュウヤホシテントウに対して殺虫活性を示さないことが明らかになり、INA-02株には*cryIA(a)*以外に、ハスモンヨトウやニジュウヤホシテントウに対して殺虫活性を有する*cry*遺伝子が存在する可能性が示唆された。このため、INA-02株が鱗翅目と鞘翅目昆虫両方に殺虫活性を有するTailor et al. (1992)により報告された*cryV*遺伝子が存在するかどうかを調査した結果、従来の*cryV*遺伝子に極めて相同性の高い*cryV*_{INA-02}が存在することを確認した。さらにINA-02株からクローニングした*cryV*_{INA-02}遺伝子を結晶非産生株であるBt51株で発現させ、CryVタンパク質が

ハスモンヨトウに対しても殺虫活性を示すことも報告した。このように、殺虫活性と*cry*遺伝子検索の結果を併せて考察することで、まだ知られていない新しい活性を持つ遺伝子の検索を可能にした。また、クローニングした*cry*遺伝子を大腸菌あるいは結晶を産生しない*B. thuringiensis*株で発現させることで、鱗翅目と鞘翅目昆虫両方に殺虫活性を示す*cryVINA-02*遺伝子にコードされる発現タンパク質の性状を明らかにした。以上のような手法は、新しい殺虫活性を有する*B. thuringiensis*株を検索するための極めて有効な方法であると考えられる。

また、本研究で得られた*cryVINA-02*は、難防除害虫であるハスモンヨトウを含む鱗翅目昆虫に殺虫活性を有しているとともに、鞘翅目昆虫にも殺虫活性を示すことから、今後害虫防除に有効に利用される菌株となる。

2. 新規serovar sotto SKW01-10.2-06(SKW株)の性状

SKW株は球状、菱形、サイコロ型の3タイプの結晶タンパク質を産生していた。PCRによる*cry*遺伝子検索の結果、本SKW株は*cryIA(b)*と*cryIIA*遺伝子を有することが明らかとなった。serovar sotto標準株は従来*cryIA(a)*と*cryIA(b)*のみを保有している。本SKW株が*cryII*遺伝子を有することは、蚊の幼虫に対しても殺虫活性を示すことを意味しており、新規の殺虫活性スペクトラムを有する菌株の発見となった。一方、この後、ひきつづき既知の*cryII*遺伝子とSKW株の有する*cryII*遺伝子の性状を比較する目的で、SKW株から*cryII*遺伝子(*cryII(SKW)*)をクローニングし、塩基配列の決定を行った。また、*cryII(SKW)*と*cryIIA*をBt51株で発現させ、両者の殺虫活性を比較した。その結果、*cryII(SKW)*と*cryIIA*は、コードするタンパク質のアミノ酸配列が95.4%という高い相同性を示したにもかかわらず、カイコに対する殺虫活性の強さに違いが認められた。CryII(SKW)とCryIIAタンパク質のわずかなアミノ酸配列の違いが、感受性昆虫に食下されたときの中腸内でのタンパク質の安定性や、昆虫中腸上皮細胞に存在するとされるレセプターへの結合の強さに影響を及ぼし、このような活性の強さに現れてきている可能性も考えられ、CryIIタンパク質の殺虫活性機構を研究する上で興味深い材料となった。

また*cryIIA*遺伝子は、3つのORFからなるオペロンの3番目のORFとして存在しており、CryIIAタンパク質の結晶化には*cryIIA*遺伝子上流にある2番目のORF、*orf2*の産物が必要であるという報告がされている。本研究においても*cryII(SKW)*の上流の塩基配列の決定を行ったところ、*cryIIA*と同様に、2つのORFが存在していた。CryII(SKW)タンパク質の結晶化にも*orf2*の産物が必要であるかどうかを調査するために、*cryII(SKW)*を*cryIA(a)*遺伝子のプロモーターを利用してBt51株で発現させた結果、結晶形成が確認され、CryII(SKW)タンパク質では*orf2*の産物が必要ではないという可能性が示唆された。この性質の違いが、CryII(SKW)タンパク質を発現させる際の*B. thuringiensis*宿主によるのか、あるいは*cryII(SKW)*と*cryIIA*遺伝子の塩基配列の構造上の違いによるのかを明らかにすることが今後の課題となった。また、*orf1(SKW)*

と*orf2*(*SKW*)にコードされるタンパク質が、どのように*cry II*(*SKW*)の発現に関わっているのかを検討することが、*cry II*遺伝子の発現機構の解明に繋がるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	飯塚敏彦
副査	教授	上田一郎
副査	教授	三上哲夫
副査	助教授	伴戸久徳

学位論文題名

Bacillus thuringiensis 株の分離・同定ならびに新規 *B. thuringiensis* 株の有する *cry* 遺伝子の解析

本論文は、総頁数92頁、表9、図25からなる和文論文で、他に参考論文8編が添えられている。

*B. thuringiensis*は、鱗翅目・双翅目・鞘翅目等の昆虫に特異的殺虫活性を示す結晶タンパク質を産生する。この性質から*B. thuringiensis*は、微生物農薬として利用されている。近年、Bt製剤の利用の増加とともに、新しいBt製剤の開発という面から、自然界から新しい殺虫活性を有する株の検索が盛んに行われている。本研究では、北海道およびインドネシアの土壌から多数の*B. thuringiensis*を分離するとともに、従来行われている鞭毛抗原による分類法に加えて、PCR法によって作成した殺虫性結晶タンパク質遺伝子である各*cry*遺伝子のDNAプローブを基に新しいタイプの*B. thuringiensis*を得ることを目的とした。その結果、興味深い性質を有する serovar *kurstaki* INA-02 と serovar *sotto* SKW01-10.2-06(SKW株)を得た。これら新規*B. thuringiensis*株については、各菌株の保有する*cry*遺伝子を解析することにより、新たな知見を得たので以下に報告する。

1. 新規 serovar *kurstaki* INA-02 の性状

INA-02株は、コナガ、ハスモンヨトウ等の鱗翅目と、鞘翅目昆虫であるニジュウヤホシテントウに対して殺虫活性を示す株として選抜された。しかしPCRによる*cryI*~*cryIV*遺伝子の検索では、*cryIA(a)*遺伝子のみが検出された。INA-02株の*cryIA(a)*遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させて殺虫活性を調べたところ、この発現タンパク質はハスモンヨトウやニジュウヤホシテントウに対して殺虫活性を示さないことが明らかになり、INA-02株には*cryIA(a)*以外に、ハスモンヨトウやニジュウヤホシテントウに対して殺虫活性を有する*cry*遺伝子が存在する可能性が示唆された。このため、INA-02株が鱗翅目と鞘翅目昆虫両方に殺虫活性を有するTailor et al. (1992)により報告された*cryV*遺伝子が存在するかどうかを調査した結果、従来の*cryV*遺伝子に極めて相同性の高い

*cryVINA-02*が存在することを確認した。さらにINA-02株からクローニングした*cryVINA-02*遺伝子を結晶非産生株であるBt51株で発現させ、CryVタンパク質がハスモンヨトウに対しても殺虫活性を示すことも報告した。このように、殺虫活性と*cry*遺伝子検索の結果を併せて考察することで、まだ知られていない新しい活性を持つ遺伝子の検索を可能にした。

また、本研究で得られた*cryVINA-02*は、難防除害虫であるハスモンヨトウを含む鱗翅目昆虫に殺虫活性を有しているとともに、鞘翅目昆虫にも殺虫活性を示すことから、今後害虫防除に有効に利用される菌株となる。

2. 新規serovar *sotto* SKW01-10.2-06(SKW株)の性状

SKW株は球状、菱形、サイコロ型の3タイプの結晶タンパク質を産生していた。PCRによる*cry*遺伝子検索の結果、本SKW株は*cryIA(b)*と*cryIIA*遺伝子を有することが明らかとなった。serovar *sotto*標準株は従来*cryIA(a)*と*cryIA(b)*のみを保有している。本SKW株が*cryII*遺伝子を有することは、蚊の幼虫に対しても殺虫活性を示すことを意味しており、新規の殺虫活性スペクトラムを有する菌株の発見となった。一方、この後、ひきつづき既知の*cryII*遺伝子とSKW株の有する*cryII*遺伝子の性状を比較する目的で、SKW株から*cryII*遺伝子(*cryII(SKW)*)をクローニングし、塩基配列の決定を行った。また、*cryII(SKW)*と*cryIIA*をBt51株で発現させ、両者の殺虫活性を比較した。その結果、*cryII(SKW)*と*cryIIA*は、コードするタンパク質のアミノ酸配列が95.4%という高い相同性を示したにもかかわらず、カイコに対する殺虫活性の強さに違いが認められた。CryII(SKW)とCryIIAタンパク質のわずかなアミノ酸配列の違いが、殺虫活性にも違いを与えており、CryIIタンパク質の殺虫活性機構を研究する上で興味深い材料となった。

また*cryIIA*遺伝子は、3つのORFからなるオペロンの3番目のORFとして存在しており、CryIIAタンパク質の結晶化には*cryIIA*遺伝子上流にある2番目のORF、*orf2*の産物が必要であるという報告がされている。本研究においても*cryII(SKW)*の上流の塩基配列の決定を行ったところ、*cryIIA*と同様に、2つのORFが存在していた。本*cryII(SKW)*における*orf2*の発現産物は、その存在がなくてもBt51株では結晶を形成したことから、*cryIIA*と*cryII(SKW)*とは遺伝子の発現機構が異なることが判明した。

以上のように本研究は、新規微生物農薬の開発に貢献する点大きい。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者佐々木潤は、博士(農学)の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。