

学位論文題名

PCR法による *Bacillus thuringiensis cry* 遺伝子同定法の  
確立と新規 *B. thuringiensis* 菌株の発見

学位論文内容の要旨

本論文は、総頁数85頁、表13、図19からなる和文論文で、他に参考論文13編が添えられている。

*Bacillus thuringiensis*は、土壤に生息する芽胞形成菌で、近縁な種である *B. cereus*とは芽胞形成時に殺虫性結晶タンパク質（ICP）を産生するという点で区別されている。*B. thuringiensis*は、近年、環境に優しい微生物農薬として特に注目をあびている害虫防除剤である。*B. thuringiensis*は通常、鞭毛抗原型（H-serotype）によって分類されているが、同一H-serotypeの菌株においても異なる特異的殺虫活性を示す場合が報告されている。近年のICP遺伝子解析により、*B. thuringiensis*菌株の示す特異的殺虫活性は、菌株の有するICP遺伝子の種類に依存することが明らかとなってきた。現在、ICP遺伝子は、鱗翅目に殺虫活性を有する *cry I*、双翅目と鱗翅目に殺虫活性を有する *cry II*、鞘翅目に殺虫活性を有する *cry III*、双翅目に殺虫活性を有する *cry IV*各遺伝子に分類されている。

本研究ではまず、*B. thuringiensis*菌株が有する各種*cry*遺伝子をPCR法によって同定することによって、それらの菌株の有する殺虫活性スペクトラムを簡便かつ迅速に推定する技術の確立を目的とした。次に、この手法を用いて各地の土壤ならびに死亡幼虫から新しく分離した*B. thuringiensis*菌株について*cry*遺伝子を解析し、新規有用菌株の検索を試みた。以下、2項目に大別して要旨を述べる。

1. PCR法による *Bacillus thuringiensis cry* 遺伝子同定法の確立

(1) *cry I* 遺伝子（鱗翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

鱗翅目昆虫に対する各 *cry I* 遺伝子の特異的殺虫活性がすでに明らかにされている。即ち、*cry IA(a)*がカイコに対して、*cry IA(c)*がコナガに対して、*cry IC*がハスモンヨトウに対して殺虫活性を有している。最近、これらの *cry I* 遺伝子について特異的殺虫活性に関与する領域が明らかとなった。そこで、それらの領域を指標にそれぞれの *cry I* 遺伝子に特異的なプライマー

を作成し、PCR法による各*cry I*遺伝子の同定法を確立した。さらにその手法の妥当性は、*cry I*遺伝子特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによって確認した。

### (2) *cry II*遺伝子（鱗翅目・双翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

鱗翅目ならびに双翅目昆虫に対する*cry II*遺伝子の特異的殺虫活性がすでに明らかにされている。即ち、鱗翅目・双翅目昆虫に殺虫活性を有するのが*cry II A*遺伝子であり、鱗翅目昆虫にのみ殺虫活性を有するのが*cry II B*遺伝子である。また、*cry II A*遺伝子上の双翅目昆虫に対する特異的殺虫活性領域も明らかとなった。ここでは、両*cry II*遺伝子に共通する領域に対するプライマーをデザインし、PCR法により*cry II*遺伝子を増幅した後、増幅領域内における制限酵素認識部位の違いによって両*cry II*遺伝子を区別・同定する方法を確立した。

### (3) *cry III*遺伝子（鞘翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

鞘翅目昆虫に対して特異的殺虫活性を有する*cry III*遺伝子は、*cry III A*から*cry III D*遺伝子まで報告されており、特にハムシ科の昆虫に対して強い殺虫活性を有している。ここでは、それぞれの*cry III*遺伝子の特異的な領域に対してプライマーをデザインし、PCR法によって各*cry III*遺伝子の特異的増幅が可能な系を確立した。

### (4) *cry IV*遺伝子（双翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

双翅目昆虫に対して特異的殺虫活性を示す*cry IV*遺伝子は、*cry IV A*から*cry IV D*遺伝子まで4種類報告されている。まず、それぞれの特異的領域を選んでデザインしたプライマーを作成し、PCR法によって各*cry IV*遺伝子の増幅を可能にした。また、各プライマーの特異性は、PCR産物をアガロースゲル上で電気泳動した後、各*cry IV*遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより確認した。

## 2. 新規*B. thuringiensis* 菌株の発見

1. において確立したPCR法による同定法を用いて、様々な*B. thuringiensis* 分離菌株の有する*cry*遺伝子を同定し、その菌株の殺虫活性スペクトラムの推定を行うとともに、生物検定を行った。その結果、*cry I A(a)*遺伝子を有するsubsp. *japonensis* N141株が、難防除害虫であるドウガネブイブイに殺虫活性を有することが明らかとなった。*cry I A(a)*遺伝子は、鱗翅目昆虫にのみ殺虫活性を示すことが知られていることから、N141株は新規の*cry*遺伝子を有することが推定された。そこでN141株の結晶タンパク質の抗体を作成し、 $\lambda$ gt11を用いて作成したゲノムライブラリーのスクリーニングを行ったところ、新規の*cry*遺伝子(*cryN141*)が分離された。*cryN141*遺伝子の塩基配列を決定した結果、N141株同様ドウガネブイブイに強い殺虫活性を有するsubsp. *japonensis* Buibui株の*cry*遺伝子(*cryBuibui*)にアミノ酸レベルにおいて約60%の相同性を示した。また、他の*cry*遺伝子と比較した結果、鱗翅目昆虫であるハチミツガに対して殺虫活性を有する*cry I G*遺伝子に

対して高い相同性が認められ、アミノ酸レベルにおいて約70%の相同性を有することが明らかとなった。この値はドウガネブイブイに対し殺虫活性を有する *cryBuibui* 遺伝子との相同性よりも高い値であった。*cryN141* 遺伝子の特異的殺虫活性を確認する目的で、結晶タンパク質を産生しない *B. thuringiensis* 菌株 (BT51) における *cryN141* タンパク質の大量発現を試みた。*cryN141* 遺伝子をエレクトロポレーションにより導入したBT51株では、結晶タンパク質の形成が認められ、走査電子顕微鏡による観察の結果、N141株と同様の形態が確認された。このことは、改めてN141株の結晶タンパク質が本遺伝子にコードされていることを示すものであり、本遺伝子のドウガネブイブイに対する殺虫活性を示唆している。

本研究では、微生物農薬として近年注目をあびている *B. thuringiensis* について、PCR法あるいはPCR法により新たに作成したDNAプローブを用いて、各 *B. thuringiensis* の有する *cry* 遺伝子を同定する方法を確立した。これにより、新しく分離された *B. thuringiensis* 菌株の殺虫活性スペクトラムを簡便かつ迅速に推定することが可能となった。明らかに本手法は、新規優良微生物農薬の開発にも効果的であり、事実、本実験の過程で難防除害虫であるコガネムシ類に殺虫活性を有する *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141が発見された。以上、本研究の成果は学術面のみならず実用面でも多大に貢献したことは明らかである。

# 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 教 授 伴 戸 久 徳

## 学位論文題名

### PCR 法による *Bacillus thuringiensis cry* 遺伝子同定法 の確立と新規 *B. thuringiensis* 菌株の発見

本論文は、総頁数85頁、表13、図19からなる和文論文で、他に参考論文13編が添えられている。

*Bacillus thuringiensis*は、土壤に生息する芽胞形成菌で、芽胞形成時に殺虫性結晶タンパク質（ICP）を産生する。*B. thuringiensis*は、近年、環境に優しい微生物農薬として特に注目をあびている害虫防除剤である。

本研究ではまず、*B. thuringiensis* 菌株が有する各種*cry*遺伝子をPCR法によって同定することによって、それらの菌株の有する殺虫活性スペクトラムを簡便かつ迅速に推定する技術の確立を目的とした。次に、この手法を用いて各地の土壤ならびに死亡幼虫から新しく分離した*B. thuringiensis*菌株について*cry*遺伝子を解析し、新規有用菌株の検索を試みた。以下、2項目に大別して要旨を述べる。

#### 1. PCR法による*Bacillus thuringiensis cry* 遺伝子同定法の確立

##### (1) *cry I* 遺伝子（鱗翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

鱗翅目昆虫に対する各*cry I*遺伝子の特異的殺虫活性がすでに明らかにされている。即ち、*cry I A(a)*がカイコに対して、*cry I A(c)*がコナガに対して、*cry I C*がハスモンヨトウに対して殺虫活性を有している。そこで、それぞれの*cry I*遺伝子に特異的なプライマーを作成し、PCR法による各*cry I*遺伝子の同定法を確立した。さらにその手法の妥当性は、*cry I*遺伝子特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによって確認した。

##### (2) *cry II* 遺伝子（鱗翅目・双翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

鱗翅目ならびに双翅目昆虫に対する*cry II*遺伝子の特異的殺虫活性がすでに明らかにされている。即ち、鱗翅目・双翅目昆虫に殺虫活性を有するのが*cry II A*遺伝子であり、鱗翅目昆虫にのみ殺虫活性を有するのが*cry II B*遺伝子

である。そこで、両 *cry II* 遺伝子に共通する領域に対するプライマーをデザインし、PCR法により *cry II* 遺伝子を増幅した後、増幅領域内における制限酵素認識部位の違いによって両 *cry II* 遺伝子を同定する方法を確立した。

### (3) *cry III* 遺伝子（鞘翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

鞘翅目昆虫に対して特異的殺虫活性を有する *cry III* 遺伝子は、*cry III A* から *cry III D* 遺伝子まで報告されており、特にハムシ科の昆虫に対して強い殺虫活性を有している。ここでは、それぞれの *cry III* 遺伝子の特異的な領域に対してプライマーをデザインし、PCR法によって各 *cry III* 遺伝子の特異的増幅が可能な系を確立した。

### (4) *cry IV* 遺伝子（双翅目殺虫活性遺伝子）同定法の確立

双翅目昆虫に対して特異的殺虫活性を示す *cry IV* 遺伝子は、*cry IV A* から *cry IV D* 遺伝子まで4種類報告されている。まず、それぞれの特異的領域を選んでデザインしたプライマーを作成し、PCR法によって各 *cry IV* 遺伝子の増幅を可能にした。また、各プライマーの特異性は、PCR産物をアガロースゲル上で電気泳動した後、各 *cry IV* 遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより確認した。

## 2. 新規 *B. thuringiensis* 菌株の発見

1.において確立したPCR法による同定法を用いて、様々な *B. thuringiensis* 分離菌株の有する *cry* 遺伝子を同定し、その菌株の殺虫活性スペクトラムの推定を行うとともに、生物検定を行った。その結果、*cry I A(a)* 遺伝子を有する *subsp. japonensis* N141株が、難防除害虫であるドウガネブイブイに殺虫活性を有することが明らかとなった。*cry I A(a)* 遺伝子は、鱗翅目昆虫にのみ殺虫活性を示すことが知られていることから、N141株は新規の *cry* 遺伝子を有することが推定された。そこでN141株の結晶タンパク質の抗体を作成し、 $\lambda$ gt11を用いて作成したゲノムライブラリーのスクリーニングを行ったところ、新規の *cry* 遺伝子 (*cryN141*) が分離された。*cryN141* 遺伝子の塩基配列を決定した結果、N141株同様ドウガネブイブイに強い殺虫活性を有する *subsp. japonensis* Buibui株の *cry* 遺伝子 (*cryBuibui*) にアミノ酸レベルにおいて約60%の相同性を示した。*cryN141* 遺伝子の特異的殺虫活性を確認する目的で、結晶タンパク質を産生しない *B. thuringiensis* 菌株 (BT51) における *cryN141* タンパク質の大量発現を試みた。*cryN141* 遺伝子をエレクトロポレーションにより導入したBT51株では、結晶タンパク質の形成が認められ、走査電子顕微鏡による観察の結果、N141株と同様の形態が確認された。このことは、改めてN141株の結晶タンパク質が本遺伝子にコードされていることを示すものであり、本遺伝子のドウガネブイブイに対する殺虫活性を示唆している。

以上の研究結果は、微生物農薬として近年注目をあびている *B. thuringiensis* において、新しい方法による *cry* 遺伝子同定を行い、各菌株の有する殺虫活性スペクトラムを推定することを可能にしたこと、この方法を利用して新規優良微生物の発見を行ったことであり、その成果は高く評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて本論文の提出者浅野眞一郎は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格が有るものと認定した。