

博士（農 学） 橋 本 直 樹

学 位 論 文 題 名

*Bacillus thuringiensis*における殺虫性タンパク質遺伝子の
発現と制御に関する研究

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、総頁数96頁、表2、図32からなる和文論文で、他に参考論文5編が添えられている。

Bacillus thuringiensis (Bt)は、芽胞形成期に殺虫性結晶タンパク質(ICP)を產生することから、微生物農薬として広く利用されている。この ICP をコードする遺伝子(cry 遺伝子)には、異なる塩基配列を有する数多くの遺伝子が報告されており、感受性昆虫種を基にして分類されている。本研究は、結晶を產生しない Bt51 株にエレクトロポレーション法により、異なる cry 遺伝子導入を行いそれぞれの遺伝子の発現や制御の機構に関する研究を行ったのでその概要を述べる。

1. *B. thuringiensis* serovar *mexicanensis* TKD2-14 株の cry 遺伝子のクローニングと構造解析

北海道の土壤から分離された serovar *mexicanensis* TKD2-14 株は、サイコロ状結晶を產生する。しかし、TKD2-14 株は、これまでサイコロ状結晶を形成するとされる cry II 遺伝子を有していなかった。従って、新しい cry 遺伝子をもつことが示唆されたため、TKD2-14 株より cry 遺伝子のクローニングを行った。また、純化した結晶に対して作製した抗結晶タンパク質抗体を用い、λ gt11 発現ベクターを用いて、TKD2-14 株より抽出した DNA の遺伝子ライブラリーを作製しイムノスクリーニングにより行った。その結果、結晶タンパク質遺伝子を分離することに成功した。遺伝子の塩基配列が決定され、構造解析を行ったところ、得られた遺伝子(cryTKD)は、これまでに報告のない

新しい遺伝子であることが明らかになった。

2. *B. thuringiensis* 発現ベクターの構築

cryTKD 遺伝子ならびに他の *cry* 遺伝子の発現機構を解明するために、Bt 内での発現ベクターを用いた発現系の構築を行った。遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法とし、プラスミドを欠失させることによって結晶を作らないようにした Bt51 株を用いた。発現ベクターは、2 つのプロモーターをもつ *cryIA(a)* 遺伝子のプロモーター領域を大腸菌と Bt51 でも複製可能なシャトルベクター pHY300PLK に組込んで作製された(pHY/IAaP)。pHY/IAaP に *cryIA(a)*(殺鱗翅目)、*cryIIA*(殺鱗翅目ならびに殺双翅目)、*cry III A*(殺鞘翅目)、*cry IV A*(殺双翅目)、*cry IV D*(殺双翅目)ならびに *cryTKD* 遺伝子を組んだ発現プラスミドが作製され、Bt51 株形質転換体での結晶產生の有無が調査された。その結果、*cryIIA* と *cryTKD* 遺伝子を除き、それぞれの *cry* 遺伝子で報告されている形態の結晶発現が確認され、本発現系は、結晶形態を変化させず結晶を產生できることが明らかになった。*cryIIA* 遺伝子は、上流域に *cryIIA* 遺伝子と同じプロモーターで制御される *orf1*, *orf2* と名付けられた 2 つのオープンリーディングフレームを有するオペロン構造をとる *cry* 遺伝子で *orf2* の発現産物が結晶形成に必要とされている。*cryIIA* 遺伝子がサイコロ状結晶をコードする遺伝子であることから、*cryTKD* 遺伝子は、*cryIIA* 遺伝子と同様に結晶形成に他の遺伝子産物が必要な *cry* 遺伝子と考えられた。

3. *B. thuringiensis* serovar *sotto* SKW01-10.2-06 (SKW 株)の有する *cry II(SKW)* 遺伝子の発現制御について

SKW 株は、インドネシアの土壌から分離された Bt であり、本研究室においてこの菌株が有する *cryII(SKW)* 遺伝子(殺鱗翅目ならびに殺双翅目)がクローニングされ性状が調査された。*cryII(SKW)* 遺伝子は、*cryIIA* 遺伝子とアミノ酸配列で 95.4 % の高い相同性を有し、同じくオペロン構造を有する遺伝子であった。しかし、*cryII(SKW)* 遺伝子は、*cryIIA* 遺伝子と結晶発現を異にしており、オペロンより *orf1* と *orf2* を欠失させても Bt51 株形質転換体で結晶を產生する特徴を有していた。本研究では、*cryII(SKW)* 遺伝子と *cryIIA* 遺伝子の結晶発現の違いについて、Bt51 株での遺伝子発現を行って解析した。

その結果、*cryIIA* 遺伝子と *cryII(SKW)* 遺伝子は、RNA ポリメラーゼでプロモーター配列認識を行う σ^{35} で認識されるプロモーター配列のみを有していた。そして、発現ベクター pHY/IAaP に *cryII(SKW)* 遺伝子を組込んだプラスミドを有する Bt51 株形質転換体は、*cryIIA* 遺伝子と異なり、結晶発現を行ったことから、その違いは、RNA の転写後の過程において違いがあると考えられた。そのため、*cryIIA* 遺伝子については、転写の有無を調べた。その結果、*cryIIA* 遺伝子の転写は他の *cry* 遺伝子と同程度に行われることが明らかとなった。これらのことから、*cryIIA* 遺伝子の結晶産生における *orf2* の役割は、遺伝子発現の段階ではなく、産生された遺伝子発現産物の結晶化に関わるものと考察された。

以上のように、本研究は、新規 *cry* 遺伝子を明らかにするとともに、*cry* 遺伝子発現ベクターを作製し、それぞれ結晶形態ならびに殺虫活性を異にする *cry* 遺伝子の結晶発現を Bt51 株で行った。この過程で、発現が異なる *cryIIA* 遺伝子と *cryII(SKW)* 遺伝子の解析を行い、両遺伝子間のアミノ酸配列の変異によって結晶発現が支配されていることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査 教授 飯塚 敏彦
副査 教授 諏訪 正明
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*における殺虫性タンパク質遺伝子の 発現と制御に関する研究

本論文は、総頁数96頁、表2、図32からなる和文論文で、他に参考論文5編が添えられている。

Bacillus thuringiensis (Bt)は、芽胞形成期に殺虫性結晶タンパク質(ICP)を產生することから、微生物農薬として広く利用されている。このICPをコードする遺伝子 (*cry*遺伝子) には、異なる塩基配列を有する数多くの遺伝子が報告されており、感受性昆虫種を基にして分類されている。本研究は、結晶を產生しないBt51株にエレクトロポレーション法により、異なる*cry*遺伝子導入を行いそれぞれの遺伝子の発現や制御の機構に関する研究を行ったのでその概要を述べる。

1. *B. thuringiensis* serovar *mexicanensis* TKD2-14株の*cry*遺伝子のクローニングと構造解析

北海道の土壤から分離されたserovar *mexicanensis* TKD2-14株は、サイコロ状結晶を產生する。しかし、TKD2-14株は、これまでサイコロ状結晶を形成するとされる*cryII*遺伝子を有していなかった。従って、新しい*cry*遺伝子をもつことが示唆されたため、TKD2-14株より*cry*遺伝子のクローニングを行った。その結果、結晶タンパク質遺伝子を分離することに成功した。遺伝子の塩基配列を決定し、構造解析を行ったところ、得られた遺伝子(*cryTKD*)は、これまでに報告のない新しい遺伝子であることが明らかになった。

2. *B.thuringiensis* 発現ベクターの構築

異なる*cry*遺伝子の発現機構を解明するために、Bt内での発現ベクターを用いた発現系の構築を行った。遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法とし、プラスミドを欠失させることによって結晶を作らないようにしたBt51株を用いた。発現ベクターは、2つのプロモーターをもつ*cryIA(a)*遺伝子のプロモーター領域を大腸菌とBt51でも複製可能なシャトルベクターpHY300PLKに組込んで作製された (pHY/IAaP)。このベクターに*cryIA(a)*、*cryIIA*、*cryIIIa*、*cryIVA*、*cryIVD*等の遺伝子を組んだ発現プラスミドが作製され、Bt51株形質転換体での結晶産生の有無が調査された。その結果、*cryIIA*と*cryTKD*遺伝子を除き、結晶発現が確認された。

3. *B. thuringiensis* serovar *sotto* SKW01-10.2-06 (SKW株) の有する*cryII(SKW)* 遺伝子の発現制御について

SKW株は、本研究室がインドネシアの土壤から分離したBtであり、殺鱗翅目ならびに殺双翅目の性質を有する遺伝子が存在することが明らかとなった。その結果、*cryII(SKW)*遺伝子が同定された。この遺伝子は、*cryIIA*とアミノ酸配列で95.4%の高い相同性を有し、*cryIIA*と同じくオペロン構造を有する遺伝子であった。しかし、*cryII(SKW)*は、*cryIIA*と結晶発現様式を異にしており、オペロンより*orf1*と*orf2*を欠失させるとBt51株形質転換体で、*cryIIA*は結晶を産生しないのに対し、*cryII(SKW)*は、結晶を産生する特徴を有していた。本研究では、この2つの*cry*遺伝子の結晶発現の違いについて、Bt51株における遺伝子転写についても解析した。その結果、*cryII(SKW)*を組込んだBt51株形質転換体は、結晶発現を行う一方、*cryIIA*はmRNAの転写までを行うが結晶は産生しないことが明らかとなった。

以上のように、本研究は、新規*cry*遺伝子を明らかにするとともに、*cry*遺伝子発現ベクターを作製し、それぞれ結晶形態ならびに殺虫活性を異にする*cry*遺伝子の結晶発現をBt51株で行った。この過程で、発現が異なる*cry*遺伝子の発現制御についての新知見を得た。得られた新知見は、学術的な貢献のみならず、微生物農薬の開発ならびに遺伝子組換え耐虫性作物の作出への応用を含むものであり、高く評価できる。

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、橋本直樹は博士（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。