

学位論文題名

Identification and Analysis of *cry* Genes Cloned
from Novel *Bacillus thuringiensis* Strains

(新規 *Bacillus thuringiensis* からクローニング
された *cry* 遺伝子の同定と解析)

学位論文内容の要旨

本論文は、総頁数61頁、表6、図8からなる英文論文で、他に参考論文2編が添えられている。

Bacillus thuringiensis は、芽胞形成期に殺虫性結晶タンパク質 (ICP) を産生することから、微生物農薬として広く利用されている。

本研究は、インドネシアの土壌ならびに桑葉から分離された *B. thuringiensis* 株の中に、蚊に殺虫活性を示す2種類の新規 *cry* 遺伝子を発見し、その性状を調べたものである。これら2種の *cry* 遺伝子は鞭毛抗原を基にした H-serotype による分類の結果、serovar *entomocidus* INA288 株ならびに serovar *aizawai* Bun1-14 株と同定された2株中に別々に存在した。これらについてはさらに遺伝子のクローニングならびに構造解析を行い、従来既に報告されている蚊に対する殺虫活性を有する *cry* 遺伝子との比較を行ったのでその概要をのべる。

1. インドネシア土壌から分離された蚊に殺虫性を有する新規 *B. thuringiensis* serovar *entomocidus* INA288 の遺伝子

はじめに INA288 株を走査電子顕微鏡で観察したところ大きなサイコロ状の結晶産生が認められた。また、殺虫活性検定の結果、*Aedes aegypti* (ネッタيشマカ)、*A. japonensis* (ヤマトヤブカ)、*Culex quinquefasciatus* 等3種の蚊に活性を有していた。H-serotype による分類では serovar *entomocidus* に属することが判明した。このため、SDS-PAGE によるタンパク質解析を行ったところペプチドとして 81kDa、58kDa、48kDa、44kDa 等が検出されたが殺虫活性主成分は 70kDa の分子量を有していた。

従来蚊に対し殺虫活性を有する *B. thuringiensis* の主タンパク質は、serovar *israelensis* で 130kDa、serovar *fukuokaensis* で 70kDa が知られているため、INA288 の 70kDa タンパク質に対する抗体を作成し、これら 2 serovar のタンパク質との間のウエスタンブロッティングならびに EIA による解析を行った。その結果、INA288 の 70kDa タンパク質はこれら 2 serovar のタンパク質との間に凝集反応が認められた。

INA288 株の *cry* 遺伝子のクローニングを行うため、既知の蚊に対する殺虫活性を有する *cry* 遺伝子、*cry2A*、*cry4A*、*cry4B*、*cry10A*、*cry11A* の特異領域で作成したプライマーを用いて PCR 法による同定を行ったところ、全てのプライマーによる DNA 増幅は認められず、INA288 は既知の殺虫活性 *cry* 遺伝子は保有していなかった。

このため、蚊に対し殺虫活性を有する *cry* 遺伝子間で比較的保存領域とされている部分を選び DNA プライマーを合成し INA288 からの *cry* 遺伝子検索を行ったところ、約 1.6kbp ならびに約 1.8kbp の DNA 断片が増幅された。

この中、1.6kbp の DNA 断片は Cry タンパク質で存在が知られる保存領域 Block 1～3 が存在していた。また、既知の Cry4Aa タンパク質とアミノ酸残基において 38% の相同性を有していた。このことは、*cry* INA288 遺伝子は新規の *cry* 遺伝子であることを示した。

2. インドネシアの桑葉から分離された *B. thuringiensis* serovar *aizawai* Bun 1-14 からの新規 *cry* 遺伝子

インドネシア・ジャワ島の桑葉から分離された serovar *aizawai* Bun1-14 ならびに Bun2-1 について、これらの結晶タンパク質形態の特異性（不定形）から、従来報告されている *B. thuringiensis* とは異なる性状を有する株であることが期待されたため、これらの殺虫活性ならびに遺伝子のクローニングとその構造解析が行われた。

これら 2 株の結晶形態は、それぞれ類似性が認められたが、殺虫活性は異なっており、Bun1-14 株はヤマトヤブカに対する殺虫活性を有するのに対し、Bun2-1 はヤマトヤブカに対しても、検定を行った鱗翅目昆虫に対しても殺虫活性を持たなかった。

SDS-PAGE 解析の結果、Bun1-14 株は 69kDa、Bun2-1 は 65-130kDa のタンパク質を有していた。蚊に殺虫活性を有する Bun1-14 株のタンパク質から作成した抗体をもとに他の *B. thuringiensis* 株において蚊に殺虫活性を有する serovar

israelensis ならびに先に報告した serovar *entomocidus* INA288 との交叉反応検定を行ったところ部分的な反応は認められた。

PCR 法によって、Bun1-14 株から得た *cry* 遺伝子 DNA 一部の構造解析の結果、serovar *israelensis* ならびに serovar *entomocidus* INA288 との *cry* 遺伝子相同性は必ずしも高くなかった。

このことから、本 Bun1-14 株由来の *cry* 遺伝子も蚊に殺虫活性を有する新規遺伝子であり、Bun1-14 株は従来の serovar *aizawai* 株とは異なる新規 *B. thuringiensis* 株であることが明らかとなった。

以上のように、本研究は、インドネシアの土壌ならびに桑葉から分離した *B. thuringiensis* 2 株の中から、蚊に殺虫活性を示す 2 種類の新しい *cry* 遺伝子を発見し、その遺伝子の特性を明らかにした。

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

Identification and Analysis of *cry* Genes Cloned from Novel *Bacillus thuringiensis* Strains

(新規 *Bacillus thuringiensis* からクローニング
された *cry* 遺伝子の同定と解析)

本論文は、総頁数 61 頁、表 6、図 8 からなる英文論文で、他に参考論文 2 編が添えられている。

Bacillus thuringiensis は、芽胞形成期に殺虫性結晶タンパク質 (ICP) を産生することから、微生物農薬として広く利用されている。

本研究は、インドネシアの土壌ならびに桑葉から分離された *B. thuringiensis* 株の中に、蚊に殺虫活性を示す 2 種類の新規 *cry* 遺伝子を発見し、これらの遺伝子のクローニングならびに構造解析を行ったのでその概要をのべる。

1. インドネシア土壌から分離された蚊に殺虫性を有する新規 *B. thuringiensis* serovar *entomocidus* INA288 の遺伝子

INA288 株を走査電子顕微鏡で観察したところ大きなサイコロ状の結晶産生が認められた。また、殺虫活性検定の結果、*Aedes aegypti* (ネッタイシマカ)、*A. japonensis* (ヤマトヤブカ)、*Culex quinquefasciatus* 等 3 種の蚊に活性を有していた。SDS-PAGE によるタンパク質解析を行ったところ殺虫活性主成分は 70 kDa の分子量を有していた。

INA288 株の *cry* 遺伝子のクローニングを行うため、既知の蚊に対する殺虫活性を有する *cry* 遺伝子、*cry2A*、*cry4A*、*cry4B*、*cry10A*、*cry11A* の特異領域で作成したプライマーを用いて PCR 法による同定を行ったところ、全てのプライマーによる DNA 増幅は認められず、INA288 は既知の殺虫活性 *cry* 遺伝子は保有していなかった。

このため、蚊に対し殺虫活性を有する *cry* 遺伝子間で比較的保存領域とされている部分を選び DNA プライマーを合成し INA288 からの *cry* 遺伝子検索を行ったところ、約 1.6kbp ならびに約 1.8kbp の DNA 断片が増幅された。

この中、1.6kbp の DNA 断片は Cry タンパク質で存在が知られる保存領域 Block 1～3 が存在していた。また、既知の Cry4Aa タンパク質とアミノ酸残基において 38% の相同性を有していた。このことは、*cry* INA288 遺伝子は新規の *cry* 遺伝子であることを示した。

2. インドネシアの桑葉から分離された *B. thuringiensis* serovar *aizawai* Bun 1-14 からの新規 *cry* 遺伝子

インドネシア・ジャワ島の桑葉から分離された serovar *aizawai* Bun1-14 ならびに Bun2-1 について、これらの結晶タンパク質形態の特異性（不定形）から、従来報告されている *B. thuringiensis* とは異なる性状を有する株であることが期待されたため、これらの殺虫活性ならびに遺伝子のクローニングとその構造解析が行われた。

これら 2 株の結晶形態は、それぞれ類似性が認められたが、殺虫活性は異なっており、Bun1-14 株はヤマトヤブカに対する殺虫活性を有するのに対し、Bun2-1 はヤマトヤブカに対しても、検定を行った鱗翅目昆虫に対しても殺虫活性を持たなかった。

SDS-PAGE 解析の結果、Bun1-14 株は 69kDa、Bun2-1 は 65-130kDa のタンパク質を有していた。蚊に殺虫活性を有する Bun1-14 株のタンパク質から作成した抗体をもとに他の *B. thuringiensis* 株において蚊に殺虫活性を有する serovar *israelensis* ならびに先に報告した serovar *entomocidus* INA288 との交叉反応検定を行ったところ部分的な反応は認められた。

PCR 法によって、Bun1-14 株から得た *cry* 遺伝子 DNA 一部の構造解析の結果、serovar *israelensis* ならびに serovar *entomocidus* INA288 との *cry* 遺伝子相同性は必ずしも高くなかった。

このことから、本 Bun1-14 株由来の *cry* 遺伝子も蚊に殺虫活性を有する新規遺伝子であり、Bun1-14 株は従来の serovar *aizawai* 株とは異なる新規 *B. thuringiensis* 株であることが明らかとなった。

以上のように、本研究は、インドネシアの土壌ならびに桑葉から分離した *B. thuringiensis* 2 株の中から、蚊に殺虫活性を示す 2 種類の新しい *cry* 遺伝子を発見し、その遺伝子の特性を明らかにした。このことは、学術的に高く評価される。

よって審査員一同は、アクマドリザリ が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。