

学 位 論 文 題 名

Studies on Insecticidal Crystal Protein Isolated
from *Bacillus thuringiensis* Strains
and Their Activity Towards Lepidopteran Insects

(*Bacillus thuringiensis* から分離された殺虫性タンパク質と
鱗翅目昆虫に対するそれらの殺虫活性に関する研究)

学位論文内容の要旨

Bacillus thuringiensis は、グラム陽性の土壌細菌で、孢子形成期に殺虫性結晶タンパク質を産生する。このことから微生物農薬として、重要な農業害虫の防除ならびに、衛生害虫の防除に広く利用されている。*B. thuringiensis* 菌は、主として土壌から分離されるが、死亡昆虫や植物の葉からも分離される。また、本細菌が保有する殺虫性タンパク質遺伝子 (*cry* gene) は、遺伝子組換え耐虫性作物の作出にも利用され、近年注目をあびている。

本研究では、東南アジアの農作物において重要な害虫である、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) に対し強い殺虫活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の検索ならびに、その菌株の有する殺虫性タンパク質遺伝子 (*cry* 遺伝子) のクローニングならびに塩基配列の決定を行った。また、その結晶タンパク質が鱗翅目昆虫に殺虫活性を示す際、対象昆虫の細胞膜上の受容体タンパク質 (receptor protein) に結合し、細胞膜に穴をあけ昆虫を死亡させることが知られていることから、受容体についても検討を行った。

1. ハスモンヨトウに対し殺虫活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の検索

本研究室保存の、*B. thuringiensis* 標準株ならびに、分離株の中から、ハスモンヨトウに殺虫活性を有する *B. thuringiensis* 菌株のスクリーニングを行った。その結果、標準株の中で、serovar *entomocidus* 株と subsp. *wuhanensis* 株が、ハスモンヨトウに対して強い殺虫活性を有していることが明らかとなった。また、各地の土壌から分離された分離株については、serovar *alesti* KMK9-20, serovar *entomocidus* KMI94-4-3, serovar *darmstadiensis* KRU-A-1 が強い殺虫活性を有していた。

2. subsp. *wuhanensis* 株の *cry1* 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

ハスモンヨトウに対して殺虫活性を有していた、*B. thuringiensis* 標準株の中、subsp. *wuhanensis* 株がより強い殺虫活性を有していたことから、この菌株を用いて、PCR 法により *cry1* 遺伝子の同定を行ったところ、*cry1Ab*、*cry1Ac* ならびに *cry1D* 遺伝子を

有している事が明らかになった。*cry1Ab* 遺伝子については、既に中谷ら (1994) によりクローニングならびに塩基配列決定がなされているので、本実験では *cry1Abw* 遺伝子の有する殺虫活性について調査した。その結果、コナガ (*Plutella xylostella*) に対して強い殺虫活性を有していたが、カイコ (*Bombyx mori*) に対しては殺虫活性を有していない事が明らかとなった。subsp. *wuhanensis* 株は、ハスモンヨトウに対する強い殺虫活性の他に、カイコに対する強い殺虫活性を有することから、カイコに殺虫活性を有すると報告されている *cry1D* 遺伝子に着目して、その遺伝子のクローニングならびに塩基配列決定を行った。その結果、約 135kDa (3400bp) のタンパク質をコードする *cry1Dbw* 遺伝子がクローニングされた。この *cry1Dbw* 遺伝子の塩基配列の決定を行ったところ、Lambert (1993) が報告した *cry1Db* 遺伝子と全く同じであることが明らかとなった。さらに、*cry1Dbw* 遺伝子を大腸菌で発現させた後、そのタンパク質の殺虫活性について、ハスモンヨトウ、カイコ、コナガについて調査した。供試した 3 種の昆虫の幼虫すべてにおいて殺虫活性が認められ、ハスモンヨトウならびにカイコについては強い殺虫活性を示した。このことより、subsp. *wuhanensis* 株の有するカイコに対する強い殺虫活性は、*cry1Dbw* 遺伝子によるものであることが明らかとなった。

3. subsp. *wuhanensis* 株殺虫性タンパク質に対する数種鱗翅目昆虫の受容体タンパク質の検出

B. thuringiensis の殺虫性結晶タンパク質に対する受容体は、感受性昆虫の幼虫の中腸上皮組織細胞の Brush Border Membrane Vesicles (BBMV) に存在するといわれ、受容体として、アミノペプチデース N やカドヘリン様タンパク質が報告されている。そこで subsp. *wuhanensis* 株の結晶タンパク質が、農業において重要な害虫 (ハスモンヨトウ、コナガ) に対して強い殺虫活性を有することから、これらの数種類の鱗翅目昆虫幼虫を用いて、このタンパク質に対する受容体の解析を行った。受容体の解析に供試した鱗翅目昆虫は、カイコ、コナガ、マイマイガ (*Lymantria dispar*)、オオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*) とし、それぞれの幼虫から BBMV を精製した。subsp. *wuhanensis* 株からクローニングされた、*cry1Abw* 遺伝子と *cry1Dbw* 遺伝子それぞれのコードするタンパク質 (Cry1Abw ならび Cry1Dbw タンパク質) と供試昆虫から精製した BBMV との結合検定 (binding assay) を行い、受容体タンパク質の検出を行った。その結果、Cry1Abw に対するカイコの受容体として、アミノペプチデース N が、Cry1Dbw に対するカイコの受容体として、アミノペプチデース N とカドヘリン様タンパク質が、検出された。このことから、*B. thuringiensis* が保有する異なった *cry* 遺伝子由来の殺虫性タンパク質は BBMV に存在する異なった受容体と結合して殺虫性を示すことが明らかとなった。カイコ以外の昆虫としては、コナガにおける受容体は、アミノペプチデース N が検出された。マイマイガ・オオモンシロチョウについては、結合検定の結果から受容体は検出されなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 塚 敏 彦
副 査 教 授 伴 戸 久 徳
副 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 助 教 授 浅 野 眞 一 郎

学 位 論 文 題 名

Studies on Insecticidal Crystal Protein Isolated from *Bacillus thuringiensis* Strains and Their Activity Towards Lepidopteran Insects

(*Bacillus thuringiensis* から分離された殺虫性タンパク質と
鱗翅目昆虫に対するそれらの殺虫活性に関する研究)

Bacillus thuringiensis は、グラム陽性の土壌細菌で、孢子形成期に殺虫性結晶タンパク質を産生する。このことから微生物農薬として、重要な農業害虫の防除ならびに、衛生害虫の防除に広く利用されている。*B. thuringiensis* 菌は、主として土壌から分離されるが、死亡昆虫や植物の葉からも分離される。また、本細菌が保有する殺虫性タンパク質遺伝子 (*cry* gene) は、遺伝子組換え耐虫性作物の作出にも利用され、近年注目をあびている。

本研究では、東南アジアの農作物において重要な害虫である、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) に対し強い殺虫活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の検索ならびに、その菌株の有する殺虫性タンパク質遺伝子 (*cry* 遺伝子) のクローニングと塩基配列の決定を行った。また、その結晶タンパク質が鱗翅目昆虫に殺虫活性を示す際、対象昆虫の細胞膜上の受容体タンパク質 (receptor protein) に結合し、細胞膜に穴をあけ昆虫を死亡させることが知られていることから、受容体についても検討を行った。

1. ハスモンヨトウに対し殺虫活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の検索

本研究室保存の、*B. thuringiensis* 標準株ならびに、分離株の中から、ハスモンヨトウに殺虫活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の検索を行った結果、標準株の中で、serovar *entomocidus* 株と subsp. *wuhanensis* 株が、また、土壌から分離された分離株については、serovar *alesti* KMK9-20, serovar *entomocidus* KM194-4-3, serovar *darmstadiensis* KRU-A-1 が殺虫活性を有していた。

2. subsp. *wuhanensis* 株の *cry1* 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

ハスモンヨトウに対して殺虫活性を有していた、*B. thuringiensis* 標準株の中、subsp. *wuhanensis* 株がより強い殺虫活性を有していたことから、この菌株を用いて、PCR 法により *cry1* 遺伝子の同定を行ったところ、*cry1Ab*、*cry1Ac* ならびに *cry1D* 遺伝子を有している事が明らかになった。*cry1Ab* 遺伝子については、既に中谷ら (1994) によりクローニングならびに塩基配列決定がなされており、カイコ (*Bombyx mori*) に対しては殺虫活性を有していない事が明らかとなっている。従って、カイコに殺虫活性を有すると報告されている *cry1D* 遺伝子のクローニングならびに塩基配列決定を行った。その結果、約 135kDa (3400bp) のタンパク質をコードする *cry1Dbw* 遺伝子がクローニングされた。この *cry1Dbw* 遺伝子の塩基配列の決定を行ったところ、Lambert (1993) が報告した *cry1Db* 遺伝子と全く同じであることが明らかとなった。さらに、*cry1Dbw* 遺伝子を大腸菌で発現させた後、そのタンパク質の殺虫活性について、ハスモンヨトウ、カイコ、コナガについて調査した。供試した 3 種の昆虫の幼虫すべてにおいて殺虫活性が認められ、ハスモンヨトウならびにカイコについては強い殺虫活性を示した。このことより、subsp. *wuhanensis* 株の有するカイコに対する強い殺虫活性は、*cry1Dbw* 遺伝子によるものであることが明らかとなった。

3. subsp. *wuhanensis* 株殺虫性タンパク質に対する数種鱗翅目昆虫の受容体タンパク質の検出

B. thuringiensis の殺虫性結晶タンパク質に対する受容体は、感受性昆虫の幼虫の中腸上皮組織細胞の Brush Border Membrane Vesicles (BBMV) に存在するといわれ、受容体として、アミノペプチデース N やカドヘリン様タンパク質が報告されている。そこで subsp. *wuhanensis* 株の結晶タンパク質の数種鱗翅目昆虫幼虫におけるこのタンパク質に対する受容体の解析を行った。受容体の解析に供試した鱗翅目昆虫は、カイコ、コナガ、マイマイガ (*Lymantria dispar*)、オオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*) とし、それぞれの幼虫から BBMV を精製した。subsp. *wuhanensis* 株からクローニングされた、*cry1Abw* 遺伝子と *cry1Dbw* 遺伝子それぞれのコードするタンパク質 (Cry1Abw ならびに Cry1Dbw タンパク質) と供試昆虫から精製した BBMV との結合検定 (binding assay) を行い、受容体タンパク質の検出を行った。その結果、Cry1Abw に対するカイコの受容体として、アミノペプチデース N が、Cry1Dbw に対するカイコの受容体として、アミノペプチデース N とカドヘリン様タンパク質が、検出された。カイコ以外の昆虫としては、コナガにおける受容体は、アミノペプチデース N が検出された。マイマイガ・オオモンシロチョウについては、結合検定の結果から受容体は検出されなかった。

以上のように本研究は、農業上重要な害虫であるハスモンヨトウ防除に有効な殺虫性タンパク質遺伝子と、その殺虫活性発現に関わっている受容体タンパク質を明らかにしたもので、学術的にも応用面でも高く評価される。

よって審査員一同は、ユリア・ブジャスツチが博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。