

学 位 論 文 題 名

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* BUN1-14株が
産生する新規結晶性タンパク質の蚊殺虫活性機構

学位論文内容の要旨

熱帯性伝染病を媒介する双翅目衛生害虫の防除には *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) が産生する Cry タンパク質を主剤とした BT 剤が使用され、効果をあげてきた。しかし、実験室内での選抜試験の結果、野外での個体群が *Bti* 由来 Cry タンパク質に対して抵抗性を獲得する可能性があることが明らかになった。このような状況の中、*Bti* 由来 Cry タンパク質に代わるもしくは併用できる新たな微生物農薬資源が求められている。また、*Bti* 由来 Cry タンパク質を含め、双翅目殺虫性 Cry タンパク質の詳細な作用機構は不明であり、個々の作用機構を明らかにすることは、これらの微生物農薬を併用し持続的かつ安全に双翅目衛生害虫を防除していくうえで重要である。本研究は *Bti* 由来 Cry タンパク質に代わるもしくは併用できる新規の Cry タンパク質を探索し、その殺虫活性機構を明らかにすることを目的とした。

新規 *cry* 遺伝子のクローニング及び発現産物の殺虫活性

B. thuringiensis subsp. *aizawai* BUN1-14 株 DNA ライブラリーよりサザンハイブリダイゼーション法を用いて、3 つの新規 *cry* 遺伝子オペロン (*cry39A&orf2-39A*, *cry40A&orf2-40A*, *cry40B&orf2-40B*) をクローニングした。各オペロンを結晶非産生 *Bt* 菌株で発現させた結果、それぞれ固有の形状を持つ結晶性封入体（クリスタル）を産生した。各クリスタルのアカイエカ・ハマダラカ・ネッタイシマカに対する殺虫活性を調査した結果、Cry39A がこれらの蚊に対して殺虫活性を示し、特にハマダラカに対しては *Bti* 由来である Cry4A の約 4 倍と高い殺虫活性を示した。

Cry39A のプロセッシング様式及びハマダラカ中腸上皮細胞刷子縁膜小胞への結合特性

感受性昆虫に食下されたクリスタルは中腸内のアルカリ性環境中で可溶化したのち、消化液に含まれるプロテアーゼによってプロセッシングを受け、活性化トキシンとなる。トリプシン及びハマダラカ中腸消化液による Cry39A 及び ORF2-39A のプロセッシング様式を調査した結果、分子量 65 kDa の ORF2-39A が分解されると共に、分子量 72 kDa の Cry39A のドメイン I の $\alpha 1$ -ヘリックスを含む N 末端 60 アミノ酸が分解し、60 kDa ポリペプチドの活性化トキシンへとプロセッシングされることが明らかになった。また、Cry39A のアカイエカとネッタイシマカ消化液によるプロセッシングを調査した結果、アカイエカ及びネッタイシマカ消化液ではハマダラカ消化液と比べて、プロセッシングが過剰に進み活性化 Cry39A トキシンの生成量が極端に少なくなることが明らかになり、このようなプロセッシングが

Cry39A クリスタルのアカイエカとネッタイシマカに対する低い殺虫活性の原因のひとつとして考えられた。

続いて、Cry39A トキシンのハマダラカ中腸上皮細胞刷子縁膜小胞 (Brush border membrane vesicles, BBMVs)に対する結合特性を調査した結果、Cry39A トキシンはハマダラカ BBMVs に対して特異的に結合し、その結合は *Bti* 由来 Cry4A トキシンと競合しなかった。この結果は作用機構上重要なステップである中腸上皮細胞膜への結合様式が Cry4A トキシンとは異なることを示しており、両者の作用機構の違いを反映していると考えられた。さらに、Cry39A トキシンは BBMVs 上でオリゴマー化し、一般的にリピッドラフトとして定義される Triton X-100 不溶性の膜画分に、可溶性膜画分と比較して優先的に相互作用したことから、他の多くの膜孔形成型トキシンと同様にリピッドラフトと呼ばれる細胞膜上のマイクロドメインを、効率よくオリゴマー化するための濃縮装置として利用していると考えられた。

Cry39A トキシンのレセプター分子探索

Cry トキシンを含む多くの細菌毒素とそれらのレセプター分子との結合には糖鎖が関与することが知られている。Cry39A トキシンのレセプター認識・結合における糖の関与を調査するため、糖による Cry39A クリスタルのハマダラカ殺虫活性抑制効果及び Cry39A トキシンのハマダラカ中腸上皮細胞毒性抑制効果を調査した結果、ガラクトースに強い抑制効果が認められた。また、Cry39A トキシン及びそのドメイン III はガラクトースと結合すること、ドメイン III をあらかじめ中腸上皮細胞に作用させることにより Cry39A トキシンの細胞毒性がある程度抑制されることが明らかになった。以上の結果から、Cry39A トキシンはドメイン III を介してレセプター分子に結合し、その認識・結合にはガラクトースが関与していることが示唆された。そこで、ガラクトースによる結合阻害を指標に Cry39A トキシンのレセプター分子の絞込みを行った。ハマダラカ BBMVs タンパク質を用いたトキシンオーバーレイアッセイの結果、Cry39A トキシンは分子量 35~18 kDa の複数の BBMVs タンパク質と結合したが、その結合はガラクトースにより阻害されず、これらのタンパク質は Cry39A トキシンが優先的に相互作用したリピッドラフト様画分には偏在していなかった。一方、ハマダラカ中腸糖脂質画分と Cry39A トキシンとの結合はガラクトースにより阻害された。動物における主要糖脂質がスフィンゴ糖脂質であり、スフィンゴ糖脂質はリピッドラフトに多く含まれることから、Cry39A トキシンのレセプター分子は、ガラクトースによる結合阻害が認められなかった BBMVs タンパク質ではなく、ガラクトースを糖鎖に含むスフィンゴ糖脂質である可能性が示唆された。トキシンにとってリピッドラフトに偏在するスフィンゴ糖脂質をレセプターとすることは、局所的にトキシン濃度を高め、オリゴマー化の効率が良くなるため、細胞を破壊するのに有利であると考えられた。

本研究を通じて得られた知見をもとに Cry39A のハマダラカにおける殺虫活性機構を以下のように考えた。①ハマダラカ中腸のアルカリ性環境下において Cry39A クリスタルが可溶化する。②65 kDa の ORF2-39A と 72 kDa の Cry39A の N 末端約 60 アミノ酸が分解し 60 kDa の活性化トキシンへとプロセシングされる。③活性化トキシンがリピッドラフトに偏在する糖鎖にガラクトースを含むスフィンゴ糖脂質にドメイン III を介して結合する。④リピッドラフト上でオリゴマー化し膜孔を形成する。⑤中腸上皮細胞を破壊し、ハマダラカ幼虫を死に至らしめる。

Bti 由来 Cry タンパク質である Cry4A トキシンのハマダラカ殺虫活性はガラクトースにより阻害さ

れないこと、Cry4AトキシンとCry39AトキシンのハマダラカBBMVに対する結合は競合しなかったこと、Cry4Bはレセプターを介さずに直接細胞膜に結合、オリゴマー化して膜孔を形成すると考えられていること等から、Cry39Aと*Bti*由来Cryタンパク質の作用機構は大きく異なることが予想され、Cry39Aクリスタルはハマダラカ防除に*Bti*由来Cryタンパク質と併用する遺伝子資材として非常に有望であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 浅 野 真 一 郎
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 教 授 木 村 淳 夫
副 査 教 授 伴 戸 久 徳

学 位 論 文 題 名

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* BUN1-14株が 産生する新規結晶性タンパク質の蚊殺虫活性機構

蚊やハエなどの双翅目衛生害虫の防除には *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) が産生する Cry タンパク質を主剤とした BT 剤が使用され、効果をあげてきた。しかし、野外での個体群が *Bti* 由来 Cry タンパク質に対して抵抗性を獲得する可能性があることが明らかになった。抵抗性獲得を抑制するためには、*Bti* 由来 Cry タンパク質と作用機構の異なる微生物農薬を併用することが効果的である。そこで、本研究では *Bti* と併用できる微生物農薬資源を提供するため、新規の蚊殺虫性 Cry タンパク質を探索し、その作用機構を調査した。

新規 *cry* 遺伝子のクローニング及び発現産物の殺虫活性

BUN1-14 株 DNA ライブラリーよりサザンハイブリダイゼーション法を用いて、3 つの新規 *cry* 遺伝子オペロンをクローニングした。各オペロンを結晶非産生 *Bt* 菌株で発現させた結果、それぞれ固有の形状を持つ結晶性封入体（クリスタル）を産生した。各クリスタルのアカイエカ・ハマダラカ・ネッタシマカに対する殺虫活性を調査した結果、Cry39A がこれらの蚊に対して殺虫活性を示し、特にハマダラカに対しては *Bti* 由来である Cry4A の約 4 倍と高い殺虫活性を示した。

Cry39A のプロセッシング様式及びハマダラカ中腸上皮細胞刷子縁膜小胞への結合特性

感受性昆虫に食下されたクリスタルは中腸内のアルカリ性環境中で可溶化したのち、消化液に含まれるプロテアーゼによってプロセッシングを受け、活性化トキシンとなる。トリプシン及びハマダラカ中腸消化液による Cry39A 及び ORF2-39A のプロセッシング様式を調査した結果、分子量 65 kDa の ORF2-39A が分解されると共に、分子量 72 kDa の Cry39A の N 末端 60 アミノ酸が分解し、60 kDa ポリペプチドの活性化トキシンへとプロセッシングされることが明らかになった。

続いて、Cry39A トキシンのハマダラカ中腸上皮細胞刷子縁膜小胞 (BBMV) に対する結合特性を調査した結果、Cry39A トキシンはハマダラカ BBMV に対して濃度依存的かつ飽和可能な結合をし、その結合は *Bti* 由来 Cry4A トキシンと競合しなかった。この結果は作用機構上重要なステップであ

る中腸上皮細胞膜への結合様式が Cry4A トキシンとは異なることを示しており、両者の作用機構の違いを反映していると考えられた。

さらに、Cry39A トキシンは BBMV 上でオリゴマー化し、一般的にリピッドラフトとして定義される Triton X-100 不溶性の膜画分に相互作用したことから、他の多くの膜孔形成型トキシンと同様にリピッドラフトと呼ばれる細胞膜上のマイクロドメインを、効率よくオリゴマー化するための濃縮装置として利用していると考えられた。

Cry39A トキシンのレセプター分子探索

Cry39A トキシンのレセプター認識・結合における糖の関与を調査するため、糖による Cry39A 毒性抑制効果を調査した結果、ガラクトースに強い抑制効果が認められた。また、Cry39A トキシン及びそのドメイン III はガラクトースと結合し、ドメイン III をあらかじめ中腸上皮細胞に作用させることにより Cry39A トキシンの細胞毒性が抑制される傾向が見られた。以上の結果から、Cry39A トキシンはドメイン III を介してレセプター分子に結合し、その認識にはガラクトースが関与していることが示唆された。

そこで、ガラクトースによる結合阻害を指標に Cry39A トキシンのレセプター分子の絞込みを行った。ハマダラカ BBMV タンパク質を用いたトキシンオーバーレイアッセイの結果、Cry39A トキシンは複数の BBMV タンパク質と結合したが、その結合はガラクトースにより阻害されなかった。一方、ハマダラカ中腸糖脂質画分と Cry39A トキシンとの結合はガラクトースにより阻害された。動物における主要糖脂質がスフィンゴ糖脂質であり、スフィンゴ糖脂質はリピッドラフトに多く含まれることから、Cry39A トキシンのレセプター分子はガラクトースを糖鎖に含むスフィンゴ糖脂質である可能性が示唆された。

Bti クリスタルの主要タンパク質の1つである Cry4A のハマダラカ殺虫活性はガラクトースにより阻害されないこと、Cry4A トキシンと Cry39A トキシンのハマダラカ BBMV に対する結合は競合しなかったことから、Cry39A と Cry4A の作用機構は大きく異なることが予想され、Cry39A クリスタルはハマダラカ防除に *Bti* 由来 Cry タンパク質と併用する遺伝子資材として有望であると考えられた。

本論文は、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* BUN1-14 株より、蚊に対して殺虫活性を有する新規 Cry タンパク質遺伝子を分離すると共に、その Cry タンパク質の作用機構を解析したものである。その結果、本 Cry タンパク質の作用機構は既知のものとは大きく異なることが予想され、蚊の防除において既知の Cry タンパク質と併用しうる新規殺虫性タンパク質として非常に有望であることが明らかとなった。これらの結果は、蚊に対する新規の微生物防除資材を提供するものとして高く評価できる。

よって、審査員一同は、伊藤 岳が博士（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。