

# Cry44A の分子内切断および 44AORF2 が殺虫活性に与える影響について

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野

船橋拓郎

双翅目衛生害虫である蚊類を媒介とした熱帯性伝染病は、近年全世界的に拡大傾向にあり、このような蚊類の防除は重要な課題である。これらの防除には、*Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) が産生する Cry タンパク質を主剤とした Bt 剤が広く利用され、効果をあげてきた。しかし、野外にて Bti 由来の Cry タンパク質に抵抗性を示す個体群の出現の可能性が指摘されており、その対策としてこれらとは異なる機構によって殺虫性を示す Cry タンパク質資材が求められている。

*Bacillus thuringiensis entomocidus* INA288 株が産生する Cry44A は、蚊幼虫に対して Bti 由来の Cry タンパク質である Cry4A, Cry4B, Cry11A に匹敵する殺虫活性を示す。しかし、Cry44A とこれらとの殺虫活性スペクトルに違いがみられることから、その殺虫作用機構が異なるとの仮説を立てた。Cry タンパク質の殺虫作用機構において、標的昆虫の中腸消化液に含まれるプロテアーゼによる限定分解（プロセッシング）は、その変化が標的昆虫の抵抗性獲得の原因となりうることから、非常に重要なステップのひとつであると考えられている。Cry44A は蚊幼虫の消化液によるプロセッシングの過程で、77 kDa のコートキシンが 45 kDa と 25 kDa に 2 断片化されることが報告されている。Bti 由来の Cry4A においても 2 断片化はされるものの、このような切断は殺虫活性には関与していないと考えられている。一方で、Cry4B では切断をさせなくすることで、ネッタイシマカ幼虫に対して殺虫活性が上昇するとの報告がされている。また、鞘翅目昆虫に殺虫活性を示す Cry3A のように、このような分子内切断によって殺虫活性が上昇する例もある。このように、コートキシンのプロセッシングの過程で起こる分子内切断は、標的昆虫に対する殺虫活性に関与することがある。そこで、Cry44A と Cry4A の作用機構の違いについてコートキシンのプロセッシング、特に分子内切断というイベントに注目し、Cry44A における分子内切断と殺虫活性との関連性を調査した。また、130 kDa 型 Cry タンパク質の C 末端側約半分の領域は、一般的に殺虫活性には直接関与しないとされており、Cry4A ではこの領域が存在しなくても殺虫活性を示す。Cry44A は 130 kDa 型の Cry タンパク質が 2 つに分断されたような構造をもつが、この領域に相当する 44AORF2 の非存在下では殺虫活性を示さないことから、44AORF2 が殺虫活性に与える影響について調査した。

Cry44A の切断部位を改変した非切断変異タンパク質 (Cry44A[R474A-44AORF2]) は、蚊幼虫に対する殺虫活性が低下した。このことから Cry44A は Cry4A とは異なり、コートキシンの分子内切断が蚊幼虫に対して殺虫作用を示す上で重要な役割を担っていることが示された。また、通常では分断された状態で結晶化されている Cry44A と 44AORF2 を繋いだ変異タンパク質 (Cry44A[44A+44AORF2]) は、ネッタイシマカ幼虫に対して消化液によるプロセッシングが十分にされず殺虫活性が低下した。Cry44A がプロセッシングされて生じる 45 kDa 断片と 25 kDa 断片および 44AORF2 の 3 つのタンパク質を Bt で結晶タンパク質として発現させたもの (Cry44A[45k-25k-44AORF2]) は、蚊幼虫に投与しても殺虫活性がみられなかった。この結果は、分子内切断後の活性断片の存在そのものが殺虫活性に関与している Cry4A, Cry11A とは異なるものであった。

以上をまとめると、Cry44A と 44AORF2 は分断された状態で結晶タンパク質として標的昆虫に食下され、可溶化、適切なプロセッシング、そして分子内切断を受けて活性断片が揃うという一連のステップが踏襲されることによって殺虫活性を最大限に発揮されることができると考えられた。これらることより、Cry44A の特異的殺虫活性は、Bti 由来である Cry4A とは異なる作用機構によるものであることが示唆された。