

## コガネムシ抵抗性芝草の作出

岡本拓士

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野

コガネムシ類幼虫はペレニアルライグラスをはじめとする芝草および牧草の根を食害し、大きな被害を与える。コガネムシ類幼虫の防除には主に化学農薬が用いられているが、人体へのリスクや環境への負荷が懸念され、化学農薬使用量の削減が求められている。コガネムシ抵抗性をペレニアルライグラスに付与することで化学農薬使用量を削減し、健康や環境に配慮したコガネムシ類幼虫の防除が可能となると考えられる。

これまでに *Bacillus thuringiensis galleriae* SDS-502 株由来 *cry8Da* 遺伝子をペレニアルライグラスに導入し、コガネムシ抵抗性の付与を試みた。しかしウエスタンブロットおよびエンザイムイムノアッセイで Cry8Da の発現を検出することはできず、またマメコガネ幼虫を用いた殺虫活性試験においても十分な抵抗性があるとはいえなかった。このことから *cry8Da* 遺伝子の導入によりコガネムシ類幼虫を効果的に防除するためには組換え体における高い遺伝子発現が必要であると考えた。そこで本研究ではペレニアルライグラスでの遺伝子発現量を高めるために、*cry8Da* 遺伝子がコードするアミノ酸配列を変えずに mRNA の不安定化を引き起こす ATTTA 配列を除去し、さらにペレニアルライグラスでの遺伝子発現に適したコドンに改変することで改変 *cry8Da* (*mtcry8D*) 遺伝子を人工合成した。これをペレニアルライグラスに導入することで Cry8Da トキシンの発現量を高め、コガネムシ類に対して高い抵抗性を示すペレニアルライグラスの作出を試みた。

パーティクルガン法を用いて 3,467 個のペレニアルライグラスのカルスに *mtcry8D* 遺伝子およびビアラフォス抵抗性遺伝子を導入した。ビアラフォスによる選抜の後、再分化の誘導を行い 8 個体の再分化植物体ペレニアルライグラスを得た。得られた組換え体のゲノム DNA を PCR によって解析したところ、8 個体中 5 個体 (mt1~mt5) に *mtcry8D* 遺伝子が導入されていることが確認された。またサザンハイブリダイゼーション解析によって各個体 (mt1~mt5) でシグナルが検出され、それぞれ *mtcry8D* 遺伝子が導入されたことが明らかとなった。次にウエスタンブロットおよびエンザイムイムノアッセイにより組換え体における Cry8Da トキシンの発現を調査した。その結果 mt5 で 60 kDa のシグナルが検出された。その発現量は可溶性タンパク質の 0.058%であり、コガネムシ類の防除に十分な発現量だと考えられる。なお他の個体ではシグナルは検出されなかった。続いて mt5 のマメコガネ 3 齢幼虫に対する殺虫活性試験を行った。しかし mt5 のマメコガネ 3 齢幼虫に対する抵抗性は認められなかった。本研究でペレニアルライグラスに導入した *mtcry8D* 遺伝子は 75 kDa のタンパク質をコードするが、mt5 で検出された発現タンパク質は 60 kDa であった。このことから完全長の Cry8Da トキシンが合成されていない、もしくは合成された Cry8Da トキシンが分解されており、このことがマメコガネ幼虫に抵抗性を示さない原因であると推測された。今後は完全長の Cry8Da トキシンが合成されない原因を調査し、コガネムシ抵抗性を持つペレニアルライグラスを作出する必要があると考えられた。