

# Cry11Aaトキシンのネッタイシマカ殺虫作用機構における AeALP のレセプター分子としての機能調査

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野  
友清貴哉

病原微生物を用いた蚊類の防除手段である、*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) を用いた Bti 剤は、標的以外の昆虫や動植物への安全性や環境保全の面から注目されている。しかし、Bti 剤同様に蚊類の防除に効果をあげている *Bacillus sphaericus* (Bs) 剤においては、野外において抵抗性を獲得した蚊個体群が発見された。Bti 剤においても、実験室内での殺虫活性選抜試験の結果、Bti 剤に対して抵抗性を獲得する蚊が選抜され、Bti 剤に抵抗性をもつ蚊が出現する可能性があることが明らかになった。これからも防除資材として Bti 剤を利用していくためには、蚊がどのように抵抗性を獲得するのかを理解する必要があり、まず Bti が産生する Cry トキシンの殺虫活性作用機構を解明しなければならない。

Cry トキシン殺虫作用機構のうち、Cry トキシンとレセプターの結合における異常が、Bs 剤の場合と同様に Bti 剤抵抗性獲得の要因となる可能性が考えられている。しかし、Cry11Aa トキシンのネッタイシマカにおけるレセプターは同定されておらず、中腸上皮細胞膜のリピッドラフトに局在する GPI アンカー型タンパク質の Alkaline Phosphatase (ALP) が有力候補としてあがっている (Fernandez *et al.*, 2006)。そこで、本研究では ALP のレセプターとしての機能を詳細に調べることにした。

ネッタイシマカ幼虫中腸で発現している *alp* 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させたところ、Cry11Aa トキシンと結合すること、その結果 Cry11Aa トキシンの殺虫活性に影響を与えることが明らかになった。そこで、AeALP の生体内での動態や機能について明らかにするため、AeALP に対するポリクローナル抗体 (AeALP 抗体) を作製した。*aealp* 遺伝子を pFastBac1 ベクターに組み込み、Bac-to-Bac システムにより、組換えバキュロウィルス (AcMNPV-AeALP) を作製した。この AcMNPV-AeALP を感染させることで Cry11Aa トキシン非感受性昆虫細胞である Sf9 細胞に AeALP を発現させた。AcMNPV-AeALP を感染させた Sf9 細胞からタンパク質を回収し、SDS-PAGE に供試するとともに、Western blotting および AeALP 抗体を用いた酵素免疫アッセイを行うことで AeALP が Sf9 細胞で発現していることが確認された。AeALP を発現させた Sf9 細胞培養液中に Cry11Aa トキシンを加えることで、細胞膜上に Cry11Aa トキシンが結合することが確認できた。これらのことから Cry11Aa トキシンは、AeALP をレセプターとして認識することが明らかになった。

Cry11Aa トキシン結合タンパク質は ALP の他に、カドヘリン、APN が確認されているが、Cry11Aa トキシンがレセプターと結合した後にオリゴマー化し、中腸上皮細胞に細孔を形成することを考慮すると、膜上を自由に動ける GPI アンカー型タンパク質の AeALP が重要な役割を果たすと考えられる。AeALP の Cry11Aa トキシンに対するオリゴマー化能や ALP、カドヘリン、APN の Cry11Aa トキシンに対する結合能を詳細に調査していくことで殺虫活性作用機構が解明できると考える。