

Cry8 のハムシ類殺虫活性機構の解明

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野
山田 溪花

(背景と目的) *Bacillus thuringiensis* (Bt) の産生する Cry タンパク質は、特異的殺虫活性を有することから、その活性機構の解明がおもに鱗翅目昆虫で進んでいる。鞘翅目の幼虫に対し殺虫活性を示す Cry タンパク質は Cry3Aa があるが、その殺虫活性機構は鱗翅目のものと同様であると考えられている。一方、本研究室で供試した Cry8Da は鞘翅目の幼虫だけではなく、成虫に対して殺虫活性を示す。よって、Cry3Aa と Cry8Da は異なる殺虫活性機構を有すると考えた。鞘翅目には農業上重要な害虫が多種属しているが、それらに対し殺虫活性を有する Cry タンパク質の種類は少なく、殺虫活性機構も不明な点が多く、成虫に対しては未だ解明されていない。昆虫消化液中のプロテアーゼによるプロセッシングは殺虫活性機構の初期段階であり、Cry タンパク質が活性型トキシンとなる段階の、トキシンの特異的殺虫活性を決定する重要な段階である。本研究では、Cry8Ca と Cry8Da のハムシ類成虫 7 種に対する殺虫活性試験を実施し、ハンノキハムシ成虫消化液およびセリンプロテアーゼによる両 Cry8 のプロセッシング様式の調査と、それらの産物のハンノキハムシ成虫 BBMV に対する結合調査を行った。

(方法と結果) Bt で発現させた Cry8Ca および Cry8Da を、7 種のハムシ類成虫の各食餌葉に塗布することにより殺虫活性試験を行い LC₅₀ 値を算出したところ、Cry8Da はハンノキハムシ、イネクビホソハムシ、ヤマナラシハムシに対し殺虫活性を示したが、Cry8Ca は 7 種すべてに対し殺虫活性を示さなかった。Cry8Ca と Cry8Da をハンノキハムシ成虫消化液により処理し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、プロセッシング様式を調査した結果、Cry8Da は 64kDa と 54kDa のコアトキシン断片が生じたが、Cry8Ca はそれよりも小さな断片 (52kDa) に消化されコアトキシン断片が生成されなかった。また、鞘翅目昆虫の消化液に多く含まれるトリプシンとキモトリプシンによるトキシンのプロセッシングを SDS-PAGE により調査した結果、消化液による処理同様に Cry8Ca は 52kDa にまで消化された。トリプシンで処理した Cry8Ca と Cry8Da をビオチンでラベルし、ハンノキハムシ成虫 BBMV とのトキシンオーバーレイアッセイを行ったところ、同サイズのタンパク質と結合がみられた。両 Cry8 トキシンによるヘテロガスコンペティションアッセイの結果、結合が競合することが確認された。

(考察及び結論) Cry8Da はハンノキハムシ成虫消化液によりコアトキシンが生じるが、Cry8Ca はさらに消化されることから、ハンノキハムシ成虫に対する Cry8Da および Cry8Ca の殺虫活性機構において、消化液によるプロセッシングは重要であることが明らかとなった。また、トリプシンで活性化した両 Cry8 トキシンは受容体と考えられるタンパク質に結合し、ヘテロガスコンペティションによりそれぞれ競合することから、同じ受容体と結合することが示唆された。ハンノキハムシ成虫の殺虫活性機構においては、他の Cry トキシンで重要な役割を示すとされる、消化液によるトキシンコア形成以降の段階よりも、消化液によるトキシンコア形成段階が重要であると考えた。