

Cry39Aa トキシンのハマダラカ特異的殺虫作用機構解明と レセプター解析

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野
石垣俊一郎

【背景と目的】 *Bacillus thuringiensis aizawai* BUN1-14 株由来の Cry39Aa は、ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) 幼虫に対し、*israelensis* 由来でカ類に殺虫活性を有する Cry4Aa, Cry11Aa より強い殺虫活性を示す。Cry39Aa の殺虫作用機構については、当研究室の伊藤 (2006) により研究が進められ、幼虫に食下された Cry タンパク質が中腸のアルカリ性環境下で可溶化され 72 kDa のプロトキシンとなり、消化液中のトリプシン様酵素によるプロセッシングにより 60 kDa の活性型トキシンが生成されることが明らかになった。しかし以降の作用ステップについては不明であるため、本研究ではまずトキシンとレセプターとの結合というステップに着目し、Cry39Aa トキシンの作用機構解明を目指した。

【方法】 Cry39Aa トキシンのレセプターとの結合領域であるドメイン II のループ 1 (³⁴⁹KYAYWR³⁵⁴) に点変異導入を行い、殺虫活性試験およびハマダラカ中腸刷子縁膜小胞 (BBMV) との結合試験を行った。Cry39Aa トキシンのレセプターとして Alkaline phosphatase (ALP) に注目し、ハマダラカ幼虫から *asalp4* 遺伝子をクローニングした。*asalp4* 遺伝子がコードするタンパク質である AsALP4 を His タグ融合タンパク質 (AsALP4t-His, AsALP4tn-His) として大腸菌で発現し、Cry39Aa トキシンとの結合および殺虫活性に与える影響を調査した。

【結果及び考察】 ループ 1 のチロシン (Y³⁵⁰ および Y³⁵²) をアラニンに置換した Cry39Aa [Y350A/Y352A] は Cry39Aa と比べてハマダラカ殺虫活性が有意に低下し、ループ 1 のすべてのアミノ酸をアラニンに置換した Cry39Aa [Mm1] は殺虫活性が大幅に低下した。チロシンを同じ芳香族アミノ酸で側鎖に水酸基をもたないフェニルアラニンに置換した変異体 (Cry39Aa[Y350F], Cry39Aa[Y352F], Cry39Aa[Y350F/Y352F]) は、Cry39Aa と比較して殺虫活性に顕著な差はなかった。ビオチンでラベルした変異 Cry39Aa トキシンとハマダラカ BBMV との結合を調査したところ、Cry39Aa[Y350A/Y352A] トキシンおよび Cry39Aa [Mm1] トキシンの結合量は Cry39Aa トキシンと比べて低下していた。ハマダラカからクローニングし大腸菌で発現させた AsALP4t-His ならびに AsALP4tn-His は、Cry39Aa トキシンのハマダラカ BBMV との結合抑制効果や、Cry39Aa トキシンとの結合による殺虫阻害活性を示した。以上の結果から、Cry39Aa トキシンのドメイン II ループ 1 の分子構造のうち Y³⁵⁰ と Y³⁵² がレセプターとの結合ならびに殺虫活性に大きく関与していること、AsALP4 の N 末端側の特定の領域が結合エピトープとして Cry39Aa トキシンに認識され、生体内でレセプターとして機能していることが示唆された。