

## ネッタイシマカ由来アルカリフォスファターゼの

### Cry11Aa トキシンレセプターとしての機能評価

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 小林洋平

#### 1. はじめに

デング熱を媒介するネッタイシマカに対する防除手段の一つに *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) を用いた生物的な防除があり, Bti が産生する Cry11Aa タンパク質はネッタイシマカに対して高い殺虫活性を示す。その作用機構において重要だと考えられているのがネッタイシマカ中腸で発現しているレセプターとの結合である。本研究では Cry11Aa トキシンレセプターの候補であるアルカリフォスファターゼ (AeALP) に注目し, AeALP を大腸菌および細胞で発現させ Cry11Aa トキシンとの結合調査を行い, AeALP の Cry11Aa トキシン殺虫作用機構における役割を調査した。

#### 2. 方法

Cry11Aa トキシンレセプターの候補である 5 つの AeALP (1, 2, 3, 4, 7) を同定し大腸菌で発現させ, Cry11Aa トキシンとの結合実験をプルダウンアッセイにて行った。また, Bac to Bac システムを用いて *Aealp1* 遺伝子を組込んだ組換えバキュロウイルスを作製し, *Spodoptera frugiperda* 由来の培養細胞 (Sf9) に感染させ, Sf9 細胞に AeALP1 を発現させた。この細胞を用いて Cry11Aa トキシンとの結合実験を行い, Cry11Aa 一次抗体及び FITC ラベル二次抗体を用いて Cry11Aa トキシンのシグナルを蛍光顕微鏡で検出した。また, Cry11Aa トキシン存在下における同細胞の形態観察を倒立顕微鏡にて行った。

#### 3. 結果と考察

大腸菌で発現させた各 AeALP と Cry11Aa トキシンとの結合実験では AeALP1 が最も高い結合能を示した。また, AeALP1 を発現させた Sf9 細胞上で Cry11Aa トキシンのシグナルが検出され, 同細胞において Cry11Aa トキシンを投与して 120 分後に細胞のブレbbingが観察された。この結果から AeALP1 は Cry11Aa トキシンのレセプターである可能性が高いと考えられる。

#### 4. 今後の課題

Cry11Aa トキシンはオリゴマー化により高い殺虫活性を示すことが報告されている。このため, Cry11Aa トキシンオリゴマー存在下での AeALP1 の機能を調査することにより, AeALP1 が Cry11Aa トキシン殺虫作用機構においてどのステージで機能しているかを検証することができると考えられる。