

## Cry8Da トキシン殺虫作用機構におけるコクヌストモドキ由来 ADAM に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 半谷 大輝

### 1. はじめに

芽胞形成細菌 *Bacillus thuringiensis* が芽胞形成時に産生する結晶性タンパク質 (Cry タンパク質) は鱗翅目, 双翅目, 鞘翅目昆虫に対して特異的殺虫活性を示すものが存在する。Cry タンパク質の殺虫作用機構は鱗翅目昆虫については研究が進んでいる一方で, 鞘翅目昆虫については明らかにされていない部分が多い。Cry タンパク質の殺虫作用機構を解明する事は Cry タンパク質を害虫防除資材として持続的に利用する上で重要であると考えられる。そこで鞘翅目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry3Aa トキシンの受容体として報告されている A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) に注目し, 本研究ではコクヌストモドキに殺虫活性を示す Cry8Da トキシンの殺虫作用機構における ADAM の機能解析を目指した。

### 2. 方法

コクヌストモドキ終齢幼虫の中腸上皮細胞より刷子縁膜小胞 (TcBBMV) を分離精製した。Cry8Da トキシンとコクヌストモドキ消化液の主成分であるトリプシン, キモトリプシンと TcBBMV をインキュベートし, Cry8Da トキシンのオリゴマー化を試みた。Cry8Da トキシンオリゴマー化にカドヘリン様タンパク質 (TcCAD-like) が関与すると推測し, Cry8Da トキシンオリゴマー化時の TcCAD-like の分子量を調査し, 分子量から推測されるドメイン構造を予測した。Zn<sup>2+</sup>および Fe<sup>3+</sup>のキレート剤であるアセトヒドロキサム酸 (AHA) の添加による Cry8Da トキシンオリゴマー化への影響および TcCAD-like の構造変化を調査した。

### 3. 結果と考察

TcBBMV と Cry8Da トキシン, トリプシン, キモトリプシンを 37°C, 16 時間インキュベートし, 抗 Cry8Da 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ約 260 kDa のシグナルが確認された。プロテアーゼインヒビターカクテルの添加によりシグナルが消失することから, 約 260 kDa のシグナルは Cry8Da トキシンペンタマーであると考えられた。Cry8Da トキシンオリゴマー化時の TcCAD-like の分子量を調査するため, 抗 TcCAD-like 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ約 60 kDa のシグナルが確認された。同様の実験系に AHA を添加しウェスタンブロットを行ったところ, AHA の濃度に依存して Cry8Da トキシンオリゴマー化は阻害され, TcCAD-like は AHA 添加により 60 kDa 以下の断片化されることが確認された。以上のことから TcCAD-like の断片化によって Cry8Da トキシンオリゴマー化が阻害されると考えた。哺乳動物において ADAM に分解制御されるカドヘリンに特徴的なドメイン構造を持つ TcCAD-like はコクヌストモドキにおいて ADAM に分解制御され Cry8Da トキシンオリゴマー化に関与するという仮説を立てた。

### 4. まとめ

今回立てた仮説が正しいとするならば, 鞘翅目昆虫において ADAM は Cry トキシンに対する防御機構として機能する可能性が考えられる。