

## Cry8Da 殺虫活性機構における

### マメコガネ幼虫由来アミノペプチダーゼ N の機能解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 谷口 悠

#### 1. 背景と目的

マメコガネは鞘翅目昆虫に属していて重要な農業害虫の1種である。Cry8Da トキシンは *B. thuringiensis galleriae* SDS-502 株から分離され、マメコガネ幼虫および成虫に殺虫活性を示す。従来の生物農薬では成虫に対して殺虫活性を持つものではなく、Cry8Da トキシンを使用することで効果的な防除と食害の低減が期待できるが、作用機構について詳しいことはわかっていない。そこでレセプターの特定が試みられ、幼虫では約110 kDa の Cry8Da トキシン結合タンパク質が、質量分析の結果アミノペプチダーゼ N (APN) であることが明らかになり、アミノ酸配列が特定された。本研究ではマメコガネの APN (PjAPN) が幼虫における Cry8Da トキシンレセプターであるか確認するための調査を行った。

#### 2. 方法

*pjapn* 遺伝子塩基配列から、Cry8Da トキシンとの結合に関係がないとされるシグナルペプチドおよび GPI アンカリングサイト領域を取り除いた PjAPNt を発現させ、Cry8Da トキシンとの結合を確認した。PjAPNt を N 末端側の PjAPNtn と C 末端側の PjAPNtc に分け発現させ、プルダウンアッセイによりトキシン結合領域を推測した。また、RNAi により PjAPN をノックダウンした個体の BBMV (中腸刷子縁膜小胞) を用いた結合試験を行い、Cry8Da トキシンの BBMV 上への結合に及ぼす影響を調査した。

#### 3. 結果と考察

発現させた PjAPNt を、トキシンオーバーレイアッセイに供試したところ、Cry8Da トキシンとの結合能を示したことから、マメコガネ幼虫のもつ PjAPN が Cry8Da トキシンレセプターとして働いていることが示唆された。また PjAPNtn と PjAPNtc を用いてプルダウンアッセイを行い、トキシン結合部位は PjAPN の C 末端側に含まれることを確かめた。さらに RNAi を用いて PjAPN のノックダウンを行い、Cry8Da トキシンとの結合実験を行ったが、RNAi 処理を行ったものとコントロールとの間で Cry8Da トキシンと BBMV との結合に差は見られなかった。マメコガネ中腸上には PjAPN 以外のレセプタータンパク質が存在しており、それらの分子に Cry8Da トキシンが結合したため、PjAPN のみをノックダウンしても変化が見られなかったと考えられる。また APN には複数のグループが存在するため、今回調べた PjAPN のほかにもマメコガネ幼虫体内には Cry8Da レセプタータンパク質である APN が存在する可能性もあり、さらなる調査が求められる。