

## Cry44Aa トキシンのネッタイシマカにおけるレセプター調査

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 中神あゆみ

### 1. はじめに

*Bacillus thuringiensis* はグラム陽性の土壌細菌であり、孢子形成時に特異的な殺虫活性を示す結晶タンパク質を産生する。このことにより、害虫防除資材として広く利用されている。本研究室で分離された *B. thuringiensis entomocidus* INA288 が産生する Cry44Aa は、デング熱や黄熱などを媒介するネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) に対し *israelensis* 由来の Cry4Aa や Cry11Aa より高い殺虫活性を持ち、新規防除資材として有用性が期待されているが、詳細な作用機構は未だ明らかになっていない。Cry トキシンの作用機構において特に重要な位置を占めているのが、可溶化されプロセッシングを受けた後、Cry トキシンが昆虫中腸内のレセプターと結合するステップであり、レセプターの同定はターゲットとなる昆虫に対する殺虫作用機構の理解に結びつく。本研究では、Cry44Aa トキシンの作用機構解明を目的とし、他の Cry トキシンレセプターとして同定されているアルカリフォスファターゼ(以下 ALP)に着目し、レセプター分子としての機能調査を行った。

### 2. 方法

Cry44Aa トキシンとの結合調査として、*aelp* 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させ、AeALP をプルダウンアッセイ、オーバーレイアッセイに供試した。Cry44Aa トキシンと AeALP を混合し、ネッタイシマカに対する殺虫活性阻害試験を行った。Bac to Bac システムを用いて作製された組換え AcMNPV (AcMNPV-AeALP) を Sf9 細胞にインフェクションすることで AeALP を発現させた。AeALP を発現させた Sf9 細胞に Cry44Aa トキシンをアッセイし、トリパンブルーにより死細胞の観察を行った。

### 3. 結果と考察

プルダウンアッセイによる結合調査を行った結果、AeALP1 と Cry44Aa トキシンの結合を示すシグナルが検出された。Cry44Aa トキシンオーバーレイアッセイによる結合調査においても、AeALP1 との結合が確認できた。AeALP1 を Cry44Aa トキシンと混合したものをネッタイシマカ幼虫に与え、AeALP1 が殺虫活性に与える影響を調査した結果、AeALP1 は Cry44Aa トキシンの殺虫活性を阻害することが確認された。これらの結果から、Cry44Aa トキシンのレセプター候補として AeALP1 を選抜した。組換え AcMNPV を Sf9 細胞にインフェクションし、AeALP1 に付加した FLAG タグによりその発現を確認した。AeALP1 を発現させた Sf9 細胞に Cry44Aa トキシンをアッセイした結果、トリパンブルーにより染色されトキシンによる細胞損傷が観察された。以上のことから AeALP1 が Cry44Aa トキシンのレセプターであると考えた。

### 4. まとめ

結合調査から、AeALP1 は Cry44Aa トキシンと結合することが明らかになった。AeALP1 を発現させた Sf9 細胞において Cry44Aa トキシンによる死細胞の増加が観察され、AeALP1 は Cry44Aa トキシンのレセプターとして機能していることが示唆された。