

# Cry8Da トキシンレセプターとしてのマメコガネ成虫由来

## β グルコシダーゼの調査

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 池田 優里恵

### 1. はじめに

マメコガネ (*Popillia japonica*) 成虫は、様々な農作物を食害し重大な被害を与えている。*Bacillus thuringiensis galleriae* SDS-502 株が産生する Cry8Da は、マメコガネ成虫に対し殺虫活性を示し、Cry8Da の殺虫活性機構を解明することは、成虫防除に有効な新規 Cry トキシンの探索に繋がる。Cry トキシンの殺虫活性機構において、Cry トキシンレセプターの機能解明は重要である。これまでに β グルコシダーゼ (APjbGlu) がマメコガネ成虫における Cry8Da トキシンレセプター候補分子として同定され

(Yamaguchi *et al.*, 2013), APjbGlu は *in vitro* でも Cry8Da トキシンと結合することが確認された。本研究では *apjbglu* ノックダウン個体の Cry8Da トキシンに対する感受性と、APjbGlu を発現させた昆虫培養細胞 Sf9 の Cry8Da トキシンに対する応答を評価した。

### 2. 方法

RNAi 法により *apjbglu* をノックダウンさせたマメコガネ成虫に Cry8Da トキシンを与えた。生存個体でノックダウンされていることを reverse transcription-定量 PCR (RT-qPCR) を用いて *apjbglu* mRNA 転写量を定量し確認した。Bac to Bac システムにより APjbGlu を発現する組換え AcMNPV を作製・感染させ、APjbGlu を発現させた Sf9 細胞に Cry8Da トキシンを供試し、細胞形態の変化を観察した。APjbGlu を発現させた Sf9 細胞と Cry8Da トキシンとの結合を、抗 Cry8Da トキシン血清を用いた免疫染色法により観察した。

### 3. 結果と考察

*apjbglu* ノックダウンマメコガネ成虫と Cry8Da トキシンを用いた殺虫活性試験では、生存個体における *apjbglu* mRNA 量がコントロール個体に比べて約 200 分の 1 に減少していた。生存個体では *apjbglu* mRNA 量の減少により APjbGlu タンパク質発現量が減少し、Cry8Da トキシンに対し非感受性になった。APjbGlu が Cry8Da トキシンレセプターとして機能している可能性が強まった。APjbGlu 発現 Sf9 細胞での Cry8Da トキシン処理の効果を解析した結果、21.1% の細胞で細胞膨潤や細胞が培養フラスコからはがれる現象が確認された。コントロールである EGFP 発現 Sf9 細胞ではトキシンにより細胞膨潤などが観察された細胞は 5.6% であった。抗 Cry8Da トキシン血清による免疫染色実験で、Sf9 細胞膜上の APjbGlu と Cry8Da トキシンの結合が観察された。これらの結果から APjbGlu は Cry8Da トキシンと結合し、殺虫活性に影響を与える Cry8Da トキシンレセプターであると結論した。