

## Cry1Ia トキシンによる

### コナガカドヘリン様タンパク質発現細胞の応答の評価

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 佐藤 文美

#### 1. はじめに

アブラナ科作物を食害するチョウ目昆虫コナガ (*Plutella xylostella*) による被害は全世界で年間 40~50 億 US ドルにもなり, その防除資材として *Bacillus thuringiensis kurustaki* HD-1 が広く利用されてきた。しかし, 連続的な使用により HD-1 抵抗性コナガの出現が世界中で報告されており, 新たな防除資材の探索が急務である。Cry1Ia トキシンはこの HD-1 抵抗性コナガに対し強い殺虫活性を有することが確認され (Cui *et al.*, 2009), 新たな防除資材として利用できる可能性があるが, Cry1Ia トキシンの殺虫活性機構はまだ明らかになっていない。殺虫活性機構を解明する上で Cry トキシンレセプターの同定と機能解析が重要である。コナガにおける Cry1Ia トキシンレセプターは, Cry1Ac トキシンのレセプターである ABCC2 トランスポーター (PxABCC2) ではなく, 他の Cry1 トキシンのレセプターであるカドヘリン様タンパク質 (PxCad) であると仮説を立てた。本研究では, バキュロウイルス発現系によって PxCad を発現させ, PxCad が Cry1Ia トキシンレセプターであるかを評価した。

#### 2. 方法

Sf9 細胞で PxCad を発現する組換え AcMNPV を作成するため, コナガから *cadherin* 遺伝子をクローニングし, トランスファープラスミド (pFBD-PxCadFLAG-EGFP) を調製した。このプラスミドと Tn7 を用いたトランスポジションを利用し, 組換え AcMNPV を作製した。この組換え AcMNPV を Sf9 細胞に感染させ PxCad 細胞膜上で発現していることを FLAG 抗体による免疫染色で確認した。この組換え AcMNPV を MOI=2 で接種し PxCad, EGFP, PxABCC2 および AeCad 発現 Sf9 細胞に Cry1Ia トキシンを供試し, 細胞形態の変化を観察した。

#### 3. 結果と考察

PxCad 発現 Sf9 細胞では, Cry1Ia トキシン処理による細胞損傷が 22% 観察された。PxABCC2 発現 Sf9 細胞では, トキシンによる細胞損傷は 7% であり, ネガティブコントロールとした EGFP 発現 Sf9 細胞, ネットアイシマカ由来のカドヘリン (AeCad) 発現 Sf9 細胞では細胞損傷はそれぞれ 11%, 9% であった。これらの結果から, Cry1Ia トキシンが PxCad 発現細胞に対して特異的に細胞損傷を起こしたと考えた。また, Cry1Ia トキシンは PxABCC2 発現に損傷を起こさせず, Cry1Ia トキシンが PxABCC2 変異によって HD-1 抵抗性を獲得したコナガに対しても殺虫活性を持つことと一致する。本研究で PxCad 発現 Sf9 細胞が Cry1Ia トキシンにより細胞損傷が見られたこと, Cry1Ia トキシンと PxCad が結合すること (Iñigo *et al.*, 2006) から, Cry1Ia トキシンのレセプターは PxCad であると結論した。

#### 4. 参考文献

- Cui *et al.*, 2009. *Acta Hort Sin* 36: 1161-1168
- Iñigo R de E *et al.*, 2006. *Appli. Environ. Microbiol.* 72: 4796-4804