

## 試験研究成果普及情報

部門	その他	対象	研究
課題名：乳化病菌から単離した新規結晶タンパク質の殺虫活性			
<p>[ 要約 ] 乳化病菌セマダラ株から単離した遺伝子 <i>cry43Aa1</i> は、新規の結晶タンパク質をコードする遺伝子である。大腸菌を宿主とする発現系を用いて作られる <i>Cry43Aa1</i> タンパク質は、コガネムシ類幼虫に強い殺虫活性及び摂食阻害を引き起こす。</p>			
<p>キーワード（専門区分） バイテク（研究対象） -                      （フリーワード） 殺虫活性・遺伝子・結晶タンパク質・コガネムシ</p>			
<p>実施機関名（主査）農業総合研究センター生物工学部微生物工学研究室                      （協力機関）農業総合研究センター生物工学部遺伝子工学研究室                      （実施期間）2002年度～2003年度</p>			

### [ 目的及び背景 ]

乳化病菌セマダラ株はコガネムシ類幼虫に対して高い殺虫活性を示すが、感染源となる孢子のうを人工培養することは難しく、本菌を用いた防除剤の開発を妨げている。一方、孢子のうの中に含まれる結晶タンパク質は、コガネムシ幼虫に摂食阻害や殺虫性を示す。そこで、乳化病菌セマダラ株から、コガネムシ類幼虫の食欲阻害や殺虫活性に直接関わっている結晶タンパク質をコードする遺伝子を単離する。単離した遺伝子を用いて、結晶タンパク質の大量発現系を構築し、殺虫性結晶タンパク質を利用した防除剤の開発を目指す。

### [ 成果内容 ]

1. 乳化病菌セマダラ株の全 DNA ライブラリーから、結晶タンパク質特異的抗血清を用い、抗体陽性クローンを選抜した。約 17kb の挿入断片を持つクローンについて挿入断片の全塩基配列を決定したところ、2つの完全長の結晶タンパク質遺伝子及び1つの不完全長の結晶タンパク質遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は、新規の結晶タンパク質をコードしていると判断され、それぞれ *cry43Aa1*、*cry43Ba1*、*cry43-like* と命名された（図1）。
2. 2種類の完全長の結晶タンパク質遺伝子（*cry43Aa1*、*cry43Ba1*）の発現クローンを作製し、ドウガネブイブイ幼虫に腐葉土とともに食べさせると、*cry43Aa1* 発現クローンは幼虫に対して強い摂食阻害及び殺虫活性を示す（表1）。
3. *cry43Aa1* 発現クローンは若齢幼虫には高い殺虫性を示すが、幼虫の齢期が進むと殺虫活性は低下する。しかし、*cry43Aa1* 発現クローンと、少量の孢子のう（感染に必要な量の 1/10）とを混用すると、それぞれ単独の場合より、殺虫性や摂食阻害効果が増大する（表2）。
4. *Cry43Aa1* 発現系として最適な組み合わせは、宿主として大腸菌 BL21(DE3)株、ベクターとしては pKK223-3 である。この発現系を LB 培地・培養温度 37℃ で、16 時間培養すると、培養液 1 ml 当たり 100～200 μg の *Cry43Aa1* タンパク質を発現させることができる。
5. 発現クローン菌体は 65℃ 15分・70℃ 10分または 75℃ 5分の熱処理により完全に死滅するが、*Cry43Aa1* タンパク質の殺虫活性は保持できる（表3）。

### [ 留意事項 ]

1. 大腸菌を宿主とする発現系を用いて作られる *Cry43Aa1* は、コガネムシ類幼虫の防除に利用できる可能性がある。今後は、製剤化に向けた技術開発が必要である。

[ 普及対象地域 ]

[ 行政上の措置 ]

[ 普及状況 ]

[ 成果の概要 ]

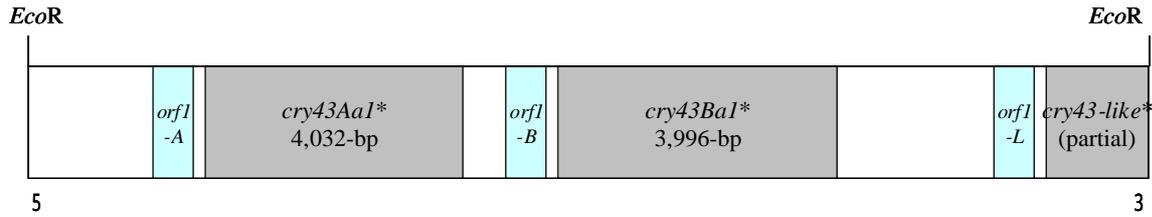


図1 抗体陽性クローンに含まれていたDNA断片中の予想される遺伝子

\*BT Crystal Protein Nomenclature Committee ( [http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html) )  
により新規結晶タンパク質をコードしていると判断され、命名された。

表1 セマダラ株からクローニングした結晶タンパク質遺伝子発現クローンのドウガネブイブイ 1 齢幼虫に対する殺虫活性

発現タンパク質	累積死亡率 (%)			
	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目
Cry43Aa1	23.3	50.0	80.0	90.0
Cry43Ba1	10.0	10.0	16.7	16.7
非組換え大腸菌	0	0	0	0

表2 cry43Aa1 発現クローンとセマダラ株の低濃度胞子の混合物のドウガネブイブイ 2 齢幼虫に対する殺虫活性

試験区	累積死亡率 (%)			
	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目
Cry43Aa1 + 胞子のう	0	3.3	80.0	90.0
Cry43Aa1	0	0	0	3.3
胞子のう	0	0	0	0
無 処 理	0	0	0	0

表3 熱処理により不活化させた cry43Aa1 発現クローンのドウガネブイブイ 1 齢幼虫に対する殺虫活性

試験区	累積死亡率 (%)			
	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目
65 , 15 分処理	6.7	80.0	93.3	96.7
70 , 10 分処理	6.7	86.7	90.0	96.7
75 , 5 分処理	0	76.7	90.0	93.3
熱処理なし	6.7	83.3	90.0	93.3
無 処 理	6.7	6.7	6.7	6.7

[ 発表及び関連文献 ]

千葉農総研研究成果集 8 (2004)

「乳化病菌からの殺虫活性遺伝子の単離と大量発現系の構築研究成果集」

[ その他 ]

農林水産省先端技術等地域実用化促進事業

「課題名：乳化病菌からの殺虫活性遺伝子の単離と大量発現系の構築」