

コガネムシ抗菌ペプチドの  
cDNAの単離と構造解析

森林昆虫研究領域 昆虫管理研究室 山内 英男

コガネムシ類幼虫は一般に「根切り虫」の一種として知られ、土壌中を動き回り植物の根部を食害する。そのため、スギ・ヒノキ苗畑の主要な害虫となっている。その防除は現在、化学農薬を主体としているが、化学農薬の使用は土壌中の小動物や微生物に与える影響が大きく、近年では環境に負荷の少ない天敵生物を利用した防除法が望まれている。その一つとして、森林総合研究所において開発されたクシダネマの利用がある。クシダネマはコガネムシ幼虫に寄生するスタイナーネマ属の線虫であり、幼虫体内に侵入するとこの線虫と共生関係にある *Xenorhabdus* 属の病原細菌を体液中に放出し、この細菌が幼虫を殺し、幼虫組織を分解して線虫の増殖に必要な栄養分を供給する。幼虫体内で増殖した線虫は、細菌を保有した状態で土壌中に出て次の宿主昆虫を探索する。

昆虫は外部からの異物侵入に対処するため高度に発達した生体防御機構を備えており、体内に侵入した小動物や微生物を非自己と認識し、生体防御因子の作用により死滅させ、体内から排除してしまう。一方、病原細菌は宿主昆虫体内で生存し宿主を致死させるので、生体防御機構を回避・抑制する生体機能を発達させていると推定される。



写真1. 寒天培地中の *Micrococcus luteus* に対する阻止円による抗菌活性の検出

本研究 (Yamauchi, 2001) では、代表的な苗畑害虫であるドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*) 幼虫を対象として実験を行っている。宿主側の生体防御因子を解析するため、この幼虫の主要な抗菌ペプチドに着目し、その相補的 DNA (cDNA) を単離して構造解析を行い、特性を明らかにした。

ドウガネブイブイ幼虫に非病原細菌を注射すると、抗菌ペプチド合成が誘導され、体液中に検出されるようになる。その抗菌活性を指標に (写真1) 幼虫体液から2種類の抗菌ペプチドを精製し、その全アミノ酸配列を解析した。その結果、2種類は極めて類似したアミノ酸配列からなるペプチドで、アミノ酸配列のうち2つのアミノ酸残基が異なっていた (図1)。アミノ酸配列に基づいてホモロジー検索を行ったところ、インセクトディフェンシン (Insect defensin) に属する新規の抗菌ペプチドであった。これらを *Anomala defensin A*, *B* と名付けた。 *Anomala defensin A*, *B* はともにグラム陽性菌に対して抗菌活性を示したが、グラム陰性菌であるクシダネマ病原細菌に対して、Aは活性を示さず、Bは活性を示した。このA,B間で検出された抗菌活性の相違は、図1で示したアミノ酸置換に起因すると推定された。

```

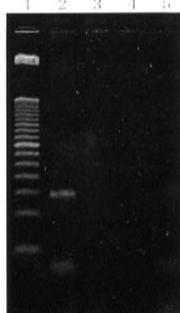
          10          20
A  VTCDLLSFEEA KGFAANHS1C
B  .....
          30          40
AAHCLAIGRKK GGSCQNGVCV CRN
.....V.....A.....
    
```

図1. *Anomala defensin A* と *B* のアミノ酸配列  
41残基のアミノ酸は同じであり、2残基の  
アミノ酸が異なることを示す。

(左下へ)

(右上へ)

次に、解析したアミノ酸配列に基づいてプライマーを設計し、遺伝子増幅 (PCR) 法によりほぼ全長の cDNA を単離した (写真2)。各クローンからの cDNA の全塩基配列を決定し、構造解析を行った。その結果、 *Anomala defensin A*, *B* の cDNA は極めて類似した構造を示すことが明らかとなった。すなわち cDNA は主要な3領域に区分され、5'側の非翻訳領域、タンパク質をコードする翻訳領域である ORF (Open Reading Frame) 及び3'側の非翻訳領域から構成されていた (図2)。さらに、ORF はシグナル配列をコードする領域及び *Anomala defensin* 前駆体をコードする領域から構成されていた。シグナル配列は高い疎水性を示すことから、前駆体の細胞外分泌の時に機能を果たすものと推定された。前駆体をコードする領域内部にはタンパク質分解酵素による限定加水分解を受けるサイトが存在し、ここで前駆体は切断され、最終生成物である機能的な *Anomala defensin* に修飾されると考えられた。3'側非翻訳領域には、酵素的にポリA鎖を付加するための配列であるポリAシグナル (AATAAA) が存在した。さらに各領域から、塩基置換変異が生じている箇所を特定した。



1: ラダーマーカー  
2: 増幅した cDNA フラグメント  
3, 4, 5: ネガティブコントロール

写真2. Degenerate PCR の電気泳動

(右上へ)

今後は単離した cDNA を利用して、病原細菌侵入にตอบสนองして宿主側の抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンを検出する実験を進める。本研究では、このような分子レベルの解析により病原細菌が宿主生体防御反応を回避・抑制する機構を明らかにし、その機構に基づいて殺虫効率をより高める研究へ発展させることを目指している。



図2. *Anomala defensin* cDNA 構造の概略図

引用文献

Hideo Yamauchi (2001) Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea*: Purification, amino acid sequences and antibacterial activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 75-84.