



| | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | 微生物殺虫蛋白質に関する遺伝子工学的研究 |
| Author(s) | 中村, 啓子 |
| Citation | 大阪大学, 1992, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38364 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| 氏 名 | 中 村 啓 子 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (工 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 0 4 9 6 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 4 年 12 月 28 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学 位 論 文 名 | 微生物殺虫蛋白質に関する遺伝子工学的研究 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 今中 忠行 教 授 高野 光男 教 授 大嶋 泰治 教 授 山田 靖宙 教 授 二井 将光 |

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、土壤細菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt 菌と略記する) の產生する殺虫蛋白質の諸性質と生産方法について遺伝子工学的手法を用いて研究した成果をまとめたもので、序論と本論5章及び総括と展望から成っている。

序論では、研究の背景と目的を述べ、本論文の構成を示している。

第1章では、鱗翅目の害虫に対して高い殺虫活性を示す Bt 菌株から、殺虫活性に重要と考えられる殺虫蛋白質の遺伝子をクローニングし、遺伝子の全塩基配列を決定して殺虫蛋白質の一次構造を明らかにしている。さらに、クローニングした殺虫蛋白質遺伝子を大腸菌 (*Escherichia coli*) で高発現させ、単一の殺虫蛋白質を容易に大量調製できることを示している。

第2章では、クローニングした殺虫蛋白質遺伝子を、Bt 菌と同じグラム陽性の *Bacillus* 属細菌である枯草菌 (*B. subtilis*)、および好熱菌 (*B. stearothermophilus*) を宿主として発現させ、殺虫蛋白質の產生を確認している。

第3章では、害虫に対して異なる殺虫活性を示す2種の殺虫蛋白質の遺伝子を組換え、大腸菌で発現させることにより、キメラ殺虫蛋白質を作製し、その性質を解析している。殺虫活性に重要な領域を明らかにするとともに、殺虫蛋白質の構造と機能の関係を考察している。

第4章では、昆虫の消化液プロテアーゼによるプロセシングが殺虫蛋白質の活性化と不活性化の過程に関与していることに着目し、殺虫蛋白質のアミノ酸残基のうちプロテアーゼで認識される残基のコドンを部位特異的変異導入法を用いて改変して27種の改変殺虫蛋白質遺伝子を作製し、大腸菌で発現させている。產生した改変蛋白質の殺虫活性、消化液によるプロセシングを調べ、プロテアーゼに認識される部位の機能を考察している。

第5章では、殺虫蛋白質を高発現した大腸菌を高密度に増殖させるための培養条件を発酵槽を用いて検討し、大腸菌組換え体を高密度培養することにより殺虫蛋白質の大量生産が可能であることを示している。

総括と展望では、本研究で得られた成果をまとめ、今後の展望と解決すべき課題を述べている。

論文審査の結果の要旨

微生物を素材とする殺虫剤の開発は、有用微生物を自然界から分離、選抜することにより進められてきたが、微生物を積極的に育種するには、分子生物学的手法を用いて人為的に改良することが望まれた。Bt 菌を育種するためには、まず、殺虫剤の有効成分となる殺虫蛋白質の構造や殺虫活性発現に関わる機能を解明し、それに基づいて改良の方策をたてる必要があった。しかし、Bt 菌の產生する殺虫蛋白質の結晶は難溶性であり高分子量の蛋白質を複数含むことから、個々の殺虫蛋白質の構造や機能を解析する上で、蛋白質化学的手法による研究には困難が伴った。本論文は、遺伝子工学的手法を用いて殺虫蛋白質の構造解明、構造活性相関の解析、生産方法の検討を行なったものであり、主な成果は以下のとおりである。

- (1) 防除目標害虫に対して高い殺虫活性を示す Bt 菌株から殺虫蛋白質の遺伝子をクローニングしてその全塩基配列を決定し、本遺伝子のコードする殺虫蛋白質の全一次構造を明らかにしている。さらに、本殺虫蛋白質遺伝子を大腸菌で高発現させ、殺虫活性を保持する殺虫蛋白質を容易に大量調製する系を確立している。
- (2) 好熱菌の酵素遺伝子のプロモーターと殺虫蛋白質遺伝子を接続して導入することにより、枯草菌及び好熱菌内で殺虫蛋白質を産生させることに成功している。
- (3) 遺伝子工学の手法を用いて、防除目標害虫に対して異なる殺虫活性を示す2種の殺虫蛋白質のキメラ体や、プロテアーゼで認識されるアミノ酸残基を置換した変異殺虫蛋白質を作製し、それらの性質を解剖することにより、殺虫蛋白質の構造と機能の関係について考察している。殺虫活性あるいは蛋白質の構造保持に重要な領域を示し、また、殺虫活性に関与しているアミノ酸残基、殺虫蛋白質の昆虫消化液プロテアーゼに対する感受性に関与している残基を明らかにしている。さらに、アミノ酸3残基を同時に置換することにより、殺虫活性が野生型に比べ2.5倍増大した変異体を得ており、遺伝子を人工的に改変することにより、殺虫活性の向上した新規殺虫蛋白質を創製できることを示している。
- (4) 大腸菌組換え体を高密度培養することにより、殺虫蛋白質を大量生産できることを示している。

以上のように、本論文は微生物の產生する殺虫蛋白質の構造と機能並びにその生産方法に関して多くの新しい知見を与えており、これらの成果は微生物殺虫蛋白質を利用した殺虫剤を開発する上で有用性が極めて高く、応用生物工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は、博士論文として価値あるものと認める。