

(様式5)

指導教員 承認印	主	副	副
	㊟	㊟	㊟

学 位 （ 博 士 ） 論 文 要 旨

論文提出者	生物システム応用科学府 生物システム応用科学専攻 博士後期課程 循環生物システム学 専修 平成 24 年度入学 氏名 田中詩穂 ㊟				
主指導教員 氏 名	佐藤令一	副指導教員 氏 名	安藤哲	副指導教員 氏 名	梶田真也
論文題目	Cry1A 殺虫毒素によって誘導される 2 種類の細胞死の機構とその役割の解析				

論文要旨 (2,000 字程度)

Cry 毒素は、昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* の産生する結晶性のタンパク質で、限られた範囲の昆虫に殺虫活性を示すため 1960 年代から人畜に安全な微生物殺虫剤として使用されてきた。昆虫に食下された Cry 毒素は、昆虫の消化液によって可溶化、活性化され、昆虫消化管上皮細胞上にある受容体との相互作用を経て細胞を死に至らしめると考えられている。Cry 毒素の殺虫作用機構については、多くの研究が行われ一般的には全貌が明らかになりつつあるように思われてきた。しかし、挙げられてきた証拠を精査すると、そこには未解明な部分や疑わしい部分が多々残されていた。また、これまでの作用機構仮説を考え直さざるを得ない新たな証拠が幾つか報告された。そこで本研究では Cry1A 毒素とカイコガを主たる材料にして、この毒素の真の作用機構と個体に死をもたらす仕組みの解析を試みることにした。

本研究では、まず Cry 毒素によって引き起こされる細胞死の種類に着目した。先行研究において、Cry 毒素がアポトーシスを起こすことにより昆虫の消化管細胞が死ぬことが報告されている。そこで、カイコガ幼虫が Cry 毒素によって死ぬ際に起こる消化管細胞の脱落がアポトーシスによるものであるか否かを確かめることにした。Cry 毒素摂取後のカイコガ幼虫組織切片を染色、観察した結果、カイコガが死ぬ条件下ではアポトーシスは観察されず、細胞は、膨潤、破裂して死に至ることが分かった。一方で、カイコガが死なない低濃度の毒素を摂食させたカイコガ組織ではアポトーシスを起こしている細胞が高頻度で観察された。さらに、72 時間後には、毒素によって受けた傷害は消化管組織から消失しているのが観察された。このことから、Cry 毒素が作用したカイコガ幼虫消化管細胞においてアポトーシスは確かに誘導されるが個体死の原因ではなく、むしろ消化管細胞が毒素によって受けた傷害から回復するのに役立っていることが明らかになった。また、個体が死に至る際には、細胞が短時間で、膨潤、破裂して死ぬことが主な現象であることを再確認した。すなわち、Cry 毒素を摂食した個体の消化管においては死に向けた組織崩壊と回復に向けた組織更新に基づく治癒反応がせめぎ合い、死か回復に行きつくことを明らかにした。

次に、個体死の主な原因であることが分かった、それが結果的に組織崩壊つながる細胞が膨らんで死ぬ、機構に着目した。Cry 毒素は、昆虫消化管上皮細胞上に発現する受容体分子と相互作用し、消化管細胞にイオンや水の透過する孔を形成することで細胞が膨らんで死ぬという現象を誘導すると考えられている。しかしながら、そのような細胞死を誘導するのに必須の受容体分子については、これまでに複数の分子が候補として同定されて来たが、最近になりそれらの重要性に疑問がもたれる証拠が昆虫の Cry 毒素抵抗性研究の成果として幾つか発表された。そこで、カイコガ幼虫中腸上皮細胞上で受容体として機能すると報告されてきたカドヘリン様タンパク質(BtR175)、アミノペプチダーゼ N1 (APN1)、そして、新しく Cry1Ab 毒素抵抗性原因子として見つかり、今まで Cry 毒素殺虫作用機構との関連性が一度も報告されたことはなかったが、新たに受容体機能を検討する必要が生じた ABC transporter C2(以下 BmABCC2)分子を昆虫培養細胞に発現させ、In vitro でのバイオアッセイを行い、受容体としての機能を評価した。その結果、BtR175、及

び BmABCC2 を発現させた場合のみ細胞を膨潤させる細胞死を誘導する受容体としての機能を有することが示された。また、Cry 毒素に対して反応するのに必要な毒素濃度を比較したところ、BmABCC2 は BtR175 よりも約 1000 倍レベルで受容体としての機能が低いことが示唆された。さらに、この 2 分子を共発現させると BmABCC2 を単独で発現させた場合よりも約 10 倍から 1000 倍高い感度で Cry 毒素に反応することが分かった。このことから、宿主細胞に感受性を付与する能力において BmABCC2 が最も主要な分子であること、また BtR175 がそれと協調的に働いて Cry 毒素の細胞傷害機能を高めるはたらきを持つことが明になった。そして、この結果をもとにして、抵抗性研究の結果と矛盾のない新しい Cry 毒素の作用機構説を世界に提示した。

次に、この BtR175 が BmABCC2 と協調的に働く宿主細胞の傷害の機構について検討した。多くが引用する仮説に見られるように、BtR175 が APN と BmABCC2 と共に一連の作用の工程機構で働き Cry 毒素が孔を形成するのに役立っているのか、それとも現在もう一つの仮説にあるように BtR175 を介したプログラム細胞死を誘導するシグナルトランスダクションが動き結果として協調作用が実現するのかを調べるためにアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、Cry 毒素によって形成される孔の数を電気生理学的解析により評価した。その結果、BtR175 と BmABCC2 の両方を共発現させた卵母細胞においては、より短時間で多くの孔が形成されることが分かり、BtR175 と BmABCC2 の協調作用は Cry 毒素がより効率よく孔を形成することに基づいて生じることが明らかになった。これにより、Cry 毒素に対する細胞の感受性を決定づけている仕組みの理解に大きな展開をもたらすことができた。

また、本研究では、Cry 毒素がどの範囲の昆虫に効くかを規定すると考えられる、Cry 毒素が結合する BmABCC2 上の部位について検討した。まず、カイコガに Cry1Ab 抵抗性を生み出す原因であった BmABCC2 の 234 位のチロシンが存在する細胞外ループ 2 領域近傍が Cry 毒素との相互作用領域である可能性を調べた。実際に細胞外ループ領域 2 に対する変異体を作出し Cry 毒素に対する反応を観察したが、どの変異体も影響がないことが分かった。このことから BmABCC2 の Cry 毒素との相互作用領域は細胞外ループ 2 以外の領域であることが示唆された。そこで次に BmABCC2 の他の細胞外ループ領域に対する変異体を複数作製し、それら変異体を発現した細胞の Cry 毒素に対する反応を調べた。その結果、細胞外ループ領域 1 及び 4 に関して作製したいくつかの変異体を発現した細胞において Cry 毒素に対する感受性が失われた。このことから、Cry 毒素が BmABCC2 の細胞外ループ 1 または 4 の領域と相互作用していることが明らかになり、Cry 毒素がどの範囲の昆虫に効くかを規定している原理を考える上で最も重要な基盤知識を得たと考えられた。