

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

Mechanisms and roles of two types of cell death induced by Cry1A insecticidal toxin

2014.3

東京農工大学大学院

生物システム応用科学府

生物システム応用科学専攻

田中詩穂

目次

序論.....	9
第 1 章 カイコガ消化管上皮細胞で起こる濃度依存的な細胞死についての解析	
第 1 節 目的.....	25
第 2 節 材料と方法.....	13
1.2.1 供試昆虫	
1.2.2 Cry1Aa 毒素の活性化と精製	
1.2.3 カイコガ幼虫を用いたバイオアッセイ	
1.2.4 カイコガ幼虫組織切片の作製	
1.2.5 TUNEL 染色	
1.2.6 カイコガ幼虫中腸の cDNA 作製とリアルタイム PCR	
第 3 節 結果.....	17
1.3.1 異なる濃度の Cry1Aa 投与濃度とカイコガ 3 齢幼虫の病状との関係の経時的観察	
1.3.2 Cry1Aa 毒素投与後の中腸上皮細胞の経時的観察	
1.3.3 Cry1Aa 処理カイコガ幼虫中腸でのアポトーシス関連遺伝子発現レベルの比較	
第 4 節 考察.....	21
1.4.1 消化管上皮細胞で起こっている出来事	

1.4.2 消化管免疫誘導の分子機構

第2章 カイコガ ABC transporter C2 の Cry 毒素殺虫作用機構上での役割の解析

第1節 目的.....34

第2節 材料と方法.....36

2.2.1 昆虫培養細胞

2.2.2 cDNA のクローニング

2.2.3 組換え型 AcNPV の作製

2.2.4 Cry 毒素の精製

2.2.5 LDH アッセイ

2.2.6 細胞傷害率の算出

2.2.7 抗血清の作製

2.2.8 BmABCC2 変異体発現細胞表面上の毒素の染色

2.2.9 ウェスタンブロッティング

2.2.10 免疫染色

2.2.11 BtR175 発現細胞表面上の毒素の検出

2.2.12 SPR を用いた BtR175 と Cry1A 毒素の結合性状の解析

2.2.13 膜画分の調整

第3節 結果と考察.....44

2.3.1 カイコガ ABC transporter C2 (BmABCC2) の Cry 毒素受容体として機能の確認

2.3.2 BmABCC2 の Y234 挿入変異の Cry1Ab, Ac 抵抗性への関与の証明

- 2.3.3 BtR175 が Sf9 に与える感受性付与能力の BmABCC2 との比較
- 2.3.4 コナガ ABCC2 の Cry 毒素受容体としての機能の確認
- 2.3.5 AaABCC2 の Cry4Aa 受容体としての機能の有無の調査
- 2.3.6 BmABCC2 の Cry9 受容体としての機能の有無の調査

第3章 ABCC2 と BtR175 の協調作用についての解析

第1節	目的.....	80
第2節	材料と方法.....	82
3.2.1	昆虫培養細胞	
3.2.1	Cry 毒素の精製	
3.2.2	カイコガ幼虫を用いたバイオアッセイ	
3.2.3	細胞傷害率の算出	
3.2.4	SPR を用いた BtR175 と Cry 毒素の結合性状の解析	
3.2.5	T7 プロモーターへの cDNA の連結	
3.2.6	cRNA の合成	
3.2.7	電気生理学的解析	
3.2.8	ウエスタンブロッティング	
3.2.9	APN1 発現 Sf9 細胞の免疫染色	
3.2.10	受容体発現アフリカツメガエル卵母細胞の免疫染色	
第3節	結果と考察.....	87
3.3.1	BtR175-TBR と BmABCC2_S の共発現細胞にみられる Cry1A 毒素に対する高	

い感受性

3.3.2 BmABCC2 と BtR175 の協調作用の Cry 毒素の活性発現における意味

3.3.3 BmABCC2 と BtR175 の 2 分子間でみられた協調作用の Cry 毒素孔形成過程
に与える影響

第 4 章 BmABCC2 と Cry 毒素の結合動態及び相互作用領域の解析

第 1 節 目的.....112

第 2 節 材料と方法.....114

4.2.1 昆虫培養細胞

4.2.2 Cry 毒素の精製

4.2.3 Cry 毒素の細胞膜上での検出

4.2.4 Flag-tag の cDNA 配列 C 末端への連結

4.2.5 BmABCC2 変異体 cDNA の作製

4.2.6 組換え型 AcNPV の作製

4.2.7 膜画分の調整

4.2.8 細胞傷害アッセイ

4.2.9 銀染色

4.2.10 ウェスタンブロッティング

4.2.11 SPR を用いた BtR175 及び BmABCC2 と Cry1A 毒素の結合性状の解析

第 3 節 結果と考察.....119

4.3.1 BtR175-TBR 及び BmABCC2 の Cry 毒素との結合動態の解析

- 4.3.2 細胞外ループ領域 2 近傍が Cry 毒素との結合領域である可能性の検証
- 4.3.3 細胞外ループ領域 2 に挿入されるアミノ酸の種類の影響
- 4.3.4 BmABCC2 細胞外ループ変異体の Cry 毒素感受性に与える影響

総合考察.....	141
-----------	-----

謝辞.....	146
---------	-----

引用文献.....	148
-----------	-----

序論

グラム陽性好気性芽胞形成細菌 *Bacillus thuringiensis* は、1901 年に石渡繁胤がカイコガ (*Bombyx mori*) の卒倒病菌 (sotto disease bacillus) として報告した昆虫病原細菌である (石渡 1901)。しかし、石渡はその後も英文雑誌に *B. thuringiensis* を新種の微生物として記載しなかったため、1911 年にシノメマダラメイガから同菌を同定した Berliner によって卒倒病菌は、*B. thuringiensis* と命名され現在に至る (Berliner et al. 1915)。その後、*B. thuringiensis* の殺虫活性の本体が、芽胞形成時に作られる結晶性タンパク質 (以下 Cry 毒素)であることが、Angus らによって発見された (Angus et al. 1954)。現在、Cry 毒素の遺伝子配列を基に Cry1 – Cry72 に分類される 400 種類以上の Cry 毒素が同定されている (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)。 *B. thuringiensis* は、1 菌株が 1 種類の Cry 毒素を生産するとは限らず、例えば *Bacillus thuringiensis* HD-1 株では、Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac の 3 種類の毒素を生産するといったように、複数種類の毒素を生産することで高い殺虫活性を有するように昆虫との間で共進化してきたと考えられる。Cry 毒素は、前駆体 Cry 毒素の分子量を基に大きく 130 kDa 型と 70 kDa 型の 2 種類に分類される。130 kDa 型には、チョウ目に活性のある Cry1A 毒素、ハエ目に活性がある Cry4A、Cry4B 毒素、コウチュウ目に活性を示す Cry8C 毒素、そしてセンチュウ目に活性がある Cry5 毒素などがある。これら 130 kDa 型毒素は、昆虫の消化液に含まれるプロテアーゼにより限定分解され、N 末端のアミノ酸 20 残基程度及び C 末端の約半分を失い、65 kDa 前後の活性型毒素となり殺虫活性を示す (Aronson et al. 1995)。一方で、70 kDa 型には、チョウ目、ハエ目の両者に活性を示す Cry2 毒素、ハエ目に活性を示す Cry11A、Cry11B 毒素、コウチュウ目に活性を示す Cry3B 毒素などがある。70 kDa 型もプロテアーゼによる限定分解を受け、N 末端のアミノ酸数残基を失い、65 kDa 前後の分子になり活性型となる。

このように、Cry 毒素にはそれぞれが異なる昆虫に対して活性を示すわけであるが、これら殺虫活性を持つ Cry 毒素の多くは、5 箇所的高度に保存されたアミノ酸配列領域(ブロック)を持つことが分かっている(Hofte et al. 1989)。この保存ブロックは、Cry 毒素の殺虫活性において何か重要な役割を持つと考えられているとともに、*B. thuringiensis* が産生する Cry 毒素が共通の祖先から生まれ、進化してきたことを示す証拠でもある。

1 次構造における相同性の高さに加え、Cry 毒素は、3 次構造についても相同性が高いことが分かっている。現在までに 3 次構造の結晶構造解析が終わっている毒素は、Cry3Aa (Li et al. 1991)、Cry1Aa (Grochulski et al. 1995)、Cry1Ac (Derbyshire et al. 2001)、Cry2Aa (Morse et al. 2001)、Cry3Bb (Galitsky et al. 2001)、Cry4Ba (Boonserm et al. 2005)、Cry4Aa (Boonserm et al. 2006)、そして Cry8E (Guo et al. 2009) の 8 種類である。全ての毒素がドメイン I からドメイン III の 3 つのドメインから成り、基本的な 3 次元構造は、全ての Cry 毒素で共通している。ドメイン I は、N 末端部分に相当し、7 個の α -ヘリックスを含む、これらの α -ヘリックスが細胞膜に貫通し、小孔を形成すると考えられている。ドメイン II とドメイン III は β -シートを含む構造から成り、宿主昆虫の消化管上皮細胞上の分子と結合する役割を持つと考えられている。

Cry 毒素は、限られた範囲の昆虫に特異的に活性を示し (van Frankenhuyzen 2009)、哺乳類に無害であるため、1960 年代には、人畜に無害な殺虫剤 (BT 剤) として米国などで実際の農業現場において使用され始めた。さらに、1990 年代以降、分子生物学の発達と共に遺伝子組換え作物の作出が可能になり、Cry 毒素の遺伝子を導入した耐虫性遺伝子組換え作物 (*B. thuringiensis* Gene modified Crop; 以下 Bt crop) が米国を中心にトウモロコシ、トマト、ジャガイモなど多くの作物に適応されるようになった(Roh et al. 2007)。Bt crop の世界における作付面積は、1996 年には、110 万 ha であったのに対し、2010 年には、6,600 万 ha と急増している(Tabashnik et al. 2013)。米国において 2012 年度に生産されたトウモロコシの 67%が Bt crop であり、

(<http://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us.aspx>)、綿については、米国、中国、インド、オーストラリアで生産された綿の 79 - 95%が

Bt crop であることが報告されている (Tabashnik et al. 2013)。したがって、Cry 毒素は世界で最も広く農業利用されてきた毒素タンパク質であると言えそうである。

このような Cry 毒素を用いた生物的防除が 1990 年以降、急速に普及した背景には、第二次世界大戦以後の化学合成農薬の開発と、それとともに人々の間に浸透した化学合成農薬に対する社会的危機感である。Cry 毒素は、タンパク質であるがゆえに土壌中で分解されやすく、また紫外線により容易に失活するため、化学合成農薬において懸念されている環境汚染や人体に有害な物質が作物に残留する心配が回避できる。また、自然界において何億年もの間、昆虫と共に共進化してきた Cry 毒素に対する抵抗性は発達しにくいと考えられ、化学農薬の使用において問題視されていた抵抗性害虫の問題も克服できると期待されたこともその理由の 1 つにある。しかし、実際には、1985 年に実験室内で飼育されていたシノメマダラメイガ (*Plodia interpunctella*) で初めての Cry 毒素 (Bt 剤) 抵抗性害虫が認められた (McGaughey. 1985)。その後も、コナガ (*Plutella xylostella*) において Bt 剤抵抗性が発達したことが報告された (Tabashnik et al. 1999; Janmaat and Myers. 2003)。さらに、2007 年に南アフリカで初めての Bt Crop に対する抵抗性を発達させたヤガ (*Busseola fusca*) が報告されて以来 (van 2007)、*P. xylostella* (Tabashnik et al. 2010)や、ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) (Storer et al. 2010)、そして、コウチュウ目である根切りハムシ (*Diabrotica virgifera virgifera*) などにおいて次々と抵抗性の発達が報告されている (Gassmann et al. 2011)。このような Cry 毒素抵抗性 (Bt 剤や Bt crop 抵抗性を指す) の発達は、今後 Cry 毒素を用いた生物的防除手段の効果を高いレベルで維持し、長期的に使用していく上で解決すべき重要な課題と言える。

このように、既に 60 年以上もの間生物的防除手段として利用されてきた Cry 毒素であるが、その作用機構については、全て解明されたわけではない。実際に、*B. thuringiensis*

の殺虫活性の本体が Cry 毒素であることが明らかになった 1956 年の August らの報告以降、約 60 年もの間多くの研究者が、Cry 毒素が昆虫を殺す仕組みを明らかにしようと精力的に研究を行ってきた。その成果により Cry 毒素作用機構の大部分は解明されたように一般的には考えられているが、現在の作用機構仮説では説明できない現象が多く存在する。すなわち、カドヘリン様タンパク質を異所発現させた細胞の感受性は必ずしも個体死を説明できるほどの高さではない (Nagamatsu et al. 1999)。また、APN を異所発現させてもその細胞には毒素に対する感受性が付与できないとの報告がある (Luo et al. 1999)。さらには、APN 遺伝子の破壊に依存する抵抗性系統の発生の例は知られていない。さらにまた、Cry 毒素変異体 (Cry1AbMod、Cry1AcMod) は、カドヘリン様タンパク質に変異がある害虫を殺すことができることが報告されている (Soberon et al. 2007)。これらのことは、現在語られている作用機構仮説には問題があることを示唆していると考えられる。

感受性昆虫体内に取り込まれた Cry 毒素は、まず消化液中のプロテアーゼにより限定分解されることで、活性型の毒素となる (Aronson et al. 1995)。現在提唱されている消化管上皮細胞レベルの作用機構仮説には“Pore formation model” (Bravo et al. 2004) や “Signal transduction model” (Zhang et al. 2005; Zhang et al. 2006) などがある。前者では、Cry 毒素が感受性昆虫体内で殺虫活性を示すのには複数の過程が必要だとされてきた。昆虫消化管内で活性型になった毒素は、カドヘリン様タンパク質との相互作用を経てオリゴマー化し (Gomez et al. 2002; Jimenez et al. 2007)、更に他の細胞膜上の分子への結合を介して消化管上皮細胞の円筒細胞の細胞膜に挿入され、pore を形成する。中腸上皮細胞は、Cry 毒素により形成された小孔から大量に流入したイオンによる浸透圧の上昇により、細胞が膨潤、破裂し、結果として昆虫を死に至らしめるとされている (Knowles 1987)。一方、後者の仮説では、活性型になった毒素が G タンパク質の活性化を介してプロテインキナーゼ A (Protein kinase A、以下 PKA) を活性化することで、oncosis 様

のプログラム細胞死を細胞に誘発するとされる。しかし、この仮説は培養細胞においてのみ適用できることが示されたものであり、昆虫の消化管でも同じことが起こるか否かについては検討されていない。

Cry 毒素によって誘導される現象は、毒素が宿主昆虫をどのような機構で殺すかという殺虫作用のみにフォーカスを当てた研究がほとんどである。しかし、昆虫が死に至るまでに細胞で起こる現象は、毒素によって物理的に引き起こされる現象だけではなくそれに対抗しようとする宿主昆虫の免疫応答なども同時に起こることが考えられる。実際に、いくつかの研究においてはそのような昆虫の Cry 毒素に対する免疫応答とも考えられる反応に着目し、研究成果を報告している。アカイエカ (*Culex pipiens*) の幼虫においては、Cry 毒素を摂取することによって中腸上皮細胞でアポトーシスが誘導され、そのことが昆虫の個体死の原因となっていることが示唆されている (Smouse and Nishiura 1997)。アポトーシスとは、生物種間で高度に保存されたプログラム細胞死の 1 つであり、DNA の断片化、クロマチンの凝集、カスパーゼの活性化といった特徴により規定される (Kerr et al. 1972)。多様な動物種において発生の過程における細胞数の制御の役割を担い (Driscoll and Chalfie. 1992; Champlin and Truman. 1998; McKay. 1997)、また、傷害を受けた細胞で誘導されるアポトーシスを引き金に、幹細胞が分化、増殖することで細胞数を維持することに役立っているとの報告もある (Jiang et al. 2009)。

また、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) とネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) に Cry1Ab、Cry11Aa を処理し RNA 干渉 (RNA interference、以下 RNAi) を用いた研究成果からも MAPK p38 経路の活性化が、Cry 毒素を摂食した昆虫の Cry 毒素に対する抵抗性に重要であると報告した (Cancino-Rodezno et al. 2010)。さらに、近年、Bedoya-Pérez らは、*A. aegypti* において RNAi を行った実験結果より unfolded protein response (UPR) 経路が Cry11Aa に対する *A. aegypti* の免疫として機能していることを示した (Bedoya-Perez et al. 2013)。すなわち、昆虫の消化管の細胞は毒素によって傷害を受けるばかりではなく、

同時にそこから回避しようと反応していると期待された。そこで、第 1 章では、カイコが幼虫消化管上皮細胞で起こる、致死量の毒素を与えた際に細胞が短時間で死ぬという現象だけではなく、毒素による傷害と宿主側のその傷害に対抗しようとする反応の全てをみることで、昆虫消化管細胞で実際に起こっている Cry 毒素によって誘導される現象を正しく理解することを目指した。

前述した通り、Cry 毒素殺虫作用機構仮説は“Pore formation model” (Bravo et al. 2004) と“Signal transduction model” (Zhang et al. 2005; Zhang, et al. 2006) が有力であると考えられている。しかし、どちらが正しい仮説であるのか、また、全ての毒素においてこの作用機構仮説が当てはまるのかに関しては未解明である。しかしながら、これらの仮説に基づいた Cry 毒素作用機構上では、Cry 毒素は、宿主昆虫の消化管上皮細胞上に発現する受容体分子と相互作用することが必要であり、この受容体分子を明らかにすることは、Cry 毒素殺虫作用機構の全貌を知るうえで非常に重要であると言える。本研究で主に用いている Cry1A 毒素については、特にこの受容体についての研究が進んでおり、必ずしも機能の証明がないものも含めていくつかの受容体、あるいは受容体候補と称されるべき分子がいくつか報告されている。カドヘリン様タンパク質は、*B. mori* (Nagamatsu et al. 1999)、*M. sexta* (Hua et al. 2004)、ニセアメリカタバコガ (*Heliothis virescens*) (Jurat-Fuentes et al. 2006)、ヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) (Flannagan et al. 2005)において Cry1A 毒素に対する感受性を培養細胞に付与することのできる分子であることが示されている。また、*H. virescens* (Gahan et al. 2001)と、オオタバコガ (*Helicoverpa armigera*) (Xu et al. 2005)、ワタアカミムシガ (*Pectinophora gossypiella*) (Morin et al. 2003)の Cry 毒素抵抗性系統に関する抵抗性遺伝子の遺伝学的解析から、カドヘリン分子が正しく発現できなくなることが、抵抗性の 1 つの原因であることが示されている。一方で、グリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol、以下 GPI)アンカー型のタンパク質の 1 つ、アミノペプチダ

ーゼ N (Amino peptidase N、以下 APN)、特に APN Class 1 (以下 APN1)は、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に発現させることで、Cry1Ac に対する感受性が生まれたとの報告や (Gill et al. 2002)、APN1 のサイレンシングが Cry 毒素に対する幼虫個体の感受性を低下させるとの報告がある (Yang et al. 2010; Tiewsi et al. 2011)。また、Cry1Ac 抵抗性の *H. armigera* において APN1 分子に変異が入っていたとの報告がある (Zhang et al. 2009)。しかし、カドヘリン様タンパク質のように遺伝学的に APN1 が Cry 毒素抵抗性原因因子だと同定された例はなく、未だ APN1 の変異や発現量の減少と抵抗性の因果関係には不明瞭な部分が多く残っている。一方、APN と同様の GPI アンカー型タンパク質であるアルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase、以下 ALP)については、Cry 毒素抵抗性昆虫において ALP に対する結合性の低下が抵抗性と相関関係があることが報告されてはいるが、異所発現実験により Cry 毒素に対する感受性を付与できるとする報告はみられない (Jurat-Fuentes et al. 2004; Jurat-Fuentes et al. 2011)。2010 年、Gahan らにより今まで Cry 毒素殺虫作用機構上に一度も姿を現したことの無い ABC トランスポーター C2 (ATP-binding cassette transporters subfamily C member 2、以下 ABCC2) が、リンケージマッピングの結果に基づき Cry1Ac 抵抗性 *H. virescens* の抵抗性原因因子であるとして報告された (Gahan et al. 2010)。また、2012 年には、カイコガにおいても Cry1Ab 抵抗性カイコガ系統のリンケージマッピング解析が行われた結果から、ABCC2 分子の変異が Cry1Ab 抵抗性の原因であるとして報告された (Atsumi et al. 2012)。さらには、カドヘリン様タンパク質や APN に変異が認められなかった Cry1Ac 抵抗性の *P. xylostella* やイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) において ABCC2 分子内に変異があることが新たに見つかり (Baxter et al. 2011)、ABCC2 分子が Cry 毒素殺虫作用機構上で重要な働きをする分子であることが確定的になってきた。

そこで、第 2 章では、ABCC2 分子が Cry 毒素殺虫作用機構上で重要な働きをする分子 (受容体) であるか否かを検討することにした。すなわち、昆虫培養細胞 Sf9 にカイ

コガの ABCC2 (BmABCC2) 及びカドヘリン様タンパク質 (BtR175) の cDNA 配列を組み込んだ組換え型 *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPN)を用いて、Sf9 細胞膜上に受容体分子を発現させ、Cry1A 毒素に対する感受性を *in vitro* のバイオアッセイによって評価した。また、チョウ目である *P. xylostella*、ハエ目であるヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*)の ABCC2 についても受容体として機能するかを調べることで、Cry 毒素受容体として ABCC2 が機能している昆虫の範囲、及び、様々な Cry 毒素の中のどの範囲までが ABCC2 を利用できるのか、について考察した。また、この Sf9 細胞を用いたバイオアッセイの結果を基に BmABCC2 の受容体としての機能 (あるいは細胞に感受性を付与する機能) を BtR175 と比較することも試みた。

前述した有力な作用機構仮説の 1 つである“Pore formation model” (Bravo et al. 2004)においては、Cry 毒素が細胞毒性を発揮するのにはカドヘリン様タンパク質とアミノペプチダーゼ (APN)という異なる 2 種類の受容体に毒素の異なる部位で結合することが重要だとされている (Bravo et al. 2004)。また、*H. virescens* においては APN と同様の GPI アンカー型のタンパク質である ALP がカドヘリン様タンパク質と結合してオリゴマー化した毒素が第2の受容体として結合することで Cry 毒素の細胞膜への挿入が可能になるとの報告もある (Jurat-Fuentes et al. 2006)。さらに近年、Cry 毒素が APN と結合した後カドヘリン様タンパク質と結合し再び APN と結合するという”Ping pong binding model”も提唱されている (Pacheco et al. 2009)。少なくとも、チョウ目昆虫の消化管の細胞上に数種類の結合タンパク質が存在するのは事実であり、第 2 章で調べたような単独で細胞上に発現する系を調べただけでは Cry 毒素の真の作用の工程を正しく理解していない可能性がある。

そこで第 3 章では、BmABCC2 と BtR175 の 2 分子を同一の昆虫培養細胞に発現させることで、先行研究により主張されているような、ひと続きの作用工程で両分子が働き、その結果として Cry 毒素に対する感受性を高めるような毒素の作用のし方が存在する

かについて検討した。また、アフリカツメガエル卵母細胞に両分子を発現させ、形成される Pore を電気生理学的手法により定量的に解析することで、本研究で Cry 毒素が作用する過程で相互作用すると考えられた 2 分子の受容体により、どのようにして Cry 毒素の活性が高められるのについても考察した。

一方、第 4 章では、Cry 毒素の受容体として機能することが分かった BmABCC2 が受容体と呼ぶべき分子であるにも関わらず、Cry 毒素と結合する証拠が見つかっていない点に着目し、BmABCC2 と Cry 毒素との結合解離の動態をとらえることを試みた。その結果、確かに Cry 毒素と BmABCC2 が結合していることを示す証拠を得たため、更にその結合動態を APN1 や BtR175 と比較することで、BmABCC2 と Cry 毒素の結合動態にどのような特徴があるかを考察した。さらに、BmABCC2 分子のどの領域が Cry 毒素との結合領域かを探索することを試みた。

第1章 カイコガ消化管上皮細胞で起こる毒素濃度依存的な細胞死についての解析

第1節 目的

諸言でも既に述べた通り、感受性昆虫体内に取り込まれた Cry 毒素は、まず消化液中のプロテアーゼにより限定分解されることで、活性型の毒素となる (Aronson et al. 1995)。現在提唱されている消化管上皮細胞への作用機構仮説には、“Pore formation model” (Bravo et al. 2004) や“Signal transduction model” (Zhang et al. 2005; Zhang, et al. 2006) などがある。前者では、Cry 毒素が感受性昆虫体内で殺虫活性を示すのには複数の過程が必要だとされてきた。昆虫消化管内で活性型になった毒素は、カドヘリン様タンパク質との相互作用を経てオリゴマー化し (Gomez et al. 2002; Jimenez-Juarez et al. 2007)、更に他の細胞膜上の分子への結合を介して消化管上皮細胞の円筒細胞の細胞膜に挿入され、pore を形成する。中腸上皮細胞は、Cry 毒素により形成された pore から大量に流入したイオンとそれに伴う水の流入による浸透圧の上昇により、細胞が膨潤、破裂し、結果として昆虫を死に至らしめるとされている (Knowles 1987)。一方、後者の仮説では、活性型になった毒素が G タンパク質の活性化を介して PKA を活性化することで、oncosis 様のプログラム細胞死を細胞に誘発するとされる。このように Cry 毒素の殺虫作用機構については、現在でも、全貌が解明されておらず、議論の余地が残されている。

ところで、実際の宿主個体では、毒素の作用と宿主の反応の総和によって宿主個体や組織は変化を示すと考えられる。すなわち、毒素に対する宿主個体の感受性は例えば免疫応答によって大きな影響を受けることが予想されるし、それどころか、免疫反応が組織の崩壊を助長する可能性さえも考えられる。Cry 毒素が属する Pore-forming toxin (以下 PFT) に対する宿主の細胞の応答について哺乳類においても多くの研究が行われている。PFT には、*Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens* などの人に病原性を示すことで有名な細菌が産生する毒素が属し、多くの知見が得られつ

つある (Huffman et al. 2004; Bischof et al. 2008)。例えば、CCL-185、CCL-138、HEK という 3 種類のヒトの上皮培養細胞に *Streptococcus pneumoniae* の産生する Pneumolysin 及び、*Bacillus anthracis* の産生する AnthorolysinO を添加すると mitogen-activated protein kinase p38 (以下 MAPK p38) 経路という免疫応答と関連のあるシグナル伝達経路が活性化されたと報告している (Ratner et al. 2006)。

センチュウや昆虫において、Cry 毒素に対する中腸上皮細胞の宿主の免疫応答の解明を目的に研究が始まっている。Cry5B を摂食した *C. elegans* の研究では、マイクロアレイによる解析により Mitogen activated protein kinase (以下 MAPK) p38 経路と c-Jun N-terminal kinase (以下 JNK) 経路という 2 種類の MAPK 経路が活性化したと結論付けている。さらに、それらの経路の活性化に関与する因子を RNA interference (以下 RNAi) によりノックダウンする実験が行われ、これら 2 種類の MAPK 経路が *C. elegans* の消化管上皮細胞を Cry5B により与えられる傷害から保護することに貢献していると報告された (Huffman et al. 2004; Bischof et al. 2008)。最近行われた Bravo らの *M. sexta* と *Aedes aegypti* に Cry1Ab、Cry11Aa を処理し RNAi を用いた研究成果からも MAPK p38 経路の活性化は Cry 毒素を摂食した感受性昆虫が生存するために重要であると報告されている (Cancino-Rodezno et al. 2010)。

一方、いくつかの Cry 毒素を用いた研究においては昆虫の消化管細胞にアポトーシスが誘導されることが報告されている。*Culex pipiens* の幼虫を用いた実験では、Cry 毒素を摂取することによって中腸上皮細胞でアポトーシスが誘導され、そのことが昆虫の個体死の原因となっていることを示唆している (Smouse and Nishiura 1997)。また、*Heliothis virescens* の中腸の培養細胞を用いた実験系では、Cry 毒素によって中腸上皮細胞のアポトーシスが誘導されることが示された (Loeb et al. 2000)。同グループの後の研究成果では、Cry 毒素を添加することにより、アポトーシスと共に、幹細胞の分化が促進された。このことから、これら一連の *in vitro* での中腸上皮細胞で観察された現象は、Cry 毒素よ

って傷害を受けたり、死んでしまった細胞を更新する意味を持つのではないかと述べている (Loeb et al. 2001)。

ここまでに述べてきた毒素の作用機構も、宿主側の生体防御反応に関しても多くは培養細胞をはじめとする様々な *in vitro* の実験系を利用して示されてきたものである (Zhang et al. 2005; Zhang, et al. 2006 ; Loeb et al. 2000; Loeb et al. 2001)。したがって、Cry 毒素による昆虫個体の死が実際にはどのような出来事の組み合わせで起こっているのかについて解答を出すためには、先に述べた 2 種類の毒素の作用機構仮説と宿主側の生体防御反応の全てを想定したうえでもう一度昆虫個体の組織で起こる出来事を詳細に観察する必要がある。いくつかの先行研究においては、致死量の Cry 毒素を暴露したチョウ目昆虫において組織学的な解析が行われてきた (Sousa et al. 2010; Nisitsutsuji-Uwo 1980; Abdel-Razek 2002)。しかしそれらの多くは、毒素によってどんな細胞傷害が起こるかにのみフォーカスを当てて、高濃度の Cry 毒素を投与した実験であった。実際に起こっている免疫反応が顕在化するのはその効果が発揮される条件下で観察した際に限られるかもしれないので、昆虫個体で起きていることを正しく知るには致死濃度の毒素を投与した際の組織を観察するだけでは不十分であるかもしれない。そこで本章では、カイコガ幼虫に対して致死濃度ばかりではなく、*sublethal* (亜致死濃度下; 死ぬか死ななにかぎりぎりの濃度) あるいは、それより低く容易に組織が治癒しうる濃度にまで設定を広げて中腸組織で起こる反応について観察し、昆虫消化管細胞で実際に起こっている Cry 毒素によって誘導される現象を正しく理解することを目指した。

第 2 節 材料と方法

1.2.1 供試昆虫

カイコガ (品種：錦秋×鐘和；上田蚕種株式会社) を 25℃、明期 16 時間、暗期 8 時間の条件で、人口試料 (シルクメイト；日本農産工業) を給餌して飼育した。

1.2.2 Cry1Aa 毒素の活性化と精製

前駆体型 Cry1Aa を発現する組換え型大腸菌は、*Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* HD-1-Dipel 株からクローニングされた *cry1Aa* 遺伝子を持つ pES1 (Schenepf et al. 1985) を鋳型に、GST 融合型発現ベクター pGEX-4T-3 (Amersham pharmacia Biotech) にサブクローニングした後、大腸菌株 BL21 を形質転換して作製された (Ikeda et al. 2000)。

前駆体型 Cry1Aa を発現する組換え大腸菌は、フリーズストックより釣菌し、50 µg/ml アンピシリンを含む LB 培地 5 ml 中で 37℃、一晚培養した。培養液を 50 µg/ml アンピシリンを含む LB 培地 250 ml に全量加え、37℃で 1.5 時間培養した後、IPTG を終濃度 1 mM になるように加え、37℃、一晚培養して毒素タンパク質を強制発現させた。菌体を 5,870 g、10 分間の遠心分離により回収し超音波処理して菌体を破碎した後、1% TritonX-100 で室温 15 分間インキュベートし、11,302 g、10 分間遠心分離した後上清を除去し、封入体を回収した。回収した封入体は、Elix 水中で懸濁し、11,302 g、10 分間遠心分離し、上清を除去する操作を 2 回繰り返した。上清回収後の封入体は、2.5 ml の Elix 水に懸濁し、2 M Tris-HCl (pH8.3) を 50 µl、1 M DTT を 5 µl、1 M NaOH を 50 µl 加え氷上でピペッティング後、15 分静置し、再び 10,000 rpm で 30 分間遠心分離し上清を回収し可溶化毒素溶液とした。可溶化毒素溶液は、透析により 50 mM Tris-HCl (pH8.3) にバッファー置換し、28,933 g で 60 分間遠心分離し不溶成分を沈殿させ除去した。上清は、0.45 µm のフィルターユニット (Millex-LH, Millipore) に通過させた陰イオン交換 HPLC を用いて、50 mM Tris-HCl (pH8.3) により平衡化した Diethylaminoethyl (DEAE) カ

ラムに吸着させた。Tris-HCl (pH8.3) の濃度を 200 mM に変え、40 分間バッファーを流してカラム中の非吸着物質を洗い流した後、0.5 mg/ ml のトリプシン溶液を 2 ml カラムにインジェクトし、カラム中をトリプシン溶液で満たした後カラムをはずし、37°C、2 時間反応させた。再びカラムを取り付け、Tris-HCl (pH8.3) バッファーを 40 分間で 150 mM – 500 mM になるようなライナーグラジエントで流し、フラクションコレクターにて活性化させた毒素を回収した。得られたフラクションを 10% Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel 電気泳動 (以下 SDS-PAGE; Laemmli et al. 1970) によって解析し、60 kDa 付近の単一なバンドを含むフラクションを回収した。これを透析により Elix 水にバッファー置換した後、凍結遠心エバポレーターを用いて 500 μ l -1 ml の範囲の容量になるまで濃縮し、1 M PBS を得られたタンパク質溶液と等量加えた。タンパク質の濃度は、SDS-PAGE でタンパク質を分離、CBB 染色したゲルで目的のバンドの濃さを基にデンストメトリー法により測定した。

1.2.3 カイコガ幼虫を用いたバイオアッセイ

12 時間絶食させた 3 齢脱皮直後の幼虫を各区 30 匹ずつ試料カップに選別した。毒素処理区には、Cry1Aa 毒素を 0.05 - 1.0 μ g/ g diet となるように Elix 水で希釈し、各 100 μ l となるようにし、人工試料 3 g に混ぜてカイコガ 3 齢起幼虫に与えた。対照区には、Elix 水 100 μ l を人工試料 3 g に混ぜて与えた。バイオアッセイは各区画 3 連で行い 各時間における死亡個体数を計測した。

1.2.4 カイコガ幼虫組織切片の作製

1.2.3 と同様の手法で毒素を摂食させたカイコガ 3 齢幼虫及び対照区の幼虫を 2 時間、4 時間、24 時間、72 時間のそれぞれの時点で回収し、頭部と尾部を切断除去後、組織の総体積の約 20 倍量の 4 %パラホルムアルデヒド-PBS により 4°C 一晩固定した。その

後、PBS で 5 分間洗い、70%エタノール中で 30 分間、90%エタノール中で 30 分間静置し、新しい 90%エタノール中で 4℃ 一晚静置した。

そして、以下の組成の溶液中でそれぞれ適正時間静置し、脱水、透徹を行った。

- | | |
|---------------------------|---------|
| 1. 35%1-ブタノール， 50%エタノール/水 | 1 時間 |
| 2. 55%1-ブタノール， 40%エタノール/水 | 1 時間 |
| 3. 75%1-ブタノール， 25%エタノール/水 | 1 時間 |
| 4. 100%1-ブタノール | 1 時間 |
| 5. 100%1-ブタノール | 4 °C 一晚 |

以上の操作を行ったサンプルを 60 °C の恒温層で融解しておいた Pathoprep 568 (病理組織包埋用, WAKO) と等量の 1-ブタノールを加えた溶液中で 1.5 - 2 時間静置した。その後、24 well マイクロプレート中に融解しておいた Pathoprep 中で 1 時間静置し、新しい Pathoprep 層へ移動する操作を 3 回繰り返す、サンプルを新しい Pathoprep へ移動させすぐに氷水へ浸し急速に固まらせた。得られたパラフィンブロックは台木に貼り付け、ミクロトーム (Leica) で 10 μm の厚さの連続切片にし、MAS コートスライドガラス (松波硝子工業) に乗せ、40 °C に設定したヒートブロック上で 2 - 4 時間伸展させ使用するまで 4 °C で保存した。脱パラフィンと再加水をおこなうため、伸展後のスライドガラス上のパラフィン切片を 以下の溶液に指定時間ずつ順に移した。

- | | |
|----------------|-----|
| 1. キシレン | 5 分 |
| 2. キシレン | 5 分 |
| 3. 100%無水エタノール | 3 分 |
| 4. 100%無水エタノール | 3 分 |
| 5. 90%エタノール | 3 分 |
| 6. 70%エタノール | 3 分 |
| 7. PBS | 5 分 |

1.2.5 TUNEL 染色

1.2.4 で得られた脱パラフィン及び加水処理済みのパラフィン切片を DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (promega) のプロトコールに従い染色した。完成した切片は、蛍光抗体体色防止液 (1.25%DABCO 1,4-ジアザビスクロ[2,2,2]オクタン, 90%グリセロール/PBS) で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

1.2.6 カイコガ幼虫中腸の cDNA 作製とリアルタイム PCR

3 齢カイコガ幼虫各 30 匹分の中腸を摘出し、ISOGEN (ニッポンジーン) のプロトコールに従いトータル RNA を調整した。トータル RNA は DNase I FPLCpure™ (GE ヘルスケア) のプロトコールに従い DNase I 処理反応を行った後、ヒートブロックを用いて 75°C15 分間処理することで DNaseI を失活させた。その後、エタノール沈殿を行い、RNA のペレットを風乾させ、RNase free water に溶解した。DNase 処理が終わった total RNA は、High-Capacity cDNA reverse Transcription Kit (アプライドバイオシステム) を使い、添付のプロトコールに従って逆転写反応を行い cDNA を合成した。作製した cDNA は、RNase free water で適量に希釈し、SYBR Premix *Ex taq*™ II (TaKaRa) を使ったリアルタイム PCR を行った。使用したプライマーについては Table 2 に示した。また、リアルタイム PCR 反応は、Roter-GeneQ (Qiagen) を用いて行い、得られた結果は、delta-delta Ct method により比較した。

第3節 結果

1.3.1. 異なる濃度の Cry1Aa 投与濃度とカイコガ 3 齢幼虫の病状との関係の経時的観察

Cry1Aa 毒素投与濃度と生死や摂食停止などのカイコガ幼虫の反応との関係を明らかにする目的で摂食実験を行った (Table 1)。全ての濃度の実験区で Cry1Aa 毒素処理後 2 - 3 時間経過するとカイコガ 3 齢幼虫は、Cry1Aa を含む人工飼料を食べるのをやめた。1.0 $\mu\text{g/g}$ diet 区のカイコガ幼虫は 24 時間後までに 27.8%が死亡し、72 時間後には 87.8%が死亡した。0.5 $\mu\text{g/g}$ diet 区のカイコガ幼虫は 24 時間後までに 15.6%が死亡し、72 時間後には、77.8%が死亡した。一方、0.25 $\mu\text{g/g}$ diet 区のカイコガ幼虫の死亡率は、48 時間後で 8.0%、72 時間後で 17%でしかなく、死亡していない個体では摂食阻害がみられたが、その後の観察において、死亡する個体は観察されなかった。また、0.1 $\mu\text{g/g}$ diet 区および 0.05 $\mu\text{g/g}$ diet 区では、摂食阻害により対照区と比較してカイコガ幼虫の体のサイズが一回り小さくなったが、死亡個体数は 72 時間後までに 0.1 $\mu\text{g/g}$ diet 区で 1 匹だけ(3%) (Table 1)であった。その後の観察においても両区画において死亡個体はこれ以上出現しなかった。

1.3.2 Cry1Aa 毒素投与後の中腸上皮細胞の経時的観察

2 つの作用機構仮説“Pore formation model”と“Signal transduction model”のいずれかに適合する現象が中腸において認められるか、あるいはカイコガ幼虫の応答の 1 つとしてアポトーシスが起こるのかを検討するために、Cry1Aa 毒素投与後のカイコガ 3 齢幼虫の中腸を経時的に固定し、切片を作製して DAPI 染色および TUNEL 染色をし、蛍光顕微鏡で観察した。対照区の組織では、大きな核を持つ円筒細胞と細胞中に空隙を持つ杯状細胞が、高密度に整然と一層の細胞層を形成している様子が観察された (Fig. 1a, b)。一方、24 時間後までに 27.8%が死亡する濃度である 1.0 $\mu\text{g/g}$ diet で Cry1Aa 毒素を摂食

させた 2 時間後のサンプルからは、多くの円筒細胞が膨潤している様子が観察された (Fig. 1c, d)。アポトーシスを起こしていることを示す TUNEL 陽性細胞は検出されなかった (Fig. 1c)。1.0 $\mu\text{g/g}$ diet、摂食開始 4 時間後の切片からは、2 時間後と同様に膨潤した円筒細胞が存在する場所も見られたが (data not shown) 多くの円筒細胞は破裂した後であり、異常な形態をした細胞や細胞残骸が多数みとめられた (Fig. 2a)。一方、アポトーシスを起こしている細胞は観察されなかった。そして同条件において 27.8% が死に至った 24 時間後の組織を観察したところ、円筒細胞の存在頻度は低下し、しかも形態を保った円筒細胞はほとんど観察されず、組織は崩壊状態にあった (Fig. 2b)。一方、2 時間後、4 時間後同様アポトーシスを起こしている細胞は観察されなかった (Fig. 2b)。24 時間後までに 15.6% が死亡した 0.5 $\mu\text{g/g}$ diet 投与区においては、4 時間後には多くの円筒細胞が膨潤しているのが観察された (Fig. 2c)。また、興味深いことに、そのような細胞の多くは、核が管腔側に移動しており、低レベルではあるが TUNEL 染色されていた (Fig. 2c, k)。また、24 時間後には中腸上皮組織の一部に正常な中腸上皮組織にみられた円筒細胞と杯状細胞の整然とした配列が乱れた領域がみられ、この時間条件においては組織の残っている細胞にはアポトーシスを起こしていることを示す TUNEL 陽性の細胞は検出されなかったが、多くの細胞残骸が囲食膜と上皮組織との間に観察された (Fig. 2d)。24 時間後までにカイコガ幼虫が 1 匹も死ななかった 0.25 $\mu\text{g/g}$ diet と 0.05 $\mu\text{g/g}$ diet 区の 2 時間後の観察では、円筒細胞の膨潤も TUNEL 陽性の細胞も観察されなかった (data not shown)。しかし、4 時間後の組織においては、円筒細胞の膨潤はみられなかったが、TUNEL 陽性である円筒細胞の大型の核が多数観察された (Fig. 2e, g)。これらの細胞の形態は通常の円筒細胞とあまり変わらなかったが、核はルーメン側に移動して細胞の先端 (apical side) にあった。また、縦長の形態をとる核も見られた (Fig. 2e, g)。24 時間後の組織の観察でも引き続き円筒細胞であることを示す大型の核を持つ TUNEL 陽性細胞が高頻度で観察された (Fig. 2f, h, Fig. 3b, c, d)。また、中腸の場所によってはこの

アポトーシス様の細胞はほとんど観察されなかったが、逆にほとんどの円筒細胞が TUNEL 陽性を示す場所も観察された (Fig. 3c)。なお TUNEL 陽性細胞がほとんど観察されなかった領域の中腸上皮細胞においては概して円筒細胞が少なくなっていた (Fig. 3h)。また杯状細胞の空隙が対照区における中腸上皮細胞の杯状細胞のものよりも広がっていた (Fig. 2h)。そして、アポトーシス様細胞が高頻度でみられる部位においては TUNEL 陽性細胞が中腸上皮組織から脱落している様子が観察された (Fig. 3d)。これらは、ここで観察された間隙の広がった杯状細胞が多く存在している領域においては円筒細胞がすでにアポトーシス様の反応で脱落した後であることを示唆していると考えられた。さらに TUNEL 陽性細胞のほとんどが、中腸上皮細胞の中で最も大きな核を持つ成熟した円筒細胞であることは、DAPI による核染色の図との比較により更に確かめられた (Fig. 3a)。また、場所によっては、これら成熟した円筒細胞の核の他に、未成熟な円筒細胞の比較的小さな核も弱く TUNEL 染色されている様子が観察された (Fig. 2h, i)。24 時間後に最も TUNEL 陽性細胞が多く観察された 0.05 $\mu\text{g/g diet}$ の Cry1Aa 毒素投与区で 72 時間後の組織を TUNEL 染色した。同標本においては、24 時間後では高頻度で見られた TUNEL 陽性細胞は観察されなくなり、アポトーシスを起こし減少していたように見えた円筒細胞の数も対照区 (Fig. 4b)と同程度まで復帰し、広がっていた杯状細胞の空隙も正常時の状態に戻っている様子が観察された (Fig. 4b)。

1.3.3 Cry1Aa 処理カイコガ幼虫中腸でのアポトーシス関連遺伝子発現レベルの比較

中腸上皮組織で観察されたアポトーシスにはどのような細胞内シグナル伝達経路が関与しているのかを調べる目的で、Bm-Apaf1、Bm-MAPKp38、Bm-Jun 発現量の変化を解析した。また、組織の更新に伴う腸管の肝細胞の分化増殖の促進を制御している Bm-Socs についても同様の解析を行った。ribosomalL31 遺伝子をリファレンス遺伝子とし、Cry1Aa 毒素未処理区と比較して何倍発現量が変わったかを $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により定量的

PCR で相対定量した。Cry1Aa 毒素 0.1 $\mu\text{g/g}$ diet の区と 1.0 $\mu\text{g/g}$ diet の区の両区においてそれぞれの遺伝子の発現量を比較したところ、Bm-Socs については、1.9 倍と 2.5 倍、Bm-Jun 両区において 3.4 倍と 3 倍、そして Bm-MAPKp38 については、1.9 倍と 1.1 倍、Bm-Apaf1 については 7 倍と 6.1 倍の発現量の増加が観察された (Fig. 5).

第4節 考察

1.4.1 消化管上皮細胞で起こっている出来事

3 日以内にほとんどが死ぬがそれほど高い濃度条件とは言えない $1.0 \mu\text{g/g diet}$ および $0.5 \mu\text{g/g diet}$ で Cry1Aa を投与したカイコガ幼虫の組織の観察では、4 時間以内に円筒細胞が膨潤している様子が観察され、24 時間後には組織が崩壊している様子が観察された (Fig. 1c, d, Fig. 2a, b)。先行して致死濃度の Cry 毒素摂食カイコガ幼虫の顕微鏡観察を行っている Nisitsutsuji-Uwo のグループは、中腸上皮細胞の特に円筒細胞が膨潤する様子が毒素処理から 60~90 分後に顕著に観察されるという本研究と類似した結果を報告している (Nisitsutsuji-Uwo, 1980)。これらのことは、まさに Pore formation model の仮説で考えられている浸透圧依存的な細胞の膨潤、破裂 (Knowles 1987) という現象が消化管で起こったことを示唆している。一方、Smouse and Nishiura らのグループ (Smouse and Nishiura 1997) は、Cry 毒素によって誘導されたアポトーシスが *Culex pipiens* の個体死の原因になっていると結論付けている。本実験では、カイコガ幼虫が、死に至る Cry 毒素濃度条件である $0.5 \mu\text{g} \sim 1.0 \mu\text{g/g diet}$ では、膨潤している細胞において低レベルで TUNEL 染色される細胞を比較的低頻度で検出しただけで、TUNEL 陽性ではなく膨潤、破裂している細胞が主ほとんどであった (Fig. 2 a, c, b, d)。この結果から、Cry 毒素による中腸の崩壊とそれに続く昆虫の個体死には、アポトーシスが主要因となっているとは考え難かった (Fig. 6)。また、前述したようにカドヘリン様タンパク質を発現させた培養細胞で、PKA の下流で oncosis 様のプログラム細胞死で細胞が死ぬことが示唆されているが (Zhang et al. 2005)、oncosis 様のプログラム細胞死には際立った形態的特徴は報告されていないため、Zhang らの主張するような oncosis 様のプログラム細胞死が同時に進行したか否かについては定かではなかった。

これに対して、多くの幼虫が最後まで生き残る濃度の Cry1Aa 毒素を処理した条件下での観察では、72 時間後までのどの時間においても高濃度毒素処理条件下でみられた

ような細胞が膨潤する様子が観察されなかった(Fig. 2e-j, Fig. 4)。そして注目すべきは、Cry1Aa 毒素処理から 4 時間後及び 24 時間後において TUNEL 陽性のアポトーシスを起こしていると考えられる細胞が観察されたことである(Fig. 2e-h, Fig. 3b,c)。ところで、この組織で観察された顕著なアポトーシス様の反応のほとんどは、中腸上皮細胞を構成する細胞で最も大きな核を持っている円筒細胞で起こっていた(Fig. 2e-h, Fig. 3b,c)。中腸上皮細胞円筒細胞上には、Cry 毒素の受容体として働くと分子が存在していると考えられていることから(Hofmann et al. 1988)、ここで観察されたアポトーシスを起こしている細胞は、Cry 毒素により膨潤を伴わないレベルの弱い障害を受けた細胞である可能性が考えられる。また、特に 24 時間後の組織の観察では、円筒細胞がアポトーシスを起こしていることに加え、杯状細胞の空隙が広がっている様子が観察された(Fig. 2c,d)。このような Cry 毒素摂食後の感受性昆虫の消化管上皮組織の杯状細胞の形態変化は、カイコガ、そして *Alabama argillacea* の幼虫中腸でも報告されている。(Sousa et al.2010; Abdel-Razek 2002)。この現象は、円筒細胞がアポトーシスによって死んで脱落したことにより中腸上皮細胞を構成する細胞数が減少したことに伴うものであり、中腸が組織崩壊するのを防ぐことに役立っているように見えた。さらに、sublethal な条件の Cry1Aa 毒素摂食後 72 時間経過後の組織の観察を行ったところ、24 時間後には頻繁にみられた TUNEL 陽性細胞が検出されず、上皮組織の円筒細胞の頻度は対照区と同程度まで復帰し、広がっていた杯状細胞の空隙も対照区と同様の状態に戻っていた(Fig. 4)。これらのことは、Cry1Aa 毒素の弱い作用を受けたが膨潤するほどではなかった円筒細胞は、4 時間後から 24 時間後、あるいはそれ以降までかけてアポトーシスを起こし、脱落し、その後に組織の更新が起こったことを示唆している(Fig. 6)。In vitro の実験であるが、*H.virescens* の中腸の培養細胞に、*Bacillus thuringiensis* AA1-9 もしくは、*Bacillus thuringiensis* HD-73 を添加したところ、アポトーシスが誘導され円筒細胞、杯状細胞の数が減少し、それに伴い、幹細胞の分化が促進されたとの報告がある(Loeb et al. 2000;

Loeb et al. 2001)。また、*in vivo* でも、*Drosophila* に *Pseudomonas aeruginosa* という細菌を摂食させると、傷害を受けた成熟した enterocyte がアポトーシスを起こし、幹細胞の分化が促進することを中腸上皮細胞での Caspase3 の活性を基に述べている(Apidianakis, et al. 2009)。したがってアポトーシスは、新たな細胞の増殖分化とリンクした傷害を受けた中腸上皮細胞の速やかな排除と組織更新に寄与するものなのかもしれない。

1.4.2 消化管免疫誘導の分子機構

Cancino-Rodezno らは MAPK p38 の RNAi を *M. sexta* と *A. aegypti* について行い、Cry1Ab 毒素及び Cry11Aa 毒素に対する感受性が、それぞれ、8 倍及び 10 倍増加したことを示し、MAPKp38 が Cry 毒素を摂食した昆虫が生存するために必須であるという考えを示した (Cancino-Rodezno et al. 2010)。この MAPK p38 経路、そして同じく MAPK の 1 つである JNK 経路の下流では、アポトーシスの引き金となる Caspase-6、Caspase-9、Caspase-3 が活性化されることが報告されている(Porta et al. 2011; N'Guessan et al. 2005)。一方、Cancino-Rodezno らの実験において Cry1Ab 毒素を摂食した *M. sexta* の MAPKp38 の発現量が 7 日後に約 7 倍増加したのに対して(Cancino-Rodezno et al. 2010)、我々の結果では Bm-MAPK p38 については 0.1 µg/g diet の区画で 1.9 倍、1.0 µg/g diet の区画で 1.1 倍であり、増加は軽微でありその意味は不明であった。一方、Jun については、0.1 µg/g diet の区画で 3.4 倍、1.0 µg/g diet の区画で 3 倍程度の発現量の増加がみられ (Fig. 5)、この経路が何等かの役割を果たしている可能性が考えられた。Apaf1 はミトコンドリアにおいてシトクロム C と結合し、Caspase9 を活性化する過程に関与しており、先行研究においてアポトーシスが起こる際に転写レベルでの活性化が起こることがヒトや *Drosophila* において報告されている(Zhou et al. 1999; Fortin et al. 2001)。近年、カイコガでもアポトーシス経路に関連した遺伝子の解析が積極的に行われていて、他の種で報告のあるアポトーシスの経路に関与している遺伝子が多く同定されつつある(Zhang et al.

2010)。具体的には、death receptor pathway、epidermal growth factor pathway、そして Apaf1 が関与している mitochondrial apoptotic pathway に関わる遺伝子が同定されていて、得に Apaf1 が関与する mitochondrial apoptotic pathway については、カイコガ由来の培養細胞である BmE cells においてストレスを感じた際にミトコンドリアからシトクロム C が有意に放出されたことからこの経路がカイコガにおいてアポトーシスが誘導される際に利用されていることが示唆された(Pan MH 2009)。本研究において、カイコガの Apaf1 ortholog である Bm-Apaf1 遺伝子の転写レベルを解析したところ、アポトーシスを頻繁に起こしていた 0.1 $\mu\text{g/g}$ diet という sublethal な Cry1Aa 毒素処理区において Cry1Aa 摂食開始から 6 時間後にの転写が対照区と比較して約 7 倍活性化されたことが確認され、中腸で観察されたアポトーシスが Bm-Apaf1 を介する mitochondrial apoptotic pathway を利用している可能性があると考えられた。さらに興味深いことに、アポトーシスが組織において全く観察されなかった 1.0 $\mu\text{g/g}$ diet においても同遺伝子が、sublethal な Cry1Aa 毒素濃度条件である 0.1 $\mu\text{g/g}$ diet で 6 時間後に検出したものと同程度 BmApaf1 が活性化されたという結果が得られた(Fig. 5 and 6)。このことは、1.0 $\mu\text{g/g}$ diet というカイコガが致死する条件下でも、Cry1Aa 毒素によるアポトーシスは、転写レベルでは誘導されている可能性を示唆している。また、カイコガが致死に至る条件である 0.5 $\mu\text{g/g}$ diet において膨潤している細胞で低レベルでの TUNEL 陽性細胞が観察されたと中腸上皮組織の顕微鏡観察の結果 (Fig. 2c) と矛盾しない。しかし、実際にアポトーシスの過程が細胞で進んでいく前に、Cry 毒素により形成される Pore からのイオン流入による細胞の膨潤、破裂の方が先行して起こるために、アポトーシスが進行する前に細胞が受動的に死んでしまっているのかもしれない。

さらに近年、他の生物種において、Cry 毒素同様、宿主の細胞にストレスを与える様々な因子が、幹細胞の分化増殖の引き金である JAK/STAT 経路を活性化するという報告がある(Beebe et al. 2010; Liu et al. 2010; Buchon et al. 2009)。このような知見を基に本研究で

は、JAK/STAT 経路の活性化を意味する Bm-Socs の転写レベルを解析することで JAK/STAT 経路の活性化の程度を評価したところ、0.1 µg/g diet 区画では 1.9 倍、1.0 µg/g diet では 2.5 倍という結果が得られた(Fig. 5 and 6)。2009 年の Jiang らの研究結果で *Drosophila* の腸細胞においてアポトーシスが JAK/STAT 経路活性化のトリガーとなることが示されていることから(Jiang et al. 2009)、本研究で観察された Cry 毒素によって誘導されたアポトーシスが JAK/STAT 経路を活性化している可能性も考えられる。

**Table 1 Median Lethal Concentrations of Cry1Aa on
3rd instar larvae of *Bombyx mori***

Cry1Aa concentration ($\mu\text{g/g}$ diet)	mortality(%) n=30		
	24 h	48h	72 h
1.5	57.8	92.2	100
1	27.8	51.1	87.8
0.5	15.6	33.3	77.8
0.25	0	8.0	17.0
0.1	0	0	3
0.05	0	0	0
LC ₅₀	1.406 μg	0.741 μg	0.386 μg
(95% fiducial limit)	(1.195 μg ~ 1.824 μg)	(0.662 μg ~ 0.832 μg)	(1.837 μg ~ 0.426 μg)

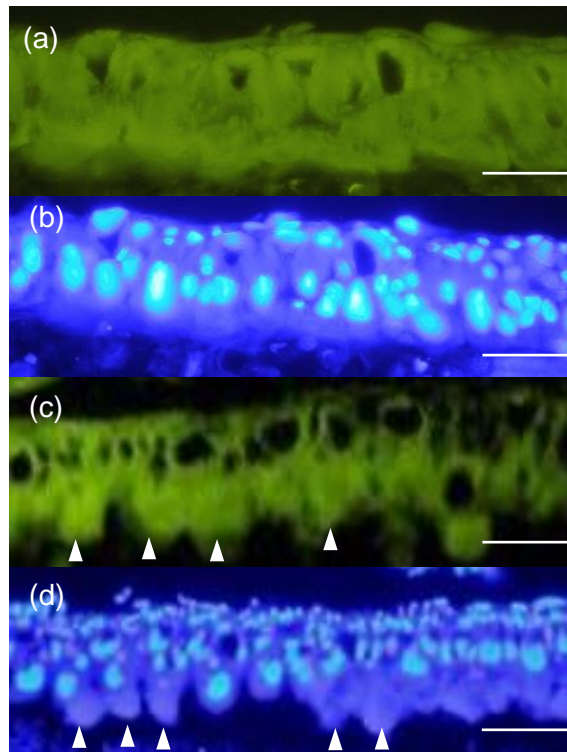


Fig. 1. Reaction of midgut epithelial cells treated with lethal dose of Cry1Aa.

Mock (a, b) or diet treated with lethal dose of Cry1Aa (1.0 μg/g diet) (c, d) midgut were fixed 2 h after treatment, and paraffin sections were prepared and stained by the TUNEL (a, d) method or counterstained with DAPI (b, d). Nuclei of the midgut epithelial cells were stained light blue with DAPI (b, d). Arrowheads indicate swollen columnar cells of which cytoplasm protruded into the lumen (c, d). Sections were examined under the Fluorescence microscopes. The scale bars represent 20 μm.

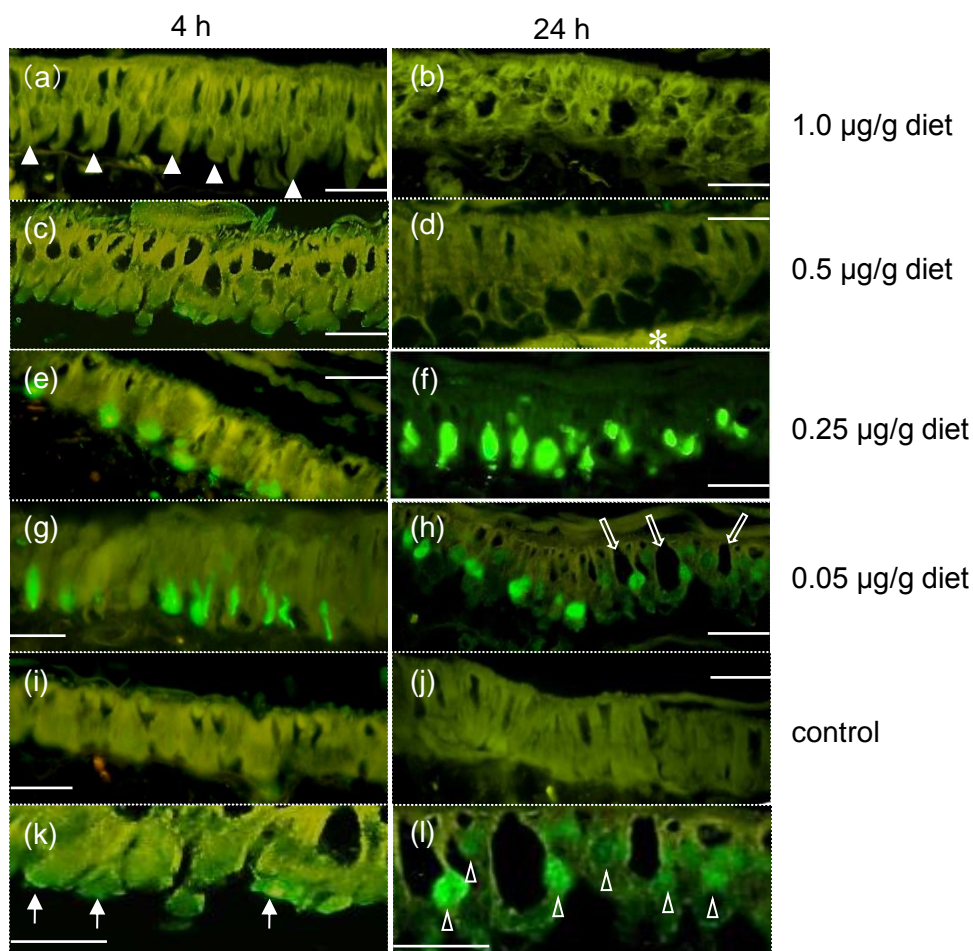


Fig. 2. Reaction of midgut epithelial cells treated with different concentration of Cry1Aa.

Bombyx mori larval midgut treated with 4 steps of Cry1Aa (0.05 µg/g diet – 1.0 µg/g diet) were fixed 4 h (a, c, e, g, i) or 24 h (b, d, f, h, j, k, l) after treated, sections were made and stained by TUNEL. The sections were observed under the fluorescence microscopes. The closed allow head indicates wreckage of the burst cells (a). The light green fluorescein indicates the TUNEL positive nuclei (e, f, g, h). The closed allows indicate weakly TUNEL positive nuclei (k). The open allow heads indicate TUNEL positive nuclei of immature cell (l). The open allows indicates goblet cells with enlarged cavity(h). Asterisk indicates cell debris accumulated on the peritrophic membrane. The scale bars represent 20 µm.

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| a. Cry1Aa 1.0 µg/g diet | b. Cry1Aa 1.0 µg/g diet |
| c. Cry1Aa 0.5 µg/g diet | d. Cry1Aa 0.5 µg/g diet |
| e. Cry1Aa 0.25 µg/g diet | f. Cry1Aa 0.25 µg/g diet |
| g. Cry1Aa 0.05 µg/g diet | h. Cry1Aa 0.05 µg/g diet |
| i. control | j. control |
| k. magnified figure of fig. h | l. magnified figure of fig. f |

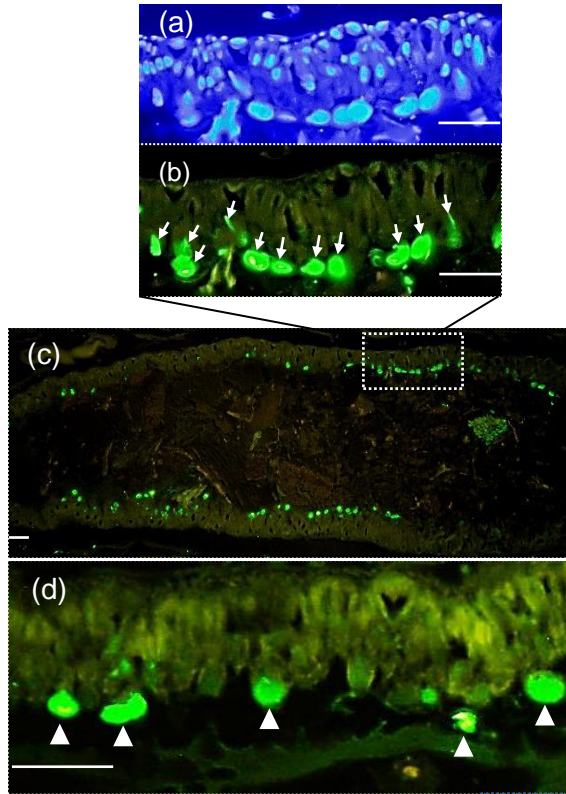


Fig.3. The spatial pattern of apoptotic cells

Midgut of 3rd instar larvae of *Bombyx mori* treated with sublethal concentration of Cry1Aa (0.05 $\mu\text{g/g}$ diet) were fixed 72 h after treatment, then the section were stained with DAPI (a) and by TUNEL (b, c, d). The allows indicates cell nucleus stained by TUNEL staining (b). The allow head indicates nuclei disintegrated and shifted to the lumen side due to apoptosis (d). The scale bars represent 20 μm (a, b, d), 50 μm (c).

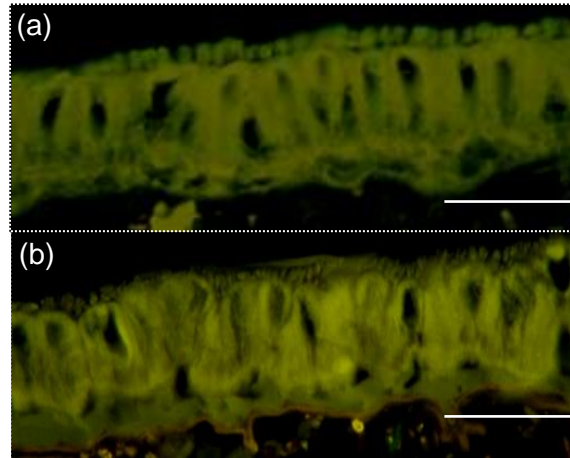


Fig.4. *Bombyx mori* midgut epithelial cells t 72 h after treatment

Midgut of 3rd instar larvae of *Bombyx mori* were fixed 72 h after treated with Cry1Aa (0.05 $\mu\text{g/g}$ diet). The sections were conducted TUNEL staining (a), mock control (b). The scale bars represent 20 μm .

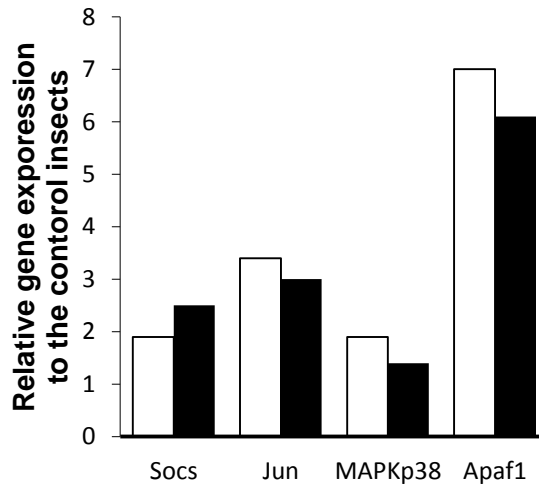


Fig.5. Analysis of host defense related genes expression

The expression levels of each genes on 3rd instar larval midgut 6h after treatment with Cry1Aa were detected by $\Delta\Delta C_t$ method by real time RT-PCR. The cDNA were prepared from 30 larval midguts. Three replicates were performed. Open bars indicate gene expression of the insects administered with Cry1Aa at 0.1 µg/g diet relative to the control insects. Closed bars indicate gene expression of the insects administered with Cry1Aa at 1.0 µg/g diet relative to the control insects.

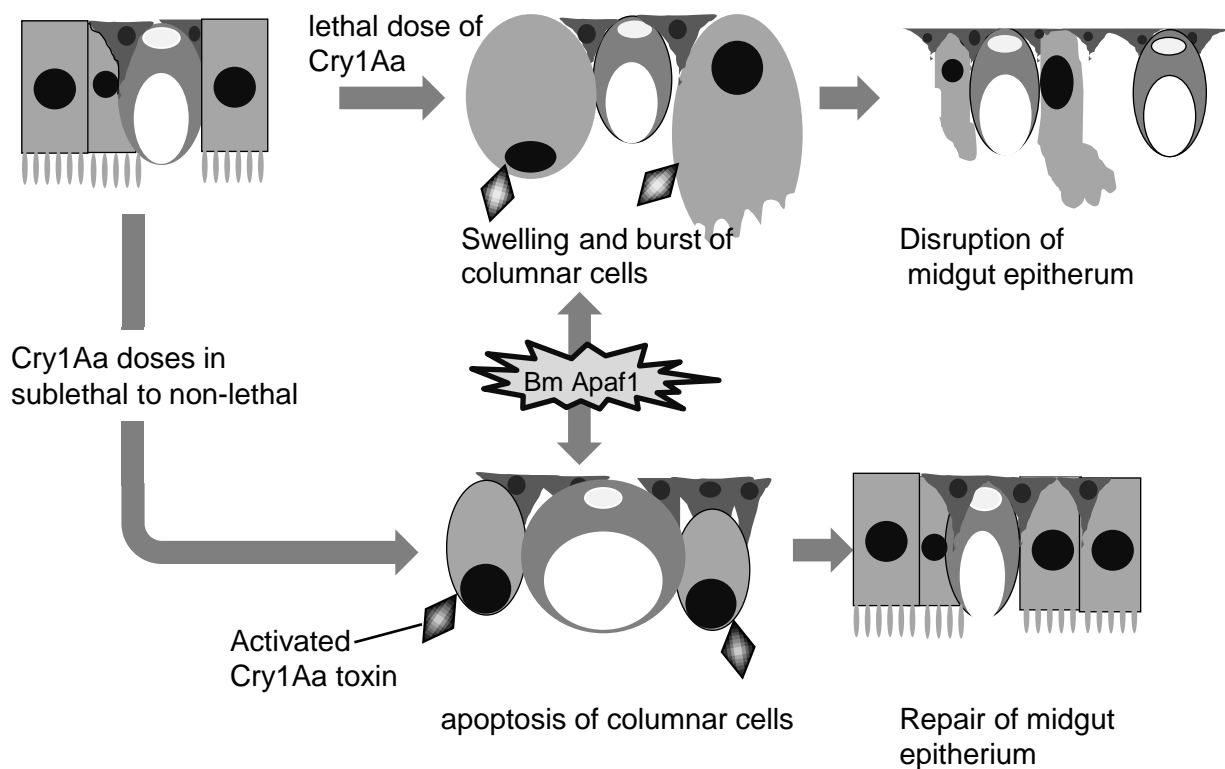


Fig.6. The model of *Bombyx mori* midgut epithelial cell's reaction against Cry1Aa

In the lethal condition of Cry1Aa administration, midgut epithelial cells were swelled and busted, and then midgut tissue collapsed. Although apoptosis happened in parallel, swelling and burst seemed to progress faster than apoptosis. In the sublethal or lower condition of Cry1Aa administration, apoptosis seems to lead to renewal of columnar cells layer in the midgut for the repair of damage.

Table 2. oligonucleotides used for real-time PCR

oligonucleotide sequence		Accession Number
Bm-MAPKp38-F	5' ttggattgctggatgtgtttac	AB208585
Bm-MAPKp38-R	5' catcgtacggacacagaagct	
Bm-Socs-F	5' cagtgtccagagatatgtgagc	BGIBMGA009619
Bm-Socs-R	5' taagcagtgcagacgcag	
Bm-Jun-F	5' cacagcatggagaccaccttc	BGIBMGA004164
Bm-Jun-R	5' gttcacgaatcgctgcac	
Bm-Apaf1-F	5' atactggtgcttcacggtatg	BGIBMGA011028
Bm-Apaf1-R	5' gcgaattgcaagaccgatgac	
Libo L31-F	5' ccaagagcaatcaaagaaatc	BGIBMGA000959
Libo L31-R	5' gtcagaaatgttccttcacgt	

第2章 カイコガ ABC transporter C2 の Cry 毒素殺虫作用機構上での役割の解析

第1節 目的

序章や第1章 第1節で既に述べた通り、Cry 毒素作用機構仮説で最も多くの論文で引用されているのは、“Pore formation model” (Bravo et al. 2004) と“Signal transduction model” (Zhang et al. 2005; Zhang, et al. 2006)である。これらの仮説に基づいた Cry 毒素作用機構上では、Cry 毒素は、宿主昆虫の消化管上皮細胞上に発現する受容体分子と相互作用することが必要であり、Cry1A 毒素については、既に複数の分子が実際に受容体として機能する可能性が示されている。その1つであるカドヘリン様タンパク質は、*Bombyx mori* (Nagamatsu et al. 1999)、*Manduca sexta* (Hua et al. 2004)、*Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes et al. 2006)、*Ostrinia nubilalis* (Flannagan et al. 2005)において Cry1A 毒素に対する感受性を培養細胞に付与することのできる分子であることが示されている。また、実際に昆虫個体を用いた Cry 毒素抵抗性の研究において、*H. virescens* (Gahan et al. 2001)と、*Helicoverpa armigera* (Xu et al. 2005)、*Pectinophora gossypiella* (Morin et al. 2003)の抵抗性遺伝子の遺伝学的解析から、カドヘリン分子が正しく発現できなくなることが、抵抗性の1つの原因であることが示されている。一方で、グリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol、以下 GPI)アンカー型のタンパク質の1つ、アミノペプチダーゼ N (Amino peptidase N、以下 APN)、特に APN Class 1 (以下 APN1)は、*Drosophila melanogaster* に発現させることで、Cry1Ac に対する感受性が生まれたとの報告や (Gill et al. 2002)、APN1 のサイレンシングが Cry 毒素に対する幼虫個体の感受性を低下させるとの報告がある (Yang et al. 2010; Tiewsiri et al. 2011)。また、Cry1Ac 抵抗性の *H. armigera* において APN1 分子に変異が入っていたとの報告がある (Zhang et al 2009)。しかし、カドヘリン様タンパク質のように遺伝学的に APN1 が Cry 毒素抵抗性原因因子だと同定された例はなく、未だ APN1 の変異や発現量の減少と抵抗性の因果関係は明ら

かになっていない。一方、APN と同様の GPI アンカー型タンパク質であるアルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase、以下 ALP)については、異所発現実験による Cry 毒素感受性を付与する分子であるという報告はないが、Cry 毒素抵抗性昆虫において ALP に対する結合性の低下が抵抗性と相関関係があることが報告されている (Jurat-Fuentes et al. 2004; Jurat-Fuentes et al. 2011)。そして、2010 年、Gahan らにより今まで Cry 毒素殺虫作用機構との関連が一度も報告されたことのない ABC トランスポーター C2 (ATP-binding cassette transporters subfamilyC member2、以下 ABCC2) が Cry1Ac 抵抗性 *H. virescense* の抵抗性原因因子であることがリンケージマッピングの結果として報告された (Gahan et al. 2010)。また、2012 年には、カイコガにおいても Cry1Ab 抵抗性カイコガのリンケージマッピング解析が行われた結果から ABCC2 分子が Cry1Ab 抵抗性であることが報告された (Atsumi et al. 2012)。さらに、先行研究においてカドヘリン様タンパク質や APN に変異が認められなかった Cry1Ac 抵抗性の *P. xylostella* や *T. ni* においても ABCC2 分子内に変異があることが新たに見つかり (Baxter et al. 2011)、ABCC2 分子が Cry 毒素殺虫作用機構上で重要な働きをする分子であることが期待されるに至った。

そこで、本章では、カイコガの ABCC2 である BmABCC2 が Cry 毒素作用機構上でのような役割をする分子であるのかを解明することにした。ABCC2 分子は、細胞膜上に発現する分子であることから、Cry 毒素受容体として機能することが期待された。そこで、Cry1A 毒素抵抗性である昆虫培養細胞 Sf9 細胞に BmABCC2 分子を発現させ、Cry 毒素感受性を調査することで BmABCC2 が受容体分子であるか否かを評価することにした。また、前述した、従来 Cry1A 毒素殺虫作用機構において重要だと考えられてきたカドヘリン様タンパク質との受容体としての機能の大きさを比べることで、Cry 毒素感受性を生み出すのに重要な受容体はどの分子であるかを 1 つの実験系を用いて評価することを試みた。

第2節 材料と方法

2.2.1 昆虫培養細胞

Sf9 細胞 (ハスモンヨトウ近縁種 *Spodoptera frugiperda* 卵巣由来) を培養フラスコ (tissue-treated, IWAKI) 中にて, 10 % (v/v) 牛胎児由来血清 (FBS, JRH Bioscience) を添加した Sf-900 II SFM (GIBCO, Invitrogen) により 28°C でフラスコ底面に付着させて生育させた。

2.2.2 cDNA のクローニング

Enhanced green fluorescent protein (以下 EGFP) をコードする cDNA は pA3hr5(-)EGFP vector (山口大学 小林 淳 教授 より 分 与) を 鋳 型 に し、5'-tcggTCTAGAatggtgagcaagggcgagga-3' と 5'-gatgAGGCCTtacattgtacagctcgtcca-3' のプライマーを用いて PCR 反応により増幅し、3 種の cDNA を同時に発現できるベクター pBAC4x-1 (Novagen) の *Xba*I、*Stu*I サイトに組み込んだ。完全長 BtR175 (以下 BtR-Full; AB026260) をコードする cDNA は、3 齢カイコ (錦秋×昭和) 中腸の cDNA を鋳型に 5'-caagcgtAAGCTTatgggagttgacgttcg-3' と 5'-acgaatcacgagctcgggtatggcaaccatga-3' のプライマーを用い、EGFP を組み込んだ pBAC4x-1(pBAC4x-1-EGFP) の *Hind*III と *Xho*I サイトに組み込んだ。シグナルペプチドと BtR175 毒素結合領域 (Toxin binding region; 以下 BtR175-TBR) の cDNA 断片は、3 齢カイコ (錦秋×昭和) 中腸の cDNA を鋳型にそれぞれ、5'-caagcgtAAGCTTatgggagttgacgttcg-3' と 5'-acgaatcacgagct cgggtatggcaaccatga-3'、5'-tggttgccataccgagctcgtgattcgtcc-3' と 5'-cctacagCTCGAGtttctggaattgatttcg-3' のプライマーをもちいて PCR 反応により増幅し、overlap extension PCR により cDNA 断片を連結し、pBAC4x-1-EGFP の *Hind*III と *Xho*I サイトに組み込んだ。APN をコードする cDNA は、3 齢カイコ (錦秋×昭和) 中腸の cDNA を鋳型にそれぞれ 5'-taaataGCGGCCGCatggcatctcgtggtt-3' と 5'-ggccattCTCGAGtgccaaattgacagctaa-3' のプライ

マーを用いて PCR 反応により増幅し、pBAC4x-1-EGFP の *XhoI* と *HindIII* サイトに組み込んだ。BmABCC2_S と BmABCC2_R をコードする cDNA は、それぞれ、カイコガ (Ringetsu, race 606, <https://www.gene.affrc.go.jp/ex-nises/bombygen/indexJ6-eng.html>) または、カイコガ

(Chinese No. 2, race 401, <https://www.gene.affrc.go.jp/ex-nises/bombygen/indexJ4-eng.html>) 由来の中腸 cDNA を鋳型に 5'-cgtGCGGCCGCatgaatagtgtatgggagag-3' と 5'-tgaGCGGCCGCttttctgtattctacc-3' のプライマーを用いて PCR により増幅し、pBAC4x-1-EGFP の *NotI* サイトに組み込んだ。BmABCC2_S^{+234Y} 及び BmABCC2_R^{-234Y} の cDNA 配列は、3つの PCR 断片を overlap extension PCR により連結させ、作製した。それぞれの PCR 断片は、pBAC4x-1-EGFP に BmABCC2_S または BmABCC2_R を組み込んだものを鋳型にそれぞれ、F1 (5'-cgtGCGGCCGCatgaatagtgtatgggagag-3') and R1 (5'-taccaccagaggtagtgtgcaa-3'), F2 (5'-tgtaagcggaggaaactggt-3') and R2 (5'-acatgttataaatattatacttcttcagt-3'), and F3 (5'-atgatagcactcaggaagtct-3') and R3 (5'-tgaGCGGCCGCttttctgtattctacc-3') のプライマーを用いて PCR 反応を行い増幅した。

overlap extension PCR によって各断片を連結させた BmABCC2_S^{+234Y} 及び BmABCC2_R^{-234Y} の完全長 cDNA 配列は、pBAC4x-1-EGFP の *NotI* サイトに組み込んだ。

PxABCC2_S と PxABCC2_R の cDNA 配列は、それぞれの遺伝子がクローニングされ組み込まれたプラスミド DNA (pGEM-T easy) を鋳型にそれぞれ、

5'-GCTAggatccATGGAAAACGGAAGCGGAGC-3' と

5'-CGCaagcttAGGATGGTCGTCGAAGTAT-3' または、

5'-GCTAggatccATGGAAAACGGAAGCGGAGC-3' と

5'-ATTaagcttCGTCTTGCGCCCCGTGCTA-3' のプライマーを用いて PCR 反応を行い獲得した。獲得した PCR 断片は、pBAC4x-1-EGFP の *BamHI* と *XhoI* サイトに組み込んだ。

AaABCC2 の cDNA は、東京農工大学 工学部 BASE 棟周辺で捕獲したヒトスジシマカよ

り合成した cDNA を鋳型に、5'-AAATgcggccgcATGGATAGCTCGCGGAAG-3' と 5'-CCGActcgagTTGGCCTTCCTTGCTAAAAC-3' のプライマーを用いて PCR 反応を行い増幅した。この PCR 断片は、pBAC4x-1-EGFP ベクターの *NotI* と *XhoI* サイトに組み込んだ。それぞれの cDNA を組み込んだ cDNA は大腸菌株 DH 5 α に取り込ませ形質転換した。

2.2.3 組換え型 AcNPV の作製

組換え型 *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPN) を作製するため、24 well plate (Iwaki) に播種した 4.0×10^4 /well の Sf9 細胞に対し、25 ng の BacMagic DNA と 125 ng の pBAC4x-1 トランスファーベクターを共導入した。BacMagicDNA とトランスファーベクターを共導入した細胞より、力価の高いウイルスを得るための培養操作は、Bac MagicTM DNA kit (Novagen) のプロトコールに従っておこなった。

2.2.4 Cry 毒素の精製

Cry1Aa1 (AA22353) 毒素については、第 1 章 2 節 (2.2) で使用したものと同様の組換え型大腸菌を用いた。Cry1Ab8 (AAA22551) 毒素の DNA 配列は、Atsumi *et al.* (2005) で使用された Cry1Ab8 の DNA 配列が組み込まれたプラスミド DNA を鋳型に 5'tcaatCCCGGGacatggataacaatccgaacatc3' と 5'gtccaatgctGCGGCCGCttattcctcca のプライマーを用いて PCR 反応により増幅した。獲得した DNA 配列は、pGEX4t-3 ベクターの *SmaI* と *NotI* のサイトに組み込んだ。Cry1Fa 毒素については、Fentes *et al.* (2006) の記載通り活性化、精製されたタンパク質を Dr. Jurat-Fuentes より分与いただいたものを用いた。Cry1Ac(AAA22331)毒素の cDNA 配列は、*B. thuringiensis* HD-73 のプラスミド DNA を鋳型に 5'-gcaaGTCGACatggataacaatccgaacat-3' and 5'-atcGCGGCCGCttattcctccataaggagt-3' プライマーにより PCR 反応により増幅した。獲得した DNA 配列は、pGEX-4t-3 ベクターの *NotI* と *SalI* のサイトに組み込んだ。獲得した cDNA 配列は pGEX-4t-3 の *NotI* と *SalI*

のサイトに組み込んだ。Cry9Aa 毒素の配列は、Bacillus genetic stock center より取り寄せた Cry9Aa 遺伝子配列を組み込んだ pSB1402 プラスミド(BGSC No. ECE130)を鋳型に 5'-ACGCgtcgacATGAATCAAAATAAACACGG-3' と 5'-CGTgcggccgcTTACTTTTCTGTTTCAACG-3'のプライマーを用いてPCR反応により増幅し、pGEX-4t-3 ベクターの *NotI*, *SalI* サイトに組み込んだ。Cry 毒素遺伝子を組み込んだ pGEX-4t-3 ベクターは、大腸菌株 BL21 に形質転換し第 1 章、2.2 と同様の方法で大腸菌を培養し、Cry 毒素の封入体を精製した。精製し、200 mM Tris-HCl (pH8.3) に透析した Cry 毒素前駆体タンパク質は、終濃度 0.2 mg/ml のトリプシンを加え 37℃でインキュベートすることにより活性化した。活性化し凝集したタンパク質は、28,933 g, 10 min, 4 °Cの遠心分離によって沈殿として回収し、PBS で 3 回洗った後、再び NaOH で可溶化し、PBS に透析した。PBS に透析したタンパク質は、デンストメトリー法により濃度を定量して用いた。Cry9Da2 毒素は、Sinkawa et al., (1999)に記載されている Cry9Da2 のみを産生する *B. thuringiensis japonensis* 株(AF032733, genebank)を培養し、同論文にある 2 層分配法を用いて精製した毒素を他の毒素と同様の方法で活性化、定量したものをを用いた(Sinkawa et al. 1999)。

2.2.5 LDH アッセイ

Sf9 細胞にそれぞれの AcNPV を感染させ、72 時間、25℃でインキュベートした。細胞は、PBS で洗い、96 well プレートに播種し、Cry1Aa 毒素を添加し、25℃で 1 時間インキュベートした。インキュベート後の細胞は、Cytotoxicity Detection KitPLUS (Roche) のプロトコールに従い、放出された乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase; 以下 LDH) をプレートリーダーを用いて測定した。

2.2.6 細胞傷害率の算出

Sf9 細胞にそれぞれの AcNPV を感染させ、72 時間、25℃でインキュベートした。細胞を回収し、細胞の懸濁液をカバーガラス上に各 100 μ l 添加し、静置させることで細胞をカバーガラスへ貼り付けた。細胞を貼り付けたカバーガラスは、PBS で洗い死細胞や活力を失った細胞を除去した後、Cry 毒素溶液を入れた 2 穴のスライドガラス (Matsunami) に細胞を接着させた面が Cry 毒素溶液と触れるような向きで被せた。スライドガラスは、60 分 25 度でインキュベートし、蛍光顕微鏡 (BX50 Olympus light microscope) 下で、BX-FLA epifluorescence unit (Olympus) を用いて観察した。細胞傷害率は、1 視野中の膨潤した細胞の割合を算出する操作を 5 視野分行いその平均値を用いて計算した。

2.2.7 抗血清の作製

BtR175 抗血清を作製するための抗原は、Hara et al.(2003)で使用された BtR175 の毒素結合領域 (TBR) を発現する大腸菌で発現させたタンパク質を用いた。BmABCC2 抗血清を作製するための抗原を作製するために、本章 2.2 で作製した pBAC4x-1-EGFP に BmABCC2_S の配列を組み込んだプラミドを鋳型に 5'-GCAAgtcgacTCGTTGGAACGCATTCAAAA-3' と 5'-ATCgcgccgcTTTCACTGCAGACAAATAC-3'のプライマーを用いて PCR 反応を行った。増幅した PCR 断片は、pGEX4t-3 ベクターに *Sal*I、*Not*I サイトを用いて組み込んだ。組換えたプラスミドは、大腸菌株 BL21 に形質転換し、第 1 章 2.2 と同様の手法でタンパク質を生産させ、封入体を精製した。精製した封入体は、モデル 422 エレクトロエリ्यूター (Bio-Rad) を用いてエレクトロエシユーション法により目的タンパク質の断片を切り出し、PBS に透析し、濃度を定量し、抗原タンパク質とした。BtR175 抗血清を得るために、抗原タンパク質を Jcl:ICR マウス 6 終齢雌個体に 5 回免疫し、全採血し、一晩 4℃で静置した後、2,290 g、10 min の遠心分離操作を行った上清を抗血清として

用いた。抗血清は 0.005% アジ化ナトリウムと終濃度 50% のグリセロールを加えて 20℃ で保存し以後の実験に用いた。BmABCC2 抗血清については、マウスとウサギの両方を作製した。マウス血清は、BtR175 と同様の方法で作製した。ウサギ抗血清は、株式会社 蛋白精製工業に外注し、作製されたものを用いた。

2.2.8 BmABCC2 変異体発現細胞表面上の毒素の染色

Sf9 上に発現させた BmABCC2_R-^{234Y} と BmABCC2_S+^{234Y} の Cry1Aa, Cry1Ab 結合能を調べるために、それぞれの組み換え型 AcNPV を感染させた細胞は、NoStickHydrophobic Microtubes (Scientific Specialties Inc., Lodi, USA) に回収し、PBS で細胞を洗った。それぞれ 20 mM Cry1Aa もしくは Cry1Ab と 10 分間室温で反応させ、4% PFA で 10 分間固定した。固定した細胞は、PBS で 3 回洗い抗 Cry1Aa ウサギ抗血清と 16 時間 4℃ で反応させ、PBS で 3 回洗った後に、Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) と 1 時間室温で反応させ PBS で 3 回洗った後、封入し、2.6 で記載した顕微鏡下で観察した。

2.2.9 ウェスタンブロッティング

2.2.6 と同様の手法でそれぞれの AcNPV を感染させた Sf9 細胞は、1.5 ml チューブに回収し、PBS で 3 回洗った後、SDS-PAGE sample buffer を加え煮沸し、SDS-PAGE のサンプルとした。SDS-PAGE の操作では、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、分離後のゲルは PVDF 膜 (Perkin Elmer Life Sciences) に転写した。タンパクを転写した PVDF 膜は、5% スキムミルク/TNT で 1 時間、室温で振盪しながらブロッキングし、BtR175 抗血清を添加し、1 時間、室温で振盪した。2 次抗体には horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG を用い、バンドは、Immobilon detection system (GE Healthcare) を用いて検出した。

2.2.10 免疫染色

発現細胞上の BtR175-TBR と BtR175-full の免疫染色は以下のように行った。2.6 と同様の手法でそれぞれの AcNPV を感染させ培養した細胞は、MAS-GP type A Micro slide glass 上に播種した。4%PFA/PBS で 10 分間固定した後、抗 BtR175 マウス抗血清を添加後、16 時間、4℃でインキュベートし、PBS で 3 回洗った。2 次抗体には、Alexa-555-conjugated-anti-mouse IgG (Molecular Probes) を用い、1 時間室温で反応させた後封入し、2.2.6 に記載した蛍光顕微鏡下で観察した。

2.2.11 BtR175 発現細胞表面上の毒素の検出

Cry1Aa の BtR175 に対する結合能を調べるため、2.6 と同様の手法で、BtR175 を発現させた Sf9 細胞を MAS-GP type A micro slide glass (Matsunami) に播種し、4%PFA で固定した。PBS で 3 回洗った後、10 nM の Cry1Aa 毒素と 16 時間 4℃で反応させ、抗 Cry1Aa ウサギ抗血清と 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗った後、Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) と 1 時間室温で反応させ、封入し、2.2.6 に記載した蛍光顕微鏡下で観察した。

2.2.12 SPR を用いた BtR175 と Cry1A 毒素の結合性状の解析

大腸菌で発現させた BtR175-TBR の封入体の精製、可溶化は、Hara et al. (2003)と同様の方法で行った。精製した BtR175 は pH 4.0 の 10 mM 酢酸アンモニウムに終濃度 50 µg/ml になるように希釈し、CM5 センサーチップ(GE Healthcare)にアミンカップリング法により固相化した。Cry1A 毒素はそれぞれ各 70 µl になるように PBST で希釈し 5 濃度ずつ用意し、BtR175-TBR を固相化した CM5 センサーチップに 120 秒間インジェクトした。解離曲線を得るために、Cry1A 毒素溶液から PBST buffer に切り替え 240 秒間記

録を取った。反応曲線は、1:1 Langmuir binding model を使ったグローバルフィッティングを行い、結合速度定数 (k_a) 及び解離速度定数 (k_d) を算出した。また、センサーチップの再生には、40 μ l の 5 mM NaOH を用いた。

2.2.13 膜画分の調整

25 cm² の培養フラスコ (Orange scientific) にコンフルエントな状態の Sf9 細胞を滅菌した 100 ml の三角フラスコに 30 ml の培地と共に移し、それぞれの AcNPV を 30 μ l 添加し 25 °C で 72 時間振盪培養した。細胞は PBS で 2 回洗い、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を添加した PBS 5 ml で懸濁後、氷上でホモジナイザーを用いて 3000 rpm で破碎した。細胞の破碎液は、5000 rpm、10 分、4°C で遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は、新しい 50 ml の遠沈管に移し 16,000 rpm、4°C、40 分の遠心分離操作により膜画分を沈殿させた。上清を除去した膜画分に 1 % n-dodecyl- β -D-maltoside を含む PBS を加え 1 時間、4°C でローテーター上で攪拌し、16,000 rpm、20 分、4°C の遠心分離操作後の上清を可溶化した膜画分サンプルとして使用した。

第3節 結果と考察

2.3.1 カイコガ ABC transporter C2 (BmABCC2) の Cry 毒素受容体として機能の確認

まず、Cry1Ab 感受性のカイコガ *B. mori* Ringetsu (Rin) 由来の BmABCC2 (BmABCC2_S) を Sf9 細胞表面に発現させ、受容体として機能するかを確かめた。実験を行う前に、EGFP 発現 Sf9 細胞の Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac に対する応答を観察したところ、1 μ M の高濃度でも応答は見られなかった (Fig. 7)。これに対し、BmABCC2_S を発現させた細胞に Cry1Aa を 100nM 添加すると、20 分後には EGFP を共発現していることから BmABCC2_S が発現していると考えられる細胞が毒素の傷害を受け、膨潤している様子が位相差顕微鏡下で観察された。また、毒素添加から 60 分後にはさらに多くの膨らんだ細胞が観察され (Fig. 8)、その後膨らんだ細胞は破裂した。BmABCC2_S 発現細胞に Cry1Ab、Cry1Ac を 100 nM 添加し、経時的に観察した際にも同様の反応がみられた (data not shown)。次に、Cry1A 毒素によって傷害を受けた細胞の割合を定量するために、BmABCC2_S 発現細胞と Cry1Aa 毒素を用いて、毒素によって傷害を受けた細胞から放出される LDH を測定した。Cry 毒素濃度依存的な反応曲線は得られたが、ウイルス感染によって弱った細胞のバックグラウンド値が高く出ることから毒素に対する反応性の違いを議論するのに適した精度の高い反応曲線が描けないことが分かった (Fig. 9)。そこで、LDH アッセイに代わる細胞傷害率の定量法として、PBS によりウイルス感染により死んだ細胞を洗い流す効果を含めてバックグラウンドを抑えることが期待できる Cell swelling assay を行うこととした。BmABCC2 発現細胞に、様々な濃度の3種類の異なる Cry1A 毒素を添加し、60 分後の観察を行ったところ、Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac それぞれ 100 pM、10 nM、1 nM 以上添加した際に、毒素による傷害を受け膨らんでいる細胞が観察された (Fig. 10 and 11A)。また、50%の細胞が膨らむ毒素の度は、Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac それぞれについておよそ 0.8 nM、80 nM、8 nM であった (Fig. 11A)。

2.3.2 BmABCC2 の Y²³⁴ 挿入変異の Cry1Ab, Ac 抵抗性への関与の証明

リンケージマッピングによりカイコガの Chinese2 (C2) 系統の Cry1Ab と Cry1Ac に対する抵抗性の原因は ABCC2 の変異であることが突き止められ、ABCC2 が Cry1A 毒素の作用機構上必要な分子であることが示唆された (Atsumi et al. 2012)。そこで、C2 系統の ABCC2 である BmABCC2_R 上に存在する変異が本当に抵抗性の原因であるのかを確かめることにした。BmABCC2_R を発現させた Sf9 細胞に対して、3 種類の Cry1A 毒素 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac を添加し 60 分後に観察したところ、Cry1Aa については BmABCC2_S を発現させた Sf9 細胞と同様に 100 pM 以上の毒素濃度で膨潤した細胞が観察され、100 nM で約 90% の細胞が膨潤している様子が観察された (Fig. 11B)。しかしながら、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素については、1 μM の濃度でも、膨潤した細胞は観察されなかった (Fig. 11B)。このことから確かに BmABCC2_R 分子内の変異 (BmABCC2_S との違い) が、カイコガ C2 系統の Cry1Ab、Ac 抵抗性の原因であると考えられた。なお、Cry1Aa 濃度に依存して BmABCC2_S 発現細胞中に出現する膨潤細胞の割合が示す曲線は BmABCC2_R 発現細胞とよく類似しており、C2 系統の BmABCC2_R 上の変異は Cry1Aa には無影響であることが示唆された。このことは Cry1Aa がカイコガ幼虫の Cry1Ab、Ac 抵抗性系統 (C2 系統) と感受性系統 (Rin 系統) のいずれに対してもほぼ同等の毒性を持つことと矛盾がなかった。

ところで、BmABCC2_R が由来する C2 系統を始めとする Cry1Ab と Ac に抵抗性を持つ *B. mori* の 7 系統の ABCC2 のアミノ酸配列には Rin 系統の ABCC2 と比較して 234 位に全てにおいて共通して 1 残基のチロシンの増加が認められた。よって、このチロシンの増加が抵抗性を生んだ主要な原因ではないかと考えられた (Atsumi et al. 2012)。しかし、Rin 系統と C2 系統の間にはこの 234 位を含めて 13 ヶ所のアミノ酸の違いがある (Fig. 12A)。そこで、本当に 234 位のチロシンの増加が ABCC2 分子の受容体機能の消失につながるかを確かめるために、BmABCC2_S の 234 位に Tyrosine を付加した

BmABCC2_S+²³⁴Y を導入したウイルス、AcNPV-BmABCC2_S +²³⁴Y を作出した (Fig. 12A)。このウイルスを感染させた BmABCC2_S+²³⁴Y 発現 Sf9 細胞の感受性を評価したところ、Cry1Aa を 100 nM 添加した際には膨潤した細胞が見られたのに対して、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素については、それぞれが 500 nM でも反応した細胞は観察されなかった (Fig. 12B, Upper)。すなわち、BmABCC2_S+²³⁴Y 発現 Sf9 細胞は Cry1Aa 毒素に対しては感受性を保っていたが、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素に対しては抵抗性であった。次に、BmABCC2_R の 234 位の Tyrosine を取り除いた BmABCC2_R-²³⁴Y を作製し組換え型バキュロウイルス AcNPV-BmABCC2_R-²³⁴Y を作出した (Fig. 12A)。このウイルスを用いて BmABCC2_R-²³⁴Y 発現 Sf9 細胞を作りその細胞の感受性を評価したところ、100 nM の Cry1Aa に反応するばかりか、BmABCC2_R 発現細胞では感受性を示さなかった 500 nM の Cry1Ab および 100 nM の Cry1Ac にも反応し膨潤した細胞が観察された (Fig. 12B, Lower)。これらのことから 234 位のチロシンの増加は BmABCC2 の細胞に対する Cry1A 毒素感受性付与能力に重要な影響を与える部位であることが示唆された。また、抗 Cry1Aa 抗体を用いて免疫染色を行い、BmABCC2_S+²³⁴Y 及び BmABCC2_R-²³⁴Y 発現細胞表面上で Cry1Aa、Ab 毒素が結合または細胞膜に刺さっている状態が検出できるかを確かめた。BmABCC2_R-²³⁴Y 発現細胞では、比較的 EGFP の発現量の多い細胞において両毒素が細胞表面で検出された (Fig. 13)。一方で、BmABCC2_R+²³⁴Y 発現細胞においては、Cry1Aa 毒素のみが細胞表面で検出された (Fig. 13)。このことから、BmABCC2_R にみられた BmABCC2_S より 1 残基多く存在する 234 位のチロシンは BmABCC2_R と Cry1Ab 毒素の相互作用に悪影響を及ぼしていることが示唆された。

2.3.3 BtR175 が Sf9 に与える感受性付与能力の BmABCC2 との比較

Cry 毒素活性に対する生理的な機能が報告されてきた BtR175 (Nagamatsu et al. 1999; Hara et al. 2003) の細胞に対する感受性付与能力を BmABCC2 と比較する目的で、

BtR175 を完全長 (BtR175-full) もしくは Cry1Aa 結合領域 BtR175-TBR

(Nagamatsu et al. 1999) として導入した AcNPV である、AcNPV-BtR175-full 及び AcNPV-BtR175-TBR を作出し、Sf9 細胞に感染させ BtR175-full と BtR175-TBR (Fig. 14) を発現させた。なお AcNPV-BmABCC2 の時と同様にウイルス感染細胞を識別できるようにする目的で、これらのウイルスには同時に EGFP cDNA を導入した。感受性を評価する前に、目的分子が Sf9 細胞表面上に期待通りに発現していることを確かめる目的で、これらの組換えウイルスを感染させた Sf9 細胞に対して 3 つの実験を行った。まず、ウェスタンブロッティングを行ったところ、BtR175-full 発現細胞と BtR175-TBR 発現細胞からは、それぞれ 175 kDa と 70 kDa の理論値通りのバンドが検出された (Fig. 15A)。次に、抗 BtR175 抗血清でウイルス感染 Sf9 細胞に対し免疫染色を試みた。その結果、これらの感染細胞の約 60% が感染マーカーである EGFP を発現していたが、その中でも EGFP が強く発現しているように見える一部の細胞において BtR175 血清で染まっていることが認められた (Fig. 15B)。さらに、BtR175-TBR 発現細胞をホルムアルデヒド固定した後、Cry1Aa が細胞表面に結合するか否かを検討した。抗 Cry1Aa 抗血清を用いた細胞に結合した Cry1Aa の検出系でも、BtR175 抗血清を用いた免疫染色同様、EGFP が強く発現しているように見える一部の細胞で Cry1Aa 毒素が結合していることが認められた (Fig. 15C)。これらのことから、BtR175-TBR 発現細胞では Cry1Aa に結合する性状を保った形で BTR175-TBR を細胞表面に提示していると考えられた。一方、BtR175-full 発現細胞に関しても膜上の発現が確認され (Fig. 15B)、BtR175-TBR 発現細胞と同様に Cry1Aa に対する結合性状を保っていることが期待された。

BtR175 が期待通り細胞膜上に正しい分子量で発現していることが確認できたため、次に、BtR175 発現細胞の Cry1Aa 毒素に対する感受性を評価した。まず、BtR175-TBR 発現細胞に Cry1Aa、毒素を 500 nM になるように添加し、細胞の形態変化を経時的に観察したところ、毒素添加から 20 min 経過時から EGFP マーカーを多量に発現している

BtR175 発現細胞特異的に膨潤が観察され始め、60 分後にはさらに多くの EGFP 陽性細胞に膨潤が見られた (Fig. 16)。しかし、さらに 6 時間後まで観察を続けたが、EGFP 陽性細胞の膨潤の程度は 60 分後の観察とほとんど変わらず、BmABCC2 発現細胞の場合と違って破裂する細胞はほとんど見られなかった(data not shown)。次に、BtR175-full 発現細胞に Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素を添加し、60 分後のそれぞれの形態変化を位相差顕微鏡下で観察したところ、Cry1Aa と Cry1Ab に対しては 600 nM で膨潤する細胞が観察されたが、Cry1Ac に対しては 600 nM でも膨潤細胞は観察されなかった(Fig. 17A)。一方、BtR175-TBR 発現細胞は Cry1Aa、Cry1Ab および Cry1Ac に対し、それぞれ 150 nM, 150 nM, および 450 nM 以上の濃度で膨潤が観察され (Fig. 17B and Fig. 18A)、3 種の Cry1A 毒素に対して BtR175-full 発現細胞より高い感受性を持つことが示された。そこで、これ以降の実験には BtR175-TBR 発現細胞を用いることとした。なお、我々が作った BtR175-TBR 発現 Sf9 細胞の Cry1Aa に対する感受性は Nagamatsu らが報告している BtR175-TBR を発現させた Sf9 細胞の感受性レベルや Tsuda らが報告した完全長 BtR175 を発現させた HEK293 細胞の感受性レベルとほぼ同レベルであった (Nagamatsu et al. 1999; Tsuda et al. 2003)。

AcNPV-BmABCC2_S と AcNPV-BtR175-TBR に感染した Sf9 細胞の EGFP 発現量には大きな差は認められなかった(Fig. 8 and 16)。しかしながら、EGFP を発現している細胞における BtR175 と BmABCC2_S 発現細胞の Cry 毒素に対する反応を比較してみると、BtR175 発現細胞は EGFP の発現量が高い細胞のみが Cry1A 毒素に反応しているのに対して (Fig. 16)、BmABCC2_S 発現細胞は、EGFP 発現量が低い細胞でも Cry1A 毒素に対して明らかに高い感受性を示しているように見えた (Fig. 8)。すなわち、BmABCC2_S 発現細胞の場合は、より少ない BmABCC2_S の発現レベルでも Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac に対してそれぞれ 100 pM、10 nM、および 1 nM で感受性を示した。したがって、BtR175 が Sf9 細胞に付与する感受性は、BmABCC2_S が付与する感受性よりも Cry1Aa、Cry1Ab、

Cry1Ac それぞれに関して約 1000 倍、約 10 倍、約 100 倍以上低いものと思われた (Fig. 11A and 18A)。 *H. virescens* における Cry1Ac によって選抜された抵抗性系統でも、カドヘリン様タンパク質の機能を欠損している YFO 系統においては 5 µg/ml レベルの Cry1Ac 感受性を示すのに対して、ABCC2 分子の機能を欠損している YEE 系統では 50µg/ml レベルの、すなわち 10 倍低い感受性を持つことが示されている (Gahan et al. 2010)。これらのことは、Cry1A 毒素に対する感受性を細胞に与える役割においては、BmABCC2 が BtR175 よりもより大きな意味を持つことを示唆していると考えられる。

すでに示した通り、BtR175-TBR 発現細胞は Cry1Aa、Cry1Ab および Cry1Ac に対し、それぞれ 150 nM, 150 nM, および 450 nM 以上の濃度で感受性を示し、BtR175-TBR 発現細胞には 3 種の毒素に対して若干の感受性差があることが分かった (Fig. 18A)。ここで観察された、BtR175 が細胞に与える 3 種の Cry1A 毒素に対応した感受性の高さの違いは、BtR175 とこれらの毒素の結合親和性の違いに由来する可能性がある。そこで、この可能性を確かめるため、大腸菌発現型 BtR175-TBR を固定化したセンサーチップ CM5 chip を用いて Biacore J で 3 種の Cry1A 毒素と BtR175-TBR の結合親和性について解析した。12.5 nM から 200 nM の 5 段階に希釈した毒素を用いて解析を行ったところ 200 nM の各毒素を添加した際の 120 秒後の到達反応値 (Resonance Unit, RU) は Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac それぞれにおいて 870、200、および 350 RU で、Cry1Aa は Cry1Ab、Cry1Ac のそれぞれ、約 4.3 倍、2.5 倍高い値であった (Fig. 18 B-D)。一方、結合親和性を示す各パラメーターを比較してみると、KD 値は Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac それぞれにおいて $2.87(\pm 1.38) \times 10^{-9}$ M、 $4.21(\pm 1.24) \times 10^{-7}$ M、 $3.02(\pm 1.39) \times 10^{-8}$ M であった (Table 3)。したがって、BtR175-TBR に対して解離定数が小さい毒素ほど細胞毒性が高いという単純な関係性は見られず、BtR175-TBR の毒素に対する結合性の良し悪し以外の未知の他の要素も細胞の毒素に対する感受性に影響を及ぼしていると考えられた。

2.3.4 コナガ ABCC2 の Cry 毒素受容体としての機能の確認

ここまでの実験より、カイコガにおいては、BmABCC2 が Cry1A 毒素の受容体として機能し、本研究で行った Sf9 に感受性を与える能力を比較する限りでは、BtR175 よりもその能力は高いことが示唆された。しかし、ABCC2 の Cry1A 毒素に対する受容体としての役割の一般性に関しては様々な昆虫種においてさらに検討される必要が残されている。一方、コナガにおいて、一般の系統と比較して Cry1Ac に対して約 300 倍の抵抗性を示す抵抗性が出現したことが報告された (Personal communication)。そこで、コナガにおいても ABCC2 が Cry1A 毒素受容体として機能するか、また抵抗性コナガの抵抗性の原因が ABCC2 分子の変異に起因するのかを調べることにした。コナガ ABCC2 については、2011 年に、Baxter らが Cry1Ac 抵抗性のコナガについてリンケージマッピング解析を行い、抵抗性コナガの原因が ABCC2 分子であり、細胞膜貫通ドメイン 12 の領域に 110 アミノ酸の変異があることを報告した (Baxter et al. 2011)。本研究で使用した Cry1A 毒素抵抗性コナガについても ABCC2 の cDNA をクローニングし、感受性コナガの配列と比較したところ、翻訳開始点からの位置 862 位から 869 位の 8 塩基と 1038 位から 1059 位の 22 塩基の 2 か所の欠失と 3778 位以降トランスポゾンの挿入による破壊が確認された(Fig. 19 and 20)。すなわち、抵抗性系統の ABCC2 分子は第 5 膜貫通領域のかかなりの部分と C 末端部位を失っていると予想された。そこで、感受性、抵抗性それぞれのコナガ由来の ABCC2 を発現する AcNPV を作製し、カイコガの場合と同様、Cry1A 毒素に対する感受性を確かめた。感受性コナガの ABCC2 である PxABCC2_S を発現させ、毒素と反応させたところ、毒素に反応し膨らんでいる細胞が観察された(Fig. 21)。Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac それぞれに対する反応性はカイコガの BmABCC2_S と異なり、それぞれの毒素を 100 nM、1 nM、100 pM 以上添加した際に初めて膨らんでいる細胞が観察された (Fig. 21)。これらの結果より、コナガにおいても ABCC2 分子が Cry1A 毒素の受容体として機能することが明らかになった。一方で、抵抗性型の ABCC2

である PxABCC2_R を発現させた細胞は、Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、それぞれの毒素を 1 μ M 添加し、60 分反応させた場合にも毒素に反応し膨らんでいる細胞は確認できなかった (data not shown)。このように PxABCC2_R 発現細胞が非感受性になる原因がこの分子が細胞膜上に正しく発現しないせいである可能性が考えられたため、PxABCC2_S 及び PxABCC2_R 発現細胞より細胞膜画分を調整し、BmABCC2 抗血清の交叉性を利用し、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、細胞膜上に PxABCC2_R は PxABCC2_S と同レベルで発現量していることが確認できた (Fig. 22)。一方、すでに述べた通り、ABCC2 遺伝子の異常は *H. virescens*、*P. xylostella*、*B. mori* において Cry1A 毒素に対する抵抗性の原因であることが報告されている (Gahan et al. 2010; Baxter et al. 2011; Atsumi et al. 2013)。これらのことは、ABCC2 がチョウ目昆虫において広く Cry1A 毒素の受容体として機能していることを示唆していると考えられる。一方、Cry1A 毒素抵抗性コナガ由来の ABCC2 は Cry 毒素受容体として機能しないことが確認されたことから、個体で観察された Cry1A 毒素抵抗性の重要な原因となっている可能性が考えられた。また、細胞膜に発現しているにもかかわらず、PxABCC2_R が Cry 毒素受容体として機能しない理由は、アミノ酸の欠失により PxABCC2_R の構造が正常のものと異なるためであると考えられた。また、Heckel の報告にあるように ABCC2 分子が Cry 毒素受容体として機能する際には、ABCC2 分子が本来持つ ATPases associated with diverse cellular activities domain (以下 AAA ドメイン) の働きの結果起こる構造変換が必要である可能性が考えられる。これらを考慮すると PxABCC2_R の欠失部位が AAA ドメイン 2 の一部であるために、PxABCC2_R の分子の動きが失われ、Cry 毒素受容体として機能することができなくなった可能性も考えられた (Heckel 2012)。

2.3.5 AaABCC2 の Cry4Aa 受容体としての機能の有無の調査

ABCC2 がかなりの範囲のチョウ目昆虫において Cry1A 毒素受容体として機能するら

しいことが明らかになってきたが、現在までに、ABCC2 が受容体であることが異所発現系などで直接的に示された昆虫は、カイコガとコナガのみであり、チョウ目の範囲にある。また、抵抗性研究においても、チョウ目昆虫以外の昆虫で ABCC2 が Cry 毒素受容体として機能するという報告はまだない。そこで、他の目の昆虫とそれに活性持つ Cry 毒素の関係においても ABCC2 分子が受容体分子として機能しうるかを検討することにした。材料として、*Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* が産生する Cry4A, Cry4B, Cry11A, Cyt1A などが活性を持つ標的昆虫であるヒトスジシマカ *Aedes albopictus* を用いた。まず、10 頭の *A. albopictus* 幼虫を Cry4aAa の封入体を含む水に入れ、48 時間後の死亡個体を計測することで、*A. albopictus* が Cry4Aa に感受性を持つかどうかを調査した。その結果、100 µg/ml の封入体を含む区画において 4 匹の死亡個体が観察された。一方、対照区では、死亡個体は観察されなかった。したがって、実際に *A. albopictus* が Cry4Aa に感受性を持つことが確認された。NCBI とヒトスジシマカの近縁種である *Aedes aegypti* のゲノムデータベース *Aedes aegypti* Database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aedes_aegypti) の BLAST を用いて、*A. aegypti* における BmABCC2 に最もホモロジーの高い分子を探索した。その結果、AaABCC2 (XM_001651648) が BmABCC2 に最も近い分子であることが分かった (Fig. 23)。さっそく AaABCC2 をクローニングし、組換え型バキュロウイルス AcNPV-AaABCC2 を作出した。作出した組み換え型ウイルスを用いて、AaABCC2 を Sf9 細胞に発現させ、Cry4Aa 毒素に対する反応を見ることにした。AaABCC2 が Sf9 細胞膜上に発現しているかを確認するために、抗 AaABCC2 血清を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、理論値である 150kDa 付近にバンドが確認され、AaABCC2 は細胞膜上に発現していることが確認できた (Fig.24)。次に、活性化した Cry4Aa を用意できる最大濃度である 1.6 µM で添加し、60 分後の細胞を観察し、AaABCC2 発現細胞が Cry4Aa 毒素によって傷害を受け膨潤しているかを見ることにした。しかし、60 分後

の観察では、Cry4Aa 毒素に反応している細胞は観察されず (Fig. 25)、さらに 3 時間後まで観察を続けたが、AaABCC2 発現細胞が反応している様子は観察されなかった (data not shown)。このことから、AaABCC2 (XM_001651648) は Cry4Aa 毒素受容体として機能しない可能性が示唆された。*A. aegypti* や *A. albopictus* はデング熱の媒介昆虫であることから、ハエ目に活性のある Cry 毒素は防除手段の 1 つとして効果が期待されていて、殺虫作用機構についても多くの研究が行われている。Cry4Ba と BBMV を用いた結合実験より、*A. aegypti* においてはアルカリフォスファターゼが、*Anopheles albimanus* では、 α -アミラーゼが受容体であることを示唆する報告がある (Jimenez et al. 2012., Fernandez-Luna et al. 2010)。また、Cry11Aa と BBMV を用いた結合実験では、*A. aegypti* のカドヘリン様タンパク質が Cry11Aa に結合すること、さらに、Cry11Ba と *A. aegypti* の BBMV を用いた結合実験では、カドヘリン様タンパク質、アミノペプチダーゼ N、アルカリフォスファターゼの断片が Cry11Ba と BBMV の結合を阻害することが報告されている (Chen et al. 2009., Likitvivatanavong et al. 2011)。このように、実際に ABCC2 以外の複数の宿主分子がハエ目昆虫に活性のある Cry 毒素と特異的に結合することが報告されていることから、ハエ目昆虫に活性のある Cry 毒素の受容体分子、少なくとも Cry4Aa については、ABCC2 分子以外である可能性も考えられる。また、作製した系統樹を見てみると、AaABCC2 は Cry 毒素受容体として機能することが分かった BmABCC2 や PxABCC2 とは少し離れた位置に属することから (Fig. 23)、そもそも、*A. albopictus* にはチョウ目昆虫で Cry 毒素受容体として働く ABCC2 のホモログ分子が存在しない可能性についても考えられた。以上のように、他の目の昆虫とそれに活性持つ Cry1 以外の毒素との組み合わせにおいては、ABCC2 分子が受容体分子として機能しない場合があると考えられた。

2.3.6 BmABCC2 の Cry9 受容体としての機能の有無の調査

カイコガにおいて、BmABCC2 は 3 種類の Cry1A 毒素に対する受容体であることが分かった一方で、チョウ目の範囲を超えた昆虫種においては、ABCC2 が Cry 毒素受容体ではない昆虫がいる可能性が見えてきた。また、Cry 毒素の種類についてみると、Cry 1 A 毒素の範囲を超えた Cry 毒素については、抵抗性研究も含め、未だ ABCC2 分子が受容体として機能するとの報告はない。カイコガに活性を持つ Cry 毒素は、Cry1A と比較的近縁のものから離れた関係にあるものまでさまざまであり、例えば Cry1 とはかなり離れた関係にある Cry9 に属する幾つかの毒素がカイコガに活性を持つ。そこで次に、チョウ目昆虫（カイコガ）においては Cry1A 毒素と離れた関係にある毒素も ABCC2 を受容体に行っているかについて検討することにした。Cry9Aa, Cry9Da は共にチョウ目に活性があり、Cry1A 毒素と同様に前駆体が 130kDa 型の Cry 毒素である。また、大部分の Cry 毒素が持つ毒素が毒性を示すのに必要だと考えられている 5 個の保存領域も保有している (Sanahuja et al. 2011)。このように、チョウ目に活性があり、Cry1A 毒素と構造が類似していることから、Cry9 も標的昆虫を殺す際に BmABCC2 を受容体と行っていることが期待された。

まず、カイコガ個体が、本当に Cry9Aa、Cry9Da に対して感受性であるかを確認することにした。N28、C440 という Cry1Ab に対して感受性と抵抗性であることが分かっている (personal communication) 2 種類の異なるカイコガの系統を用いて、Cry9Aa、Cry9Da 毒素に対する感受性を調査した。その結果、Cry9Aa、Cry9Da は N28 系統、C440 系統の両方に対して高い活性を示した (Fig. 26)。さらに、カイコガに高い活性があることが分かっている Cry1Aa、Cry1Ab の半数致死濃度である LC_{50} 値と比較してみることにした。その結果、Cry9Aa は N28、C440 に対し、それぞれ 16.9 ng/cm^2 、 14.7 ng/cm^2 という値を示し、今回調べた 4 種類の毒素の中で最も活性が高いことが分かった (Table 4)。また、Cry9Da の LC_{50} 値は、それぞれ、 68.4 ng/cm^2 、 60.9 ng/cm^2 であり、Cry1Aa とほぼ同レベルの活性を示すことが分かった (Table 4)。Cry9Aa、Cry9Da 共にカイコガ

個体に対して高い活性を示すことが確認できたので、次に N28 系統由来の BmABCC2 (BmABCC2N28)をクローニングし、AcNPV-BmABCC2N28 を作製した。

BmABCC2N28 発現 Sf9 細胞に Cry1Aa、Cry1Ab、をそれぞれ 500 nM 添加し、細胞の形態を観察したところ、どちらも毒素に反応して膨らんだ細胞が観察され、BmABCC2N28 も Cry1Aa、Cry1Ab に対する受容体として確かに機能していることが確認できた (Fig. 27)。しかし、Cry9Aa、Cry9Da をそれぞれ用意できる最大の濃度である 4.5 μ M、14.5 μ M ずつ添加した際には、60 分後の観察において、毒素に対して反応し、膨らんでいる細胞は観察されなかった(Fig. 27)。このことから、Cry9Aa、Cry9Da は確かにカイコ個体に対して高い活性を示すにも関わらず、BmABCC2 分子を利用することができない、すなわち Cry9Aa、Cry9Da の受容体分子は、BmABCC2 ではないものと考えられた。*Pectinophora gossypiella* の Cry1Ac 抵抗性である APHIS-98R と ZAP-R 系統は、Cry9Ca 毒素に対して感受性であることが報告されている (Tabashnik et al. 2000)。また、Cry1Ac 感受性系統である APHIS-S 由来の BBMV を用いた毒素の結合実験においても Cry9Ca は Cry1Ac と BBMV の特異的な結合を阻害しないことが分かっている (Gonzalez-Cabrera et al. 2003)。これら抵抗性研究の結果は、Cry1A 毒素と Cry9 毒素がチョウ目昆虫の消化管上皮細胞において異なる受容体を利用することを示唆するものであり、本研究でみた Cry1A 毒素と Cry9 毒素の ABCC2 に対する親和性の違いと同じ原因を見ているものと推定される。以上のことから、カイコガに活性を持つ毒素の中にも ABCC2 を受容体としないものがあることがありとえられる。

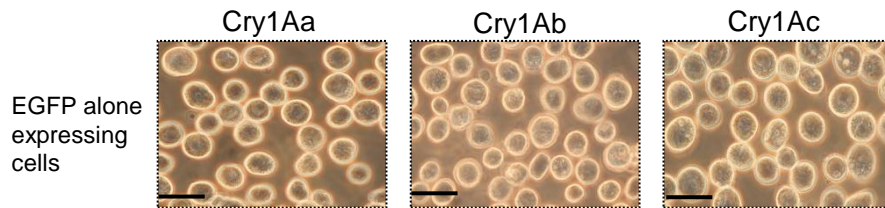


Fig.7. Morphological changes in EGFP-expressing cells. Sf9 cells were infected with AcNPV-EGFP and incubated. After 72 h, the medium was replaced with PBS containing each Cry1A toxin 1 μ M. After 60 min incubation, cells were observed using phase-contrast microscopy; scale bars represent 10 μ m.

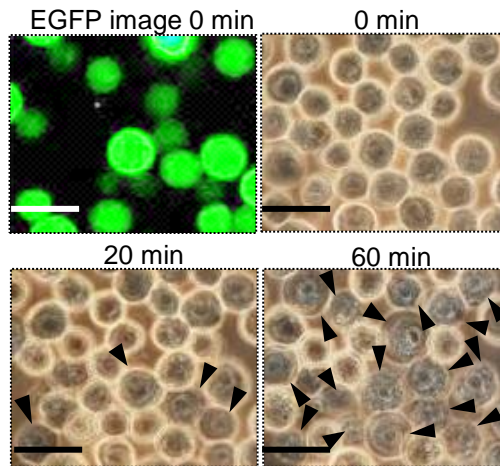


Fig. 8. Toxin-induced morphological changes in Sf9 cells expressing BmABCC2_S. Sf9 cells expressing BmABCC2_S were exposed to PBS containing 100 nM Cry1Aa for the specified time. Slightly refractive swollen cells (arrow heads) were observed using phase-contrast microscopy; scale bars represent 10 μ m

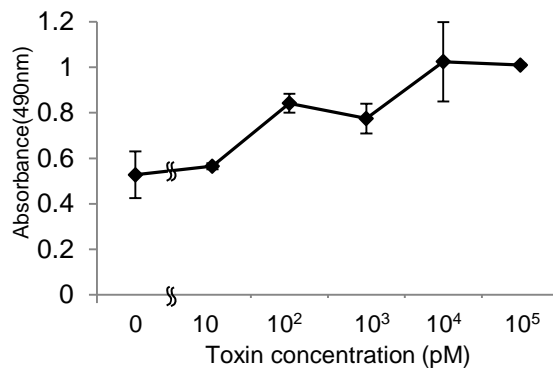


Fig. 9. Toxin concentration-dependent cell response profile in LDH assay. Sf9 cells were infected with AcNPV-BmABCC2_S and cultured for 72 h. The medium was replaced with PBS containing Cry1Aa toxins and incubated for 60 min, and then LDH activity was determined by measuring the absorbance at 490 nm as described in materials and methods. High back ground and high data diversity seemed to depend on existence of many dead and low viability cells due to the infection by the virus

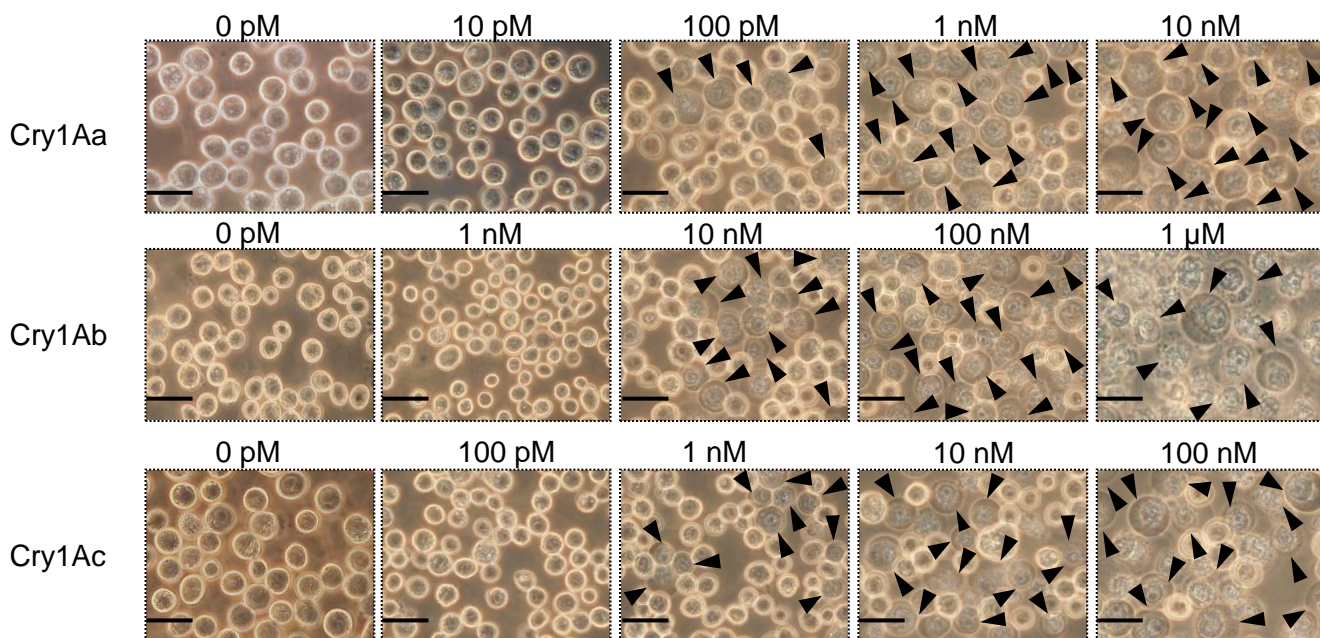


Fig. 10. Pictures of BmABCC2_S expressing Sf9 cells administrated with various concentration of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins. Sf9 cells expressing BmABCC2_S were exposed to PBS containing various concentration of Cry1A toxins. . Slightly refractive swollen cells (arrow heads) were observed using phase-contrast microscopy. Scale bars represent 20 μm.

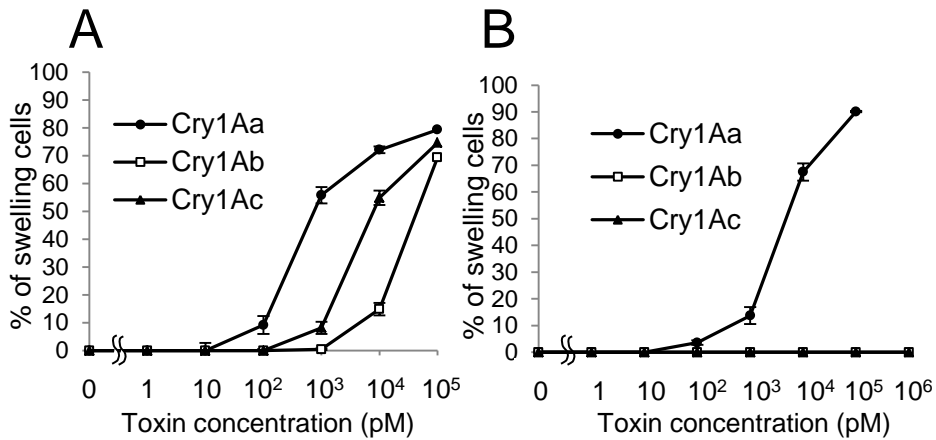


Fig.11. Dose-response curves for Sf9 cells expressing BmABCC2_S (A) or BmABCC2_R (B) after treatment with increasing concentrations of Cry1Aa, Cry1Ab, or Cry1Ac toxins. The cells were observed 60 min after toxin administration. The mean proportion of swollen cells from all EGFP-expressing cells was calculated from three independent experiments. Bars represent the standard error of the mean for each toxin concentration tested.

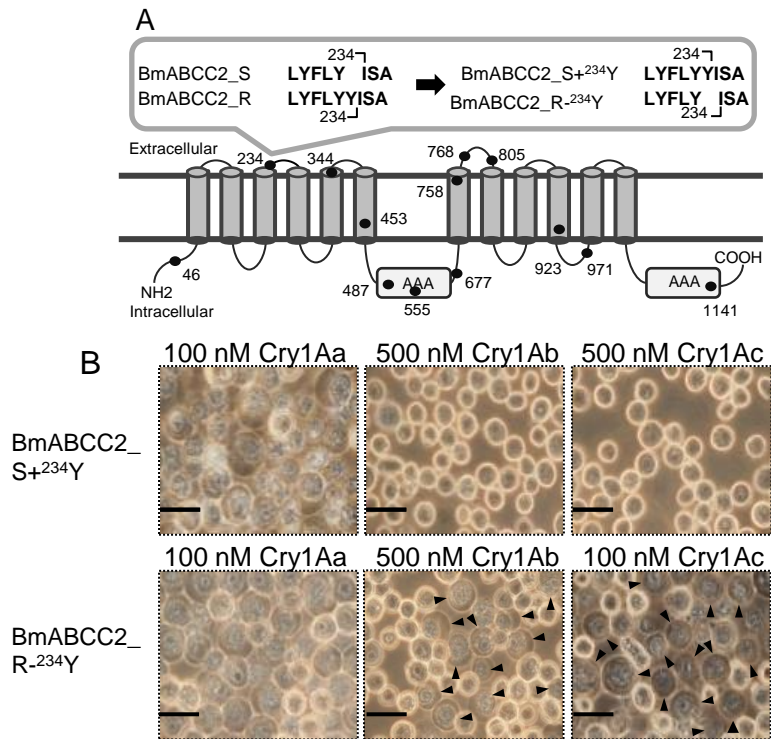


Fig. 12. Insertion of ²³⁴Y causes dysfunction of BmABCC2 as a receptor to Cry1Ab and Cry1Ac toxins. (A) Diagram of mutation sites observed in BmABCC2_R in previous reports (Atsumi et al. 2012) and BmABCC2 variant constructs used for the confirmation of the receptor function-disrupting effect of the ²³⁴Y insertion. Closed circles in the pattern diagram represent mutation sites in BmABCC2_R compared to BmABCC2_S. (B) Susceptibility of Sf9 cells expressing BmABCC2_S+²³⁴Y or BmABCC2_R-²³⁴Y to Cry1Aa, Cry1Ab, or Cry1Ac toxins at the indicated concentrations. The experiment was conducted as described in Fig. 7. Slightly refractive swollen cells are indicated by arrowheads in panels. Scale bars represent 20 μ m.

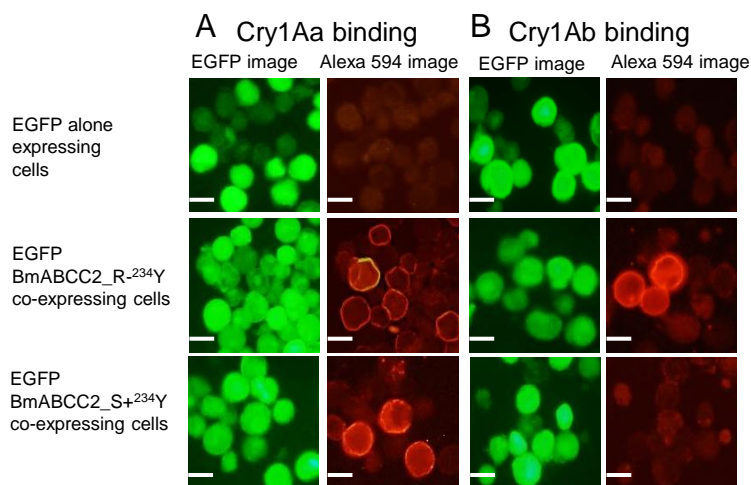


Fig. 13. Detection of Cry1Aa and Cry1Ab toxin binding to BmABCC2. Sf9 cells infected with AcNPV-BmABCC2_R-²³⁴Y or AcNPV-BmABCC2_S+²³⁴Y, were incubated with 20 nM Cry1Aa (A) or Cry1Ab (B) for 10 min, and then stained with anti-Cry1Aa rabbit antiserum followed by Alexa 594-conjugated anti-rabbit antisera and observed in a fluorescence microscope. In the images EGFP is used as marker for expression of BmABCC2_R-²³⁴Y or BmABCC2_S+²³⁴Y, and Alexa 594 fluorescence indicates Cry toxin binding to the cell membrane. Scale bar represents 10 μ m.

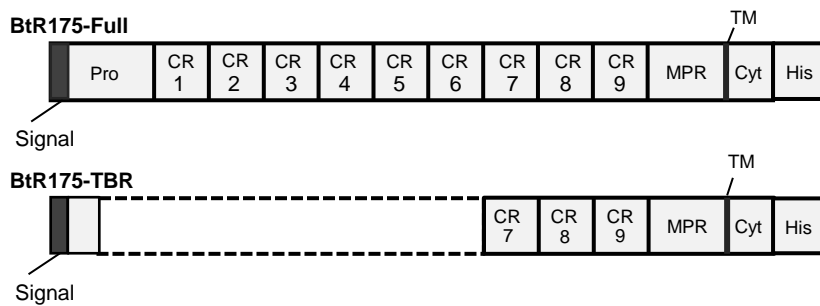


Fig.14. Schematic diagrams of BtR175-full (Upper) or BtR175-TBR (Down). Signal, signal sequence; Pro, proprotein region; CR, cadherin repeat; MRP, membrane proximal region; TM, transmembrane region; Cyt, cytoplasmic region, His; His-tag.

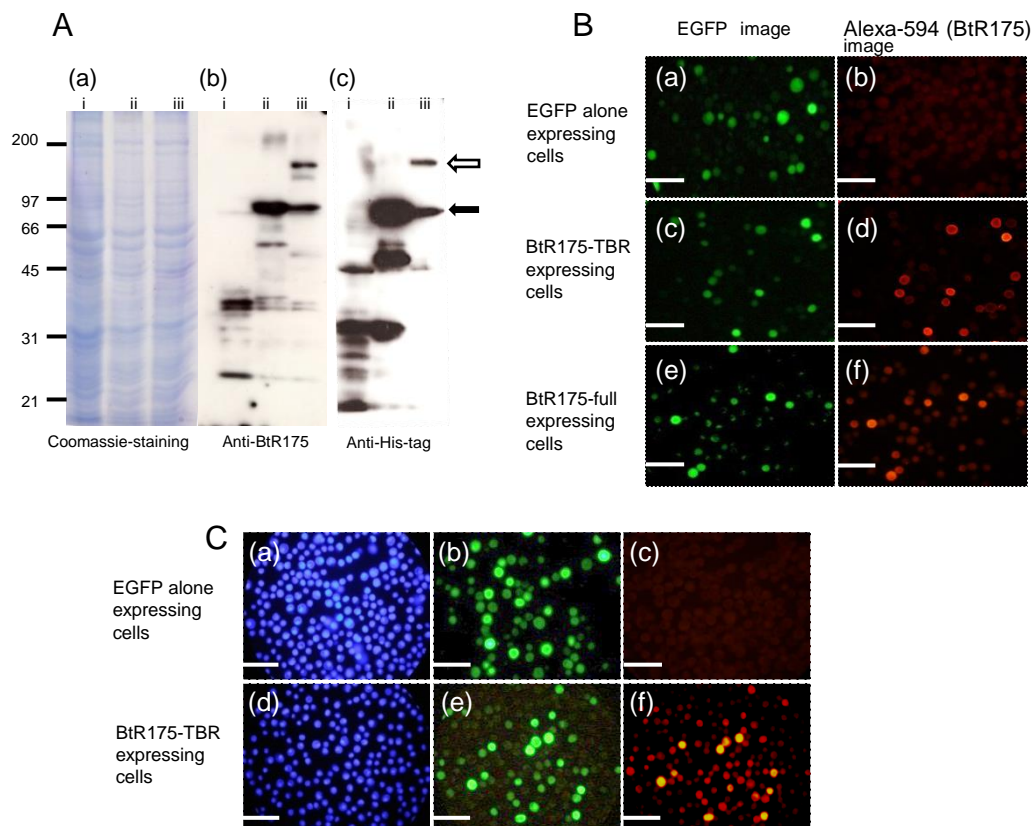


Fig.15. Bt175-TBR and Bt175-full is expressed correctly on the Sf9 cell surface. (A) His-tagged BtR175-full- or His-tagged BtR175-TBR-expressing cell lysates were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (a) or analyzed by Western blotting using anti-BtR175 antiserum (b) or anti-His-tag antibody (c). Open and closed arrows indicate the theoretical molecular mass of BtR175-full and BtR175-TBR, respectively. Lane i, Sf9 cells without infection; lane ii, Sf9 cells infected with AcNPV-BtR175-TBR; lane iii, Sf9 cells infected with AcNPV-BtR175-full. (B) Detection of BtR175-TBR and BtR175-full on the Sf9 cell surface by immunostaining. Sf9 cells were infected with AcNPV-EGFP (a, b), AcNPV-BTR175-TBR (c, d), and AcNPV-BtR175-full (e, f) to express EGFP alone, BtR175-TBR, and BtR175-full, respectively. The cells were fixed and stained with anti-BtR175 followed by Alexa-594 conjugated anti-mouse IgG and observed under a fluorescent microscope. EGFP images of c and e indirectly indicate BtR175-TBR- and BtR175-full-expressing cells, respectively. Scale bars represent 50 μ m. (C) Toxin-binding assay of BtR175-TBR-expressing cells using Cry1Aa as a ligand. Sf9 cells infected with AcNPV-EGFP (a, b, c) or AcNPV-BtR175-TBR (d, e, f) were fixed with paraformaldehyde and incubated with 10 nM Cry1Aa toxins. For detection of Cry1Aa toxin binding to the cell surface, the cells were stained with anti-Cry1Aa followed by Alexa 594 conjugated anti-rabbit IgG. The nuclei of cells were counterstained with DAPI. (a, d), DAPI image; (b, e), EGFP image; (c, f), Alexa 594 image. Scale bars represent 50 μ m.

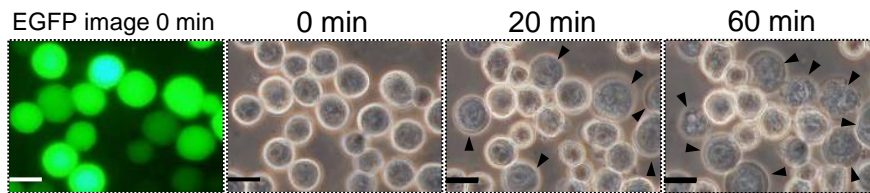


Fig. 16. Morphological changes in Sf9 cells expressing BtR175-TBR. Sf9 cells expressing BtR175-TBR were exposed to PBS containing 500 nM Cry1Aa for the specified time. Slightly refractive swollen cells (arrow heads) were observed using phase-contrast microscopy; scale bars represent 10 μ m

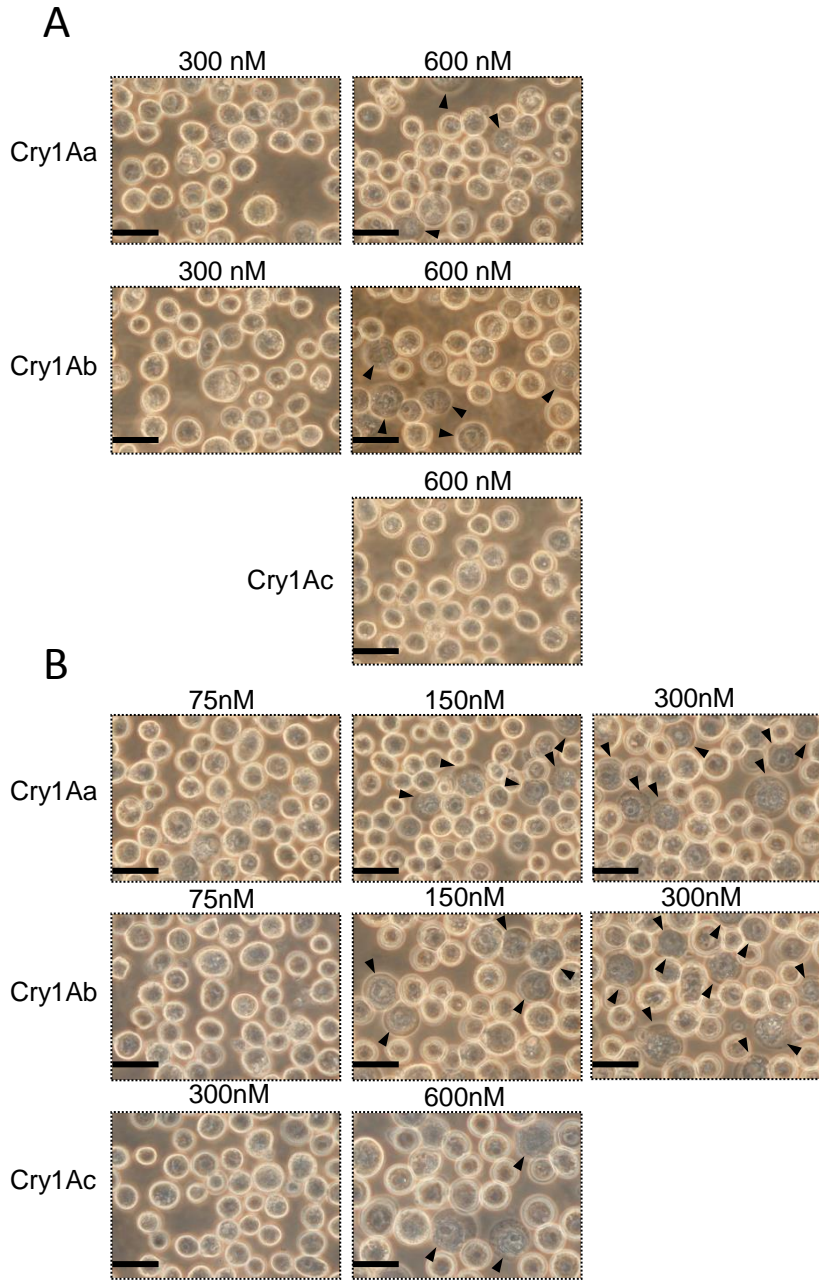


Fig. 17. Cry1A toxins' activity against BtR175-full or BtR175-TBR expressing cells. Sf9 cells were infected with AcNPV-BtR175-full (A) or BtR175-TBR (B) and cultured for 72 h. The medium was replaced with PBS containing Cry1Aa, Ab or Ac, and the cells were observed 60 min after toxin administration. Lowly-refractile swollen cells are indicated by arrow heads. Scale bars represent 20 μ M.

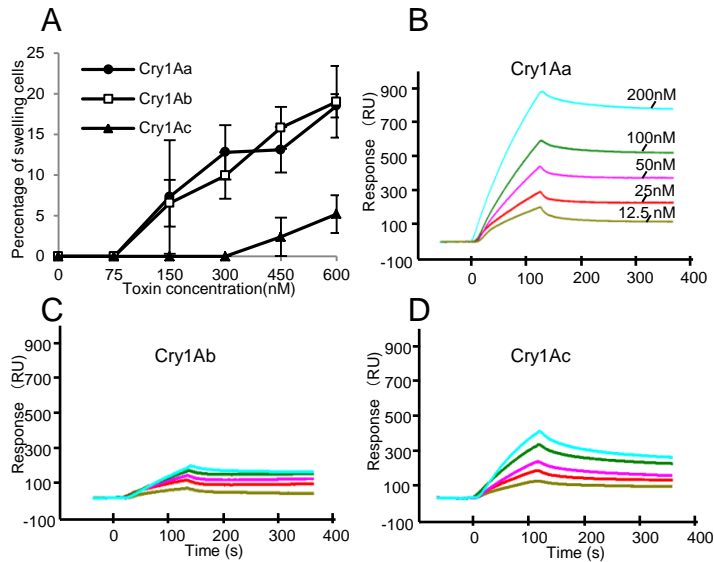


Fig. 18. BtR175 functions as a receptor for Cry1A toxins only at a high concentration. (A) Reaction profile of BtR175-TBR-expressing cells. The experiment was conducted as described in Fig. 11A and B. (B-D) Biacore sensorgrams for the binding of Cry1Aa (B), Cry1Ab (C), and Cry1Ac (D) toxins to recombinant BtR175-TBR. Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac solutions at 12.5, 25, 50, 100 or 200 nM were applied to BtR175-TBR immobilized on a chip, and the kinetics of the association and dissociation reactions were determined using Biacore surface-plasmon resonance (SPR) detection equipment. RU, SPR response unit.

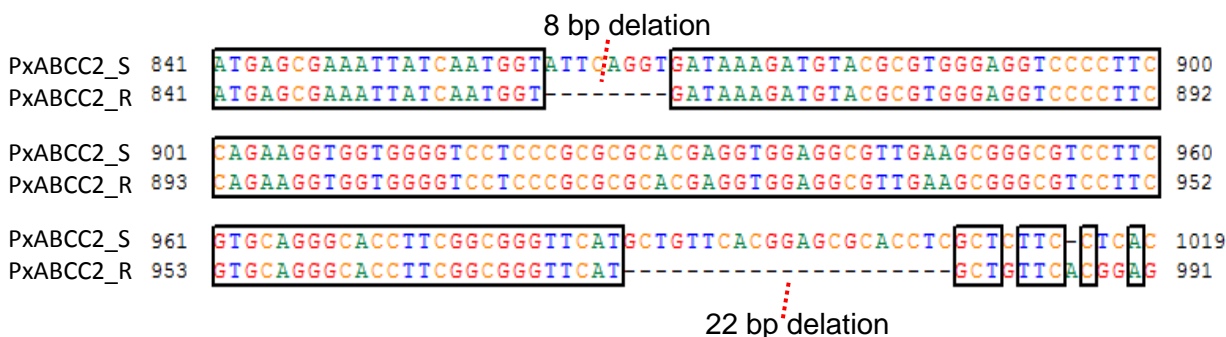
Table 3. Affinity parameters of Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac binding to BtR175-TBR determined using Biacore surface-plasmon resonance detection equipment.

	Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)
Cry1Aa	$9.47(\pm 4.08) \times 10^4$	$1.91(\pm 0.35) \times 10^{-4}$	$5.75(\pm 0.15) \times 10^9$	$2.87(\pm 1.38) \times 10^{-9}$
Cry1Ab	$5.06(\pm 1.60) \times 10^4$	$8.02(\pm 4.69) \times 10^{-4}$	$2.49(\pm 1.57) \times 10^7$	$4.21(\pm 1.24) \times 10^{-7}$
Cry1Ac	$6.29(\pm 2.74) \times 10^4$	$1.52(\pm 0.19) \times 10^{-3}$	$3.66(\pm 1.53) \times 10^7$	$3.02(\pm 1.39) \times 10^{-8}$

Values represent means \pm standard error.

Rate constants for association (ka) and dissociation (kd) and dissociation constant (KD) were determined from fitted curves obtained by global fitting using 1:1 Langmuir binding model from 15 binding curves obtained by 3 repetitive injections of different five concentrations of the toxins.

A



B

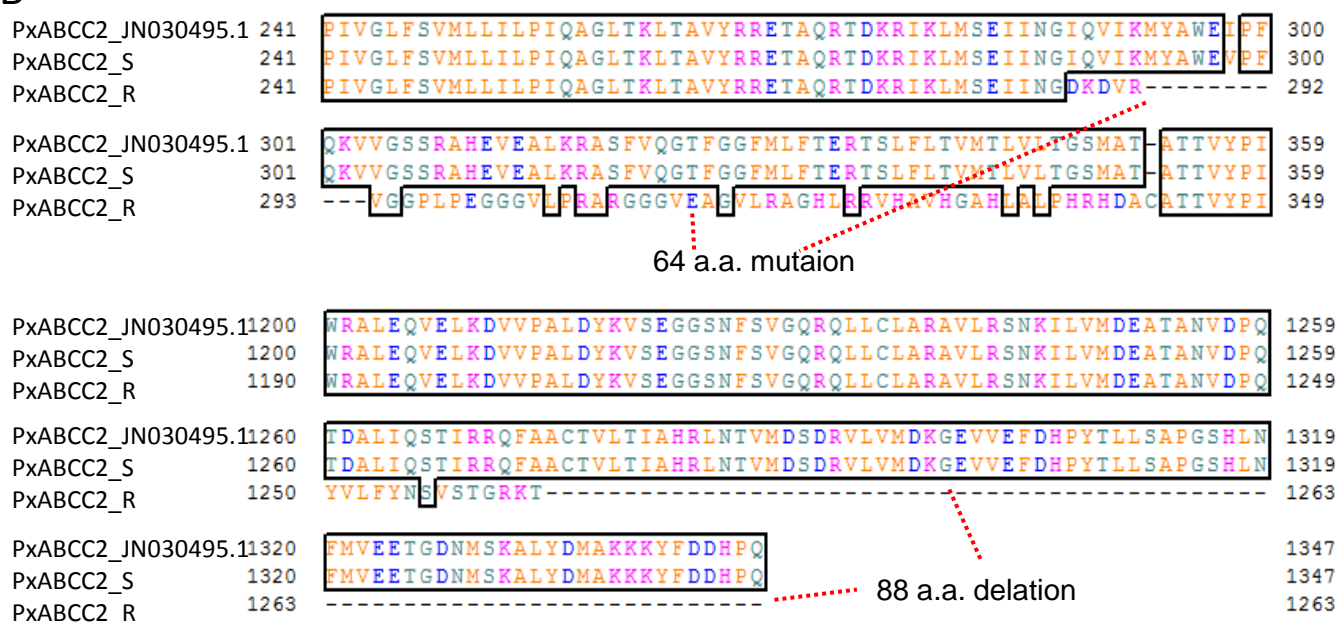


Fig. 19. Sequence alignments of the first mutation site found in PxABCC2_R.

Nucleotide sequence (A) and amino acid sequence (B) were aligned by multiple alignment system packaged in GENETX7(A). PxABCC2_S and PxABCC2_R are susceptible and resistant strains of *P. xylostella* described in the text, respectively. PxABCC2_JN030495 is the ABCC2 amino acid sequence from Cry1Ac susceptible strain reported by Baxter et al. (2011).

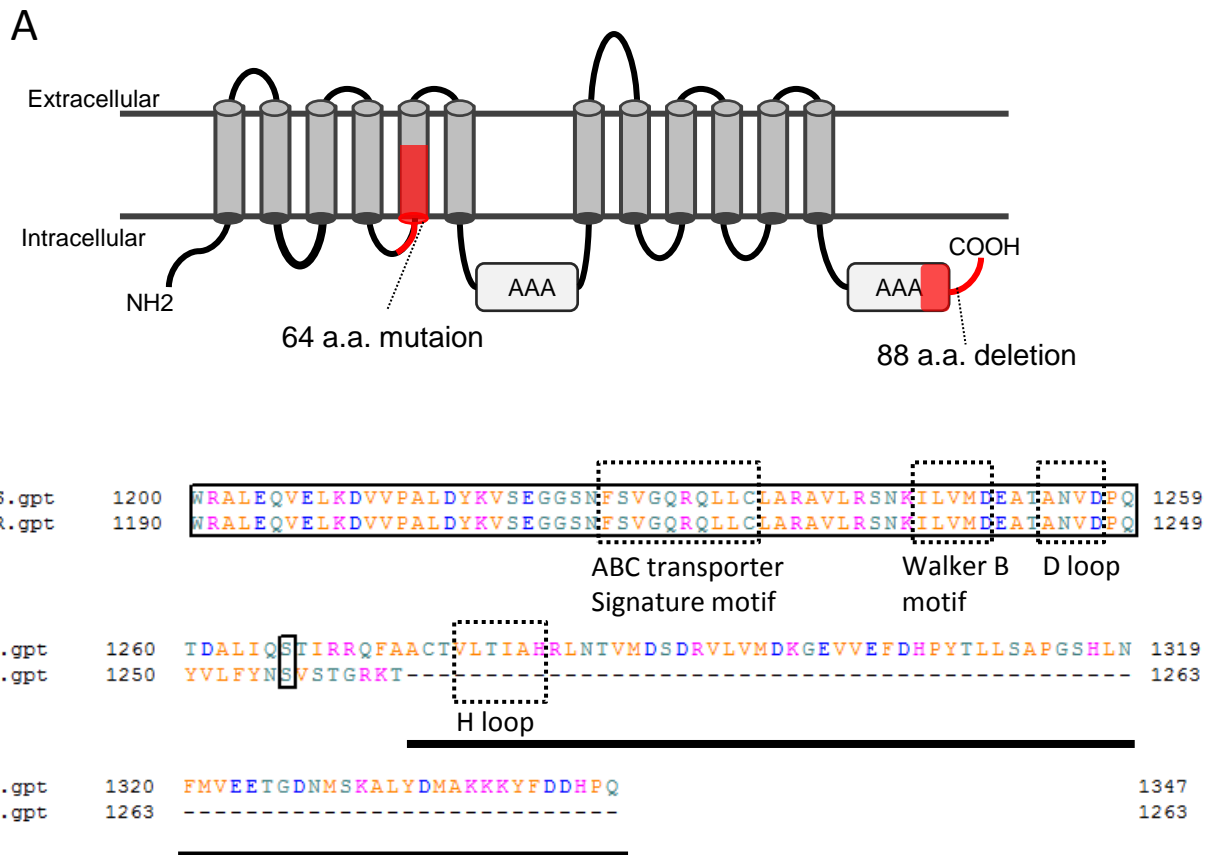


Fig. 20. Schematic diagram of PxABCC2_R mutation sites.

Two mutation sites found in PxABCC2_R are indicated as red-colored parts (A). Deleted amino acids found in the C terminal region of the 2nd AAA domain of PxABCC2_R is indicated by underlines and drawn with dashes (B).

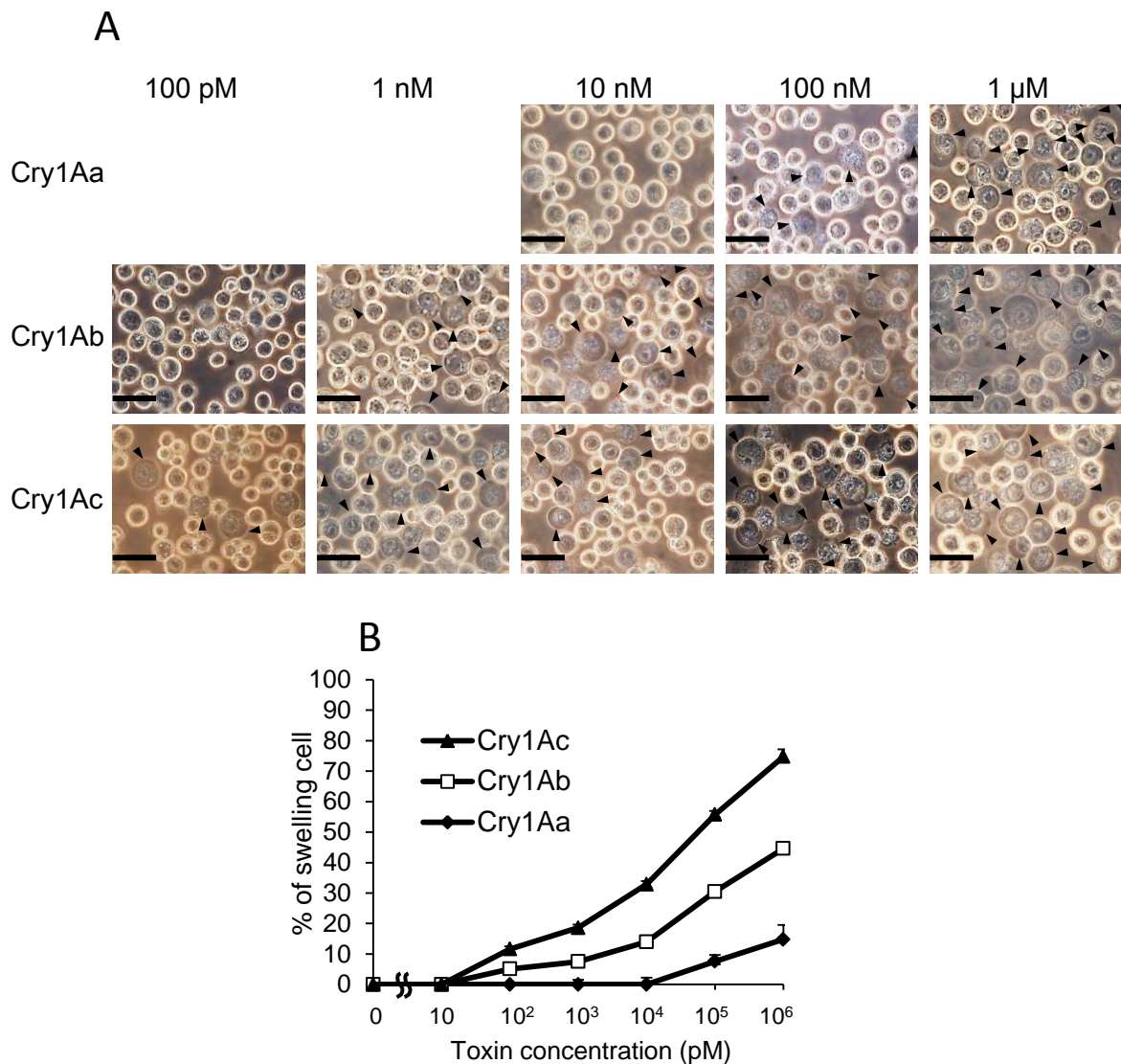


Fig. 21. Cry1A toxins' activity against BtR175-full or BtR175-TBR expressing cells. (A) Sf9 cells infected with AcNPV-PxABCC2_S were incubated 72h. The medium was replaced with PBS containing Cry1Aa, Ab or Ac, and the cells were observed 60 min after toxin administration. Lowly-refractile swollen cells (arrow heads) were observed under the phase contrast microscopy. Scale bars represent 20 μ M. (B) Reaction profile of PxABCC2_S-expressing cells. The experiment was conducted as described in Fig. 11A and B.

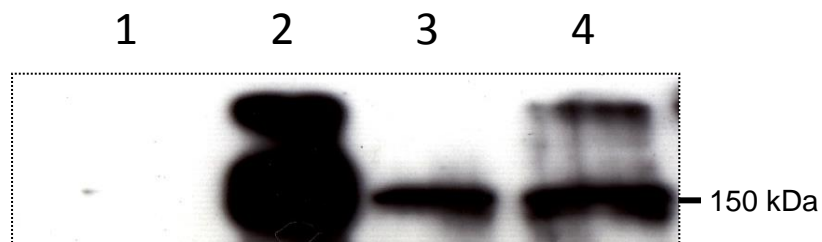


Fig. 22. Western blotting analysis of PxABCC2_S or PxABCC2_R on cell surface. The membrane fraction of EGFP- (lane1), BmABCC2_S- (lane 2), PxABCC2-S (lane 3) or PxABCC2_R (lane 4) expressing cells were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using rabbit anti BmABCC2 antibody.

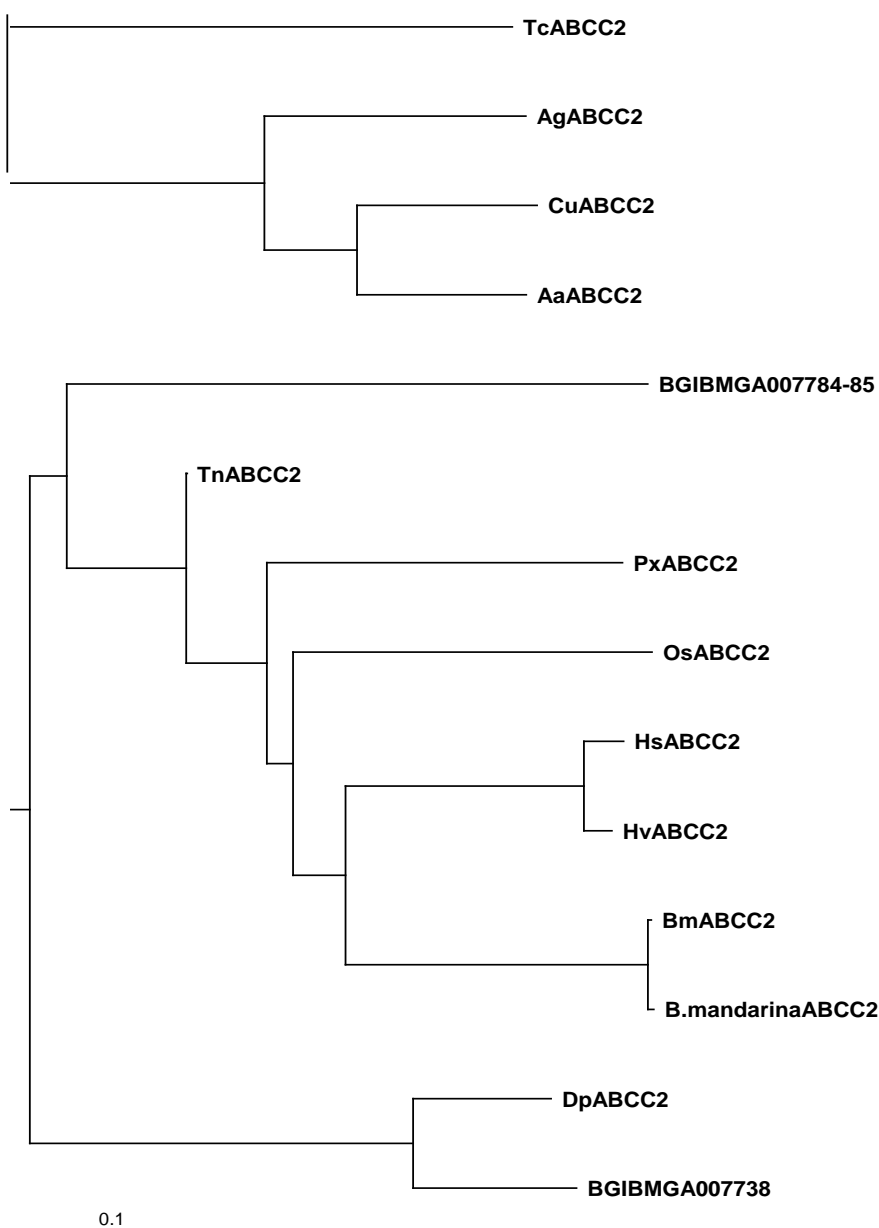


Fig. 23. Phylogenetic tree of ABC transporters

TcABCC2 is from *Tribolium castaneum* (XM_964756); AgABCC2 is from *Anopheles gambiae* (XM_312930); CuABCC2 is from *Culex quinquefasciatus* (XM_001843037); AaABCC2 is from *Aedes aegypti* (XM_001651648); BGIBMGA007784-85 is ABCC4 from *Bombyx mori* (XR_209861); TnABCC2 is from *Tricoplusia ni* (JN030493); PxABCC2 is from *Plutella xylostella* (JN030490); OsABCC2 is from *Ostrinia scapularis* (KC758896); HsABCC2 is from *Heliothis subflexa* (GQ332573); HvABCC2 is from *Heliothis virescens* strain YFO (GQ332571); BmABCC2 is from *Bombyx mori* strain Ringetsu (AB620075); *B. mandarina* ABCC2 is from *Bombyx mandarina* (JQ774504); DpABCC2 is from *Danaus plexippus* (EHJ725); BGIBMGA007738 is ABCC4 from *Bombyx mori* (XM_004928679). The phylogenetic tree was drawn by neighbor-joining method. Scale bar at bottom indicates evolutionary distance of 0.1 amino acid substitution per position.

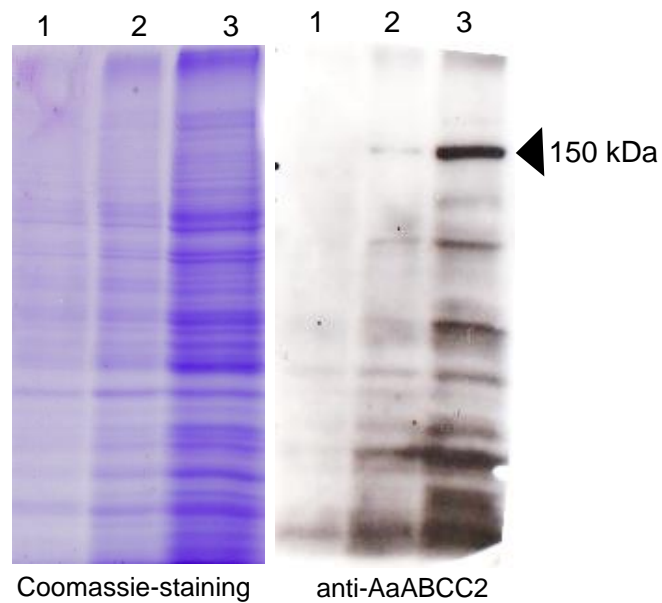


Fig. 24. Western blotting analysis of AaABCC2 expressing cells.

The membrane fraction of EGFP- (lane1), BmABCC2_S- (lane 2), or AaABCC2 (lane 3) - expressing cells were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using rabbit anti AaABCC2 antibody.

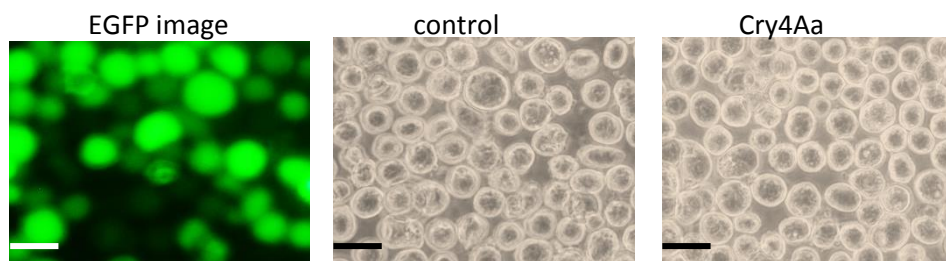


Fig. 25. Pictures of AaABCC2 expressing Sf9 cells 60 min after administration of Cry4Aa. Sf9 cells were infected with AcNPV-AaABCC2 and cultured for 72 h. The medium was replaced with PBS containing 1.6 μ M Cry4Aa, and the cells were observed 60 min after toxin administration. Scale bars represent 20 μ M.

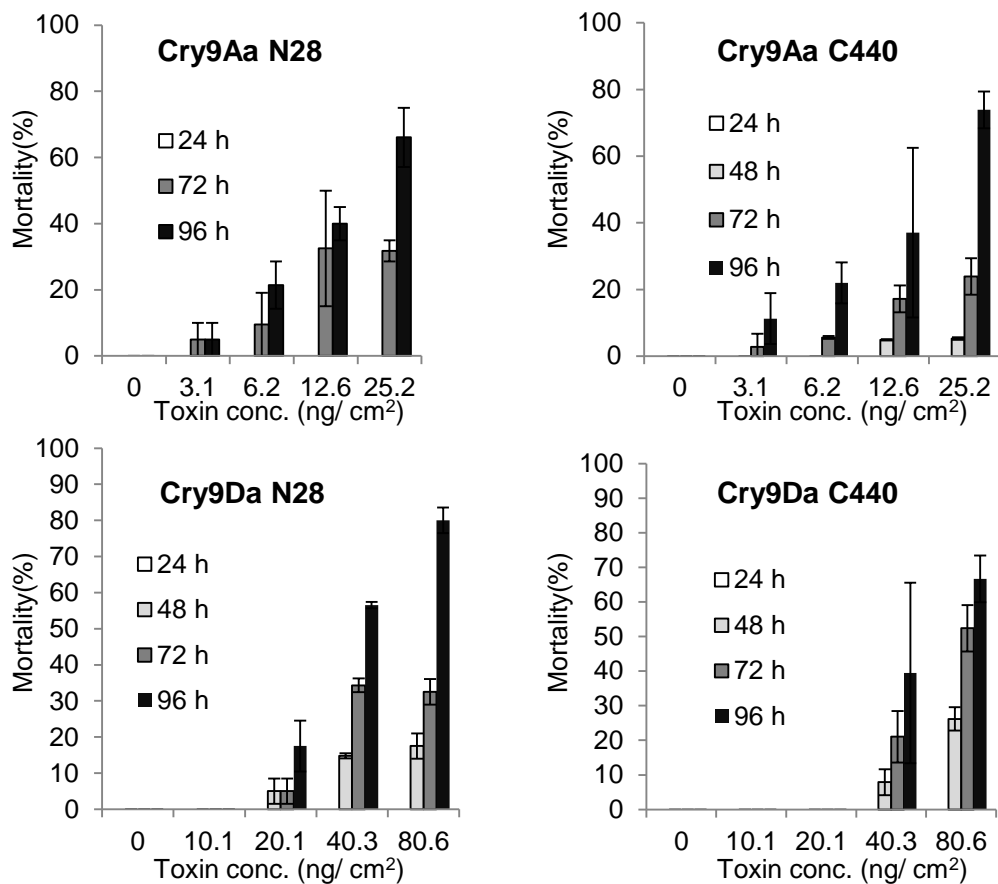


Fig. 26. Mortality of *B. mori* first instar larvae exposed to Cry9Aa or Cry9Da. First instar larvae of *B. mori* strain N28 or C440 were administrated with a serial dilution of Cry toxin. The dead larvae were counted at several 24 h. Error bar indicate the standard deviation of the mean.

Table 4. Median lethal concentration at day 4 of four Cry 9 toxins against *B. mori* Strain N28 and C440

Toxins	LC ₅₀ ^a	
	N28 (ng/ cm ²)	C440 (ng/ cm ²)
Cry9Aa	16.9 (13.6 - 22.7)	14.7 (11.4 - 20.9)
Cry9Da	68.4 (52.9 - 110.3)	60.9 (49.3 - 77.5)
Cry1Aa	73.4 (50.3 - 117.2)	40.9 (33.7 - 47.5)
Cry1Ab	71.9 (60.4 - 88.4)	>131.5 ^b

^aFirst instar larvae of *B. mori* strain N28 and C440 were used for bioassay. Mortality was recorded after 4 days exposure to a serial dilution of toxin. The 95 % confidence limit is indicated parenthesis.

^bNo mortality was observed at 131.5 ng/ cm²

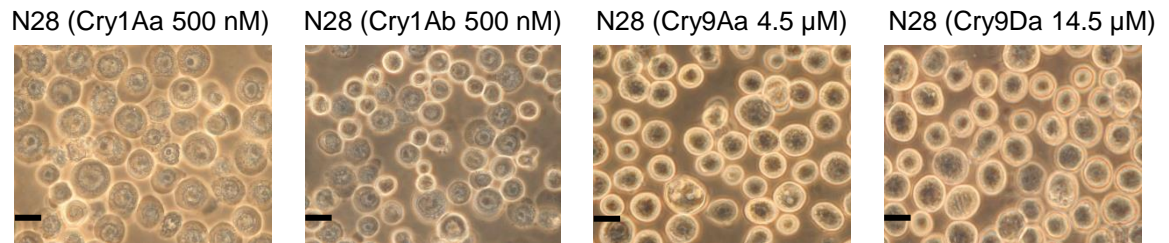


Fig.27. Toxin-induced morphological changes in BmABCC2N28-expressing cells. Sf9 cells were infected with AcNPV-BmABCC2N28 and incubated. After 72 h, the medium was replaced with PBS containing each Cry toxin. After 60 min incubation, cells were observed using phase-contrast microscopy; scale bars represent 10 μ m.

第3章 ABCC2 と BtR175 の協調作用についての解析

第1節 目的

冒頭や第2章で既に述べた現在有力だとされている作用機構仮説のいくつかは、殺虫作用の過程において消化管上皮細胞の膜上にある複数の受容体と結合する可能性を示唆している。Bravo らは、Cry 毒素が細胞毒性を発揮するのにはカドヘリン様タンパク質とアミノペプチダーゼ (APN) という異なる2種類の受容体に毒素の異なる部位で結合することが重要だと述べている (Bravo et al. 2004)。また Juat-Fentes らは、*H. virescens* において APN と同様の GPI アンカー型のタンパク質である alkaline phosphatase (ALP) がカドヘリン様タンパク質と結合してオリゴマー化した毒素が第二の受容体として結合することで Cry 毒素の細胞膜への挿入が可能になると主張している (Jurat-Fuentes JL & Adang MJ. 2006)。さらに近年、Pacheco らは Cry 毒素が APN と結合した後カドヘリン様タンパク質と結合し再び APN と結合するという”Ping pong binding model”を提唱している (Pacheco et al. 2009)。少なくとも、チョウ目昆虫の消化管の細胞上に数種類の結合タンパク質が存在するのは事実であり、第2章で調べたような単独で細胞上に発現する系は非現実的である。一方、第2章において、BmABCC2 が新たに Cry 毒素受容体として機能する分子であり、Sf9 細胞に与える感受性付与能力を比較する限りにおいては、従来チョウ目においてもっとも重要だと考えられてきたカドヘリン様タンパク質である BtR175 よりも能力の高い受容体であることが見えてきた。それどころか、BtR175 は単独では Cry1A 毒素に対してほとんど意味ある感受性を付与する能力を示さなかった。しかし、一方で、*H. virescens* (Gahan et al. 2001)、*Helicoverpa armigera* (Xu et al. 2005)、*Pectinophora gossypiella* (Morin et al. 2003)の抵抗性研究では、カドヘリン様タンパク質遺伝子の破壊が数百倍から数千倍レベルの抵抗性系統を生み出すことが示されてきた。すなわち、カドヘリン様タンパク質は、Cry1A 毒素の作用機構上で決して影響力の小さな

分子ではないことが示唆されてきた。よって、第 2 章で見た現象と抵抗性に関して示されてきた事柄との間には、現時点の知識では説明が困難な隔たりがあると言える。

そこで、単独でそれぞれが Cry 同素受容体として機能する BtR175 と BmABCC2 が、現在提唱されている作用機構仮説における APN1、ALP とカドヘリン様タンパク質の関係のように、連続する 1 連の作用上で働く分子である可能性を含め、2 分子が同一細胞上に同時に存在する場合の効果について 2 分子を発現させた昆虫培養細胞とアフリカツメガエル卵母細胞を用いて調べることにした。

第2節 材料と方法

3.2.1 昆虫培養細胞

第2章 2.2.1と同様の手法で培養した Sf9 細胞を用いた。

3.2.2 Cry 毒素の精製

Cry1Aa 毒素については第1章 2.2.2 で使用したものと同様の Cr1Aa 発現組換え型大腸菌を使用した。Cry1Ab, Cry1Ac 毒素については、第2章 第2節 2.4 で使用したものと同様の大腸菌株を使用した。Cry8Ca (AAA21119) 毒素の DNA 配列は、*B. thuringiensis* serovar *japonensis* strain BuiBui のプラスミド DNA を鋳型に 5'-gcaaGTCGACatgagtccaaataatcaaa-3' と 5'-cgtGCGGCCGCTtactcttcttctaacacga-3' のプライマーを用いて PCR 反応により増幅した。その cDNA 配列は、pGEX-4t-3 の *NotI* と *SalI* のサイトに組み込んだ。Cry3Bb1 (AAA22334) 毒素の DNA 配列は、Bt 製剤、Raven® (Ecogen, Inc., Langhorne, PA) 中に含まれるプラスミド DNA を鋳型に 5'-gcaaGTCGACatgaatccaaacaatcgaag-3' と 5'-cgtGCGGCCGCTtacaattgtactgggataa-3 のプライマーを用いて増幅した。Cry 毒素遺伝子を組み込んだ pGEX-4t-3 ベクターは、大腸菌株 BL21 を形質転換し第1章、1.2.2 と同様の方法で大腸菌を培養し、Cry 毒素の封入体を精製した。活性化は、第2章 2.2.4 と同様の方法を用いて行った。

3.2.2 カイコガ幼虫を用いたバイオアッセイ

様々な濃度に PBS で希釈した Cry 毒素は、原種用人工飼料 Silk Mate PM (Nihon Nosan CO. CTO.) に練り込んだ。第2章 2.2.2 で BmABCC2 の cDNA を取得するための PCR 反応の鋳型として使用したカイコ Rin の3齢幼虫に毒素を練りこんだ人工飼料を与え、2日後の半数致死濃度 (LC₅₀) をプロビット法を用いて算出した。

3.2.3 細胞傷害率の算出

2 種類の受容体を同一の Sf9 細胞に発現させるために、それぞれの AcNPV を 24 穴プレートに播種した細胞の同一ウェル中に添加し、72 時間、25°C でインキュベートした。以後の操作は、第 2 章 2.2.6 と同様の方法で行った。

3.2.4 SPR を用いた BtR175 と Cry 毒素の結合性状の解析

第 2 章 2.2.12 と同様の方法で行った。使用した Cry1Fa 及び Cry8Ca 毒素は、PBST に透析し、0.22 μm のフィルターユニット (Millex-LH, Millipore) を通過させたものを用いた。

3.2.5 T7 プロモーターへの cDNA の連結

アフリカツメガエル卵母細胞に BmABCC2 及び BtR175 を発現させるために、T7 プロモーター下流に各 cDNA を連結させた。BmABCC2 の cDNA は、第 2 章 2.2.2 に記載した pBAC4x-1-EGFP ベクターに BmABCC2 をクローニングしたプラスミドを鋳型に 5'-CGCtctagaATGAATAGTGATGGGAGAGC-3' と 5'-CGCtctagaTCATTTTTCTGTATTTCTACCAAGATG3' のプライマーを用いて PCR 反応によって増幅した cDNA 断片を pGEMHE ベクター (生理学研究所 久保義弘教授より分与; T7 プロモーター下流にアフリカツメガエルの β -グロビン遺伝子ノンドコード領域の配列が組み込まれており、アフリカツメガエル卵母細胞で多くの膜タンパク質発現実績がある) に *Xba*I サイトを利用して挿入して作製した。BtR175-TBR の cDNA は、第 2 章 2.2.2 に記載した pBAC4x-1-EGFP に BtR175-TBR の cDNA 配列をサブクローニングしたプラスミドを鋳型に 5'-cgcTCTAGAatgggagttgacgttcgaat-3' と 5'-gccAAGCTTttatttctggaattgatt-3' のプライマーを用いて PCR 反応によって増幅した

cDNA 断片を pGEMHE ベクターに *Xba*I と *Hind*III サイトを用いて挿入した。

3.2.6 cRNA の合成

3.2.4 で作製した各遺伝子の cDNA 配列を挿入した pGEMHE ベクターを取り込ませ形質転換させた大腸菌株 DH5 α を培養し、プラスミドを抽出した。抽出したプラスミドを鋳型に、T7 プロモーター領域に対して作製したプライマー 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' と SP6 領域の下流に対して作製したプライマー 5'-CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC-3' を用いて PCR 反応を行った。PCR 産物は、GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen) を用いて精製し、MilliQ 水に溶解した。精製した PCR 産物を鋳型に mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit (Ambion) のプロトコルに従いそれぞれの cRNA を合成し、吸光度計を用いて濃度を測定し、MilliQ 水で cRNA 濃度が 1 μ g/ μ l になるよう調整した。

3.2.7 電気生理学的解析

40.4 nl の cRNA を *Xenopus laevis* の卵母細胞にインジェクトし、MBS(Ca²⁺) 中で 72 時間 20°C でインキュベートした。毒素によって形成される Pore に由来する卵母細胞内への陽イオンの流入の結果起こる電流値の変化は、二本刺膜電位固定法用のアンプ OC725C (Warnar Instrument) とデータ取得、解析用ソフトウェア pClamp10 (Axon Instrument) を用いて記録した。電極は、芯入りガラスキャピラリー GC150TF-10 (HARVARD APPARATUS) を用い、電極ホルダー (Warnar) の約 3 分の 1 が 3M KCl で満たされるように電極中に 3 M KCl を注入した。測定中の卵母細胞チャンバーは、Standard Ringer solution (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 1.8 mM CaCl₂, pH7.4) で満たした。

3.2.8 ウェスタンブロッティング

cRNA をインジェクト後 72 時間、20℃でインキュベートした卵母細胞それぞれ 5 つを 1% n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) /MBS (+Ca²⁺) に Protein inhibitor (Roche)を添加した溶液を各 200 μ l 添加し、ピペッティングにより卵母細胞を破壊、懸濁した。ローターを用いて、4℃で 60 分間振盪した後、16,000 rpm、4℃、10 分の遠心分離操作を行い、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。SDS-PAGE サンプルバッファーを添加し、95℃で 5 分間保温し、タンパク質を変性させたものを SDS-PAGE のサンプルとした。SDS-PAGE 以後の操作は、第 2 章 2.2.9 と同様の操作を行った。APN1 のウェスタンブロッティングには、1 次抗体として抗 APN1-7 (40 - 317 a.a.に対する血清)及び、抗 APN1-314(190 - 987a.a 血清)を用い、2 次抗体には、horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG を用いた。

3.2.9 APN1 発現 Sf9 細胞の免疫染色

Sf9 細胞に AcNPV-APN1 を感染後 72 時間の細胞を 4% PFA/ PBS を用いて固定した。以降の操作は、第 2 章 2.2.10 と同様の手法で行い、3.2.7 に記載した APN1-7 及び、APN1-314 を 1 次抗体として用いた。2 次抗体には、Alexa Fluor® 555 Conjugate 抗マウス抗体を用いた。

3.2.10 受容体発現アフリカツメガエル卵母細胞の免疫染色

cRNA をインジェクト後 72 時間、20℃でインキュベートした卵母細胞を凍結組織切片作製用包埋剤 ティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド (サクラファインテック) で満たしたパラフィルムで作製した直径 1.5cm の包埋皿に沈め、-80℃フリーザー中で速やかに凍結させた。凍結させた組織ブロックよりクライオスタット (サクラファインテック) を用いて厚さ 12 μ m の薄切切片を作製し、MAS-GP type A Micro slide glass

(Matsunami) に伸展させた。スライドグラス上に伸展させた組織切片は、4% PFA/ PBS と室温、10 分間反応させることにより固定の操作を行い、PBS で 2 回洗った。その後の操作は、第 2 章 2.2.10 と同様の方法で行った。

3.2.10 毒素結合実験

cRNA をインジェクト後 72 時間、20℃でインキュベートした卵母細胞は、100 μ M Cry1Aa 毒素を含む MBS (+Ca²⁺) に浸し、60 分間 20℃でローテーターで振盪しながら反応させた。その後、MBS (+Ca²⁺) で 3 回洗い、1% DDM を含む MPB (+Ca²⁺) 200 μ l 中に移し、ピペッティングにより卵母細胞を破碎し、ローテーターで振盪しながら 60 分間 4℃でインキュベートした。28,933 g で 4℃ 10 分間の遠心操作を行い上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、2×サンプルバッファーを加え、オリゴマー化した毒素を見る目的では 50℃で、また通常の観察を目的とする場合は 95℃で 5 分加熱し、SDS-PAGE (10 %ポリアクリルアミドゲル) により分離した。1 次抗体に抗 Cry1Aa 毒素抗体、2 次抗体に抗ウサギヤギ抗体を用いて第 2 章 2.2.9 と同様の操作でウェスタンブロットティングを行った。

第3節 結果と考察

3.3.1 BtR175-TBR と BmABCC2_S の共発現細胞にみられる Cry1A 毒素に対する高い感受性

単独でそれぞれが Cry 毒素受容体として機能する BtR175 と BmABCC2 が、現在提唱されている作用機構仮説における APN1、ALP とカドヘリン様タンパク質の関係のように、連続する1連の作用上で働く分子である可能性や2分子が協調的に働く可能性について調べることにした。2種類の AcNPV を共感染させることで、1つの細胞に2種類の受容体 BtR175 及び BmABCC2_S を発現させた Sf9 細胞を作り、3種類の Cry1A 毒素に対する感受性を評価した。その結果、3種類の Cry1A 毒素に対してそれぞれ 10 pM 以上添加した際に膨潤した細胞が観察された (Fig. 28A)。3種類すべての Cry1A 毒素に対して、BmABCC2_S だけ (Fig. 11A) もしくは BtR175 だけ (Fig. 18A) を発現させた際よりも両者を発現した細胞は高い感受性を示した。すなわち、細胞が膨張を開始する最も低い濃度を比較すると、Cry1Aa の場合は、BmABCC2_S だけを発現させた場合よりも両者を発現した細胞の感受性は 10 倍上昇し、BtR175 だけを発現させた場合よりも感受性は 15000 倍上昇した。また、同様の比較では、Cry1Ab の場合は、1000 倍と 15000 倍、Cry1Ac の場合は 100 倍と 45000 倍であった。これらのことは BtR175 と BmABCC2 は細胞上で協調的に働き感受性を高め合う関係にあることを示唆している。そこで次に実際に、生物統計学的手法を適用し、本研究で観察された現象が協調作用と呼べる現象であるのかを検証した。Fernández-Luna らが Cry4Ba and Cry11Aa と Cyt1Aa の間にみられる相乗作用を示すのに用いたフィッシャーの正確確率検定 (Fernández-Luna et al. 2010) を使用して、BmABCC2 と BtR175 の間に見られた協調作用が確かに相乗的な効果によるものであるかを確かめた。その結果、3種類の毒素それぞれにおいて 100 pM と 1 nM の2点において協調作用が起こるという仮説が棄却されない結果が得られた (Table

5)。この結果は、*H. virescens* におけるカドヘリン様タンパク質と ABCC2 の両方の機能を欠損した抵抗性系統は Cry1Ac に対して感受性系統である JEN 系統よりも少なくとも 3000 倍高い抵抗性を示し(Gahan et al. 2010)、その抵抗性レベルがカドヘリンのみを欠損した YFO の 40 倍、そして ABCC2 のみを欠損した YEE の約 4 倍高い (Gahan et al. 2010) ことと見かけ上よく似た現象である。一方、BtR175-TBR と BmABCC2_R を共発現させた Sf9 細胞についても細胞毒性を評価した。その結果、Cry1Aa については BtR175-TBR と BmABCC2_S とを共発現させた際とほぼ同様に 10 pM 以上の毒素を添加した際に反応が見られた (Fig. 28B)。Cry1Ab については、100 nM の毒素を添加した際には 23 % の細胞が膨潤していることが確認できたが、10 nM においては膨潤した細胞は観察できず (Fig. 28B)、BtR175-TBR だけを発現させた際 (Fig. 18A) と同程度の感受性であった。Cry1Ac については 100 nM 添加した際にも反応している細胞は 1 つも観察されず (Fig. 28B)、これに関しても BtR175-TBR だけを発現させた際 (Fig. 18A) と同程度の感受性であることが伺えた。これら BtR175 と BmABCC2 の共発現細胞の結果から見てきた 2 分子の協調的な働きが、BtR175 と BmABCC2 の間だけに起こるものであるかについて考察するため、現在提唱されている作用仮説において BtR175 とひとつながりの作用の過程で働くと考えられている (Pacheco et al. 2009)。受容体であると報告のある APN1 の組換え型 AcNPV を作出し、BmABCC2_S 分子との協調的作用が観察されるか否かを評価した。まず、作出した AcNPV-APN1 を感染させ、正しい分子量で Sf9 細胞膜上に目的の分子が発現するかどうかを APN1 血清による免疫染色およびウエスタンブロッティングによる解析を行った。2 種類の APN1 のアミノ酸配列の異なる箇所を抗原とした APN1 血清、APN1-7 (40 - 317 a.a.に対する血清)及び、抗 APN1-314(190 - 987a.a 血清)を用いた免疫染色では、発現マーカーである EGFP が発現している細胞の輪郭が浮き立つように染色され、APN1 が細胞膜上で発現していることが確認できた (Fig. 29A)。また、同 APN1 血清を用いたウエスタンブロッティングの結果からも APN1

が 120kDa の理論値通りの質量を持った形で Sf9 細胞に発現していることが示された (Fig. 29B)。しかしながら、APN1 発現細胞に Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac をそれぞれ、3 μ M、600 nM、1.6 μ M 添加した後 60 分後の観察を行ったところ 3 種類全ての毒素において膨潤した細胞は 1 つも観察されなかった (data not shown)。また、APN1 と BmABCC2_S の共発現細胞の 3 種類の Cry1A 毒素に対する感受性レベルは、BmABCC2_S 単独発現細胞と同程度であり、BtR175 と BmABCC2 の共発現細胞に見られた感受性の協調的増大は観察されなかった (Fig. 28C)。Luo らは *M. sexta* の APN1 を培養細胞に発現させ、APN1 が正しい分子量で、本来あるべき酵素活性を持った分子として培養細胞膜表面上に発現していることを確かめたにも関わらず、Cry1C に対する感受性を示さなかったことを報告し、その原因として、実際の腸管と糖鎖などの修飾が異なるためではないかと主張している (Luo et al. 1999)。糖鎖などの修飾を含めて APN1 が本来の形で Sf9 膜上に発現していることを示すことは困難なので、APN1 に BmABCC2 と協調作用する機能がないことを完全に証明することは現時点では不可能である。しかし、現在までにリンケージマッピングなどの手法で APN1 が抵抗性の原因であることが確かめられた例はまだない。このこともまた APN がカドヘリン様タンパク質や ABCC2 と協調的に働く分子ではないことを示唆するのかもしれない。

3.3.2 BmABCC2 と BtR175 の協調作用の Cry 毒素の活性発現における意味

BtR175 と BmABCC2 の受容体としての機能が異なる Cry 毒素についても当てはまることであるか否かを検討した。*B. mori* に対して活性を持つ Cry1Fa と、甲虫目に対する活性はあるが *B. mori* に対して活性を持たないと報告されている Cry8Ca、Cry3Bb を用いて、BtR175-TBR 単独発現細胞、BmABCC2_S 単独発現細胞、あるいはこれらの共発現細胞に対する活性を調べた。BtR175-TBR 発現細胞については、これら 3 種類の毒素を 300 nM 添加しても膨潤している細胞が観察されなかった (Fig. 30B)。*H. virescence*

のカドヘリン様タンパク質を *Drosophila* の S2 細胞に発現させ Cry1A 毒素と Cry1Fa 毒素の感受性を調べた Jurat-Fuentes らもカドヘリン様タンパク質発細胞が、Cry1Fa 毒素に対する感受性は獲得できなかったことを報告している (Jurat-Fuentes et al. 2006)、本研究と同様、Cry1Fa 毒素に対するカドヘリン様タンパク質の受容体としての役割は低いことを示唆している。Cry1Fa と Cry8Ca について大腸菌発現型 BtR175 との結合親和性を Biacore を用いて解析したところ、Cry1A 毒素と比較して極めて低い親和性しか持たないことが明らかとなり (Fig. 31)、これが BtR175-TBR 単独発現細胞に感受性が見られなかった現象の一因であると考えられた。

次に、BmABCC2_S 発現細胞に対して各毒素を 10 nM で作用させたところ、Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Fa 毒素についてはそれぞれ 72%、14.9%、54.9%、40.1%の細胞が膨潤したのに対し、Cry8Ca ではウイルス未感染の細胞である対照区の 1.7%と同レベルの 3%未満の膨潤した細胞しか観察されず、Cry3Bb については膨潤した細胞は観察されなかった (Fig. 30C)。Cry8Ca、Cry3Bb について毒素濃度を上げて試験したところ、Cry8Ca については 100 nM で 25%の細胞に膨潤が見られた (Fig.30F)。しかし、Cry3Bb については、500 nM でも膨潤している細胞は観察されなかった (data not shown)。

3種の Cry1A 毒素に対して最も高い感受性を示した BtR175-TBR と BmABCC2_S を共発現した細胞について 10 nM で Cry1Fa、Cry8Ca、Cry3Bb に対する感受性を評価したところ、*B. mori* 幼虫に対して活性があった Cry1Fa については 60%以上の割合で膨潤した細胞が観察され、高い感受性が見られた (Fig. 30D)。一方、*B. mori* にほとんど活性のない Cry8Ca に対しては膨潤細胞の比率が 17%であり低い感受性が認められ (Fig. 30D and G)、また Cry3Bb 毒素に対しては膨潤細胞の比率が 0%であり感受性は認められなかった (Fig. 30D)。BmABCC2 単独発現の時と同様、Cry3Bb と Cry8Ca について、毒素濃度を上げて試験したところ、Cry3Bb は 500 nM 添加した際にも膨潤した細胞は観察されなかった (Fig. 30I)。一方、Cry8Ca は、100 nM の濃度で毒素を添加した際に、40%の割合

の細胞が膨潤している様子が観察された (Fig. 30H)。

各受容体を発現させた培養細胞の感受性とカイコガ幼虫の感受性の関係性を調べる目的で、実際にカイコガ幼虫の感受性試験を行った。トリプシンによって活性化した Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Fa、Cry8Ca、Cry3Bb 毒素を人工飼料中に練りこみ、カイコガ幼虫に供試した後、2 日後の死亡個体数を計測し、 LC_{50} を算出した。その結果、BmABCC2_S と BtR175 共発現細胞に対して高い活性を示した (Fig. 30D) カイコガに活性のあると報告されてきた Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Fa の LC_{50} 値は、それぞれ、0.45、0.26、1.5、1.1 $\mu\text{g/g diet}$ であった (Table 6)。また、既に述べたように、これらの毒素はいずれも Cry8Ca は先行研究により一般的な投与濃度においてはカイコガに対する活性が見られないことが報告されている (Ohba et al. 1992; Donovan et al. 1992)。しかし、本実験で Cry8Ca 2 $\mu\text{g/g diet}$ で投与して 2 日間観察したところ、死んだ個体は出現しなかったものの、顕著な摂食阻害が観察された (data not shown)。そこで、より高濃度の毒素による試験で個体死が観察されることを期待し、大量の Cry8Ca 毒素の前駆体を用意して、次にその毒素前駆体を用いて再度試験をおこなった。73 $\mu\text{g/g diet}$ の Cry8Ca 毒素前駆体を供試し、同様のバイオアッセイを行ったところ、2 日後には 30 匹中 5 匹の個体が死亡した (Table 6)。すなわち、これまで Cry8Ca がカイコガをはじめとするチョウ目昆虫に対して活性を持たないとされていた見解は間違いであることが明らかになった。また、この結果は Cry8Ca が BmABCC2_S と BtR175 共発現細胞に対して低いながらも細胞膨潤活性を示したことと矛盾がなかった。一方、BmABCC2_S と BtR175 の共発現細胞も感受性を示さなかった Cry3Bb 毒素に対して、カイコガ幼虫は 4 $\mu\text{g/g diet}$ でも感受性を示さず、Cry8Ca 同様、50 $\mu\text{g/g diet}$ という高濃度の前駆体 Cry3Bb を用いた再試験においても死亡個体どころか摂食阻害すら観察されなかった (Table 6)。したがって、Cry3Bb はこれまでの報告通りカイコガに対して活性を持たないことが確かめられた。また、BmABCC2_S と BtR175-TBR の共発現細胞が反応を示す Cry1Aa、Cry1Ab、

Cry1Ac、Cry1Fa、Cry8Ca、の各毒素の最も低い濃度はそれぞれ 10 pM、10 pM、10 pM、100 pM、10 nM であり、これらの Cry 毒素のカイコガ幼虫に対する殺虫活性と BmABCC2_S と BtR175-TBR の共発現細胞に対する活性には見かけ上緩いながらも相関関係が認められた(Fig. 30D and Table 6)。このことは、カイコガ個体の感受性に関しては、BtR175 と BmABCC2 の 2 分子が重要な決定因子であることを示唆しているのではないかと考えられた。また、第 2 章で行った Cry4 毒素については、適応範囲外であったが、BmABCC2 は、Cry1 毒素の範囲を超えて広く Cry 毒素の受容体として働き、宿主昆虫の Cry 毒素感受性を生み出す機構において重要な役割を担うことが推察された(Fig. 32)。しかしながら、カイコガ幼虫消化管を用いた *ex vivo* toxicity assay では 1 nM 以上の Cry1Ab 毒素に対して反応を示すことが報告されており (Ibiza-Palacios et al. 2008)、BtR175 と BmABCC2_S の共発現細胞で観察された感受性レベルは、少なくとも Cry1Ab 毒素についてはこの *ex vivo* での消化管細胞の感受性レベルより約 100 倍も高い。すなわち、今回培養細胞で観察した感受性はバキュロウイルス発現系に起因する BtR175 と BmABCC2_S の高い発現によってもたらされた結果であり、実際の消化管細胞の感受性をそのまま正しく表しているとは言い難い。したがって、今回 Sf9 細胞を用いた異所発現の系で試みた BtR175 と BmABCC2 の Cry 毒素の作用における重要性の評価の結果については、今後ますます検討を重ねる必要性が残されている。

3.3.3 BmABCC2 と BtR175 の 2 分子間でみられた協調作用の Cry 毒素孔形成過程に与える影響

ここまでの結果から、BmABCC2 と BtR175 の間には結果として Cry 毒素の活性を高める協調作用がみられることが分かった。しかしながら、その協調作用の実態や協調作用が発生するしくみについては未解明である。ところで、BmABCC2 と BtR175 を異所発現させた昆虫培養細胞 Sf9 を用いたバイオアッセイ (Fig. 28A) では、毒素添加から

60 分後といった比較的長い時間をかけて毒素によって傷害を受けた細胞が膨潤するという結果の差を見ている。したがって、この膨潤が第 1 章 第 1 節で述べた “Pore formation model” (Bravo et al. 2004) と “Signal transduction model” (Zhang et al. 2005; Zhang, et al. 2006) のいずれの結果起こった現象であるかは識別できない。すなわち、この時間内ならば両反応はともに起こりうる。また、2 つの作用機構経路が同時に働くことが協調作用を生む可能性もある。そこで、BmABCC2 と BtR175 の協調作用が Cry 毒素が細胞膜上に刺さり孔を形成する過程の効率を高めることに貢献しているか、すなわち “Pore formation model” の範囲で起きているのか否かを知るために、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて BmABCC2、BtR175、あるいはこれらの両者を発現させて電気生理学的手法で解析することにした。この実験手法により Cry 毒素によって形成される孔の形成に関する情報をより直接的に、しかも細胞において複数の事象が起こりにくい短時間のうちに評価することを目指した。

まず、作製した cRNA が正しく機能するかを確かめるために、BmABCC2 と BtR175 をそれぞれ別々の卵母細胞にインジェクトし、各 5 個ずつランダムに選んだ卵母細胞をサンプルとし、ウエスタンブロッティングを行った。また、カエルの個体差に由来する発現量のばらつきの大きさを見る目的で、サンプルの採取は、異なるカエル個体由来の卵母細胞を用いて 2 回行った。その結果、BmABCC2 及び BtR175-TBR の cRNA をインジェクトした卵母細胞において、それぞれ、150 kDa と 70 kDa の理論値通りのバンドが検出された (Fig. 33)。

そこで、2 本刺し膜電位固定法を用いて、毒素添加後 100 秒という短い時間に Cry 毒素によって形成される孔の数に由来する電流値、すなわち陽イオン流入に起因する電流値の経時的変化の記録を取ることにした。まず、BmABCC2 を単独で発現させた卵母細胞に対して、膜電位を -70 mV に保った状態で PBS を添加したところ記録を取った 100 秒間の間に電流（あるいは電流値の変化）は認められなかった (Fig. 34A)。一方、同様

の条件で膜電位を固定し、Cry1Aa または、Cry1Ab を添加した BmABCC2 発現卵母細胞においては、Cry 毒素が形成した孔を通して陽イオンが流入するため、経時的に電流値が増加し（細胞内に流れる電流はマイナス表示となる）、しかも添加した毒素濃度に依存して孔の数が増えたことを意味する電流値変化の傾きの増加が観察された (Fig. 34C and D)。このような電流の発生は、培養細胞を用いた実験で BmABCC2 が受容体として機能しないことが示唆された Cry9Aa の場合には、10.6 μ M の高濃度で添加した際でも観察されなかった (Fig. 34B)。したがって、Cry1Aa もしくは Cry1Ab の添加で発生した電流は、これらの Cry1A 毒素と BmABCC2 が相互作用し、Cry 毒素が卵母細胞膜に刺さることで形成された孔から陽イオンが流入することに由来していると考えられた。

次に、BtR175 を発現させた卵母細胞に Cry1Aa 毒素を添加後の電流値の記録を取った。Cry1Aa、Cry1Ab それぞれ 400 nM を添加後 100 秒間の電流値の変化を観察したが、BmABCC2 発現卵母細胞の際に観察された電流の発生はみられなかった (Fig. 35B and C)。さらに、Cry1Aa 添加後、電流値の記録をとる時間を 500 秒に延長したが、極微な電流値の変化しか見られなかった (Fig. 35D)。Nagamatsu らが行った BtR175 発現 Sf9 細胞を用いた Cry1A 毒素によって形成される孔からのイオンの流入に伴う電流値の変化をパッチクランプ法で解析した実験では、終濃度 330 nM の Cry1Aa 毒素添加後の測定において電流値の変化が記録されたことを報告している (Nagamatsu et al. 1999)。本研究では、2 本刺し膜固定法を用いていることからパッチクランプ法よりも測定の感度は高いことが予測されるにも関わらず、微量な電流値の変化しか認められなかった。ABCC2 発現卵母細胞に比べ BtR175 発現卵母細胞にはあまりに少ない電流しか発生しなかった理由が BtR175 が膜上に機能するのに十分な量が発現していないことに起因するのではないことを確かめる目的で BtR175 を発現させた卵母細胞の切片を免疫染色し、BtR175 が細胞膜上に発現しているかを確かめた。その結果、BtR175 は確かに細胞膜に発現していることが確認できた (Fig. 36)。すなわち、BtR175 の発現量が一般的に機能が確認

できるほどの十分な量であることが確認された。一方、BtR175 と BmABCC2 の卵母細胞細胞膜上の発現量を正しく論じることができないが、卵母細胞に注入した cRNA の量は BtR175 と BmABCC2 の間でほぼ同量であり、ウエスタンブロッティングで検出されるバンドの濃さにも大きな違いはなかった。すなわち、両者の発現量が著しく大きく違っていると考えるべき根拠は見つからない。また、ここで見られた現象は、第 2 章 2.3.3 でみた BmABCC2 よりも BtR175 の方が Sf9 細胞を膨潤させる能力が大きいという結果と矛盾がなかった。これらのことから、BmABCC2 は BtR175 よりも Cry 毒素が孔を形成するための足場としての機能がはるかに高いものと考えられた。

次に、卵母細胞を用いた Cry 毒素が作るイオンチャネル（イオンが通れる孔）の形成を直接的に評価できると考えられるこの実験系においても BmABCC2 と BtR175 の間に相乗作用が見られるかについて検討した。BmABCC2 と BtR175 を共発現させた卵母細胞に Cry1Aa 毒素を添加すると、BmABCC2 を単独で発現させた際には電流値の変化が観察されなかった 44 nM において、BmABCC2 を単独で発現させた卵母細胞に 160 nM の Cry1Aa 毒素を添加した際よりも大きな傾きの経時的電流値の変化がみられ (Fig. 37A and C)、2 分子を共発現させることにより、より短時間で多くの孔を形成することが分かった。また、Cry1Ab についても同様の実験を行い、BmABCC2 を単独で発現させた際には電流値の変化が認められなかった 35 nM の Cry1Ab 毒素が、BmABCC2 を単独で発現させた際の Cry1Ab 140 nM に匹敵する経時的電流値変化を生むこと確認でき (Fig. 37B and D)、Cry1Ab に対しても 2 分子共発現による Cry 毒素によって形成される孔の形成効率の上昇を確認した。また、2 分子それぞれの発現量を確認したところ、BmABCC2、BtR175 共に単独で発現させた場合と共発現した場合で、発現量に大きな差はみられないことが確認された (Fig. 38)。これらのことから、培養細胞で観察された BtR175 と BmABCC2 の 2 分子間にみられる Cry 毒素感受性を高める協調作用 (Fig 28 and 30) に関しては、少なくともその一部は、細胞膜に孔を形成する過程で発生すると考え

られた。しかしながら、培養細胞でみられた協調作用は、Cry1Aa、Cry1Ab それぞれについて BmABCC2 単独で発現させた場合と比較して、10 倍、1000 倍であったのに対し、卵母細胞を用いた実験では、それぞれの毒素に対して、4 倍レベルの孔形成率の増加のみであった。しがたって、培養細胞で細胞が膨潤するという現象でみた 2 分子の協調作用は、卵母細胞でみた孔形成の過程だけではなく、第 2 章の冒頭で述べたシグナルトランスダクションが動いておこる細胞死など、様々な現象が起こった総和として見ている可能性も考えられる。よって、今後は、培養細胞でみられた現象と卵母細胞でみられた現象のギャップを埋めるべく、細胞の膨潤という現象を引き起こす他の因子やその現象と深い関係にありそうなプログラム細胞死の経路などについても解析する必要があると考える。

BtR175 と BmABCC2 の共発現でみられた Cry 毒素による孔形成効率の上昇が、Ping pong binding model (Pacheco et al. 2009)で主張されている Cry 毒素のオリゴマー体の形成効率の増大を意味するかを検討することにした。ウエスタンブロッティングを用いてそれぞれの分子を発現させた卵母細胞上に結合、または刺さった Cry 毒素を検出した。その結果、多量体、単量体を区別せずに、また膜上の受容体に結合しているか細胞膜に刺さって状態にあるかについても区別せずに膜に結合した毒素の総結合量を 60 分後に見た場合、BmABCC2 単独で発現させた卵母細胞への毒素の結合量は 2 分子を共発現させた卵母細胞の膜上への結合量よりも著しく少なかった (Fig. 39)。また、これら細胞間の毒素結合量の関係は、Cry 毒素によってそれら細胞に形成される孔に由来すると考えられる電流値、および毒素濃度依存的に得られる電流値の経時的変化の傾き(すなわち孔のでき易さ)の違いの関係とおおいた比例関係にあるように見受けられた。一方、BtR175 発現卵母細胞においても BmABCC2 の 4 分の 1 程度の強さのシグナル強度をもつ Cry 毒素が細胞膜上から検出された(Fig. 39)。BtR175 発現卵母細胞からは、電流は長時間毒素を反応させた後でさえ極微量しか検出されず(Fig. 35D)、その量はウエスタンブロッ

ティングのバンド量 (Fig. 39B)の「4 分の 1」から期待されるより明らかに小さなものであった。このことは、BtR175 発現卵母細胞上で検出された Cry 毒素は、細胞膜に刺さったのではなく BtR175 分子上に不可逆的結合状態にあることを示唆する。一方、Cry 毒素多量体が検出できる条件におけるウエスタンブロッティングの結果では、BtR175 と BmABCC2 それぞれを単独で発現させた卵母細胞からは同程度の 3 量体と 4 量体が検出された (Fig. 39C)。すなわち、BtR175 発現卵母細胞への総結合量 (Fig. 39B)が少ないことから考えると、BtR175 の方が BmABCC2 よりもオリゴマー形成誘導能が高いことを意味していると思われた。しかし、ABCC2 は単独でもオリゴマー化を誘導できることも確かである。一方、総結合毒素における 3 量体と 4 量体の比率においては BtR175 と BmABCC2 間で多少の違いが認められた。すなわち、BtR175 発現細胞からはより 3 量体が多く、BmABCC2 発現細胞からは 4 量体の方が多く検出された。しかしこの違いの意味に関しては不明である。一方、BtR175 と BmABCC2 を共発現させた卵母細胞ではオリゴマーは明らかにより大量に誘導されたが、結合した毒素の総量 (Fig. 39B) に対するオリゴマー体の割合は BmABCC2 だけを発現させた細胞とほぼ同様であった (Fig. 39C)。しかし、BtR175 と BmABCC2 間で認められたこのオリゴマーの比率の違いの意味は不明である。既に述べた Ping pong binding model (Pacheco et al. 2009) 仮説では、BtR175 は Cry1A 毒素のオリゴマー化を誘導し、孔の前駆体を形成する役割を持つと説明されてきた。また、BtR175 と BmABCC2 を共発現する細胞では BmABCC2 単独発現細胞よりオリゴマーを含む総結合毒素量が 4、5 倍程度多かった。この毒素結合量の違いはこれら細胞間の孔に由来すると考えられる電流値、および毒素濃度依存的に得られる電流値の経時的変化の傾き (すなわち孔のでき易さ) とよく一致した。これらのことは、BtR175 が Cry1A 毒素のオリゴマー化を誘導し、孔の前駆体を形成する役割を介して協調作用に関与する可能性を示唆しているかもしれない。

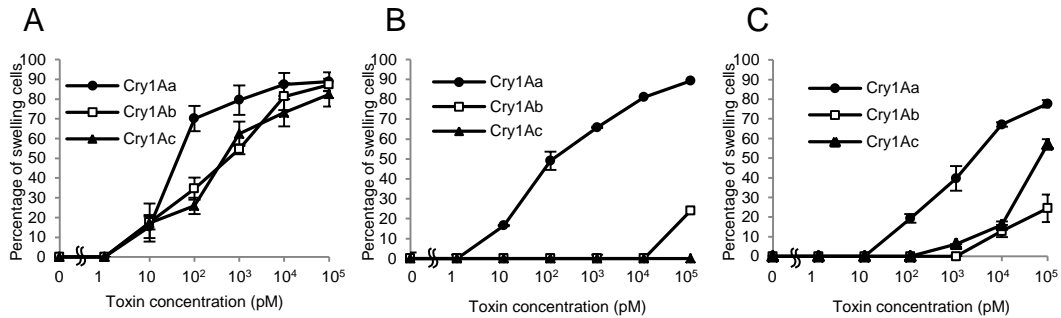


Fig. 28. BmABCC2 and BtR175-TBR double-expressing cells show increased susceptibility to Cry1A toxins in a synergistic manner. Reaction profile of BmABCC2_S and BtR175-TBR double-expressing cells (A), BmABCC2_R and BtR175-TBR double-expressing cells (B), and BmABCC2_S and BmAPN1 double-expressing cells (C) treated with Cry1A toxins. Cells were observed 60 min after administration and the percentage of swollen cells of total EGFP expressing cells was calculated. The experiments were performed in triplicate and error bars represent standard error of the mean, although some of them are too small to observe on the scale used.

Table5. Single concentration statistic test with Fisher's exact test for evaluating synergism among BmABCC2 and BtR175

			Number of cells ^a			Swelling cell (%)		
Receptor	toxin	toxin conc.(pM)	total cell	S.D. ^b	swelling cell	S.D.	Expected ^c	observed
BmABCC2_S	Cry1Aa	100	191.7	24.2	19.1	11.5	NA ^d	10
		1000	189.6	19.7	124.4	27.2	NA	65.6
BtR175-TBR	Cry1Aa	100	106.1	48.7	0	0	NA	0
		1000	140.9	41.7	0	0	NA	0
BmABCC2_S+ BtR175-TBR	Cry1Aa	100	106.2	28.0	70.1	10.3	10	66
		1000	104.4	48.7	78.8	8.3	65.6	75.7
BmABCC2_S	Cry1Ab	100	180.3	13.4	0	0	NA	0
		1000	172.9	26.7	0.71	1.5	NA	0.4
BtR175-TBR	Cry1Ab	100	128.5	41.1	0	0	NA	0
		1000	115.3	51.2	0	0	NA	0
BmABCC2_S+ BtR175-TBR	Cry1Ab	100	116.3	45.5	37.1	10.8	0	31.9
		1000	88.8	48.5	46.7	30.1	0.4	52.5
BmABCC2_S	Cry1Ac	100	184.7	29.1	0	0	NA	0
		1000	191.5	25.0	15.8	3.7	NA	8.2
BtR175-TBR	Cry1Ac	100	109.1	32.8	0	0	NA	0
		1000	136.3	14.0	0	0	NA	0
BmABCC2_S+ BtR175-TBR	Cry1Ac	100	108.2	32.2	27.2	7.0	0	25.2
		1000	102.2	18.9	61.0	9.1	8.2	59.8

^aNumber of cells were the average of five sets of observation, and each treatment was replicated three times. All observed % of cell swelling are significantly greater than expected % of swelling cells (Fisher's exact test, $P < 0.001$ for each comparison).

^bS.E. represent standard error.

^cExpected value was calculated according to the procedure described by Fernandez-Luna *et al.*(2010)(34)

^dNot applicable; Expected % of swelling cell was not calculated for single receptor expressing cells.

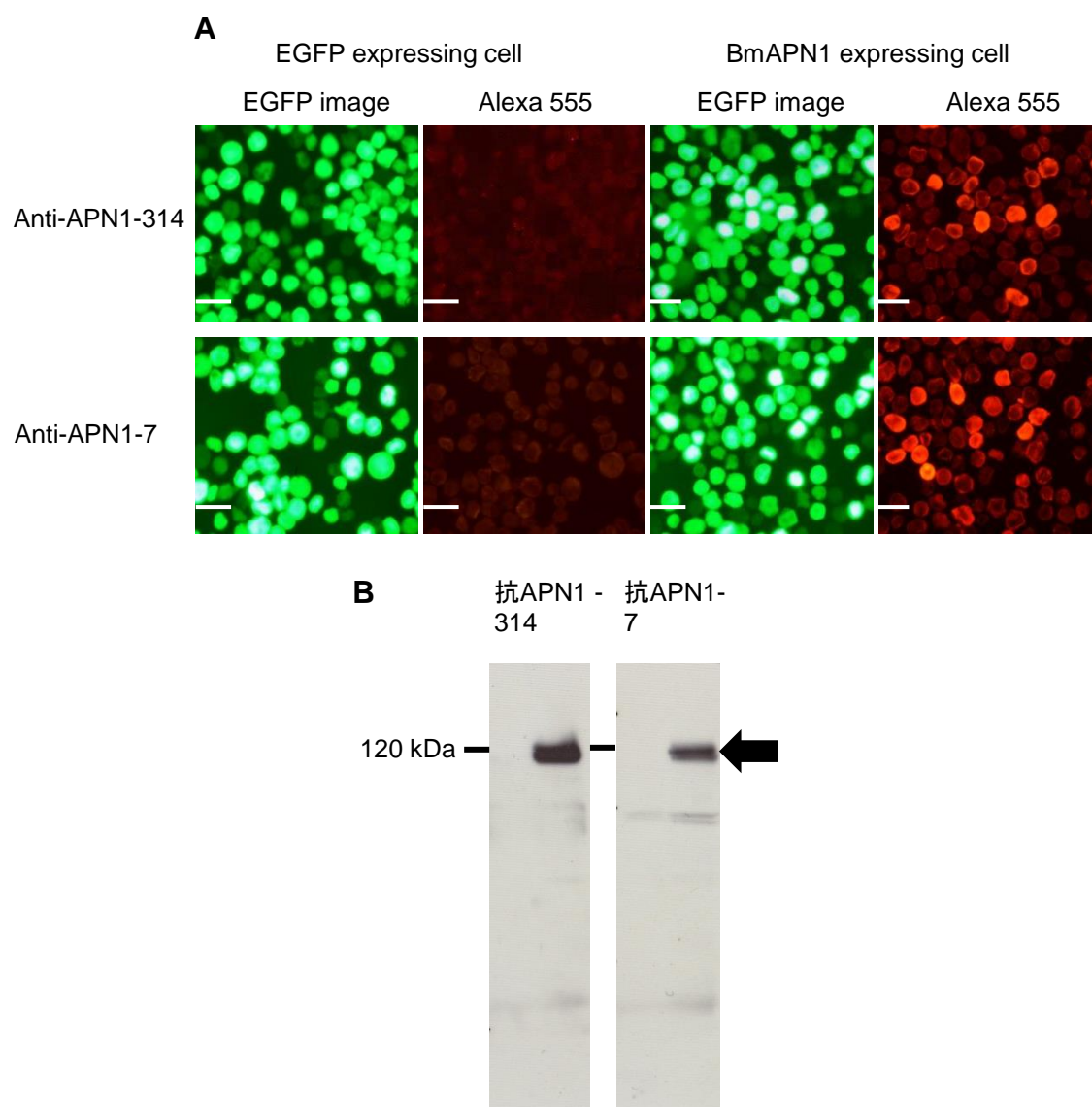


Fig.29. APN1 is expressed correctly on the Sf9 cell surface. (A) Detection of APN1 on the Sf9 surface by immunostaining. Sf9 cells infected with AcNPV-EGFP or AcNPV-APN1 were incubated 72 h. The cells were fixed and stained with anti-APN1-317 or anti-APN-7. Followed by Alexa-594 conjugated anti-mouse IgG and observed under a fluorescent microscope. Scale bars represent 20 μ m. (B) EGFP or APN1 expressing cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-APN1-317 or anti-APN1-7 serum. Arrows indicate theoretical molecular mass of APN1.

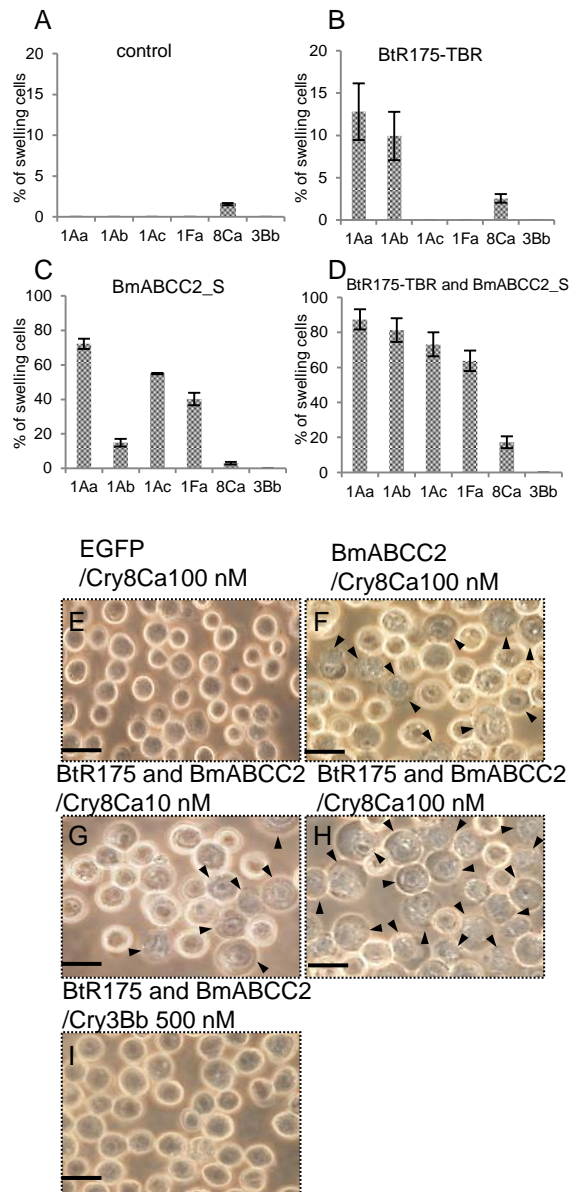


Fig. 30. Synergistic effect between BmABCC2 and Btr175 to a phylogenetically wide range of Cry toxins.

(A-D) The percentage of swollen cells was determined as described in Figure 28 60 min after administration of Cry toxins to control (infected with EGFP) Sf9 cells (A), cells expressing BtR175-TBR (B), cells expressing BmABCC2_S (C), or cells co-expressing BtR175 and BmABCC2_S (D). Toxin concentrations were 300 nM in (A) and (B) and 10 nM in (C) and (D). Data shown are the means calculated from three independent experiments. Bars represent the corresponding standard error. (E-I) Susceptibility of EGFP expressing (E), BmABCC2_S expressing (F), and BtR175-TBR and BmABCC2_S co-expressing cells (G-I) to Cry8Ca or Cry3Bb toxins. Cells (G-I) were treated with 10 nM Cry8Ca (G), 100 nM Cry8Ca (E, F, H), or 500 nM Cry3Bb (I) toxins and observed by microscopy after 60 min. Lowly-refractile swollen cells are indicated by arrow heads. Scale bars represent 20 μ m.

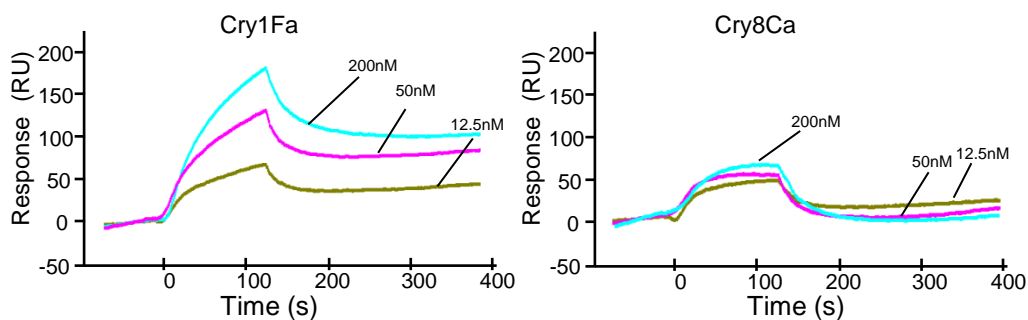


Fig. 31. Biacore sensorgrams for the binding of Cry1Fa and Cry8Ca toxins to the recombinant BtR175-TBR. Cry1Fa and Cry8Ca were applied at various concentrations to the same BtR175-TBR-immobilized chip as used in the experiment in Fig 18B-D and the kinetics of the association and dissociation reactions were determined using a Biacore. RU, SPR response unit.

Table 6. Apparent correlation between the susceptibilities of *Bombyx mori* third instar larvae and BtR175-TBR and BmABCC2_S double-expressing Sf9 cells to Cry toxins

Cry toxin	Toxicity against <i>Bombyx mori</i> 3rd instar larvae			The lowest active concentration against BtR175-TBR and BmABCC2_S double expressing Sf9 cells
	LC ₅₀ (µg/g diet) ^a	95% FL	Slope ± SE	
Cry1Aa	0.45	0.37 - 0.54	3.8 ± 0.34	10 pM
Cry1Ab	0.26	0.20 - 0.33	2.6 ± 0.45	10 pM
Cry1Ac	1.5	0.78 - 2.3	1.1 ± 1.4	10 pM
Cry1Fa	1.1	0.89 - 1.3	3.8 ± 0.34	100 pM
Cry8Ca	>73 ^b	-	-	10 nM
Cry3Bb	>50 ^c	-	-	>500 nM

^a30 of 3rd instar larvae were fed on artificial food contaminated with each trypsin activated Cry toxin and the number of surviving larvae were recorded after 2 days.

^b Larvae were administrated with protoxin of Cry8Ca and five dead larvae were observed at the concentration of 73 µg /g diet within 2 days after administration.

^c Larvae were administrated with protoxin of Cry3Bb.

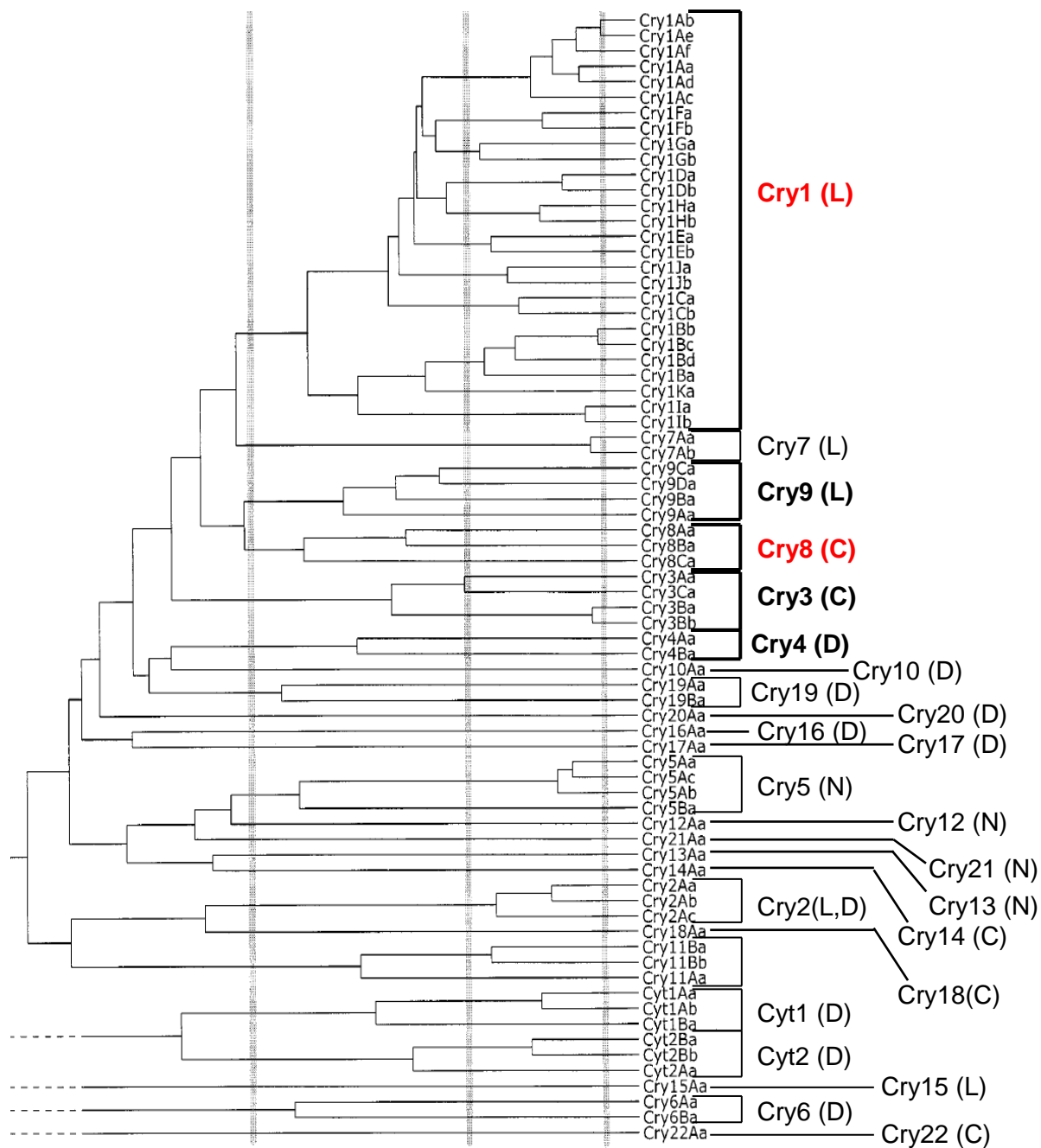


Fig. 32. Phylogenetic tree of Cry and Cyt toxins. Phylogenetic tree written by Crickmore et al. (1998) was modified. Bold type represent Cry toxin used in this study. Red-letters represent Cry toxins which were indicated in this study to use BmABCC2 as a receptor. Letter in parenthesis indicate insecticidal spectrum of each toxin as follows. L, lepidopteran; C, coleopteran; D, dipteran; N, nematoda.

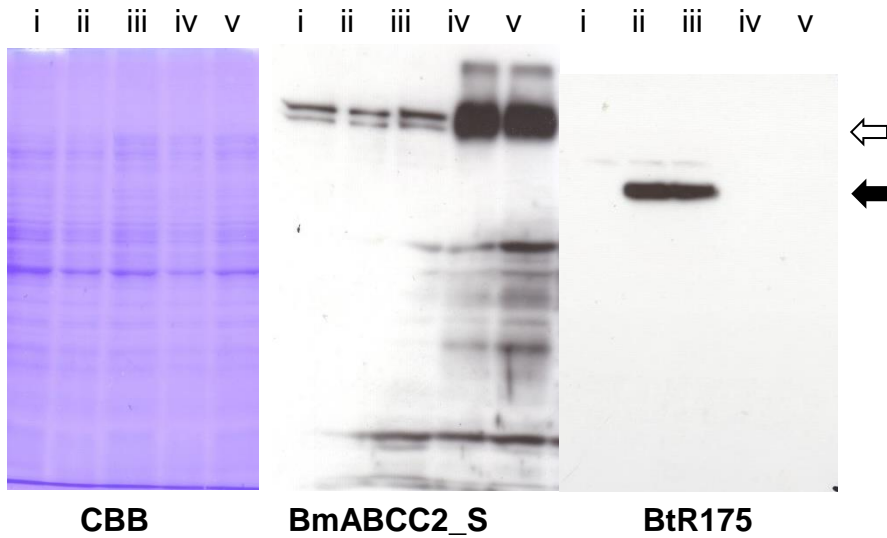


Fig. 33. Western blotting analysis of BtR175 or BmABCC2_S expressing oocytes. Oocytes injected with Water (i), cRNA of BtR175 (ii and iii), or cRNA of BmABCC2_S (iv and v), were homogenized and solubilized with DDM. The solubilized lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-BmABCC2_S or -BtR175 serum. Closed arrow indicates theoretical molecular mass of BtR175, and open arrow indicates theoretical molecular mass of BmABCC2_S.

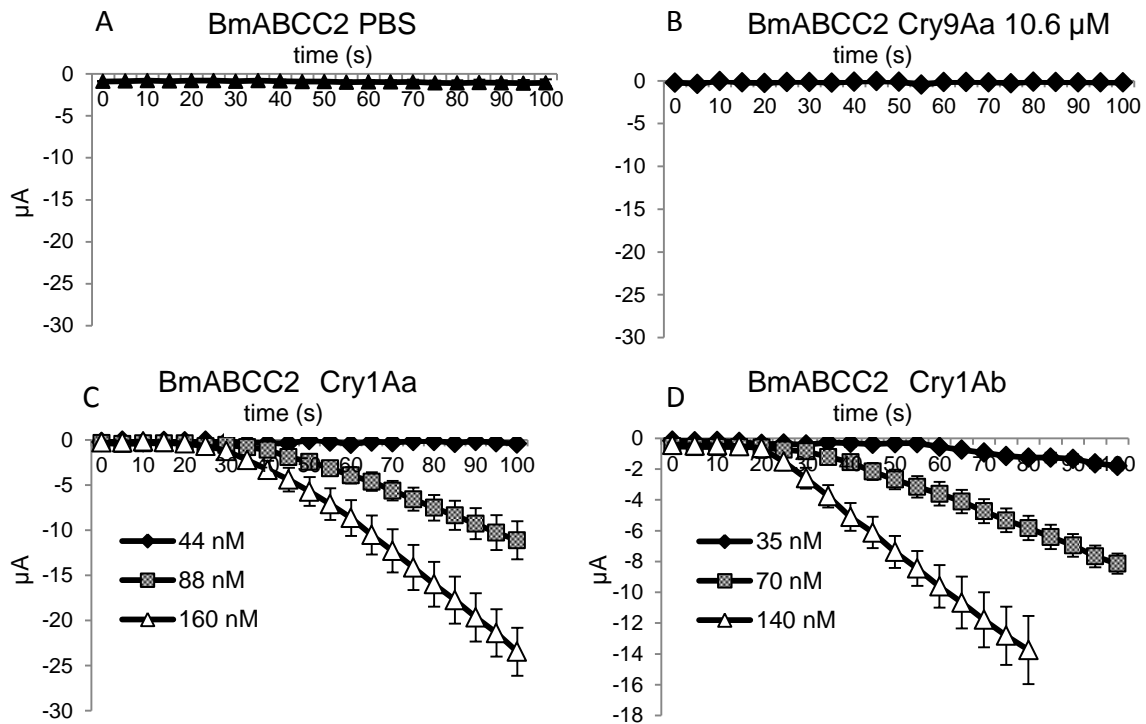


Fig. 34. Measurement of electric current induced by Cry toxin on the BmABCC2_S expressing oocyte cell membrane. Current traces were obtained by voltage clamp with oocytes injected with cRNA of BmABCC2_S. The currents were recorded immediately after applying PBS (A), Cry9Aa (B), Cry1Aa (C), or Cry1Ab (D) to the bathing solution. Bars represent the standard error of the mean regarding each toxin concentration tested.

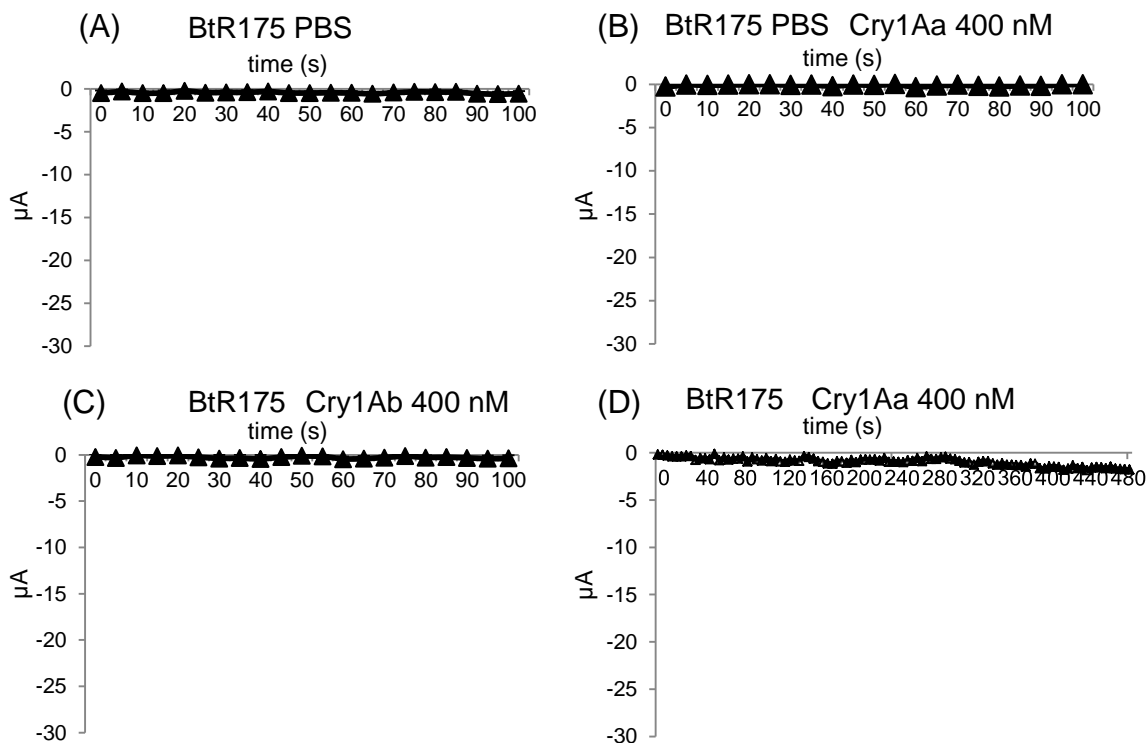


Fig. 35. Measurement of electric current induced by Cry toxin on the BtR175-TBR expressing oocyte cell membrane. Current traces were obtained by voltage clamp with oocytes injected with cRNA of BtR175-TBR. The currents were recorded immediately after applying PBS (A), Cry1Aa (B and D), or Cry1Ab (C) to the bathing solution. Bars represent the standard error of the mean regarding each toxin concentration tested.

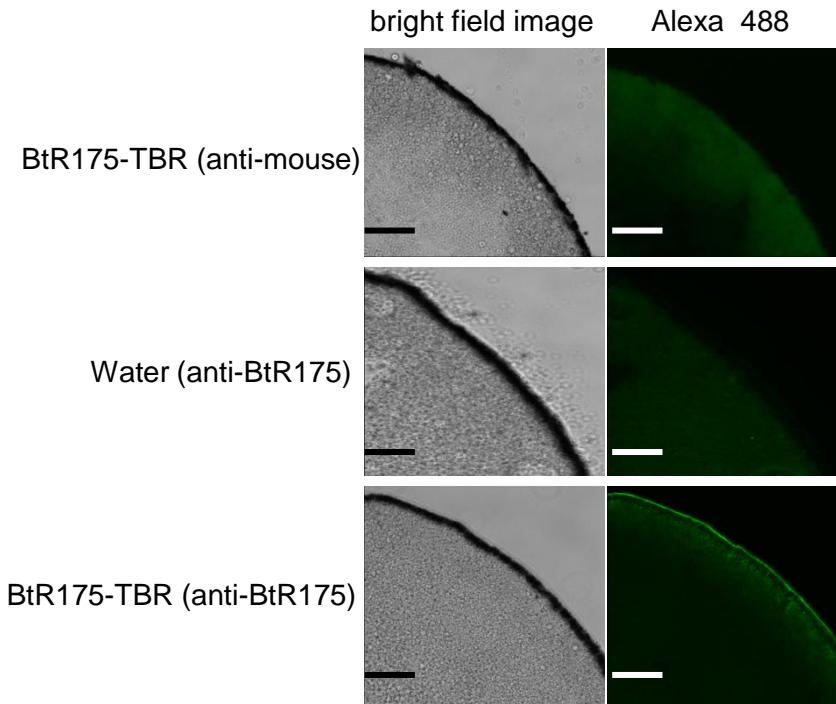


Fig. 36. Detection of BtR175-TBR on the oocyte surface by immunostaining. The oocytes injected with cRNA of BtR175 or water were incubated for 72 h. The oocytes were fixed and stained with anti-BtR175 serum. Following Alexa-488 conjugated anti-mouse IgG treatment, the oocytes were observed under a fluorescent microscope. Scale bars represent 50 μ m.

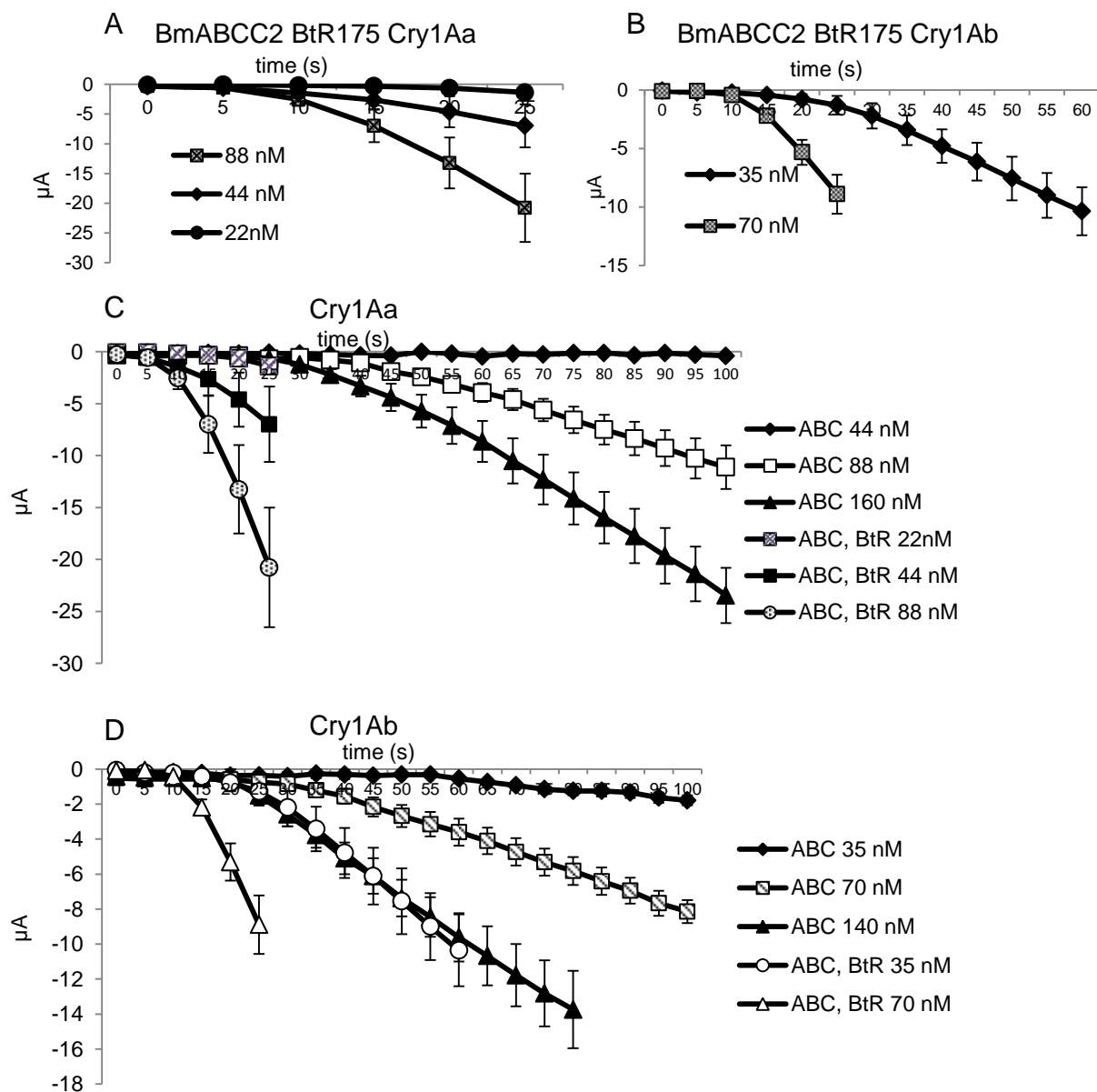


Fig. 37. Measurement of electric current induced by Cry toxins on the BmABCC2_S and BtR175-TBR co-expressing oocyte cell membrane. Current traces were obtained by voltage clamp with oocytes injected with cRNA of BmABCC2_S and BtR175-TBR. The currents were recorded immediately after applying Cry1Aa (A); or Cry1Ab (B) to the bathing solution. (C) Merged data of electric current from BmABCC2_S- or BmABCC2_S and BtR175-TBR co-expressing oocytes after applying Cry1Aa. (D) Merged data of electric current from BmABCC2_S- or BmABCC2_S and BtR175-TBR co-expressing oocytes after applying Cry1Ab. Bars represent the standard error of the mean regarding each toxin concentration tested.

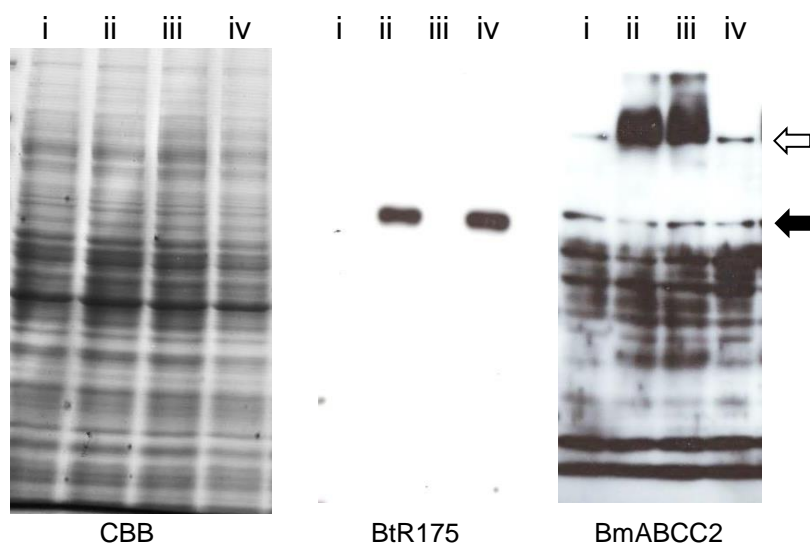


Fig. 38. Analysis of expression level of BtR175-TBR and BmABCC2_S. Oocyte injected with water (i), BtR175-TBR and BmABCC2_S (ii), BmABCC2_S (iii), BtR175-TBR (iv) were homogenized and solubilized with DDM. The solubilized lysate were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-BtR175 or BmABCC2 serum. Closed arrow indicates theoretical molecular mass of BtR175-TBR, and open arrow indicates theoretical molecular mass of BmABCC2_S.

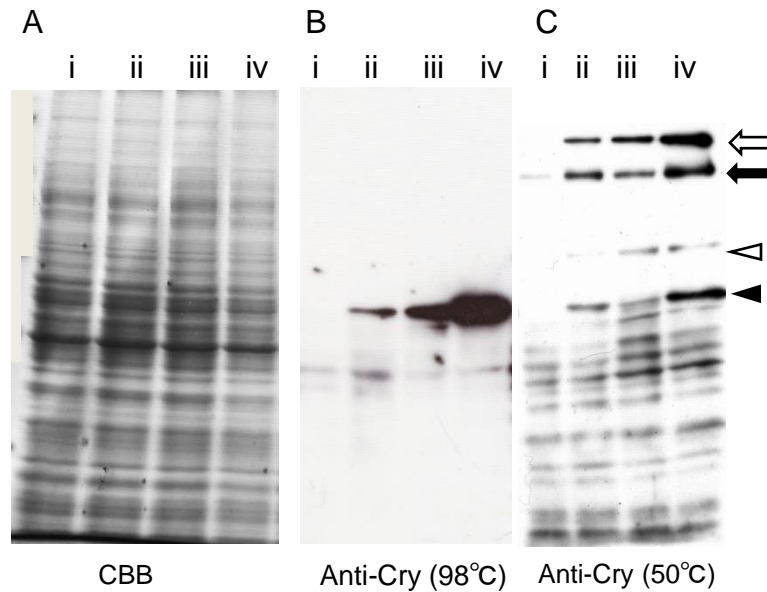


Fig. 39. Toxin-binding assay of oocyte surface using Cry1Aa as a ligand. Oocytes injected with water (i), BtR175-TBR (ii), BmABCC2_S (iii), and BtR175-TBR and BmABCC2_S (iv) were incubated with 100 nM Cry1Aa toxin. The oocytes were homogenized and separated by SDS-PAGE (A) and analyzed by Western blotting using anti-Cry1Aa serum (B and C). Closed arrow head indicates monomer of Cry1Aa, open arrow head indicates dimer of Cry1Aa, closed arrow indicates trimer of Cry1Aa, and open arrow indicates tetramer of Cry1Aa. Dimer, trimer, and tetramer of Cry toxin were heat-resisting property at 50 °C (C) but 98°C(B).

第4章 BmABCC2 と Cry 毒素の結合動態及び相互作用領域の解析

第1節 目的

受容体分子の Cry 毒素との相互作用のありようや毒素上のその相互作用を司る領域を明らかにすることは、Cry 毒素の作用機構や昆虫の抵抗性獲得の機構を解明し、抵抗性発達の抑制策を考える上で重要である。実際に、以前より Cry 毒素受容体として機能することが報告されているカドヘリン様タンパク質については、*B. mori* (Nagamatsu et al., 1999)、*Helicoverpa armigera* (Wang et al., 2005)、*Manduca sexta* (Gang et al., 2004)などの昆虫においては、高い親和性で Cry 毒素が結合することや、その Cry 毒素との結合領域が報告されている。また、カドヘリン様タンパク質の種々の Cry 毒素との結合領域は、いずれもカドヘリン膜近傍及びカドヘリンリピート9-11付近であり相同性のある領域が結合領域であり (Pigott and Ellar, 2007)、この領域が欠損することがそれを持つ昆虫に抵抗性を生みだすことに結びつくことが明らかにされている (Gahan et al. 2001; Xu et al. 2005; Morin et al. 2003)。一方、本研究第2章 2.3.1 においてそれが持つ機能の面から BmABCC2 は受容体分子であることを示した。しかし、Cry 毒素と BmABCC2 との相互作用のありようについては何ら情報が得られていない。また、カドヘリン様タンパク質や APN1 が Cry 毒素と結合する分子であるという実験結果より受容体分子である可能性が見出されてきたのに対し (Knight et al. 1995; Nagamatsu et al. 1998; Nagamatsu et al. 1999)、BmABCC2 が Cry 毒素と結合するという報告はこれまでになく、勿論 BmABCC2 と Cry 毒素との相互作用の特性の解析結果は知られていない。BmABCC2 は、膜タンパク質であることから生体内での発現量は多くはないことが想像され、それは、BmABCC2 が今まで見つかってこなかった原因の1つかもしれない。また、3次構造を保った状態でのみ結合する、もしくは、3次構造に加え、Heckel ら (Heklel 2012) が想像するように ABC transporter C2 の ATP の加水分解を伴う構造変換が起こり、開口した際

にのみ毒素と相互作用する可能性すらある。一方、何故 BmABCC2 がこれまで Cry 毒素に対する結合タンパク質として見いだされずに来たのか、どのような結合特性をもつためにそのような結果になったのかは、BmABCC2 を利用した Cry 毒素の作用機構の理解と、今後更に多様な Cry 毒素のあるグループの受容体を探索する上で重要な情報になるはずである。また、BmABCC2 が受容体分子であるならば、必ず Cry 毒素との結合領域が存在するはずであるが、これに関してもまだまったく情報がない。しかし、抵抗性発生機構理解のためにはこのような情報は必須である。

そこで、第 4 章では、まず Cry 毒素と BmABCC2 の結合性状を BtR175 との比較を通して解析した。すなわち、これにより第 2 章、第 3 章で観察された BmABCC2 がより多くの Cry 毒素を細胞膜に挿入させる受容体として BtR175 よりも大きな機能を発揮する理由を明らかにすることを目指した。また、BmABCC2 分子上の Cry 毒素結合領域の探索をおこない、カイコガの Cry1Ab 毒素抵抗性が 234 位のチロシンの付加によってどのような仕組みで生み出されるかについて検討した。

第2節 材料と方法

4.2.1 昆虫培養細胞

第2章 2.2.1と同様の手法で培養した Sf9 細胞を用いた。

4.2.2 Cry 毒素の精製

本章で使用した Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素は、第2章 2.2.4 に記載した遺伝子組換え大腸菌株に生産させ、同様の手法で活性化した毒素を用いた。

4.2.3 Cry 毒素の細胞膜上での検出

Sf9 細胞に AcNPV-BmABCC2 を感染後、72 時間培養した細胞を、4%PFA で固定、または未固定の細胞に終濃度 20 nM になるように調整した Cry1Aa 毒素を添加し、室温で 60 分インキュベートした。以降の操作は、第2章 2.2.8 と同様に行った。

4.2.4 Flag-tag の cDNA 配列 C 末端への連結

C 末端に Flag-tag を付加した AcNPV-BmABCC2-Flag を作製するための BmABCC2 の cDNA 断片は、pBAC4x-1-EGFP-BmABCC2 のプラスミド DNA を鋳型に 5'-CGCtctagaATGGACTACAAAGACCATG-3' と 5'-TCATGGTCTTTGTAGTCCATTTTTTCTGTATTTCTACCAA-3' のプライマーを用いて PCR 反応を行い増幅した。Flag-tag の配列は 3×Flag pUAST プラスミドベクター DNA (東京大学 薬学部 遺伝学研究室 三浦正幸教授より分与) を鋳型に 5'-TTGGTAGAAATACAGAAAAAATGGACTACAAAGACCATGA-3' と 5'-CTAtctagaCTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATC-3' を用いて PCR 反応を行い増幅した。2 つの PCR 産物は、Gel / PCR Purification Kit (Favorgen) を用いてカラム精製し、50 µl の MilliQ 水 (Millipore) で溶出した。精製した PCR 産物各 1 µl ずつを混合した溶液を鋳型

に 5'-CGCtctagaATGGACTACAAAGACCATG-3' と
 5'-CTAtctagaCTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATC-3'のプライマーを用いて PCR 反応を行
 い 2 つの PCR 断片を連結させた。得られた PCR 産物は、pBAC4x-1 の *Xho* I サイトに組
 込んだ。C 末端に Flag-tag を付加し AcNPV-BtR175-TBR-Flag を作製するために、
 pBAC4x-1-EGFP-BtR175-TBR の プ ラ ス ミ ド DNA を 鋳 型 に し 、
 5'-AAGCctcgagATGGACTACAAAGACCATG-3' と
 5'-TCATGGTCTTTGTAGTCCATtttctggaattgattgcaa-3'のプライマーを用いて PCR を行い
 BtR175-TBR の cDNA 断片を増幅した。Flag-tag の配列は、3×Flag pUAST を鋳型に
 5'-ttgcaaatcaattccagaaaATGGACTACAAAGACCATGA-3' と
 5'-CGActcgagTCACTTGTTCATCGTCATCCTTG-3'のプライマーを用いて PCR 反応を行い
 増幅した。それぞれの PCR 産物は、Gel / PCR Purification Kit (Favorgen)をカラム精製し、
 50 µl の MilliQ 水 (Millipore) で溶出した。精製した PCR 産物各 1 µl ずつを混合した溶
 液 を 鋳 型 に 5'-AAGCctcgagATGGACTACAAAGACCATG-3' と
 5'-CGActcgagTCACTTGTTCATCGTCATCCTTG-3'のプライマーを用いて 2 つの PCR 断片
 を連結し、pBAC4x-1-EGFP の *Xho*I サイトに組込んだ。

4.2.5 BmABCC2 変異体 cDNA の作製

Table 9、Table 10、Table 11、Table 12 に記載した BmABCC2 は、全て
 pBAC4x-1-EGFP-BmABCC2 のプラスミド DNA を鋳型に、Table 13-15 に記載したそれぞ
 れの Primer を用いて PCR 反応を行い 2 つの PCR 断片(各 Table に記載した Fragment 1、
 Fragment 2)を合成した。それぞれの PCR 産物は、Gel / PCR Purification Kit (Favorgen)
 をカラム精製し、50 µl の MilliQ 水 (Millipore) で溶出した。精製した PCR 産物各 1 µl
 ずつを混合した溶液を鋳型に 5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' と
 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'のプライマーを用いて 2 つの断片を連結し、

pBAC4x-1-EGFP の *NotI* サイトに組込んだ。作製した全ての変異体について、目的の配列がプラスミド DNA に正しく組込めたかは、それぞれのプラスミド DNA を DNA シーケンス受託サービス（オペロンバイオテクノロジー株式会社）に外注し、確認した。

4.2.6 組換え型 AcNPV の作製

4.2.4 及び 4.2.5 で作出したそれぞれの cDNA 配列を組込んだ pBAC-4x-1 ベクターと Bac MagicTM DNA kit (Novagen) を用いてそれぞれの AcNPV を作製した。組換え AcNPV の作製法は、第 2 章 2.2.3 と同様の方法で行った。

4.2.7 膜画分の調整

可溶化した膜画分を精製せずにセンサーチップに固定化して行った SPR 解析(Fig. 42) 及び発現量を確認するためのウエスタンブロッティング(Fig. 41 and 53)に用いた膜画分は、それぞれの AcNPV を用いて、第 2 章 2.2.13 と同様の方法で調整した。

Flag-tag 精製 (Fig. 44 and 45) 及び、Flag-tag 精製した ABCC2-Flag と BtR175-TBR-Flag の SPR 解析(Fig. 45)に用いた膜画分は、以下の方法で調整した。10 % (v/v) 牛胎児由来血 (FBS, JRH Bioscience)と、終濃度 50 µg/ml ストレプトマイシン 及び終濃度 50 U/ml のペニシリンを添加した Sf-900 II SFM (GIBCO, Invitrogen)培地を滅菌した 300 ml ねじ付き三角フラスコ (Iwaki) に 150 ml ずつ用意した。150 cm² の培養フラスコ(IWAKI) にコンフルエントな状態の細胞を培養フラスコ 2 つ分ずつ培地を入れた三角フラスコ中に移し、それぞれの組換えバキュロウイルスを適量添加した後、3 日間 25°C で振盪培養した。その後の膜画分を精製し、DDM で可溶化する過程は、第 2 章 2.2.13 に記載した方法と同様の方法で行った。最終的に BtR175-Flag は 2.5 L、BmABCC2-Flag は 3 L 培養、精製した膜画分をそれぞれの実験に用いた。

4.2.8 細胞傷害アッセイ

BmABCC2-Flag 及び BtR175-TBR-Flag、及び BmABCC2 の変異体を発現させた培養細胞に対する Cry1A 毒素の活性の有無は、第 2 章 2.2.6 と同様の手法で評価した。

4.2.8 Flag-tag 精製

SPR 解析に用いる精製した BmABCC2-Flag 及び BtR175-TBR-Flag を得るために、4.2.7 の方法で DDM で可溶化した膜画分を 0.22 μm のフィルターユニット(Millex-LH, Millipore)を通過させたものを用い Flag-tag 精製をおこなった。ANTI-FLAG M2 Agarose Affinity Gel (sigma)のプロトコールに従い精製を行った。溶出は、3×Flag ペプチド (sigma) を用いて行い、PBST に透析することによりペプチドを取り除いた。

4.2.9 銀染色

4.2.8 で Flag-tag 精製したサンプルを 10%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって分離した。SDS-PAGE 後のゲルは、銀染色キット (Wako) のプロトコールに従い染色した。

4.2.10 ウェスタンブロッティング

それぞれの BmABCC2 変異体を発現させるための AcNPV を感染させ、組換えウイルス由来のタンパクを発現させた Sf9 細胞より第 2 章 2.2.13 と同様の手法で調整した膜画分をサンプルとして用いた。以降の操作は、第 2 章 2.2.9 と同様の方法で行った。

4.2.11 SPR を用いた BtR175 及び BmABCC2 と Cry1A 毒素の結合性状の解析

4.2.7 の要領で調整した膜画分または、4.2.8 の Flag 精製の過程を経て精製された膜タンパク質は、pH 4.0 の 10 mM 酢酸アンモニウムに 4 分の 1 量 (w/v)になるよう添加し

CM5 センサーチップ(GE Healthcare)にアミンカップリング法により固相化した。Cry 毒素との相互作用解析及び結合パラメーターの算出は、第 2 章 2.2.12 と同様の方法で行った。

第3節 結果と考察

4.3.1 BtR175-TBR 及び BmABCC2 の Cry 毒素との結合動態の解析

本章の第一節で既に述べた通り、BmABCC2 が Cry 毒素結合分子であると言える証拠は、未だ示されていない。しかしながら、BmABCC2 が Cry 毒素が細胞膜に刺さり孔を形成するのを促進する受容体分子であることは第2章、第3章で示した結果から明らかであり、その受容体機能を発揮するためには BmABCC2 は必ず Cry 毒素に結合した瞬間を持つはずである。第2章 2.3.2.で BmABCC2_R-^{234Y} 発現培養細胞において Cry 毒素が検出された結果 (Fig. 13) は、Cry 毒素と BmABCC2 が結合したことを意味すると考える。しかしながら、4% PFA で細胞を固定(細胞膜の流動性を失わせる)と明らかに BmABCC2 に結合する Cry 毒素の量が減少したことから(Fig. 40)、第2章 2.3.2.でみた BmABCC2_R-^{234Y} の発現培養細胞表面で検出された Cry 毒素 (Fig. 13) は、一つの仮説として膜に刺さっている状態を意味する可能性があることが考えられた。このように、細胞表面での BmABCC2 と Cry 毒素の結合という状態が検出されにくい原因として、BmABCC2 と Cry 毒素は確かに結合するものの、解離が非常に早く結合しても瞬時に解離してしまう可能性、または、Cry 毒素との結合段階自体が瞬時であり、結合したらすぐに膜に刺さる可能性が考えられた。そこで、結合をリアルタイムでとらえることができる SPR (表面プラズモン共鳴) 解析であれば、BmABCC2 と Cry 毒素の結合動態を解析できると考え、BtR175-TBR、BmABCC2 それぞれを発現させた培養細胞の膜画分と Cry 毒素との結合解離動態を Biacore を用いて解析することにした。精製した膜画分に十分量の BtR175-TBR 及び BmABCC2 が含まれているかを確認するため、銀染色を行ったが、どれがそれぞれの分子と質量が一致するかが不明であり、それぞれの分子に由来すると考えられるバンドは識別できなかった (data not shown)。しかしながら、同サンプルを用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、両分子の存在が確認され (Fig.41)、それぞれの抗体の力価を基に推察すると少なくとも膜画分懸濁液には 1 ng/ μ l

以上の BtR175-TBR または BmABCC2 を含む溶液として調整できていることが分かった。そこで、さっそく Biacore を用いた SPR 解析に進み、センサーチップに各固相化し、Cry1Aa 毒素との結合解離動態を解析した。EGFP、BtR175-TBR、BmABCC2 発現細胞の膜画分を固相化したそれぞれのセンサーチップに対して Cry1Aa 毒素を 200 nM、400 nM で添加し、センサーチップに結合した Cry 毒素の量を示すセンサグラムを得た。ネガティブコントロールとして用いた EGFP を単独で発現した細胞では、結合した絶対量は、50 RU 以下と非常に少なく、Cry1Aa 毒素の Biacore の流路への添加を終了し毒素を含まない緩衝液に置換する 120 秒を過ぎると急激に結合量が落ち、緩衝液への置換後 240 秒間に、結合した毒素のほとんどが解離することを意味するセンサグラムが得られた(Fig. 42)。これに対し、BtR175 及び BmABCC2 区では、毒素の添加後に EGFP 区よりも明らかに大きな反応値がえられ、毒素の添加が終了してもそのほとんどがはがれることなく、多くの毒素分子がなお結合状態にあることを意味するセンサグラムが得られた(Fig. 42)。これらの結果は、Sf9 細胞膜画分にはもともと Cry1Aa 毒素に結合性を持つ分子が存在すること、よって全ての膜画分には Cry1Aa 毒素と弱い相互作用のバックグラウンドが存在することを示すものと思われた。また、BtR175 と BmABCC2 の発現細胞の膜画分においては、BtR175 および BmABCC2 と Cry1Aa 毒素の相互作用分の上積みグラフに表れており、さらにそれらの結合の多くはバックグラウンドで見られた結合とは違って解離しにくい性状のものであることを意味すると考えられた。一方、結合親和性を示す各パラメーターを比較してみると、 K_A 、 K_D 値はそれぞれ、BtR175 が 1.12×10^7 と 8.97×10^{-8} であり、BmABCC2 は 5.61×10^7 と 1.78×10^{-8} RU であり (Table 7)、ほぼ同じ値を示した。この結果からは、期待していたような受容体としての機能の違いを説明できる BtR175 と BmABCC2 の結合性状の違いは見えてこなかった。しかし、本来見えるべき結合解離の動態の特性がバックグラウンドに埋もれて分かりにくくなっている可能性が考えられた。

そこで、次に、BtR175-TBR と BmABCC2 に Flag-tag を付加し、Flag-tag 精製によりそれらを粗精製してセンサーチップに固相し、再度解析を試みることにした。まず、C 末端に Flag-tag を付けた BtR175-TBR-Flag 及び BmABCC2-Flag が受容体としての機能を保持しているかを見ることで、tag をつけたことによる機能の欠損が起こっていないかを確認した。BtR175-Flag 及び BmABCC2-Flag を発現させた Sf9 細胞に 500 nM の Cry1Aa 毒素を添加したところ、毒素に反応し膨らんでいる細胞が観察され(Fig. 43)、これらの tag 無し分子を発現させた細胞と同程度の感受性を持つことが確認された。すなわち、tag を付加しても Cry 毒素受容体としての機能は保持していることが確認できた。そこで次に、これらの分子の Flag-tag による精製を行い、ウエスタンブロッティングで確認したところ溶出区に目的の分子のバンドが認められ(Fig. 44 and 45)、さらにそれらの位置に銀染色でバンドが確認できた(Fig. 46)。これらの結果より、今回調整製した膜タンパク質は、SPR 解析に値する精製度であり、溶液中に含まれるそれぞれのタンパク質の濃度は、ウエスタンブロッティングの結果を基に少なく見積もっても 10 ng/ μ l はあることが推定された。そこで、それぞれの精製したタンパク質をセンサーチップにつけ、Cry1Aa 毒素との相互作用を解析した。その結果、未精製の膜タンパクを用いた場合 200 nM の各毒素を添加した際の 120 秒後の到達反応値 (Resonance Unit, RU)は、BtR175-TBR、BmABCC2 両者ともおよそ 100 RU であったのに対し (Fig.42)、今回は、250 RU と 500 RU であり、反応値があがり、バックグラウンド打ち消されずに結合特性が解析できると期待できた。しかしながら、結合親和性を示すパラメーターは、BtR175-TBR と BmABCC2 でそれぞれ、 K_A が 4.74×10^8 、 3.30×10^8 、 K_D は 4.97×10^{-9} 、 4.93×10^{-9} RU であり、期待していたような受容体としての機能の違いを説明できる大きな違いは見られなかった (Table 8)。今回の反応結果から算出した結合親和性を示すパラメーターというのは、解離の特性には、1:1 binding モデルを適用できるものとそうでないものがあるにも関わらず、無理やり当てはめて出た結果でしかない。つまり、BtR175 についても、BmABCC2

についても 1:1 binding モデルが適用できない例を見ている可能性がある。APN1 と Cry 毒素の結合動態に迫ったいくつかの先行研究で報告されたセンサグラムは、結合の後に時間経過と共に解離がみられ、1:1 binding モデルが適応される 1 例であると言える (Jenkins et al. 2000; Lee et al. 2001; Jenkins and Dean, 2001)(Fig. 48)。一方で、今回 BtR175 及び BmABCC2 について得られたセンサグラムは、解離がほとんど観察されず、1:1binding モデルが適用されると考えられる APN1 と比べて解離が極端に緩やかである (Fig. 47)。このことから、これら 2 分子と Cry 毒素との間の結合には、オリゴマー化した分子が多点結合することで生じる効果やその他の何らかの理由で固定化した分子から解離できなくなる効果の影響を受けていることが想像される。すなわち、カドヘリンタンパク質からの Cry 毒素の緩やかな解離には Cry 毒素の多量体とカドヘリン様タンパク質が多点で結合することで生み出される、抗体が 2 価で結合する際に一般的にみられる avidity 効果をみているものと考えられる (Fig. 48)。もしそうならば、1:1 binding モデルに当てはめようとする行為が間違っており、このモデルに当てはめて算出した結合親和性を表すパラメーター(KD や KA)の示す値には何の意味もないことになる。一方、BmABCC2 のセンサグラムも解離曲線の傾きが非常に緩やかであり (Fig. 47)、1:1binding モデルに当てはめてよい相互作用であるかに疑問がもたれる。しかしながら、PFA 固定細胞に結合した毒素が免疫染色で検出された結果 (Fig. 40)や、先行研究において今まで一度も結合対象として報告されてこなかったことを考慮すると、この緩やかな解離はカドヘリンタンパク質と同様のオリゴマー化に依存する avidity 効果をみているとは考えにくい。また、センサグラムの形状をよく見てみると、Cry 毒素の添加が終了する 120 秒付近で、BtR75 には、見られない急激な解離が起こっていることが分かる (Fig. 47)。400 nM の Cry1Aa 毒素添加時には毒素添加終了(120 秒地点)から約 10 秒間の間に結合した毒素の全体量の約 3 分の 1 程である約 200RU の毒素が解離している (Fig. 47)。このことは、Cry1Aa 毒素と BmABCC2 の結合に瞬時に解離するような結合成分が含まれてい

る、換言すると Cry1Aa 毒素は BmABCC2 に対して解離しやすい相互作用の状態をもつことを意味するのかもしれない (Fig. 48)。そして、それに引き続きみられる一見 avidity によく似た非常に緩やかな解離は、培養細胞の系やアフリカツメガエルの系でみてきたような BmABCC2 を足場に Cry 毒素が脂質膜に刺さる、あるいは BmABCC2 分子から Cry1Aa 毒素が解離できない状態にあることを意味するのかもしれない。実際、今回センサーチップに固定化した ABCC2 分子の膜貫通領域（疎水部位）には両親媒性の物質 DDM が結合しており、それは細胞膜表面の脂質二重層の代わりの役を果たしている。緩やかな解離を生む理由は Cry 毒素が脂質膜に刺さったことにある可能性は否定できない (Fig. 48)。このように、今回得られた BmABCC2 と Cry 毒素の結合をみたセンサグラムは、カドヘリン様タンパク質と Cry 毒素の間に見られるように、複数の異なる様式の結合の総和を意味している可能性がある。しかし同時に、最も重要なことは、このセンサグラムが確かに Cry 毒素と BmABCC2 との間に結合という段階があることを示すものである点である。

ところで、センサーチップ上の BmABCC2 の周囲には本来このトランスポーター分子に予想される「廃棄される対象となる分子」も、このトランスポーターの構造変換を駆動する ATP も存在しない。よって、センサーチップ上の BmABCC2 は開口部位を閉じた状態にあると予想され、本研究で得られたデータは、Cry1Aa 毒素が開口部位を閉じたままの BmABCC2 を利用して膜に刺さることを意味する可能性がある。このことは、今後はさらに異なる実験系を用いて確認される必要がある。

4.3.2 細胞外ループ領域 2 近傍が Cry 毒素との結合領域である可能性の検証

ここまでの結果より、BmABCC2 と Cry 毒素は確かに結合することが示されたため、次に、BmABCC2 のどの領域が Cry 毒素と実際に結合するのかさらに詳細に調べることにした。そこで、まず、本研究で BmABCC2 を受容体候補分子として扱うきっかけと

なった細胞ループ領域の 234 位の変異に着目した。既に述べた通り、2012 年、渥美らによって 7 系統の Cry1Ab 感受性カイコガと 10 系統の抵抗性カイコガの間でみられた Cry1Ab 感受性の違いが、BmABCC2 分子の細胞外ループ領域の 2 の 234 位へのチロシンの挿入に起因することが示唆された (Atsumi et al. 2012)。また、第 2 章では、この 234 位のアミノ酸挿入変異が確かに、Cry1Aa と Cry1Ab、Cry1Ac の間にみられる感受性の違いの原因になっていることを BmABCC2_S+²³⁴Y と BmABCC2_R-²³⁴Y の 2 種類の変異体を培養細胞に発現させそれぞれの Cry1A 毒素感受性の違いを見ることにより証明した (Fig. 12)。このように、234 位のチロシン挿入は、少なくとも Cry1Ab、Cry1Ac が BmABCC2 と結合することに影響を与え、細胞外のループ領域であることから、234 位の近傍が少なくとも Cry1Ab、Cry1Ac にとっての BmABCC2 上の結合領域である可能性が考えられた。それらを検証するために BmABCC2_S の細胞外ループ領域 2 のアミノ酸をアラニンに置換したアラニン置換変異体を 2 種類作出した。作出した Y²³³ および ²³⁴IS²³⁵ をそれぞれアラニンに置換した変異体に対して Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac それぞれの毒素を 50 nM、500 nM、の 2 濃度で添加し、毒素に対する反応を調べた。その結果、2 種類の変異体発現細胞は、野生型である BmABCC2_S 発現細胞と同レベルで Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素全てに対して反応がみられた (Table 9 and Fig. 49)。このことから、ループ領域 2 のアミノ酸に変異を入れても影響がないことが明らかになった。すなわち、ループ領域 2 近傍の配列が BmABCC2 と直接相互作用する領域ではないであろうと考えられた (Fig. 51)。

4.3.3 細胞外ループ領域 2 に挿入されるアミノ酸の種類の影響

細胞外ループ領域 2 が、期待していたような Cry 毒素との直接的な結合領域ではないが、234 位のチロシン挿入で、Cry1Ab、Cry1Ac と結合できなくなるという現象がなぜ起こるのかに迫ることは、Cry 毒素と BmABCC2 の結合領域を知る手がかりを得ること

につながり得ると考えた。そこで、次に 234 位に挿入されたチロシンは直接的な結合領域ではないが Cry 毒素と BmABCC2 の結合を阻害する構造になっているという仮説を立てた。チロシンはベンゼン環を有する比較的大きなアミノ酸である。Cry1Ab、Cry1Ac と結合できなくなるのは、チロシンの大きな側鎖が Cry 毒素との結合を阻害するからなのか、それとも他の側鎖の小さなアミノ酸でも同様の結果が生み出されるのかを調べることにした。BmABCC2_S の 234 位にカルボキシル基の側鎖 1 つしか持たない小さなアミノ酸であるアラニン、チロシンと同じくベンゼン環を持つ大きなアミノ酸であるフェニルアラニン及び、トリプトファン、そして、ベンゼン環はもたないが、極性を持つために、分子に構造的な変化をもたらす阻害が容易に起こりそうなアルギニン、ヒスチジンという異なる 6 種類のアミノ酸を挿入した BmABCC2_S 変異体を作製した。これら作出した変異体を発現する Sf9 細胞の Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac それぞれに対する感受性を調べたところ作出したすべての変異発現細胞について、既に報告されている Cry1Ab 抵抗性系の BmABCC2_R (²³⁴Y)と同様に Cry1Aa には感受性であるが、Cry1Ab, Cry1Ac にはそれぞれ 1 μ M の毒素に対しても抵抗性であることが分かった(Table 10 and Fig. 50)。これらの結果より、234 位に Tyrosine が挿入されたことによって生み出された Cry1Ab、Cry1Ac に対する受容体機能の変化は、アミノ酸の大きさや性質に関係なく、234 位にどんなアミノ酸を挿入した際にも生み出されることが分かった(Fig. 51)。これらことは、ABCC2_S の本来の機能とは無関係に、細胞外ループ部位の構造変化が受容体機能を阻害できることを意味している。すなわち、4.4.2 の結果と合わせて考えると、BmABCC2 との相互作用領域は、1 アミノ酸挿入に起因する細胞外ループ 2 のコンフォメーションチェンジの影響を受けるような領域であり、Cry 毒素が細胞外から BmABCC2 と結合することを考えると、細胞の周期からアクセスしやすい位置にある細胞外ループ領域のいずれかである可能性が考えられた。

4.3.4 BmABCC2 細胞外ループ変異体の Cry 毒素感受性に与える影響

BmABCC2 に 6 つ存在する細胞外ループ領域全てに対し、ランダムに 1 つまたは連続する 3 つのアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作成した。作成したそれぞれの BmABCC2 変異体を発現させた培養細胞に対して各 100 nM の Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素を添加し 60 分後の細胞の毒素に対する反応を観察した。その結果、作成した 16 種類全ての変異体を発現させた培養細胞は、Cry 毒素に対する感受性を保持しており (Table 11)、細胞外ループ領域は、Cry 毒素との結合に関与していないかのように見えた。しかしながら、6 つ存在する細胞外ループ領域を構成するアミノ酸の数は、それぞれ、19、5、5、54、5、5 a.a. だと予測されている。細胞外ループ領域 1 と細胞外ループ領域 4 は、他の細胞外ループ領域よりも長く、今回ランダムに作成した変異体だけでは、細胞外ループ領域 1 及び 4 の領域の近傍が Cry 毒素との結合に関与しているか結論付けることは難しいと考えた。そこで、細胞外ループ領域 1 及び 4 について、アミノ酸の一部を欠失させた変異体を作成することにした。細胞外ループ領域 1 については、¹²⁰A - S¹²⁷、¹²¹E - T¹³¹、¹²²L - V¹²⁸ a.a. の領域の欠失体を作製したが、全ての変異体において、各 100 nM の Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac を添加後 60 分後に見られるはずの毒素に反応して膨らんで見える細胞が観察されなくなり、Cry1A 毒素受容体としての機能を失ったことが示唆され (Table 12 and Fig. 52)、細胞外ループ領域 1 が Cry 毒素との結合に関与していることが期待された。細胞外ループ領域 4 については、まず、⁷⁸⁸A - L⁸⁰⁶ との領域に対する変異体を作製し、3 種類の毒素に対する反応をみたところ、⁷⁸⁸A - L⁸⁰⁶ では、3 種類全ての毒素に対して感受性が残っていたのに対し、⁷⁷⁰D - T⁷⁹⁵ の領域を欠失させると、全ての毒素に対する感受性が失われた (Table 12 and Fig. 54)。更に変異によって影響が出る領域を狭める目的で ⁷⁷⁰D - T⁷⁹⁵ の内部の領域に標的配列を少しずつずらした 5 つの欠失変異体を作成した。それらを発現させた細胞に対する感受性を調べたところ、⁷⁷⁰D - T⁷⁹⁵ の後半の領域に対する変異体である ⁷⁷⁹Q - D⁷⁸¹、⁷⁸³Y - L⁷⁸⁷、⁷⁸⁶S - A⁷⁸⁸ の 3 種

類の変異体については、3 種類の Cry 毒素に対する感受性に影響を与えないという結果が得られた(Table 12 and Fig. 54)。一方で、⁷⁷⁰D – T⁷⁹⁵ の前半部分に作製した ⁷⁷⁰D – L⁷⁷³ と ⁷⁷³L – F⁷⁷⁵ の変異体では、変異体を発現した細胞の 3 種類の Cry1A 毒素に対する感受性が失われたことが分かった(Table 12 and Fig. 54)。一方、これらの変異体は、発現量が少ない、または発現していないために受容体としての機能を失ったかのように見えたという可能性が残された。そこで、ウェスタンウェスタンブロッティングにより、細胞膜上での発現を確認したところ、全ての変異体が細胞膜上で十分量発現していることが確認できた (Fig. 53)。これらの結果より、細胞外ループ領域 1 の ¹²⁰A - T¹³¹ の領域と細胞外ループ領域 4 の少なくとも ⁷⁷⁰D - F⁷⁷⁵ の領域の付近で、Cry 毒素と結合する可能性が期待された。

本節では、ABCC2_S 上の 2 つの領域に欠失を導入することにより、本分子が細胞に Cry1A 毒素に対する感受性を付与できなくなることを示した。このことは野外昆虫においてもこれらの領域の欠失によって容易に Cry1A 毒素抵抗性系統が発生しうることを示している。

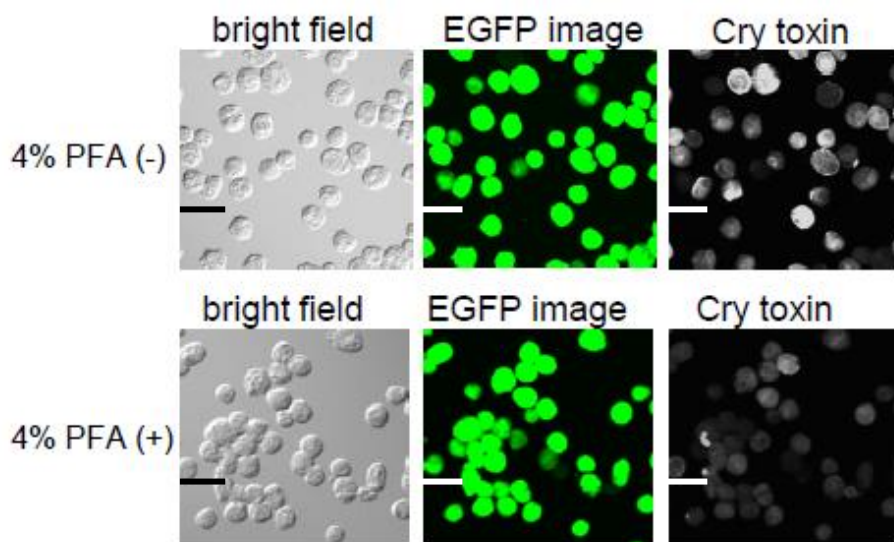


Fig. 40 Detection of Cry1Aa toxin binding to BmABCC2. Sf9 cells infected with AcNPV-BmABCC2 were incubated with 20 nM Cry1Aa after fixing by 4% PFA (upper) or without fixing (lower). These cells were stained with anti-Cry1Aa rabbit antiserum followed by Alexa 594-conjugated anti-rabbit antisera and observed in a fluorescence microscope. In the images EGFP is used as marker for expression of BmABCC2, and Alexa 594 fluorescence indicates Cry toxin binding to the cell membrane. Scale bar represents 20 μ m.

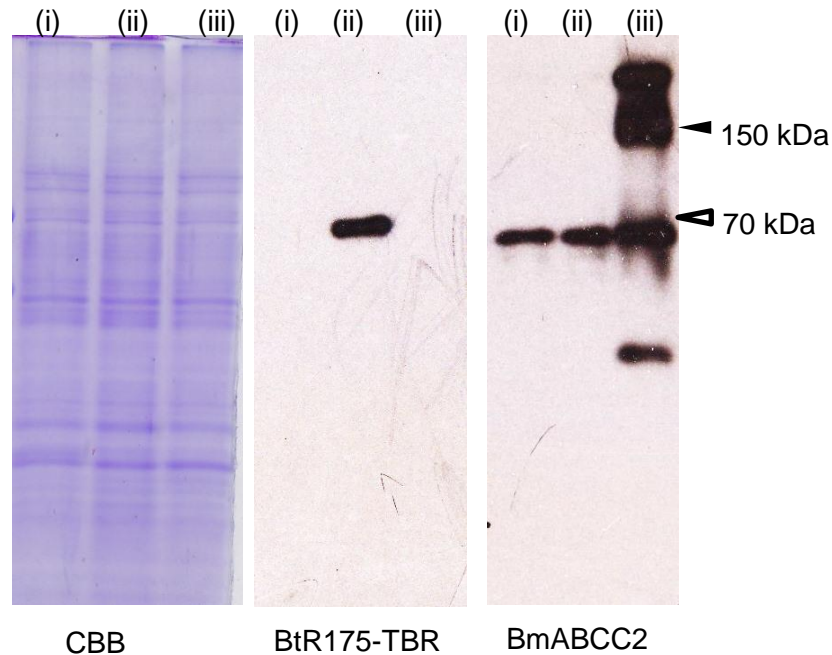


Fig. 41. Western blotting analysis of BtR175-TBR or BmABCC2 expressing cell membrane. Membrane fraction of Sf9 cells expressing EGFP (i), BtR175-TBR (ii), and BmABCC2 (iii) were solubilized with DDM and separated by SDS-PAGE. Western blotting were conducted with anti-BtR175 or anti-BmABCC2 serum. Open arrow represents theoretical molecular mass of BtR175, and closed arrow represents theoretical molecular mass of BmABCC2.

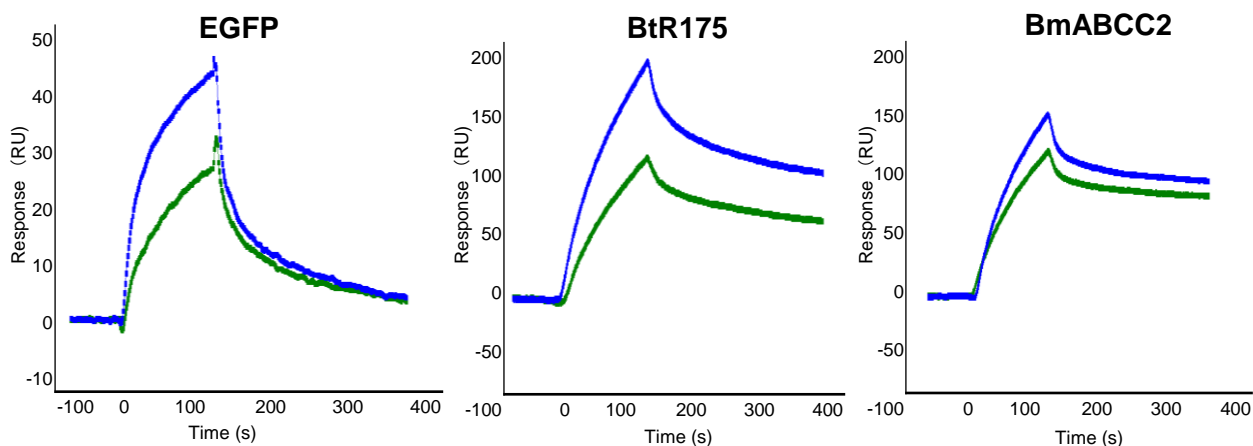


Fig.42. Biacore sensorgrams for the binding of Cry1Aa to EGFP, BtR175, or BmABCC2. Membrane fraction of Sf9 cells expressing EGFP, BtR175, or BmABCC2 were purified and immobilized on sensor chip. Cry1Aa toxin solutions at 200 nM (green) or 400 nM (blue) were applied as a ligand to the sensor. 120 s after injection, the flow was replaced by PBST and measurement was continued until at 240 s after flow replacement. The kinetics of the association and dissociation reactions were measured using Biacore J surface plasmon resonance (SPR) detection equipment. RU, SPR response unit.

Table 7. Affinity parameters of Cry1Aa binding to EGFP, BtR175 or BmABCC2 determined using global fitting model integrated in Biacore surface plasmon resonance detection equipment.

	K_A (M^{-1})	K_D (M)
EGFP	$4.59e^6$	$2.18e^{-7}$
BtR175	$1.12e^7$	$8.97e^{-8}$
BmABCC2	$5.61e^7$	$1.78e^{-8}$

Rate constants for association (k_a) and dissociation (k_d) were determined by global fitting from 3 fitted curves obtained using 1:1 Langmuir binding model. The association and dissociation constants [K_A (M) and K_D (M)] was then calculated according to the formula, $K_A = k_a/k_d$ and $K_D = k_d/k_a$.

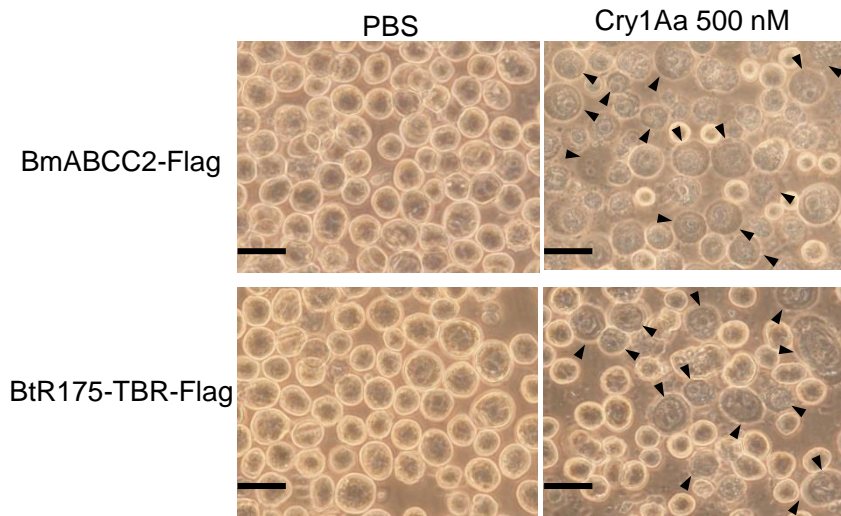


Fig. 43. Cry1A toxins' activity against BmABCC2-Flag or BtR175-TBR-Flag expressing cells. Sf9 cells were infected with AcNPV-BmABCC2-Flag (Upper) or BtR175-TBR - Flag (Lower) and cultured for 72 h. The medium was replaced with PBS containing Cry1Aa 100 nM and the cells were observed for 60 min after toxin administration. Lowly-refractile swollen cells are indicated by arrow heads. Scale bars represent 20 μ m.

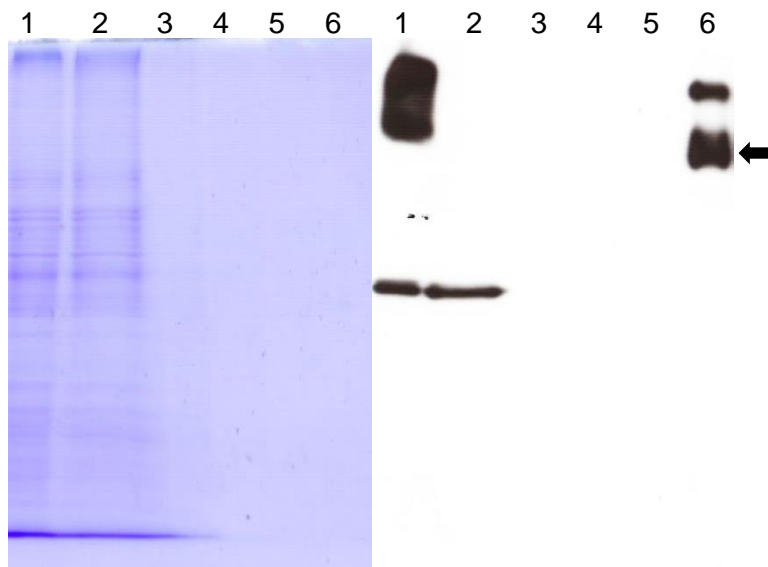


Fig.44. Purification of Flag-tagged BmABCC2. Membrane fraction from Sf9 cells expressing BmABCC2-Flag was solubilized using DMM and BmABCC2-Flag was purified with anti-flag tag antibody conjugated agarose gel. Each sample was separated by SDS-PAGE and detected by anti-BmABCC2 serum. Lane 1, solubilized membrane fraction; lane 2, fraction unbound to the affinity gel; lane 3, wash fraction 1; lane 4, wash fraction 2; 5, wash fraction 3; lane 6, elute fraction. Closed arrow indicates the theoretical molecular mass of BmABCC2.

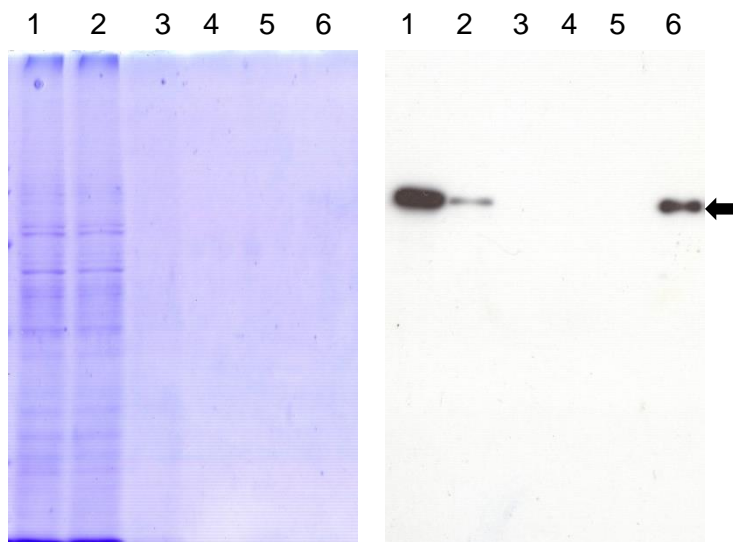


Fig.45. Purification of Flag-tagged BtR175. Membrane fraction from Sf9 cells expressing BtR175-Flag was solubilized using DMM and BtR175-TBR-Flag was purified with anti-flag tag antibody conjugated agarose gel. Each sample was separated by SDS-PAGE and detected by anti-BtR175 serum. Lane 1, solubilized membrane fraction; lane 2, fraction unbound to the affinity gel; lane 3, wash fraction 1; lane 4, wash fraction 2; 5, wash fraction 3; lane 6, elute fraction. Closed arrow indicates the theoretical molecular mass of BtR175-TBR.

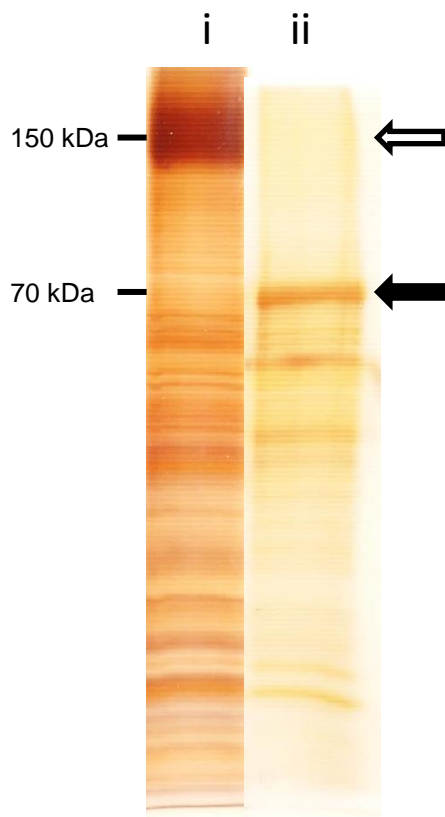


Fig. 46. Silver staining of affinity gel eluate fractions of BmABCC2-Flag and BtR175-TBR-Flag. BmABCC2-Flag (i) and BtR175-Flag (ii) were purified using anti-flag antibody conjugated affinity gel. The partially purified proteins were separated by SDS-PAGE and stained by silver staining. Closed arrow indicates the theoretical molecular mass of BtR175-TBR. Open arrow indicates the theoretical molecular mass of BmABCC2.

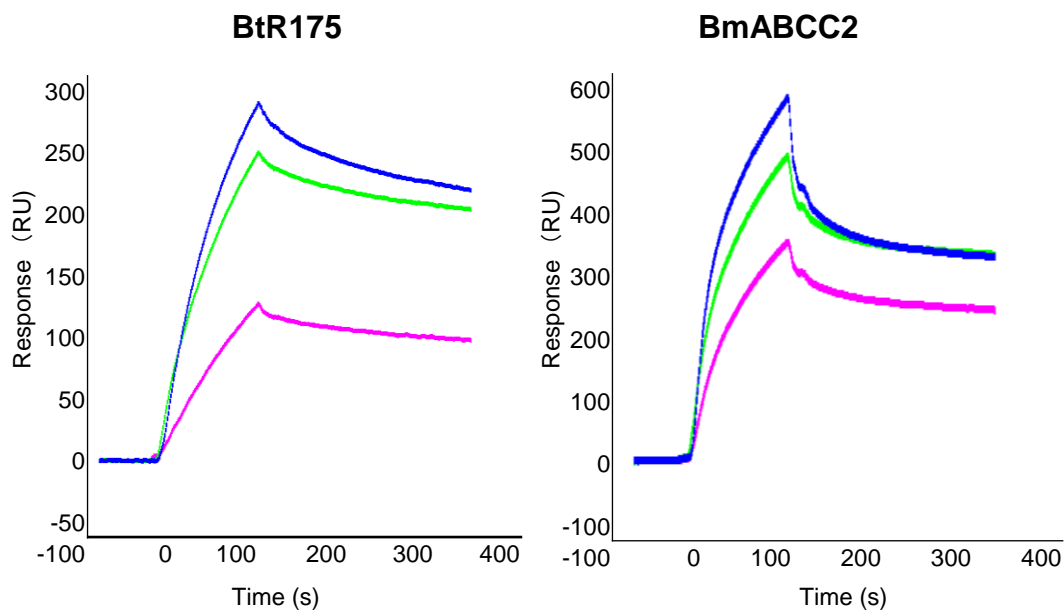


Fig. 47. Biacore sensorgrams for the binding of Cry1Aa to BtR175-TBR-Flag or BmABCC2-Flag. Membrane fraction of Sf9 cells expressing BtR175, or BmABCC2 were purified using affinity gel and immobilized on chip. Cry1Aa toxin solutions at 100 nM (magenta) , 200 nM (green), or 400 nM (blue) were applied to as a ligand ligand to the sensor. 120 s after injection, the flow was replaced by PBST and measurement was continued until at 240 s after flow replacement. The kinetics of the association and dissociation were measured using Biacore J surface plasmon resonance (SPR) detection equipment. RU, SPR response unit.

Table 8. Affinity parameters of Cry1Aa binding to EGFP, BtR175 or BmABCC2 determined using Biacore surface plasmon resonance detection equipment.

	KA	KD
BtR175	4.74e ⁸	4.97e ⁻⁹
BmABCC2	3.30e ⁸	4.93e ⁻⁹

Rate constants for association (ka) and dissociation (kd) were determined by global fitting from 3 fitted curves obtained using 1:1 Langmuir binding model. The association and dissociation constants [K_A (M) and K_D (M)] was then calculated according to the formula, $K_A = ka/kd$ and $K_D = kd/ka$.

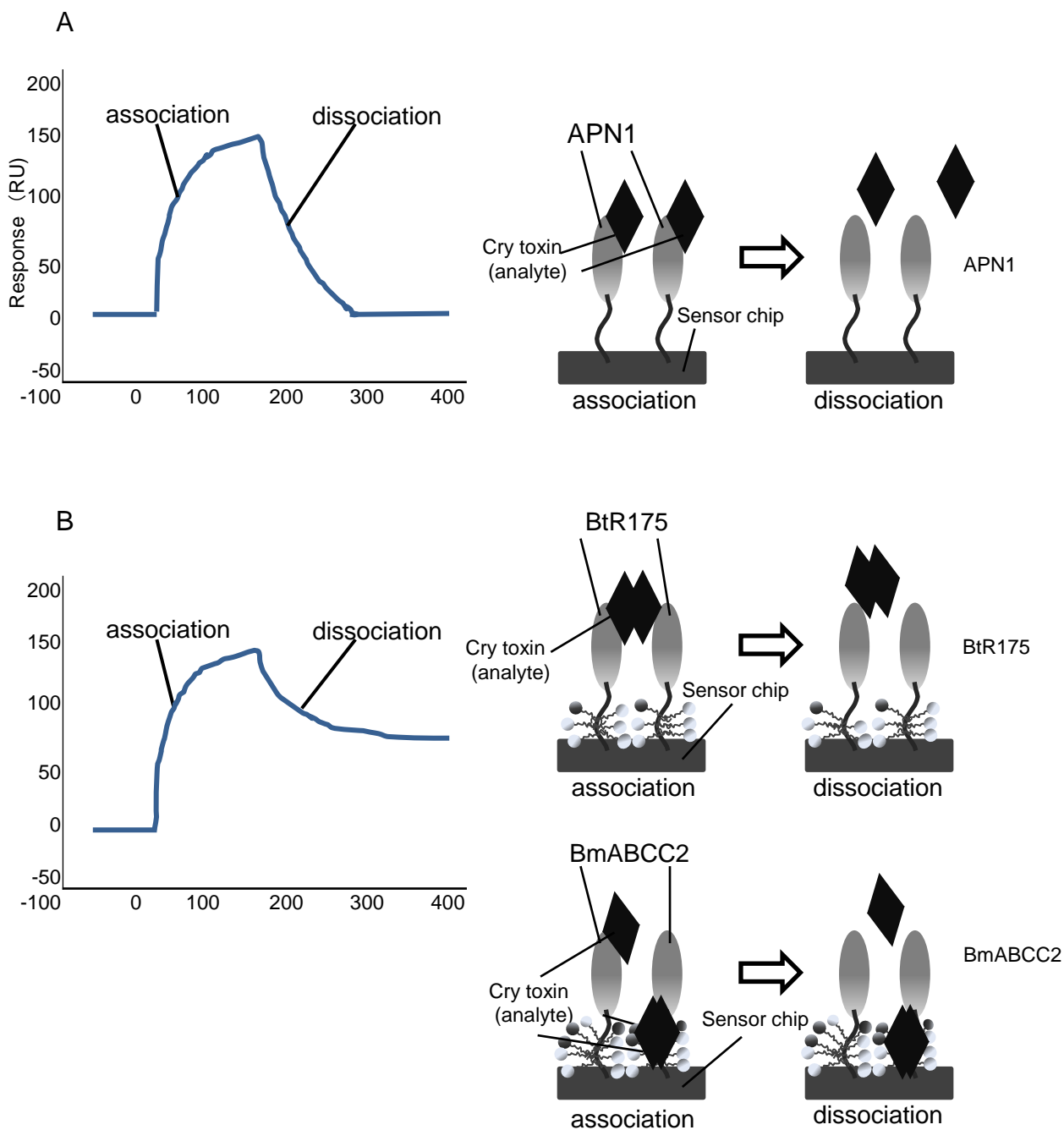


Fig. 48. Schematic of the kinetic profile drawn by Biacore for the Cry1Aa toxin binding and dissociation to APN1, BtR175 and ABCC2, and hypothetical explanation for the cause of different pattern of each profile. (A) Kinetic profile which fit Cry1Aa-APN1 interaction. (B) represents Kinetic profiles which fit Cry1Aa-BtR175 or Cry1Aa-ABCC2 interaction.

Table 9. Susceptibility to Cry1A toxins of Sf9 cells that expressBmABCC2_S with alanine replacement in the extracellular loop 2 region

Amino acid sequences of the loop 2 region 233-237	Susceptibility against ^a		
	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac
²³³ YISAG ²³⁷ (Wt)	(+)	(+)	(+)
²³³ AISAG ²³⁷	(+)	(+)	(+)
²³³ YAAAG ²³⁷	(+)	(+)	(+)

^a Cells were observed 60 min after treatment with each Cry1A toxin at 100 nM
(+) represents that more than 50 % of swelling cells were observed

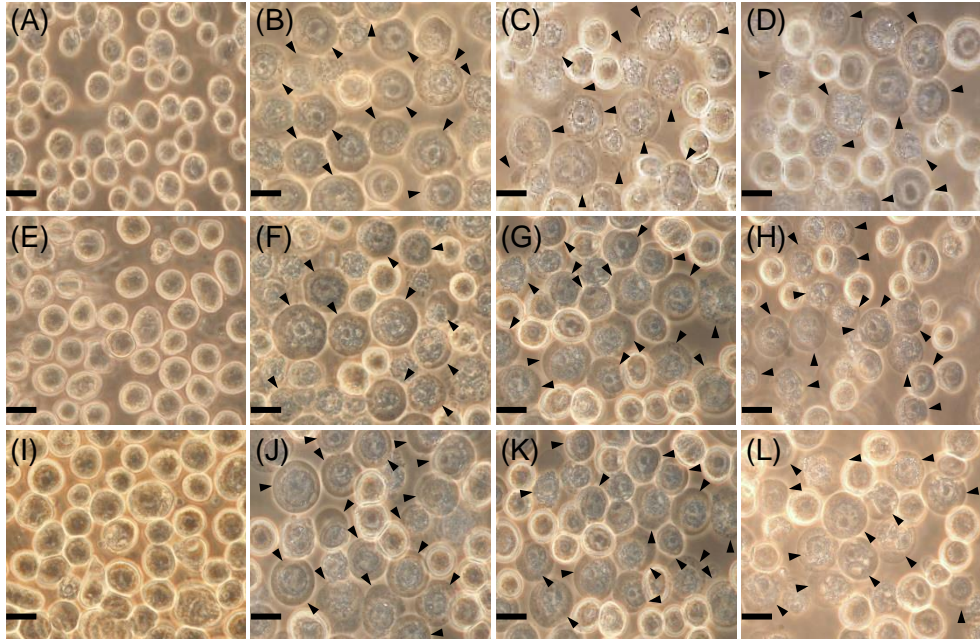


Fig. 49. Morphological changes of ^{233}Y alanine replacement mutant of BmABCC2_S-expressing Sf9 cells administrated with Cry1A toxins. The cells were observed 60 min after administrated with each Cry1A toxin at 100 nM. (A, B, C, D) BmABCC2_S-expressing cells, (E, F, G, H) $^{233}\text{AISAG}^{237}$ mutant-expressing cells, and (I, J, K, L) $^{233}\text{YAAAAG}^{237}$ mutant-expressing cells. (A, E, I), PBS; (B, F, J), 100 nM Cry1Aa; (C, G, K), 100 nM Cry1Ab; (D, H, L), 100 nM Cry1Ac. Scale bar represents 10 μm . Slightly refractive swollen cells are indicated by arrowheads.

Table 10. Susceptibility to Cry1A toxins of Sf9 cells that express BmABCC2_S with extra 1 amino acid insertion behind ²³³Y.

Insertion	Susceptibility against		
	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac
²³⁴ Y(BmABCC2_R)	(+)	(-)	(-)
²³⁴ A	(+)	(-)	(-)
²³⁴ F	(+)	(-)	(-)
²³⁴ R	(+)	(-)	(-)
²³⁴ W	(+)	(-)	(-)
²³⁴ H	(+)	(-)	(-)

^a Cells were observed 60 min after treatment with each Cry1A toxin at 100 nM .

(+) represent that more than 50 % of swelling cells were observed

(-) represent that less than 10 % of swelling cells were observed

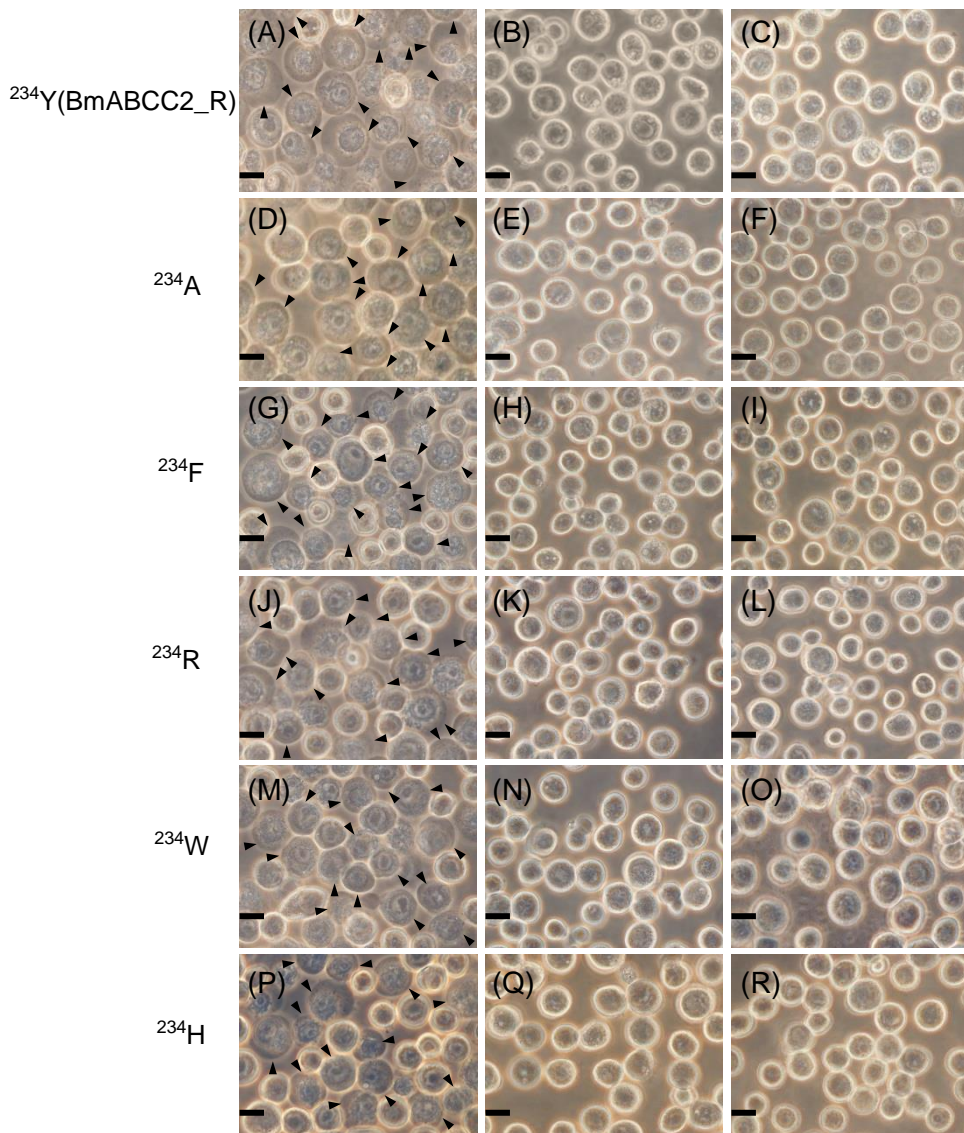


Fig. 50. Morphological changes of Alanine insertion mutant of BmABCC2 against Cry1A toxin.

The cells were observed 60 min after administrated with each Cry1A toxin 100 nM. (A, D, G, J, M, P) Cry1Aa 100 nM, (B, E, H, K, N, Q) Cry1Ab 100 nM, (C, F, I, L, O, R) Cry1Ac 100 nM. Scale bar represent 10 μ m. Slightly refractive swollen cells are indicated by arrowheads.

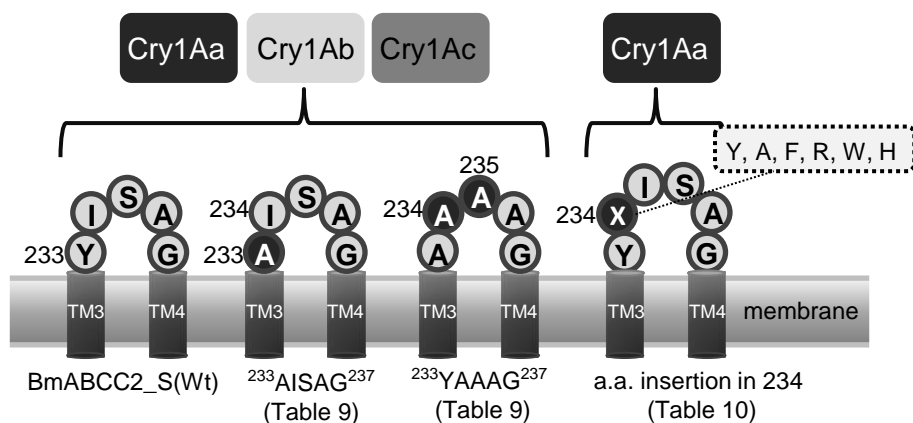


Fig. 51. Schematic of amino acid insertion effect in extracellular loop2 region of BmABCC2 to each Cry1A toxin.

The conformation of 6 amino acid at loop2 region influenced Cry toxin's interaction. Amino acid replacement mutants described in Table 9 interact with Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac, whether the mutants which were inserted a amino acid in 234 interact only Cry1Aa toxin.

Table 11. Susceptibility to three Cry1A toxins of the cells expressing BmABCC2_S mutants having replacement with alanine in the extracellular loop regions.

Extracellular loop reagon alanin replacement mutants of BmABCC2_S			Susceptibility against*		
loops	Amino acid sequences of the loop region	replaced amino acids	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac
loop1	¹¹⁸ VFAELLSYWSVEATITRLE ¹³⁶	Y ¹²⁵	(+)	(+)	(+)
		W ¹²⁶	(+)	(+)	(+)
		S ¹²⁷	(+)	(+)	(+)
loop2	²³⁴ YISAG ²³⁸	Y ²³⁴	(+)	(+)	(+)
		S ²³⁶	(+)	(+)	(+)
		²³⁵ IS ²³⁶	(+)	(+)	(+)
loop3	³⁴⁷ PIQQY ³⁵¹	³⁴⁷ PIQ ³⁵⁹	(+)	(+)	(+)
		³⁴⁸ IQQ ³⁵⁰	(+)	(+)	(+)
		I ³⁴⁸	(+)	(+)	(+)
		Q ³⁴⁹	(+)	(+)	(+)
loop4	⁷⁵⁵ MVVTLVITQGCATFIDYWLSFWTNQVD EYEQSLAEGEEPSTSLDTQAGAFTLGV ⁸⁰⁸	⁷⁷⁹ QVD ⁷⁸¹	(+)	(+)	(+)
		⁹⁰⁶ LPW ⁹⁰⁹	(+)	(+)	(+)
loop5	⁹⁰⁵ ALPWT ⁹⁰⁹	⁹⁰⁷ PWT ⁹¹⁰	(+)	(+)	(+)
		W ⁹⁰⁹	(+)	(+)	(+)
loop6	¹⁰¹¹ IDFST ¹⁰¹⁹	¹⁰¹² DFS ¹⁰¹⁴	(+)	(+)	(+)

*Cells were observed 60 min after treatement with each Cry1A toxin at 100 nM.

(+) represents that more than 50 % of swelling cells were observed

(-) represents that less than 10 % of swelling cells were observed

Table 12. Susceptibility to three Cry1A toxins of the cells expressing BmABCC2_S mutants having amino acid deletion in the extracellular loop regions (ECL1 and 4).

mutation position	Susceptibility against		
	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac
ECL1 120-127	-	-	-
ECL1 121-131	-	-	-
ECL1 122-128	-	-	-
ECL4 788-806	+	+	+
ECL4 770-773	-	-	-
ECL4 770-795	-	-	-
ECL4 773-775	-	-	-
ECL4 779-781	+	+	+
ECL4 783-787	+	+	+
ECL4 786-788	+	+	+

*Cells were observed 60 min after treatment with each Cry1A toxin at 100 nM.

(+) represent that more than 50 % of swelling cells were observed

(-) represent that less than 10 % of swelling cells were observed

A

ECL1 ¹¹⁸VFAELLSYWSVEATITRLE¹³⁶
ECL1 120-127 ¹¹⁸VF**AELLSYWS**VEATITRLE¹³⁶
ECL1 121-131 ¹¹⁸VFA**EELLSYWSVEAT**ITRLE¹³⁶
ECL1 122-128 ¹¹⁸VFAE**LLSYWSV**EATITRLE¹³⁶

B

EC4 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFIDYWLSFWTNQVDEYEQSLAEGEEPSTSLDTQAGFTLG⁸⁰⁸
ECL4 788-806 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFIDYWLSFWTNQVDEYEQSLAEGEEPSTSLDTQAGFTLG⁸⁰⁸
ECL4 770-795 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFI**DYWLSFWTNQVDEYEQSLAEGEEPST**SLDTQAGFTLG⁸⁰⁸
ECL4 770-773 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFI**DYWL**SFWTNQVDEYEQSLAEGEEPSTSLDTQAGFTLG⁸⁰⁸
ECL4 773-775 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFIDYW**LS**FWTNQVDEYEQSLAEGEEPSTSLDTQAGFTLG⁸⁰⁸
ECL4 779-781 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFIDYWLSFWTN**QV**DEYEQSLAEGEEPSTSLDTQAGFTLG⁸⁰⁸
ECL4 783-787 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFIDYWLSFWTNQVDE**YEQ**SLAEGEEPSTSLDTQAGFTLG⁸⁰⁸
ECL4 786-788 ⁷⁵⁵MVVTLVITQGCATFIDYWLSFWTNQVDEYEQ**SLA**EGEEPSTSLDTQAGFTLG⁸⁰⁸

Fig. 52. Amino acid sequences of extracellular loop region amino acid deletion mutants of BmABCC2_S. Amino acid sequence and mutation position of each ECL1 (A) or ECL4 (B) is described. Bold type represents mutation sequence. Red-letters indicate deletions that conferred receptor function breaking effect to the mutants when mutant BmABCC2_S expressing Sf9 cells were tested at 100 nM Cry1A toxin

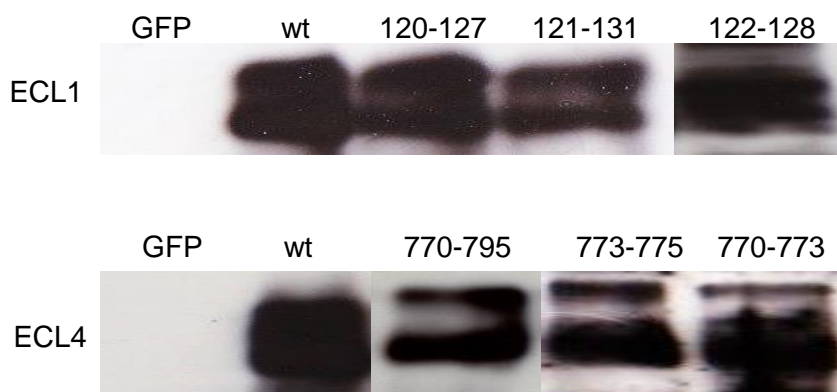


Fig. 53. Western blotting analysis of the expression of BmABCC2_S ECL1 or ECL4 mutants on Sf9 cell membrane. Membrane fractions of Sf9 cells expressing each BmABCC2_S ECL1 or ECL4 mutant were prepared and treated with sample buffer. The samples were separated by SDS-PAGE and detected by anti BmABCC2 antibody.

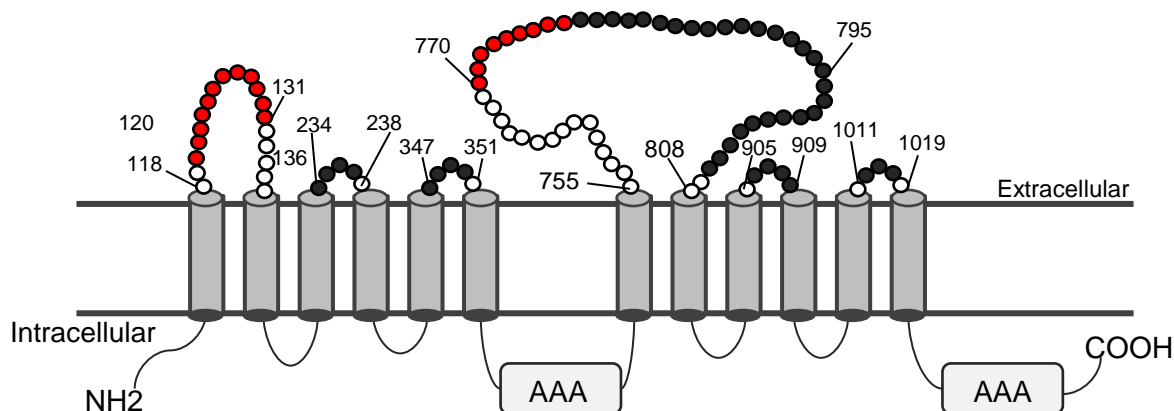


Fig. 54. Diagram of mutations that conferred receptor function breaking effect to *BmABCC2_S*. Red and Gray circles in the pattern diagram represent mutation sites of alanine replacement described in Table 11. or mutation sites of deletion described in Table 12. and Fig. 52. Red circles also represent loss of function generating sites which were suggested by the cell swelling assay described in Table 12. and Fig. 52.

Table 13. oligonucleotides used for making the mutants described in Table 9 and 10

	fragment 1	fragment 2
²³³ AlSAG ²³⁷ (Y ¹²⁵)	5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-CCCGCAGAAATGGCTAAGAAATATAGTACTACAGCCGCTT-3'	5'-TTCTTAGCCATTTCTGCGGGATACGCACCGTTCGTCGGCT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTTCTACC-3'
²³³ YAAAG ²³⁷ (²³⁵ IS ²³⁶)	5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-CCCGCCGCCGCATATAAGAAATATAGTACTACAGCCGCTT-3'	TTCTTATATGCGGCGCGGGATACGCACCGTTCGTCGGCT 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTTCTACC-3'
²³⁴ A	5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GCAGAAATGGCATATAAGAAATATAGTACTACAGCCGCTT-3'	5'-TTCTTATATGCCATTTCTGCGGGATACGCACCGTTCGTCG-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTTCTACC-3'
²³⁴ F	5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GCAGAAATGAAATATAAGAAATATAGTACTACAGCCGCTT-3'	5'-TTCTTATATTCATTTCTGCGGGATACGCACCGTTCGTCG-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTTCTACC-3'
²³⁴ R	5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GCAGAAATTTCTATATAAGAAATATAGTACTACAGCCGCTT-3'	5'-TTCTTATAGAATTTCTGCGGGATACGCACCGTTCGTCG-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTTCTACC-3'
²³⁴ W	5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GCAGAAATCCAATATAAGAAATATAGTACTACAGCCGCTT-3'	5'-TTCTTATATTGGATTTCTGCGGGATACGCACCGTTCGTCG-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTTCTACC-3'
²³⁴ H	5'-CGTgcggccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GCAGAAATGTGATATAAGAAATATAGTACTACAGCCGCTT-3'	5'-TTCTTATATCACATTTCTGCGGGATACGCACCGTTCGTC-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTTCTACC-3'

Table 14. oligonucleotides used for making the mutants described in Table. 11

	fragment 1	fragment 2
Y ¹²⁵	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TGCTTCTACTGACCAGCGGAAAGCAGTTCGGCGAATACT-3'	5'-CCGCCTGGTCAGTAGAAGCAACTATAACTCGACTAGAAGC-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
W ¹²⁶	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TGCTTCTACTGAGCGTAGGAAAGCAGTTCGGCGAATACT-3'	5'-CCTACGCCTCAGTAGAAGCAACTATAACTCGACTAGAAGC-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
S ¹²⁷	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TGCTTCTACGCGCCAGTAGGAAAGCAGTTCGGCGAATACT-3'	5'-CCTACTGGCCGTAGAAGCAACTATAACTCGACTAGAAGC-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
³⁵⁷ PIQ ³⁵⁹	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TTGGGCGGCGCGCTAAATCAGAGTAGCTGTAACAAGGTTA-3'	5'-TGATTTACGCCGCGCCCAATACATCAGCATTATTCAAAT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
³⁴⁸ IQQ ³⁵⁰	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TGCTGATGTAGCGCGCGCAGGGTAAATCAGAGTAGCTGT-3'	5'-TGCCGCGCGCTACATCAGCATTATTCAAATCAATTTGACT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
I ³⁴⁸	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TTGTTGGGCAGGGTAAATCAGAGTAGCTGTAACAAGGTTA-3'	5'-TGATTTACCCTGCCCAACAATACATCAGCATTATTCAAAT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
Q ³⁴⁹	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TGCTGATGTATTGGGCAATAGGGTAAATCAGAGTAGCTGT-3'	5'-TATTGCCCAATACATCAGCATTATTCAAATCAATTTGACT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
⁷⁷⁹ QVD ⁷⁸¹	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-CATACTCGGCGGCGCATTGTCCAAAACTCAGCCAATA-3'	5'-AAATGCCGCGCCGAGTAGAACAATCTTTAGCTGAGGGA-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
⁹⁰⁶ LPW ⁹⁰⁹	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GTTGGGATCAACGTGGCGGCGCTGCTATAGCATTTAAATAAGT-3'	5'-GCAGCCGCCGCCACGTTGATCCCAACAGCGGTACTTTTGA-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
⁹⁰⁷ PWT ⁹¹⁰	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-CAAGGCGGCGGCTAATGCTATAGCATTTAAATAAGTATA-3'	5'-TAGCATTAGCCGCCGCTTGATCCCAACAGCGGTACTTTT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
W ⁹⁰⁹	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-CAACGTGGCCGTAATGCTATAGCATTTAAATAAGTATA-3'	5'-TAGCATTACCGGCCACGTTGATCCCAACAGCGGTACTTTT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'
¹⁰¹² DFS ¹⁰¹⁴	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TAAAGTGGCGGCGGATTACAAGGAAGATCGTCAATATC-3'	5'-TAATCGCCGCCGCACTTAATCCCGTCGGTAGCGTGGG-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTTCTGTATTCTACC-3'

Table 15. oligonucleotides used for making the mutants described in Table. 12

	fragment 1	fragment 2
EC1 120-127	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TCTAGTCGAGTTATAGTTGCTTCGAATACTAGCGGCTGAA-3'	5'-TTCAGCCGCTAGTATTCGAAGCAACTATAACTCGACTAGA-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC1 121-128	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-AATAGCTTGCTTCTAGTCGGTAGGAAAGCAGTTCGGCGA-3'	5'-GAACTGCTTTCCTACCGACTAGAAGCAAGCTATTATGCTC-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC1 122-131	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-CTTGCTTCTAGTCGAGTTATTTGCGCGAATACTAGCGGCT-3'	5'-AGCCGCTAGTATTCGCCGAAATAACTCGACTAGAAGCAAG-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC4 788-806	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TAAAGATTGTTCACTACTCATCAACTTG-3'	5'-GGAGTATACCTTTGGACTTATGG-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC4 770-773	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-TCAACTTGATTGTCCAAAACTTATGAACGTCGCACATC-3'	5'-GATGTGCGACGTTTCATAAGTTTTGGACAAATCAAGTTGA-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC4 770-795	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GCGTGTCCAACTTATGAACGTCGCACATCCTTG-3'	5'-GATGTGCGACGTTTCATAAGTTTTGGACACGCAAGCCGGAGC-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC4 773-775	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-ATACTCATCAACTTGATTTGTCCGCCAATAATCTATGAAC-3'	5'-GTTCATAGATTATTGGCGGACAAATCAAGTTGATGAGTAT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC4 779-781	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-AAGATTGTTCACTACTCATCAACTTGAAACTCAGCCAATA-3'	5'-TATTGGCTGAGTTTTCAAGTTGATGAGTATGAACAATCTT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC4 783-787	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-GTGCTCGGTTCTTCTCCCTCAGCCTCATCAACTTGATTG-3'	5'-CAAGTTGATGAGGCTGAGGGAGAAGAACCGAGCACA-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'
EC4 786-788	5'-CGTgcgccgcATGAATAGTGATGGGAGAG-3' 5'-AACTTGTGCTCGGTTCTTCTCCCTCTTGTTCACTCATC-3'	5'-GATGAGTATGAACAAGAGGGAGAAGAACCGAGCACAAGTT-3' 5'-TGAgcggccgcTTTTCTGTATTCTACC-3'

総合考察

本研究では Cry1A 毒素とカイコガを主なる材料にして、Cry 毒素の真の作用機構と個体に死をもたらす仕組みの解明を目的とし実験を行った。第 1 章では、カイコガ幼虫消化管上皮細胞で起こる現象を、毒素による傷害と宿主側のその傷害に対抗しようとする反応の両方にフォーカスを当て、消化管上皮細胞で実際に起こっている Cry 毒素によって誘導される現象の正しい理解を目指した。その結果、カイコガ幼虫個体が死に至る現象における主要な原因は、細胞が短時間で、膨潤、破裂して組織が損傷を受けることであることを再確認した。さらに、カイコガ幼虫個体が死なない sublethal (亜致死濃度下; 死ぬか死なないかぎりぎりの濃度) あるいはそれよりも低い濃度の Cry 毒素条件下においては、アポトーシスが Cry 毒素によって傷害を受けた消化管上皮細胞の速やかな排除と組織更新に寄与すると考えられた (Fig. 2)。これらのことから、Cry 毒素によって誘導される消化管上皮細胞で起こる現象は、Cry 毒素の毒性と宿主の回復に向けた組織更新に基づく治癒反応の闘ぎ合いの結果を見ていることが示唆された。今までの多くの先行研究では、毒素によって宿主の消化管上皮細胞が受ける細胞傷害にばかりフォーカスが当てられてきたのに対し、本研究では、宿主側の毒素による傷害に対抗しようとする応答についても着目することで、今まで見えてこなかった宿主消化管上皮細胞で起こる「膨潤、破裂には及ばないレベルのダメージの存在と、それへの応答としてのアポトーシスという宿主細胞側の応答」を発見することができた。しかしながら、oncosis 様の細胞死や(Zhang, et al. 2006)、免疫反応の関与 (Cancino-Rodezno et al.2010; Bedoya-Perez et al. 2013) など既にいくつかの研究で報告があるように、アポトーシス以外にも毒素によって障害を受けた細胞自体に起こる反応があることが予想される。さらには Cry 毒素によって障害を受けた細胞の周りの組織全体に誘導される反応も存在するものと思われる。すなわち、本研究で見たアポトーシスは、それら Cry 毒素によって誘導される反応

の1つにすぎず、消化管上皮細胞で実際に観察される現象は、より複雑な多くの現象の総和であることが想像された。

第2章以降では、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につながる細胞が膨らんで死ぬ機構に着目した。特に、細胞が膨らんで死ぬという消化管上皮細胞の反応の第一段階である Cry 毒素と消化管上皮細胞の相互作用に必須である受容体分子の解明を試みた。抵抗性研究の結果より分かってきた、**BmABCC2** という今まで一度も殺虫作用機構との関連が報告されたことがなかった分子を培養細胞に発現させ *in vitro* でのバイオアッセイを行い、同分子が受容体であることを証明した。また、Cry1Ab 抵抗性カイコガでみつかった 234 位のチロシンの 1 アミノ酸挿入が確かに Cry1Ab 抵抗性の原因であることも変異型 **BmABCC2** を用いた実験により明らかにした (Fig. 12 and Fig. 13)。 *H. virescens* (Gahan et al. 2010) や、 *P. xylostella* (Baxter et al. 2011) など他の昆虫種においても **ABCC2** 分子が抵抗性の原因として既に報告されていたが、受容体として機能するか否かは未だ確認されていなかった。よって、本研究は、**BmABCC2** が Cry1A 毒素の作用上において最も重要な分子であることを直接的に示した世界で最初の報告となった。さらに、 *P. xylostella* の **ABCC2** である **PxABCC2** についても同様の実験手法により Cry1A 毒素受容体として機能することを示した (Fig. 21)。また、**BmABCC2** と **PxABCC2** の実験結果により、チョウ目昆虫では広く **ABCC2** 分子が Cry1A 毒素受容体として機能することが示唆された。一方、**ABCC2** が Cry1A 毒素を超えた広範囲の Cry 毒素においても受容体として機能するかを検討したところ、系統樹上で Cry1A 毒素とは大きく離れた関係にある Cry8Ca において、**BmABCC2** が受容体として機能することが明らかになった (Fig. 30)。しかしながら、Cry1A に対して Cry8Ca とほぼ同等の距離にある Cry9Aa 毒素 (Fig. 32)は、カイコガ個体に活性があるにも関わらず、**BmABCC2** を受容体として利用しないことが明らかになった (Fig. 27)。また、Cry1A とはさらに遠い関係にある Cry4Aa と *Aedes albopictus* の **ABCC2** (**AaABCC2**) の組み合わせ

せにおいては、ABCC2 分子が受容体として機能する証拠は得られなかった (Fig. 25)。これらのことから、Cry 毒素の系統進化によって生じた Cry1A と Cry8 の間に位置する毒素に関しては ABCC2 を受容体としていることが期待できると思われた。また、同時に、Cry9 よりも遠い関係にある毒素においては、もはや ABCC2 を受容体にしていない可能性を考える必要があると思われた。しかし、ABCC2 を受容体にする Cry 毒素が系統進化の位置づけ通りにきれいに整理できるものではなさそうなことも既に明らかになりつつある。実際、抵抗性研究において、*Pectinophora gossypiella* の Cry1Ac 抵抗性系統に対しては、Cry9Ca ばかりか Cyt1 に属する Cry1Ca が活性を示すと報告 (Tabashnik et al. 2000) されており、それらの毒素が ABCC2 分子以外の分子を受容体として利用していることを意味するものと考えられる。以上のように、本研究では ABCC2 が毒素受容体として機能することと同時に、多くの Cry 毒素が ABCC2 を受容体として利用できないことを明らかにした。今後、ABCC2 が受容体ではないことが推定される Cry4、Cry1Ca、Cry9 を用いてそれらの受容体が解明され、Cry 毒素受容体の多様性が解明されることに期待したい。

また、第 2 章では、BmABCC2 と今まで Cry1A 毒素受容体として最も重要だと考えられてきたカドヘリン様タンパク質 (BtR175) の受容体としての機能を比較し、培養細胞に与える感受性を比べる限りにおいて、BmABCC2の方がはるかに高いことを明らかにした (Fig. 11 and Fig. 18A)。さらに第 3 章では、BmABCC2 と BtR175 の共発現細胞が、BmABCC2 単独発現細胞よりも Cry 毒素に対する感受性が高い、すなわちこれら 2 分子の間に Cry 毒素感受性を高めるような協調作用がみられることを見出した (Fig. 28)。さらに、BmABCC2 と BtR175 の協調作用は、カイコガ個体の感受性と相関関係があるように思われた (Table 6)。このことからカイコガ個体の感受性に関しては、BtR175 と BmABCC2 の 2 分子が重要な決定因子であると考えられた。一方、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験により、2 分子の協調作用の一部は少なくとも、“Pore formation

model” の範囲内で起こる Cry 毒素の小孔の形成の過程に関与していることが明らかとなった (Fig. 37)。今回は、小孔の形成という “Pore formation model” の範囲内で起こる協調作用についてのみ検討したが、培養細胞でみられた 60 分後の毒素によって傷害を受け膨らんだ細胞の割合の比較においては、それ以外の例えば、シグナルトランスダクションが動いておこる細胞死などの要素も含まれた総和を見ているのかもしれない。よってそれらについても検討し、BtR175 と BmABCC2 の間にみられる協調作用の実態を明らかにしていく必要がある。

第 4 章では、まったく情報がなかった BmABCC2 と Cry 毒素との相互作用の実態を捕え、BmABCC2 上の Cry 毒素との相互作用に重要な領域を探索することを目的とし、Biacore を用いて BmABCC2 と Cry 毒素の結合動態を解析した。また、BtR175 の Cry 毒素との結合動態と比較することで、BmABCC2 がより多くの Cry 毒素を細胞膜に挿入させる受容体として BtR175 よりも大きな機能を発揮する手がかりが得られると考え、実験をおこなった。Biacore を使った SPR 解析の結果、確かに、BmABCC2 が Cry 毒素と結合することが確かめられた (Fig. 47)。これは他の昆虫の ABCC2 における先行研究においても未だ到達していない結果であり、ABCC2 を標的とした今後の研究の展開に大きく貢献する成果であると言える。また、この結果は第 2 章で得られた「ABCC2 が受容体機能を発揮する」事実を物理的な一面から見直したものであると考えられる。しかしながら、培養細胞に感受性を付与する能力において ABCC2 は BtR175 よりもはるかに勝っていたが (Fig. 11 and 18)、Cry 毒素との相互作用の特性を示すパラメーター K_A 、 K_D 値は BtR175 と BmABCC2 の間で期待したような大きな差はなかった。その原因として、BtR175、BmABCC2 とともに、1:1 binding では評価できないような結合要素 (BtR175 では avidity、BmABCC2 では界面活性剤が形成する脂質 2 重膜に似た構造に毒素が挿入された) を Cry1A 毒素に対して持つ可能性をセンサグラムの形状から想像することができた (Fig. 48)。この考えは、未だ仮説の範囲でしかないため、今後、Avidity や

膜への挿入がなく 1:1 binding モデルが適応されることが期待される APN の SPR 解析を行い、その結果と比較することをはじめとして、異なる幾つかの系で解析を進めることを介して、信憑性について検討する必要がある。また、BmABCC2 の細胞外ループ 1 や細胞外ループ 4 領域に対するいくつかのアミノ酸欠失変異体が Cry 毒素受容体としての機能を失った結果から、BmABCC2 の Cry 毒素相互作用領域であることが期待される。今後それら機能を失った変異体について SPR 解析を行うことで、確かに Cry 毒素との結合能を失ったことを示す必要がある。一方、細胞外ループ 1 や細胞外ループ 4 領域に生じた変異によって抵抗性が生まれうることも明らかになった。

本研究成果は、Cry1A 毒素殺虫作用機構に今までにないいくつかの新しい知見を追加した。これらは、今後、Cry1A 毒素の範囲を超えた Cry 毒素の殺虫作用機構の解明において大きな貢献をもたらすものと考えられる。さらに、これらは将来、新たに ABCC2 が原因の抵抗性が発達した際に有効な解決策を提案する手助けとなるであろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切なご指導ならびに御教示を賜った、佐藤令一教授に厚く感謝の意を示します。また、学位論文の審査にあたられました安藤哲教授、岩淵喜久男教授、梶田真也准教授、仲井まどか准教授にも深く感謝の意を表します。貴重なご助言とご協力をいただいた生物システム応用科学府生物生物相関システム学研究室の菊田真吾助教に感謝の意を表します。

カイコガを用いた実験を行うにあたり、多大な御協力と御教示をいただいた農業生物資源研究所の宮本和久博士、ならびに東京農工大学蚕学研究室蜷木理教授に感謝の意を表します。

Cry1F 毒素の提供ならびに投稿論文の執筆において多大な御協力と御助言を賜りましたテネシー大学 Juan Luis Jurat-Fuentes 博士に感謝の意を表します。

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的解析の立ち上げを行うにあたり、多くの御協力と貴重な御助言をいただいた生理学研究所神経機能素子研究部門久保義弘教授ならびに同研究室の方々、農業生物資源研究所の朝岡潔博士、そして、東京農工大学メディカルフォトニクス研究室の西舘泉准教授に感謝の意を表します。

ヒトスジシマカと Cry4Aa を用いた実験を遂行するにあたり、多大なるご協力と御助言を賜りました国立感染症研究所佐々木年則博士、岡山大学早川徹助教授に感謝の意を表します。

そして、終始暖かい励ましの言葉をいただき、多くの場面で多大なるご協力、ご助言を賜った、生物相関システム研究室の卒業生の方々、ならびに学友諸氏に心より感謝いたします。特に、生物相関システム学研究室の卒業生である吉澤靖貴博士、小幡史明博士には、多大なるご指導、ご協力を賜りました。重ねて深く感謝の意を表します。また、生物相関システム研究室の飯塚亜美氏には、SPR 解析を行うにあたり、ご

協力、ご助言を賜りました。深く感謝の意を表します。

最後に、終始励ましの言葉をいただき心の支えとなってくださった友人と長期にわたる研究生生活を経済的、精神的に支えてくださった両親に深く感謝の意を表し謝辞に代えさせていただきます。

引用文献

- Abdel-Razek, A. S. (2002). Comparative study on the effect of two *Bacillus thuringiensis* strains of the same serotype on three coleopteran pests of stored wheat. J Egypt Soc Parasitol **32**(2): 415-24.
- Apidianakis, Y., C. Pitsouli, et al. (2009). Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. Proc Natl Acad Sci U S A **106**(49): 20883-8.
- Angus, T. A. (1954). A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature **173**:545-6
- Aronson, A. I., D. Wu, et al. (1995). Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. J Bacteriol **177**(14): 4059-65.
- Atsumi, S., E. Mizuno, et al. (2005). Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. Appl Environ Microbiol **71**(7): 3966-77.
- Atsumi, S., Miyamoto, K., et al (2012) A single amino acid mutation in an ABC transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc Natl Acad Sci U S A **109**, E1591-1598
- Baxter, S. W., Badenes-Perez, F. R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., Kain, W., Wang, P., Heckel, D. G., and Jiggins, C. D. (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. Genetics **189**, 675-679
- Bedoya-Perez, L. P., Cancino-Rodezno, A., Flores-Escobar, B., Soberon, M., Bravo, A. (2013) Role of UPR Pathway in Defense Response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis*. Int J Mol Sci **14**(4), 8467-78
- Beebe, K., W. C. Lee, et al. (2010) JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. Dev Biol

338(1): 28-37.

Berliner, E., Z. (1915) Ang. Entomol., **2**, 29-56

Bischof, L. J., C. Y. Kao, et al. (2008). Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore-forming toxin in vivo. PLoS Pathog **4**(10): e1000176.

Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, Li J. (2005) Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J Mol Biol. **348**, 363–382.

Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. (2006) Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. J Bacteriol. **188**, 3391–3401.

Bravo, A., I. Gomez, et al. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim Biophys Acta **1667**(1): 38-46.

Buchon, N., N. A. Broderick, et al. (2009). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. Genes Dev **23**(19): 2333-44.

Buchon, N., N. A. Broderick, et al. (2009). *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. Cell Host Microbe **5**(2): 200-11.

Cancino-Rodezno, A., C. Alexander, et al.(2010) The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem Mol Biol **40**(1): 58-63.

Champlin DT, Truman JW (1998) Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. Development **125**:269-277

Chen, J., Aimanova, K.G., Fernandez, L.E., Bravo, A., Soberon, M. and Gill, S.S. (2009). *Aedes*

- aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Biochem J **424**, 191-200.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D.H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev **62**, 807-813.
- Derbyshire DJ, Ellar DJ, Li J. (2001) Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **57**, 1938–1944
- Donovan, W. P., Rupar, M. J., Slaney, A. C., Malvar, T., Gawron-Burke, M. C., and Johnson, T. B. (1992) Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 3921-3927
- Driscoll M, Chalfie M. (1992) Trends Neurosci. **15**(1):15-9 Developmental and abnormal cell death in *C. elegans*.
- Fernández-Luna MT, Tabashnik BE, Lanz-Mendoza H, Bravo A, Soberón M, Miranda-Ríos J. (2010) Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. J. Invertebr. Pathol. **104**, 231-233.
- Fernandez-Luna, M.T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M. and Miranda-Rios, J. (2010). An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Environ Microbiol **12**, 746-57.
- Flannagan, R. D., Yu, C. G., Mathis, J. P., Meyer, T. E., Shi, X., Siqueira, H. A., and Siegfried, B. D. (2005) Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). Insect

Biochem. Mol. Biol. **35**, 33-40

- Fortin, A., S. P. Cregan, et al. (2001). APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. J Cell Biol **155**(2): 207-16.
- Fujii, Y., Tanaka, S., Otsuki, M., Hoshino, Y., Morimoto, C., Kotani, T., Harashima, Y., Endo, H., Yoshizawa, Y., and Sato, R. Cry1Aa binding to the cadherin receptor does not require conserved amino acid sequences in the domain II loops. Biosci Rep **33**, 103-112.
- Gahan, L. J., Gould, F., and Heckel, D. G. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. Science **293**, 857-860
- Gahan, L. J., Pauchet, Y., Vogel, H., and Heckel, D. G. (2010) An ABC Transporter Mutation Is Correlated with Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin. PLoS Genet **6**, e1001248
- Gang, H., J. L. Jurat-Fuentes, and M. J. Adang (2004). BtR1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. J. Biol. Chem **279**(27), 28051-28056.
- Gill, M., and Ellar, D. (2002) Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. Insect Mol Biol **11**, 619-625
- Gonzalez-Cabrera, J., Escriche, B., Tabashnik, B.E. and Ferre, J. (2003). Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). Insect Biochem Mol Biol **33**, 929-35.
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R, et al. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J Mol Biol. **254**,447–464.
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, et al. (2001) Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. Acta

- Crystallogr D Biol Crystallogr. **57**, 1101–1109.
- Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Keweshan RS, Dunbar MW (2011) Field-evolved resistance to *Bt* maize by western corn rootworm. PLOS ONE **6**: e22629
- Gomez, I., J. Sanchez, et al. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett **513**(2-3): 242-6.
- Hara, H., Atsumi, S., et al. (2003). A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. FEBS Lett **538**, 29-34.
- Hayakawa, T., Howlader, M.T., Yamagiwa, M. and Sakai, H. (2008). Design and construction of a synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa gene: hyperexpression in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol **80**, 1033-7.
- Heckel, D.G. (2012). Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. Pesticide Biochemistry and Physiology **104**, 103-110.
- Hofmann, C., P. Luthy, et al. (1988). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur J Biochem **173**(1): 85-91.
- Hofte, H., Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev **53**(2), 242-55
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., and Adang, M. J. (2004) Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R(1a) cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. Insect Biochem. Mol. Biol. **34**, 193-202
- Huffman, D. L., L. Abrami, et al. (2004). Mitogen-activated protein kinase pathways defend

- against bacterial pore-forming toxins. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(30): 10995-1000.
- Ibiza-Palacios, M. S., Ferré, J., Higurashi, S., Miyamoto, K., Sato, R., and Escriche, B. (2008) Selective inhibition of binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to cadherin-like and aminopeptidase proteins in brush-border membranes and dissociated epithelial cells from *Bombyx mori*. Biochem J **409**, 215-221
- 石渡繁胤 (1901) 大日本蚕糸会報, **144**, 1-5
- Jenkins, J.L., Lee, M.K., Valaitis, A.P., Curtiss, A., and Dean, D.H. (2000). Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. J Biol Chem **275**, 14423-14431.
- Jenkins, J.L., and Dean, D.H. (2001). Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors. BMC Biochem **2**, 12.
- Jiang, H., P. H. Patel, et al. (2009). Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. Cell **137**(7): 1343-55.
- Jimenez-Juarez, N., C. Munoz-Garay, et al. (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. J Biol Chem **282**(29): 21222-9.
- Jimenez, A.I. et al. (2012). *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. Insect Biochem Mol Biol **42**, 683-9.
- Jurat-Fuentes JL & Adang MJ (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur J Biochem **271**, 3127-3135.
- Jurat-Fuentes JL & Adang MJ (2006) Cry toxin mode of action in susceptible and resistant

- Heliothis virescens* larvae. J Invertebr Pathol **92**, 166-171.
- Jurat-Fuentes, J. L., and Adang, M. J. (2006) The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. Biochemistry **45**, 9688-9695.
- Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning C, Liu C, Wu K, Jackson J, Gould F, Blanco CA, Portilla M (2011) Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. PLoS ONE **6**, e17606.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer **26**(4):239-57.
- Knight, P.J., Knowles, B.H., and Ellar, D.J. (1995). Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. J Biol Chem **270**, 17765-17770.
- Knowles, B. H. a. E., D.J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta. **924**,: 507-518.
- Lee, M.K., Jenkins, J.L., You, T.H., Curtiss, A., Son, J.J., Adang, M.J., and Dean, D.H. (2001). Mutations at the arginine residues in alpha8 loop of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. FEBS Lett. **497**, 108-112.
- Li J, Carroll J, Ellar DJ. (1991) Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature. **353**, 815–821.
- Likitvivatanavong, S., Chen, J., Bravo, A., Soberon, M. and Gill, S.S. (2011). Cadherin, alkaline phosphatase, and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus*

- thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Aedes aegypti*. Appl Environ Microbiol **77**, 24-31.
- Liu, W., S. R. Singh, et al. (2010) JAK-STAT is restrained by Notch to control cell proliferation of the *Drosophila* intestinal stem cells. J Cell Biochem **109**(5): 992-9.
- Loeb, M. J., R. S. Hakim, et al. (2000). Apoptosis in cultured midgut cells from *Heliothis virescens* larvae exposed to various conditions. Arch Insect Biochem Physiol **45**(1): 12-23.
- Loeb, M. J., P. A. Martin, et al. (2001). Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. J Insect Physiol **47**(6): 599-606.
- Luo K, McLachlin JR, Brown MR & Adang MJ (1999) Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells. Protein Expr Purif **17**, 113-122.
- Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Carrière, Y., Dennehy, T. J., Brown, J. K., and Tabashnik, B. E. (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **100**, 5004-5009
- Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. (2001) Structure. **9**, 409–417.
- Mckay R (1997). Stem cells in the central nervous system. Science **276**:66-71.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., and Kogure, M. (1998). Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. Biosci Biotechnol Biochem **62**, 727-734.
- Nagamatsu, Y., Koike, T, et al. (1999). The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa

- toxin. FEBS Lett **460**, 385-90.
- N'Guessan, P. D., B. Schmeck, et al. (2005). Streptococcus pneumoniae R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. Thromb Haemost **94**(2): 295-303.
- NIsitsutsuji-Uwo, Y. E. a. J. (1980). "Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* δ - Endotoxin: Histopathological Changes in Silkworm Midgut." Jornal of Invertebrate pathology **36**: 90-103.
- Obata, F., M. Kitami, et al. (2009). "Analysis of the region for receptor binding and triggering of oligomerization on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin." FEBS J **276**(20): 5949-59.
- Ohba, M., Iwahana, H., Asano, S., Suzuki, N., Sato, R., and Hori, H. (1992) A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles. Lett. Appl. Microbiol. **14**, 54-57.
- Pan MH, C. M., Huang SJ, Yu ZS, Cheng CG, Lu C (2009). "Cloning and Protein Release of Cytochrome C in the Apoptosis Cells of Silkworm, *Bombyx mori*." Scientia Agricultura Sinica.
- Pacheco S, Gomez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodriguez-Almazan C, Gill SS, Bravo A & Soberon M (2009) Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. J Biol Chem **284**.
- Pigott, C.R., and Ellar, D.J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol Mol Biol Rev **71**, 255-281.
- Porta, H., A. Cancino-Rodezno, et al. (2011). Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. Peptides **32**(3): 601-6.
- Ratner, A. J., K. R. Hippe, et al. (2006). Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial

- pore-forming toxins. J Biol Chem **281**(18): 12994-8.
- Roh, J. Y., J. Y. Choi, et al. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J Microbiol Biotechnol **17**(4): 547-59.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T. and Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol J **9**, 283-300.
- Smouse, D. and J. Nishiura (1997). A *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin induces programmed cell death in mosquito larvae. Cell Death Differ **4**(7): 560-9.
- Sousa, M. E., F. A. Santos, et al. (2010) Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. J Insect Physiol **56**(12): 1913-9.
- Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD et al. (2010) Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. J Econ Entomol **103**: 1031–1038
- Tabashnik B. E., Cushing N. L., Finson N., Johson M. W. (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol **83**:1671–1676
- Tabashnik BE, Carriere Y (2010) Field-evolved resistance to *Bt* cotton: bollworm in the U.S. and pink bollworm in India. Southw Entomol **35**: 417–424.
- Tabashnik, B. E., Brevault, T., Carriere, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. Nat Biotechnol **31**(6), 510-21
- Tiewisiri, K., and Wang, P. (2011) Differential alteration of two aminopeptidases N. 207 associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108**, 14037-14042

- Tsuda, Y., Nakatani, F., Hashimoto, K., Ikawa, S., Matsuura, C., Fukada, T., Sugimoto, K., and Himeno, M. (2003) Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). Biochem J **369**, 697-703
- Van Rensburg JBJ (2007) First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to *Bt*-transgenic maize. S Afr J Plant Soil **24**: 147–151.
- van Frankenhuyzen, K. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. J Invertebr Pathol **101**, 1-16
- Wang, G., Wu, K., Liang, G., and Guo, Y. (2005). Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. Sci China C Life Sci **48**, 346-356.
- Xu, X., Yu, L., and Wu, Y. (2005) Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. Appl. Environ. Micro
- Yang, Y., Zhu, Y. C., Ottea, J., Husseneder, C., Rogers Leonard, B., Abel, C., and Huang, F. (2010) Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Insect Biochem. Mol. Biol. **40**, 592-603
- Zhang, S., Cheng, H., Gao, Y., Wang, G., Liang, G., and Wu, K. (2009) Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Insect Biochem Mol Biol **39**, 421-429
- Zhang, J. Y., M. H. Pan, et al. (2010) The genomic underpinnings of apoptosis in the silkworm, *Bombyx mori*. BMC Genomics **11**: 611.

- Zhang, X., M. Candas, et al. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. Cell Death Differ **12**(11): 1407-16.
- Zhang, X., M. Candas, et al. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9897-902.
- Zhou, L., Z. Song, et al. (1999). HAC-1, a *Drosophila* homolog of APAF-1 and CED-4 functions in developmental and radiation-induced apoptosis. Mol Cell **4**(5): 745-55.