

(様式5)

指導教員 承認印	主	副	副
	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ

学 位 （ 博 士 ） 論 文 要 旨

論文提出者	生物システム応用科学府 生物システム応用科学専攻 博士後期課程 _____ 循環生産システム学 _____ 専修 平成 26 年度入学 氏名 _____ 遠藤 悠 _____ Ⓜ				
主指導教員 氏 名	佐藤令一	副指導教員 氏 名	鈴木丈詞	副指導教員 氏 名	
論文題目	<i>Bacillus thuringiensis</i> 殺虫性タンパク質に対する昆虫の感受性を決定する因子に関する研究				
論文要旨 (和文要旨(2000字程度)または英文要旨(500words)) 昆虫病原細菌 <i>Bacillus thuringiensis</i> の主な殺虫成分は Cry 毒素と呼ばれる殺虫性のタンパク質である。Cry 毒素は極めて狭いかつ厳密な殺虫スペクトルを持つが、それは昆虫の中腸上皮細胞上に存在する標的分子 (受容体) との特異的な相互作用の有無や強弱によって決定されていると考えられている。Cry 毒素の作用機構研究は 30 年以上にも渡るが、未だに多くの Cry 毒素において受容体は未知のままであり、殺虫機構も完全には正しく理解されていない。本研究では、2010 年代から Cry 毒素受容体として高い機能を示すことが明らかになってきた ABC トランスポーターに着目し、新規受容体の同定と受容体機能の解析を行った。また受容体との相互作用を経てから細胞が死に至るまでの過程について、それぞれの受容体分子が持つ元来の機能や、細胞膨潤を引き起こす水流入について、Cry 毒素の毒性発揮における貢献度を評価した。 第1章では、カイコガのABCトランスポーターC3 (ABCC3) とよばれる新規Cry1A毒素受容体分子について、そのパラログでありCry1A毒素の主要な受容体として知られるカイコガABCトランスポーターC2 (ABCC2) との比較評価を行った。定量的PCRによる各幼虫齢期におけるmRNA量の比較では、 <i>BmABCC2</i> と <i>BmABCC3</i> は共に1齢から4齢にかけて発現が上昇し、5齢では減少するといったように、齢期ごとの発現パターンは類似していた。 <i>BmABCC2</i> もしくは <i>BmABCC3</i> を異所発現させた培養細胞を用いて、受容体として機能するCry毒素を評価した。その結果、 <i>BmABCC2</i> はCry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry8Ca毒素に対して、 <i>BmABCC3</i> はCry1Aaのみに機能した。 <i>BmABCC3</i> が培養細胞に与えるCry1Aa感受性は <i>BmABCC2</i> よりもおよそ100倍低かった。表面プラズモン共鳴を用いた結合親和性の解析では、 <i>BmABCC2</i> と <i>BmABCC3</i> 共にCry1Aaに対して高親和性で結合し、 <i>BmABCC2</i> はCry1Abに対しても同様に結合した。一方で <i>BmABCC3</i> はCry1Abとほとんど結合せず、結合性の差異が <i>BmABCC2</i> と <i>BmABCC3</i> のCry1Abに対する受容体機能の差異を生み出していることが示唆された。これらの結果から、 <i>BmABCC2</i> と比較して <i>BmABCC3</i> がCry毒素受容体として機能する範囲は狭く、またCry1Aaに対する受容体機能も低いことが示唆された。 第2章では、昆虫ABCトランスポーターサブファミリーCに属する分子のうち、Cry1A毒素受容体として知られてきた鱗翅目昆虫のABCC2に近縁であるものについて、Cry毒素の受容体として機能するかどうか評価した。鞘翅目昆虫であるコクヌストモドキにおいて最もABCC2に近縁な分子TcABCC4A/1は、鞘翅目昆虫に特異的なCry8Ca毒素に対する感受性を培養細胞に付与したが、同じ鞘翅目昆虫特異的なCry3Bb毒素を含む他のCry毒素受容体としては機能しなかった。これは鞘翅目昆虫においてもABCトランスポーターがCry毒素として機能することを示した初の例であり、ABCトランスポーターを介した作用機構がCry毒素の共通の機構であることを示唆した。一方でヒトスジシマカやヒトにおけるABCC2近					

縁ABCトランスポーターは調べたCry毒素のいずれに対しても受容体機能を示さなかった。解析したABCトランスポーターのCry毒素に対する特異性は、昆虫個体のCry毒素感受性と概ねよく相関しており、標的昆虫が独自に持つABCトランスポーターを介したCry毒素の毒性発揮が、その殺虫特異性と関連することが示唆された。

第3章では、カドヘリン様タンパク質とABCトランスポーターについて、それぞれの分子が持つと想定される特有の分子機能が受容体機能に必要なか否かについて解析した。カドヘリン様タンパク質は、Cry毒素との結合によってシグナル伝達系を惹起する可能性が示唆されており、またカドヘリンタンパク質ファミリーに属する分子は一般に細胞骨格と連結している。そこで細胞内領域を欠損したカドヘリン様タンパク質の変異体を作り出し培養細胞に発現させ、Cry1A毒素に対する受容体機能を評価した。その結果、細胞内領域欠損変異体は野生型と同程度のCry1A感受性を培養細胞に与えた。ABCトランスポーターは基質を輸送するタンパク質であるが、輸送活性やそれに伴う構造変化がCry毒素の受容体機能に必要なか否かは不明であった。そこでまずABCC2の輸送活性を評価するにあたり、蛍光イオンインジケーターがABCC2によって輸送されることを見出し、輸送活性に関係すると想定された部位に変異を導入した変異体の輸送活性とCry毒素受容体機能の相関を評価した。その結果、輸送活性を失った変異体も野生型ABCC2に匹敵する受容体機能を維持していることが示された。以上の結果から、これら2種類のCry毒素受容体は単なるCry毒素の結合対象であり、受容体特有の分子機能はCry毒素受容体としての機能に貢献しないことが示唆された。

第4章では、Cry毒素が引き起こす細胞死における水流入の貢献を評価した。Cry毒素は標的細胞の細胞膜上で受容体との相互作用を経て、小孔を形成し、細胞を膨潤させてネクロシスを引き起こす。細胞膨潤を引き起こす直接的な因子であるはずの水流入に関しては、他の細菌性孔形成毒素を含めても、細胞死における貢献度や水が流入する経路についての研究例はほとんどない。そこで水チャネルとして知られるアクアポリン (AQP) に着目し、水流入の経路や細胞死における貢献度を評価した。アクアポリン阻害剤*S*-methylmethanethiosulfonate (MMTS) 処理したBmABCC2発現Sf9細胞では、Cry1Aa毒素に対する細胞膨潤と乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出が完全に消失した。このときMMTSはCry毒素の受容体に対する結合やオリゴマー化、孔形成を阻害しなかった。逆に、カイコガ由来のAQP過剰発現Sf9細胞では、Cry1C毒素に対する細胞膨潤およびLDH放出のスピードが有意に速くなった。これらの結果より、Cry毒素が引き起こす細胞内への水流入の主な経路はAQPであり、水流入そのものがCry毒素による細胞死を直接決定づける因子であることが示された。

第5章では、Cry1Aa毒素に高感受性のカイコガ幼虫とそれより200倍以上の低感受性を示すアズキノメイガ幼虫を材料に、両者の感受性の差異を決定する因子を解析した。カドヘリン様タンパク質、アミノペプチダーゼN1、ABCC2、およびABCC3の4種の受容体候補分子を培養細胞に発現させ、両昆虫由来の受容体分子が培養細胞に付与する感受性を比較したが、両昆虫の受容体機能の差異は感受性の差異とは相関しなかった。消化液による毒素前駆体の分解活性についても差異は認められなかった。これらのことは、アズキノメイガのCry1Aa低感受性が、消化液や受容体といったCry毒素に対する感受性決定因子以外に依存して生み出されていることを示唆した。