## カイコアミノペプチダーゼNの培養昆虫細胞膜への発現提示と 殺虫性毒素 Cry トキシン受容体機能の解析

野口理恵子<sup>1</sup>・石川寿樹<sup>1</sup>・萩野谷功輔<sup>1</sup>・蔀 泰幸<sup>1</sup>・佐藤令一<sup>2</sup>・早川 徹<sup>1</sup>・堀 秀隆<sup>1</sup>\*

#### 要 約

カイコガ( $Bombyx\ mori$ )幼虫の中腸上皮細胞アピカル膜上のブラシ状膜(Brush Border Membrane;BBM)に存在するタンパク質のアミノペプチダーゼ N1(BmAPN1)は、鱗翅目昆虫を特異的に殺す毒素 Cry1Aa の受容体と考えられているが、その確証は未だ示されていない。BmAPN1が毒性発揮へ関与するかを確認するために、BmAPN1を培養昆虫細胞膜に発現させ Cry1Aa との相互作用を調査した。昆虫培養細胞株の High Five 細胞を用いたバキュロウイルス発現系を構築した。組換ウイルスの感染により、感染処理から48時間後には110 kDa の BmAPN1が発現し細胞膜上に提示された。アミノペプチダーゼ活性は非感染細胞の10倍あり、BmAPN1の活性が保持されていることが示された。High Five 細胞に発現した BmAPN1の分子サイズは、BBM 上に存在する BmAPN1と同程度で、細胞膜上に存在した。

組換 BmAPN1が活性を持ちしかも細胞膜上に提示されたことで、この発現システムは、アミノペプチダーゼと Cryl Aa との相互作用を解析する上で非常に役立つと期待された。

新大農研報. 60:73-81. 2007

キーワード:アミノペプチダーゼ N、Bacillus thuringiensis、バキュロウイルス、Bombyx mori、殺虫性タンパク

土壌細菌 Bacillus thuringiensis (BT) が生産する殺虫性タンパク質結晶体 (ICP、Insecticidal Crystal Protein) は昆虫幼虫に強い殺虫活性を示し、広く世界で、農業害虫防除やマラリアのような昆虫媒介性の感染症の拡大防止などに利用されている。しかし、BT 殺虫剤のより高い安全性や殺虫性を改良する点で不可欠である作用機構の詳細は多くの点で未解明である。

昆虫幼虫に対する殺虫機構は以下のように考えられている。即ち、ICPが昆虫幼虫の強アルカリ中腸消化液で可溶化され、トリプシン様のタンパク質分解酵素で限定分解され、活性化Cryトキシンになった後、中腸上皮細胞アピカル膜上にあるCryトキシン受容体と結合する。結合によって分子型が変化し、トキシンのドメインIに有る $\alpha$ -ヘリックスが細胞膜に非常に接近し、分子間の疎水的相互作用によって細胞膜に陥入し、膜に小孔を形成する。この蔗糖を通すほどの穴を通してイオン、水の流出入が起こり、細胞の浸透圧が変化することで幼虫が死亡する

Cry トキシン受容体にはいくつかの候補があるが、中でも注目されているのが膜タンパク質のアミノペプチダーゼN(APN)である。

APN は昆虫や哺乳類の小腸や腎近位尿細管の上皮細胞、繊維芽細胞などの細胞膜上に局在する糖タンパク質性のプロテアーゼで、N末端がロイシン、アラニンなどの中性アミノ酸のタンパクを基質とし、そのカルボキシル基側のペプチド結合をN末端側から切断していく酵素である。鱗翅目昆虫の中腸上皮細胞膜上に存在する APN は、一次構造の相同性によって 1 から 5 までのクラスに分類されている(Herrero et al., 2005)。Cry トキシンの受容体候補となっているものは、タバコスズメガ(Manduca sexta)の <math>120kDaAPN(MsAPN1)(Garczynski et al., 1995; Knight et al., 1994)、Heliothis virescens

170kDaAPN (Rajagopal et al., 2003)、110kDaAPN (Banks et al., 2001)、Plutella xylostella APN1 (Denolf et al., 1997)、Bombyx mori 96kDaAPN (Shitomi et al., 2006) などがある。

鱗翅目昆虫のカイコ(Bombyx mori)は古くから実験昆虫として用いられ、遺伝子や生体機能が盛んに研究されているが、カイコは Cry1Aa に対して高感受性であるため、Cry1Aa の受容体を特定する研究材料として利用されてきた。カイコからは4種類の APN アイソフォームが同定されていて、受容体候補に挙げられたのが Class1 に属する APN1(BmAPN1)である。Cry1Aa と BmAPN1 との結合をリガンドブロットや表面プラズモン共鳴で解析すると強い結合を示し(Jenkins et al., 2001;Yaoi et al., 1997;Shitomi et al., 2006)、BmAPN1 におけるCry1Aa の結合領域も特定された(Yaoi et al., 1999;Nakanishi et al., 2002)ことから、BmAPN1 が Cry1Aa の受容体として示唆されている。

しかし、これらの結合実験では Cry1Aa と BmAPN1 との結合を示したものの、構造変化を起こして細胞膜に陥入し、細胞が崩壊する事を示すことは原理的に容易ではない。これまでの研究報告には、中腸上皮細胞の膜タンパク質に Cry トキシンが結合するが幼虫が死に至らない例もあり(Shinkawa et al., 1999; Kumaraswami et al., 2001; Higuchi et al., 2007)、トキシンと結合する事を以て受容体と認定するには不十分である。

BmAPN1 が毒性発揮に関わる受容体であるか同定できれば、 作用機構の解明は大きく前進するに違いない。

我々は、培養昆虫細胞膜表面に組換え APN タンパク質を発現できれば、上記の目的を達成できると考え研究を行った。培養細胞を用いる利点は、以下の3つが挙げられる。

1) 大腸菌を宿主に用いたときにみられる、組換えタンパク質

<sup>1</sup>新潟大学大学院自然科学研究科

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>東京農工大学・大学院共生科学技術研究院 先端生物システム学部門

<sup>\*</sup>代表著者:hide-hri@gs.niigata-u.ac.jp

の封入体を形成することなく、発現タンパク質は立体構造を保持していると期待できる点。

- 2) 真核細胞の培養昆虫細胞は、糖鎖などの修飾が正常に起こると期待できる点。
- 3) 発現タンパク質を細胞膜上に提示し、中腸上皮細胞膜上に ある場合とほぼ同じ存在状態を再現して解析出来ると期待でき る諸点である。

培養細胞膜に受容体候補タンパク質を発現提示する事は、これまでにプラスミド DNA とウイルスを使用した 2つの場合がある(Banks et al., 2001; Flannagan et al., 2005; Hua et al., 2004; Luo et al., 1999; Tsuda et al., 2003)。このうちウイルスの系では、昆虫特異的に感染するバキュロウイルスを用いて培養昆虫細胞に目的のタンパク質を発現させている。この系の利点は、目的タンパク質の発現量が多いこと、活性を持ったタンパク質が発現すること、大量精製が可能であること(Rajagopal et al., 2003; Simpson and Newcomb, 2000)であり、毒性発揮機構に関わる真の受容体を探索する方法として非常に有効であると考えられる。

我々は、CrylAa の受容体と考えられる BmAPN1 をイラクサキンウワバ(*Trichoplusia ni*, Hübner)由来の培養細胞である High Five 細胞に発現させ、発現タンパク質の活性や発現部位などの解析を試み幾つかの知見を得たので発表する。

#### 材料および方法

#### 1. 昆虫培養細胞

昆虫培養細胞の High Five細胞 (*T. ni*, Lepidoptera: Noctuidae、ヤガ科イラクサキンウワバの卵巣由来)、Sf21細胞 (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera: Noctuidae、ヤガ科ヨトウ・フルギペルダ由来)は、カリフォルニア大学デービス校の Dr. S.G. Kamita 氏から分譲していただいた。

#### 2. 昆虫培養細胞の培養

High Five 細胞は接着して増殖する培養細胞なので、底面積が 25cm² の組織培養用フラスコ(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)に 5 ml の培地を入れて 27℃、暗所で培養した。培地は、EXPRESS FIVE® SFM 培地(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)(以下、EF 培地)である。

細胞の継代は、顕微鏡観察によって細胞が  $3.0 \times 10^6$  個 / フラスコ程に増えたことを確認し、 $0.7 \times 10^6$  個 / フラスコとなるように EF 培地で 5 ml に希釈して、新しいフラスコに入れて 27°C、暗所で培養した。

#### 3. カイコ中腸上皮細胞アピカル膜の調製

カイコ幼虫 (*B. mori*、品種名:春嶺×鐘月) から中腸を採取し、上皮細胞アピカル膜 (Brush Border Membranes: BBM) を調製した。

長野県上田蚕種株式会社から購入した卵を、プラスチックシャーレ (10mm 径) に濾紙を敷き、1シャーレ当たり 100 粒程度の卵をまいて、25℃、暗条件下で 10 日間培養し孵化させた。2齢までの幼虫には1日1回人工飼料 (シルクメイト 2S; 日本農産工業株式会社、横浜、神奈川) を与えた。3齢からは新聞紙を敷いたプラスチックタッパ (15cm × 30cm) に移し、同じ人工飼料を朝・夕2回与えた。カイコ幼虫は孵化した後、4回脱皮して5齢幼虫まで成長する。本研究では、脱皮してから2日後の5齢カイコの中腸を用い、Wolfersbergerら (1987)の調製法を改変した Shitomiら (2006) の方法に従って

BBMV (BBM Vesicle) 画分を調製した。

#### 4. 昆虫培養細胞の全膜画分の調製

昆虫培養細胞を培養容器から遠心チューブに回収し、800 × g、4 $^{\circ}$ で5分間遠心分離した。沈殿を回収し、5 mM EDTA を含む PBS に懸濁した後、一部を少量取って等量の0.3%(w/ v) トリパンブルー溶液を入れて細胞数を測定した。残りの細胞は PBS で 2 回洗浄した後、沈殿を回収し、1 mM PMSF、6  $^{\circ}$ μg/ml Leupeptin、1  $^{\circ}$ μg/ml Aprotinin を含んだ PBS に懸濁して、ホモジナイザーで1,300 rpm で 2 分間細胞を破砕した。破砕液を遠心チューブに移し、1,000 × g、4 $^{\circ}$ で10 分間遠心分離した。核と未破砕の細胞を含む沈殿は除去し、上清を回収して遠心チューブに移し、100,000 × g、4 $^{\circ}$ で更に1時間遠心分離した。得られた上清を可溶性画分、沈殿を全膜画分とした。沈殿を PBS に懸濁し、Bradford 法(1976)でタンパク質量を求めた。

#### 5. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は濃度 7.5%のポリアクリルアミドゲルを用い、 Laemmli (1970) の方法に準じて行った。タンパク質サンプル 20μl に、サンプルバッファー (10% (w/v) SDS, 40% (v/v) 2-Mercaptoethanol. 20% (v/v) Glycerol. 0.08% (w/v) Bromo phenol blue (BPB), 50mM Tris-HCl; pH 6.8) & 4  $\mu$  l 加えて、95℃で3分間煮沸し、タンパク質を変性させた。1ウェ ルに 30 ug 相当のタンパク質 (20 ul) を充填して SDS-PAGE を行った。泳動は泳動装置(ラピタス・スラブ電気泳動槽、 AE6200, ATTO corporation, Tokyo, Japan) を用い、ランニ ングバッファー (384 mM Glycine, 50 mM Tris-HCl; pH 8.4, 0.1% (w/v) SDS) 中で、ゲル1枚につき 25 mA の定電流で行っ た。 泳 動 終 了 後 の ゲ ル は CBB 染 色 液 (0.2 % (w/v) Coomassie brilliant blue R-250, 10% (v/v) Acetic acid. 25% (v/v) 2-Propanol) に約1時間浸漬し、タンパク質を染色した。 その後、ゲルを脱色液 (10% (v/v) Acetic acid, 25% (v/v) 2-Propanol) に浸漬して脱色した。

#### 6. 抗 BmAPN 抗血清を用いたウェスタンブロット解析

SDS-PAGE により分離したタンパク質を転写バッファー (25mM Tris, 192mM Glycine, 20% (v/v) Methanol) に約 15 分間浸漬した。ブロッティング装置(Horizontal Stacket Gel Blotting Device, ATTO) を用いて PVDF メンブレン (Hybond-P, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) & 電気的に転写した。メンブレン 1cm² あたり 2 mA 通電して 2 時間の転写後、メンブレンを1%(w/v)スキムミルクを含む PBST (8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5mM KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 130mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.1% Tween20) に振盪機 (Rotary shaker NR-2: Taitec Corporation, Koshigaya, Saitama, Japan) を用いて速度「3」 で一晩振盪しながらブロッキングした。1%スキムミルクを含 む PBST (PBST-SM) でメンブレンを軽く洗った後、カイコ の APN1 に対する抗体の抗 BmAPN 抗体 (1,000 倍希釈) を含 む PBST-SM に 1 時間振盪しながら浸漬した。PBST-SM で 5 分間ずつ4回洗浄した。その後、パーオキシダーゼ結合抗ウサ ギ IgG 抗体(5,000 倍希釈)を含む PBST-SM にメンブレンを 1時間振盪しながら浸漬した。PBSTで5分間ずつ4回洗浄し、 次いで PBS で 10 分間ずつ 2 回洗浄した。タンパク質と反応し た抗体の検出は、ECL detection kit (Amersham Biosciences) を用いた化学発光法で行い、LAS-3000 (FUJI PHOTO FILM CO. LTD., Minato-ku, Tokyo, Japan) で検出した。

### 7. BmAPN1 組換ウイルスの作製

#### 7-1. 組換バクミド DNA の構築

Invitrogen 社の Geteway system を用いて、Autographa californica multi nuclear polyhedrosis virus(AcMNPV)の組換えバクミド DNA を作製して培養昆虫細胞に導入し、産生した組換えバキュロウイルスを培養昆虫細胞に感染させてBmAPN1の大量発現を試みた。

BmAPN1 の発現系構築に用いたウイルスは、昆虫特異的に 感染するバキュロウイルス科の核多角体病ウイルス (Nucleopolyhedrovirus: NPV) であり、包埋体を形成する特徴 がある。この包埋体はウイルス粒子を包埋するタンパク性の結 晶構造物 (ポリヘドリンタンパク質を含む) で、ウイルス DNA 自身にコードされているタンパク質である。NPV の包埋 体は感染した宿主細胞の核内で大量に形成され、全タンパク質 の  $20 \sim 30\%$ ほどになる。本研究では、BmAPN1 遺伝子をポ リヘドリンプロモーターの下流に挿入したウイルス DNA を構 築し、組換ウイルスを作製して昆虫培養細胞へ感染させ、大量 のタンパク質発現を目指した。完全長の BmAPN1 遺伝子の cDNA (Yaoi et al. 1999) を鋳型とし、BmAPN/F:5'-CACC ATGGCATCTC-GCGGTTTT-3'. BmAPN/R: 5'-TATTATGC CAAATTGACACGAT-3'のプライマーを用いて APN1 遺伝子 を増幅した。PCR 産物を LR clonase (invitrogen) による相同 組換えで pDEST8 (invitrogen) に挿入した。バクミド DNA (The baculovirus shatle vector, bMON14272, 136 kb, invitrogen) を 含む大腸菌 (DH10Bac, invitrogen) に pDEST8 を導入して、 部位特異的遺伝子移入によりバクミド DNA 内に BmAPN1 遺 伝子を挿入した。BmAPN1 挿入組換バクミド DNA を含む大 腸菌からバクミド DNA を抽出した。

#### 7-2. 組換バクミド DNA の昆虫培養細胞への導入

EF 培地で培養している昆虫培養細胞を  $0.5 \times 10^6$  個 /ml となるように 3.5mm ディッシュにまき、27℃で一晩培養した。組換バクミド DNA(0.5μg/100μl EF 培地)と Cell Fectin(6μg/100μl EF 培地)(invitrogen)を混合し、30 分後に 0.8mlの EF 培地で希釈した。細胞を培養した 3.5mm ディッシュに希釈した混合液を静かに入れ、27℃で 6時間静置した後に、2mlの EF 培地を加えて 27℃、暗所で 3 日間培養した。 3 日後、細胞をピペットマンで剥がして培地と共にチューブに移し、 $200 \times g$ 、4℃で 10 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに回収し、 $300 \times g$ 0、 $300 \times g$ 0 中で  $300 \times$ 

#### 7-3. 組換ウイルスの増幅

組換ウイルスを増幅するため、作製した P1 を昆虫培養細胞 High Five 細胞に感染させ、ウイルスを増幅した。培養細胞は培養容器にまいてから 27℃で一晩培養したもの使用した。

 $0.5 \times 10^6$  個の High Five 細胞を培養したディッシュの EF 培地を除去し、P1 を 0.5ml 加え、ディッシュを手で軽く水平方向に 5 回転ほどしてディッシュを揺らし、15 分毎にこれを 4 回繰り返してウイルスを感染させた。 1 時間後、同じディッシュに EF 培地を 1.5ml 加えて 27 $\mathbb{C}$ で更に 3 日間培養した後、ウイルスを含む培地を回収して P2 とした。P2 を使用して P1 の時と同様の感染操作を行い、感染細胞とウイルス液を回収し、

ウイルス液を P3 とした。更に P3 を細胞に感染処理して、細胞とウイルス液(P4)を回収した。感染処理後の細胞は PBS に懸濁し、超音波破砕機(VP-5S, Taitec)の目盛りを「4」に設定して 1 分間破砕、1 分間氷冷する操作を 2 回繰り返した。破砕液を遠心チューブに移し、 $100,000 \times g$ 、4  $\mathbb C$  で 60 分間遠心分離して沈殿を回収した。沈殿に PBS を入れてよく懸濁し、抗 APN 抗血清を用いたウェスタンブロット解析を行って、 $\mathbf BmAPN1$  の発現を確認した。

#### 7-4. Sf21 細胞への APN1-Bac の感染

バキュロウイルス発現系によく使用される Sf21 細胞に、High Five 細胞と同様の方法で P2 を感染処理した。そのウイルス液を回収して P3 とし、High Five 細胞と Sf21 細胞に感染処理を行って BmAPN1 の発現を確認した。

ウイルスを増幅してその力価を測定し、 $1 \times 10^8$  PFU (plaque-forming units)/ml となったウイルス液を以降の実験 に使用した。

#### 8. BmAPN1 発現細胞の作製と解析

#### 8-1. APN1-Bac の昆虫培養細胞への感染

アミノペプチダーゼの活性測定と BmAPN1 の発現の所在を知るための蛍光色素 FITC 標識抗体を用いた顕微鏡観察は、Multiplicity of Infection (MOI) が「10」となるようにウイルスを感染させた細胞で行った。MOI = 10 とは、細胞 1 に対して感染性ウイルスを 10 の割合で感染させると 99%の細胞が感染するウイルスの量のことである。組換ウイルスの増幅の項で述べた方法で昆虫培養細胞へウイルスを感染させ、27°C、暗所で 24 ~ 72 時間培養した。

#### 8-2. BmAPN1 の発現部位の特定-蛍光抗体による顕微鏡 観察-

培養細胞の回収と洗浄は、 $850 \times g$ 、 $4 \, \mathbb{C}$ 、 $5 \, \mathrm{分}$ 間の遠心条件で行った。ウイルス感染から 72 時間後の細胞をエッペンドルフチューブに回収し、PBS(pH 7.5)で2回洗浄した。 2%パラホルムアルデヒドを含む PBS で 20 分間、細胞の固定を室温で行い、その後、更に  $3 \, \%$ パラホルムアルデヒドで 2 時間処理した。固定した細胞を PBS で  $3 \, \mathrm{回洗浄し}$ 、 $1 \, \%$  BSA を含む PBS で室温、 1 時間処理してブロッキングした。細胞を PBS で  $3 \, \mathrm{回洗浄した}$ 後、 $0.5 \, \%$  BSA を含む PBS で抗 BmAPN 抗血清を  $100 \, \mathrm{倍に希釈し}$ 、 $1 \, \mathrm{時間室温で反応させた}$ 。反応後、PBS で  $3 \, \mathrm{回洗浄し}$ 、 $0.5 \, \%$  BSA を含む PBS で  $500 \, \mathrm{倍に希釈し}$ た FITC ラベル抗ウサギ  $1 \, \mathrm{gG}$  抗体と暗所で  $1 \, \mathrm{thg}$  室温で反応させた。細胞を PBS で洗浄して蛍光顕微鏡(励起側フィルター; $470.490 \, \mathrm{nm}$ 、検出側フィルター; $510.550 \, \mathrm{nm}$ 、 $200 \, \mathrm{em}$ )で観察した。

#### 8-3. アミノペプチダーゼ(AP) 活性測定

全膜画分の AP 活性を測定した。全膜画分のタンパク質、 $35\mu g$  を PBS に懸濁してエッペンドルフチューブに入れ、PBSで  $95\mu l$  になるように調製し、これを粗酵素液とした。30℃で 10 分間平衡化した後、 $5\mu l$  の 25mM L-pNA を加えて 30℃で 1 時間反応させた。0.5M Glycine-HCl (pH 3.0)を 400m l 加えて反応を停止し、405 nm の吸光度(A405)を測定した。ブランクは、粗酵素液に 0.5 M Glycine-HCl (pH 3.0)を加えた後、基質溶液を加えて  $A_{405}$ を測定した。

1分間に1nmolのpNA を生産する酵素活性を1単位(mU)

とし、標準検量曲線から得られた式から、酵素活性  $(mU = nmol/min) = 0.2073 \times A_{405}/60/1000$ 、及び比活性 (mU/mg) = means = means

#### 結果および考察

#### 1. BmAPN1 組換えウイルスの構築

Passagelstock (P1) を細胞に感染させ、ウイルス液 (P2) を回収し、更に P2 を細胞に感染処理して P3 を得た。P3 を感染処理した細胞の抗 BmAPN1 抗血清を用いたウェスタンプロット解析を行ったところ、無処理細胞では見られない 110 kDa 付近のバンドが感染処理細胞で特異的に検出された(図 1A レーン I、アスタリスク)。これはカイコ BBMV で 110 kDa に検出された BmAPN1 とほぼ同じ分子サイズであり、感染処理細胞で組換え BmAPN1 が発現していることが確認された。また 50 kDa 付近に強いシグナルが検出されたが、これは無処理細胞と感染処理細胞の両方で同程度検出されたことから、High Five 細胞がもともと持っているタンパク質が非特異的に検出されたものと考えられた。

P3 処理により組換え BmAPN1 の発現が確認されたものの、その発現量はウェスタンブロット解析でもわずかにしか検出されなかった。一般に、バキュロウイルスと昆虫培養細胞を用いた発現系では、感染細胞全タンパク質の2~3割を占める程の目的タンパク質が発現する。組換 BmAPN1 の発現量の少なさはウイルスの増幅が十分でなかった可能性が考えられたため、High Five 細胞をホストとして用い、ウイルスをさらに2回感染・増幅させた (P4 及び P5) が、発現量は増加しなかった (data not shown)。しかし、バキュロウイルスの増幅効率は細胞種によって異なり、High Five 細胞よりも Sf21 細胞で増幅効率が良かったという報告がある (Anderson et al., 1995)。そこで

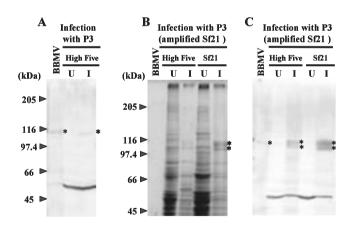


図1. BmAPN1の High Five および Sf21細胞での発現

High Five 細胞で増幅した P3 ウイルス懸濁液を High Five 細胞に感染処理し、72 時間後の細胞全タンパク質を抗 BmAPN1 抗血清によりウェスタンプロット解析した(パネル A)。Sf21 細胞で増幅したウイルスを High Five 及び Sf21 細胞に感染処理し、72 時間後のサンプルを CBB 染色(パネル B)または抗 BmAPN1 抗血清でウェスタンブロット解析した(パネル C)。レーン U:感染無処理細胞、I:感染処理細胞、BBMV:カイコ BBMV 由来の全タンパク質、アスタリスク(\*):BmAPN1 を示す。

ホストを High Five 細胞から Sf21 細胞に変え、P2 からのウイルス増幅を試みた。得られた Sf21 細胞由来 P3 ウイルス液を、High Five 細胞と Sf21 細胞に感染させて BmAPN1 の発現を確認したところ、110 kDa BmAPN1 は両細胞ではっきりと検出され、さらに 105 kDa にも感染細胞に特異的なバンドが検出された(図 1C レーン 1、アスタリスク)。この結果より、ウイルスの増幅には Sf21 細胞の方が適していると考えられたため、これ以降は Sf21 細胞で増幅したウイルスを用いた。

#### 2. 組換 BmAPN1 の昆虫培養細胞内での局在性

感染72時間後のHigh Five細胞を回収し、遠心分離により核、 膜及び細胞質画分に分画した。この内、膜画分と細胞質画分を 用い、CBB 染色と抗 BmAPN1 抗血清によるウェスタンブロッ ト解析を行った。感染処理細胞の膜画分では、発現した BmAPN1 が CBB 染色とウェスタンブロット解析で 110 kDa に確認され、ウェスタンブロット解析ではさらに 105 kDa の タンパク質も検出された(図2)。この2つのタンパク質バン ドは図1で細胞全タンパク質中に検出されたものと同一であっ た。また、BmAPN1 (110 kDa) より小さいサイズ (105 kDa) のタンパク質が検出されたことについては、BmAPN1 は糖鎖 付加などの翻訳後修飾を受けることが知られており(Neema et al., 2002)、105 kDa に検出されたタンパク質は糖鎖修飾を受 けていないか、不完全な前駆体であると考えられた。一方、感 染処理細胞の細胞質画分には特異的な発現タンパク質は検出さ れなかった(図2)。以上の結果より、High Five 細胞で発現 した組換 BmAPN1 は、細胞膜上に局在していることが確認さ カナ

#### 3. ウイルス感染後の High Five 細胞の観察

感染処理後の High Five 細胞の形態変化を顕微鏡で観察した。一般にバキュロウイルスに感染した細胞は核が肥大し、細胞自体も大きくなることが知られている。

感染24時間後には、細胞の大きさは感染前の1.5倍ほどになり、核の肥大も認められた(図3C)。48時間後には多くの細胞が底面に接着できずに浮遊し、72時間後では多くの細胞

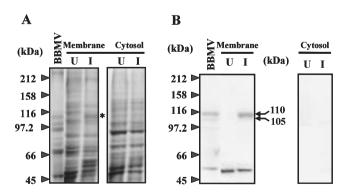


図2. 組換 BmAPN1の細胞内局在

ウイルス感染処理及び無処理細胞を全膜画分と細胞質画分とに分画し、CBB 染色(パネル A)及び抗 BmAPN1 抗血清によるウェスタンブロット解析(パネル B)を行った。レーン U: 感染無処理細胞、I: 感染処理細胞、BBMV: カイコ BBMV、PAPN1 を示す。

が死んでいるように見えた(図 3E、G)。細胞の生死を確認するため、死細胞を特異的に染色する 0.3%トリパンブルーで処理したところ、感染処理したものでは 24 及び 48 時間後で約40%、72 時間後では約50%細胞が染色された。一方、無処理細胞では、72 時間培養しても死細胞の割合は 20%以下であった。以上の結果から、感染細胞を用いた *in vivo* 解析では、感染後 48 時間以内に行うことが望ましいと考えられた。

FITCでラベルした抗 BmAPN1 抗血清を用いて培養細胞に発現した BmAPN1 の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。無処理細胞では、細胞質全体に一様な細胞の自家蛍光が観察された(図 4A)。これは、細胞の特定のタンパク質(フラビンタンパク質等)が青色を吸収し、緑色を発光する蛍光活性を持っているためだと考えられる。一方、ウイルス感染により肥大した High Five 細胞では、自家蛍光に加え細胞膜上にさらに強いシグナルが検出された(図 4C)。この結果からも、発現した BmAPN1 が細胞膜に局在することが確認された。

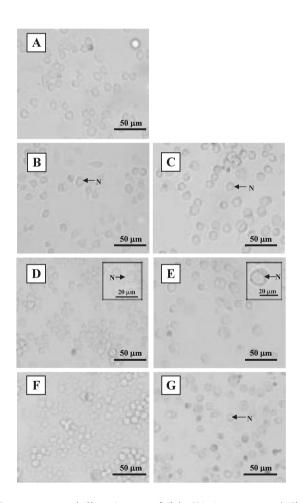


図3.BmAPN1組換ウイルスで感染処理した High Five 細胞 の顕微鏡観察

ウイルス感染処理及び無処理細胞の形態変化を顕微鏡で観察した。感染処理から 0 時間後 (パネル A)、24 時間後 (パネル B、C)、48 時間後 (パネル D、E)、72 時間後 (パネル F、G) の顕微鏡像。パネル A、B、D、F:感染無処理細胞。パネル C、E、G:感染処理細胞。N:核。

#### 4. BmAPN1 発現の経時的変化と酵素活性

High Five 細胞と Sf21 細胞に感染処理を施してから 24、48、72 時間後に細胞を回収し、超音波破砕後 100,000 × g で 60 分間遠心分離して沈殿した不可溶性画分を用いて、BmAPN1 の発現とアミノペプチダーゼ (AP) 活性を調査した (図 5)。

まず不可溶性画分のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色及びウェスタンブロット解析を行った(図 5A、B)。 High Five 細胞では、BmAPN1 の発現は CBB 染色では検出できなかったが、ウェスタンブロット解析では、48 時間後には BmAPN1 が発現し、72 時間後でも同程度の発現が確認できた。一方、Sf21 細胞では、感染 48 及び 72 時間後に、CBB 染色でも確認可能な発現量が確認された。これは、上述の様に Sf21 細胞ではウイルス増幅率が高いためと考えられた。

培養細胞で合成され細胞膜上に局在する BmAPN1 が本来の機能を発現しているか確認するため、AP 活性を測定した(図5C)。High Five 細胞では、ウイルス感染処理前の細胞でのAP 比活性は 0.32mU/mg であったが、感染 24 時間後には1.54mU/mg と処理前の約5倍に増加し、感染72 時間後には3.28mU/mg とさらに増加した。一方、Sf21 細胞では、感染48時間以降に発現したタンパク量は High Five 細胞より多かったにも関わらず、AP 活性はほとんど増加しなかった。

以上の結果から、High Five 細胞では、組換 BmAPN1 はウイルス感染の 24 時間後には発現し始め、72 時間後まで存在量と活性が時間と共に増加することが示された。

一方 Sf21 細胞では BmAPN1 の発現量は High Five 細胞より多かったが、これに比例した AP 活性の増加はみられなかった。このことは、Sf21 細胞で発現した BmAPN1 は、細胞膜には正しく局在するものの、その構造は本来のものとは異なっていることを示唆している。つまり、Sf21 細胞はウイルス増殖率・タンパク質合成活性は高いが、BmAPN1 の機能発現には適さないと思われる。

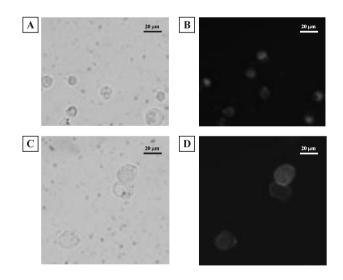


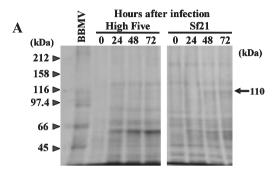
図4. 組換 BmAPN1の蛍光顕微鏡による検出

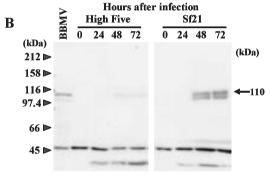
ウイルス感染処理 (パネル A、B) と無処理の High Five 細胞 (パネル C、D) を抗 BmAPN1 抗血清で処理した後、蛍光色素 FITC ラベル抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体に用いて蛍光顕微鏡観察した (200 倍)。詳細は材料・方法を参照のこと。

#### 結論

BmAPN1 組換えウイルスを感染させた細胞では、分子サイズ 110 及び 105 kDa に発現タンパク質が検出された。また細胞分画後のウェスタンブロット解析及び感染処理細胞の免疫染色により、細胞膜上に発現タンパク質が提示されていることが確認された。

BmAPN1 タンパク質は、細胞膜局在シグナル配列と GPI





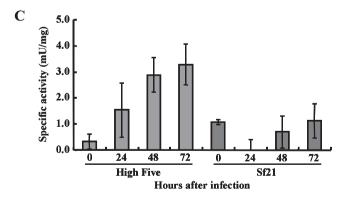


図5. 組換 BmAPN1発現の経時変動

High Five 細胞および Sf21 細胞にウイルス感染処理を行ってから 0、24、48、72 時間後に細胞を回収してウェスタンブロット解析を行い、組換え BmAPN1 の発現を検出した。パネル A: CBB 染色。パネル B: 抗 BmAPN1 抗血清によるウェスタンブロット解析。BBMV:カイコ BBMV。パネル C:ウイルス感染 High Five 細胞および Sf21 細胞のアミダーゼ活性の経時的変化。各上記時間に細胞を回収し、アミダノペプチダーゼ活性を測定し比活性を求めた。詳細は材料・方法を参照のこと。

(glycosyl-phosphatidylinositol) アンカー付加配列を持っている (Yaoi *et al.*, 1999)。110 kDa に検出された発現タンパク質はカイコ BBM 由来のものと同じサイズであり、正しく発現した組換 BmAPN1 であると思われる。

一方、105 kDa の発現タンパク質は、GPI アンカーが付加しなかった不完全な BmAPN1 タンパク質ではないだろうか。GPI アンカーは、タンパク質の翻訳後に小胞体内で付加された後、当該タンパク質は細胞膜上に輸送されるが、この時に付加反応が正常に機能せず、APN に GPI アンカーが付加されないまま細胞膜上に輸送されることがある(Neema et al., 2002)。今回も同様なことが起こり、GPI アンカリングされていない未修飾の BmAPN1 が 105 kDa タンパク質として検出されたと考えられる。

High Five 細胞は活性を保持した BmAPN1 を発現したため、今後 Cry1Aトキシンとの相互作用を解析するのに適していると思われる。また、BmAPN1 発現量と細胞死の割合から、Cryトキシンとの相互作用を解析するには感染処理後 48 時間前後が最適であると考えられたが、さらに詳細な最適化が必要であろう。一方、Sf21 細胞は活性のある BmAPN1 を発現しなかったが、ウイルス増幅用のホストに用いることでタイターの高い組換ウイルスを得ることに成功した。BmAPN1 組換ウイルスの増幅には Sf21 細胞を、組換タンパク質の発現には High Five 細胞をそれぞれ用いることで、効率の良いタンパク質発現系を構築できた。

今後の研究において、この組換 High Five 細胞は、BmAPN1のCrylAトキシン受容体としての機能を解析するのに非常に有用である。また、今回報告した培養昆虫細胞での発現系を、他のCrylAトキシン結合タンパク質にも応用していくことで、真の受容体及びCryトキシン作用機構の解明が発展することが期待される。

#### 謝辞

本研究の一部は新潟大学プロジェクト推進経費(HH; TH)(致死的、敵対的、競合的生物間相互作用の基礎研究-21世紀の生物コントロール技術の構築を目指して-;代表:渡邉剛志)の助成を受けて行われた事をしるし感謝します。また文科省科学研究費「基盤研究B」12558069(HH)および「基盤研究 A」13306006(HH)の助成を一部受けて行われた。

#### 引用文献

Anderson, D., R. Harris, D. Polayes, V. Ciccarone, R. Donahue, G. Gerard, J. Jessee and V. Luckow. 1995. Rapid generation of recombinant baculovirus and expression of foreign genes using the BAC-TO-BAC<sup>TM</sup> baculovirus expression system. *Focus*, 17: 53-58.

Banks, D. J., G. Hua and M. J. Adang. 2003. Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect. Biochem. Mol. Boil.*, 33: 499-508.

Banks, D.J., J. L. Jurat-Fuentes, D. H. Dean and M. J. Adang. 2001. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa  $\delta$ -endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* in not *N*-acetylgalactosamine mediated. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **31**: 909-918.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the

- quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Denolf, P., K. Hendricks, J. V. Damme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele and J. V. Rie. 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Pllutella xylostella* midgut aminopeptidase N emzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.*, 248: 748-761.
- Flannagan, R.D., C. Yu, J. P. Mathis, T.E. Meyer, X. Shi, H. A. A. Siqueira and B.D. Siegfried. 2005. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect. Biochem. Mol. Boil.*, 35: 33-40.
- Garczynski, S. T. and M. J. Adang. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -Endotoxin binding aminopeptidase in the *Manxuca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Insect. Biochem. Mol. Boil.*, **25**: 409-415.
- Herrero, S., T. Gechev, P. L. Bakker, W. J. Moar and R. A. de Maagd. 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *Bio Med Genomics*, **6**: 96-105.
- Higuchi, M., S. N. Kumaraswami, T. Maruyama, T. Mitsui, T. Hayakawa and H. Hori. 2001. Comparative study of proteins and neutral glycolipids of the insect midgut brush border membrane in Cry1Ac susceptible and highly resistant *Plutella xylostella*. Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of *Bacillus thuringiensis* (M. Ohba., O. Nakamura., E. Mizuki., T. Akao., eds.) 199-208, Kyushu University, Fukuoka, Japan.
- Higuchi, M., K. Haginoya, T. Yamazaki, K. Miyamoto, T. Katagiri, K. Tomimoto, Y. Shitomi, T. Hayakawa, R. Sato and H. Hori. 2007. Comparative studies of binding of Bacillus thuringiensis Cry1A toxins to midgut brush border membrane vesicles from midgut of highly Cry1Ac resistant and susceptible Plutella xylostella. Comp. Biochem. Physiol., 147: 716-724.
- Hua, G., J. L. Jurat-Fuentes and M. J. Adang. 2004. Fluorescent-based assays establish Manduca sexta Bt-R<sub>1a</sub> cadherin as a receptor for multiple Bacillus thuringiensis Cry1A toxins in Drosophila S2 cells. Insect. Biochem. Mol. Boil., 34: 193-202.
- Jenkins, J. L. and D. H. Dean. 2001. Binding specificity of Bacillus thuringiensis Cry1Aa for purified, native Bombyx mori aminopeptidase N and cadherin-like receptors. BMC Biochem., 2: 12-19.
- Knight, P. J. K., N. Crickmore and D. J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CrylAc deltaendotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molec. microbiol.*, 11: 429-436.
- Kumaraswami, N. S., T. Maruyama, S. Kurabe, T. Kishimoto, T. Mitsui and H. Hori. 2001. Lipids of brush border membrane vesicle (BBMV) from *Plutella xylostella*

- resistant and susceptible to CrylAc  $\delta$ -endotoxin of Bacillus thuringiensis. Comp. Biochem. Physiol., 129: 173-183.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Luo, K., J. R. McLachlin, M. R. Brown and M. J. Adang. 1999.
  Expression of Glycosylphosphatidylinositol-Linked Manduca sexta Aminopeptidase N in insect cells. Protein.
  Exb. Purif., 17: 113-122.
- Luo, K., S. Sangadala, L. Masson, A. Massa, R. Brousseau and M. J. Adang. 1997. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin binding and pore formation. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 27: 735-743.
- Nakanishi, K., K. Yaoi, Y. Nagino, H. Hara, M. Kitami, S. Atsumi, N. Miura and R. Sato. 2002. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Lett.*, **519**: 215-220.
- Neema, A., M. Pawan and K. B. Raj. 2002. Interaction of genecloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein CrylC. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 4583-4592.
- Rajagopal R., A. Neema, S. Angamuthu, S. Sivakumar, A. Suhail and R. K. Bhatnagar. 2003. Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Biochem. J.*, 370: 971-978.
- Shinkawa, A., K. Yaoi, T. Kadotani, M. Imamura, N. Koizumi, H. Iwahana and R. Sato. 1999. Binding of phylogenetically distant *Bacillus thuringiensis* Cry toxins to a *Bombyx mori* aminopeptidase N suggests importance of Cry toxin's conserved structure in receptor binding. *Curr. Microbiol.*, 39: 14-20.
- Shitomi, Y., T. Hayakawa, D. M. Hossain, M. Higuchi, K. Miyamoto, K. Nakanishi, R. Sato and H. Hori. 2006. A novel 96-kDa aminopeptidase localized on epithelial cell membranes of *Bombyx mori* midgut, which binds to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biochem., 139: 223-233.
- Simpson, R. M., and R. D. Newcomb. 2000. Binding of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins Cry1Ac and Cry1Ba to a 120-kDa aminopeptidase-N of *Epiphyas postvittana* purified from both brush border membrane vesicles and baculovirus-infected Sf9 cells. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **30**: 1069-1078.
- Tsuda, Y., F. Nakatani, K. Hashimoto, S. Ikawa, C. Matsuura, T. Fukada, K. Sugimoto and M. Himeno. 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.

- Wolfersberger, M. G., P. Luthy, A. Maurer, P. Parenti, V. Sacchi, B. Giordana and G. Hanozet. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicle from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Comp. Biochem. Physiol., 86A: 301-308.
- Yaoi, K., T. Kadotani, H. Kuwana, A. Shinkawa, T. Takahashi, H. Iwahana and R. Sato 1997. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* CrylAa toxin. *Eur. J. Biochem.*, **246**: 652-657.
- Yaoi, K., K. Nakanishi, T. Kadotani, M. Imamura, N. Koizumi, H. Iwahana and R. Sato. 1999. cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori. Biochim. Biophys. Acta*, **1444**: 131-137.
- Yaoi, K., K. Nakanishi, T. Kadotani, T. Kadotani, M. Imamura, N. Koizumi, H. Iwahana and R. Sato. 1999. *Bacillus thuringiensis* CrylAa toxin-binding reasion of *Bomyx mori* aminopeptidase N. *FEBS Lett.*, **463**: 221-224.

# Expression of *Bombyx mori* Aminopeptidase N on Plasma Membrane of Cultured Insect Cells and Analysis of Its Receptor Function for Insecticidal Cry Toxins

Rieko NOGUCHI<sup>1</sup>, Toshiki ISHIKAWA<sup>1</sup>, Kohsuke HAGINOYA<sup>1</sup>, Yasuyuki SHITOMI<sup>1</sup>, Ryoichi SATO<sup>2</sup>, Tohru HAYAKAWA<sup>1</sup> and Hidetaka HORI<sup>1\*</sup>

(Received June 29, 2007)

#### **Summary**

Aminopeptidase N(APN) localizing on the apical membrane of midgut epithelial cells is one of the plausible candidate of the receptor proteins for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin which specifically kills lepidopteran insects. However, comprehensive evidences to address above possibility have not been established yet. We tried to express the APN1, BmAPN1, onto plasma membrane of cultured insect cells to investigate the interaction with Cry1Aa. Gene expression system was constructed with High five cultured insect cells and baculovirus expression system. On 48 h after the infection of the cells with gene modified baculovirus, 110 kDa BmAPN1 was expressed on the cell membranes. Aminopeptidase activity was ten times higher than that of non-infected cultured cells. The recombinant BmAPN1 was the same size as native one localizing on the brush border membrane of midgut epithelial cells. The transformed cells expressing BmAPN1 is a good system for the investigation of interaction between APN and Cry1Aa toxin.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 60:73-81, 2007

Key words: Aminopeptidase N, Bacillus thuringiensis, Baculovirus, Bombyx mori, insecticidal proteins

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Graduate School of Science and Technology, Niigata University

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Graduate School of Bio-Application and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology

<sup>\*</sup>Corresponding author: hide-hri@gs.niigata-u.ac.jp