

ふりがな	ホセイン モhammad デルワード
氏名	Hossain Mohammad Delwar
学位位	博士(学術)
学位記番号	新大院博(学)第158号
学位授与の日付	平成16年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Research on interaction between <i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal toxins and midgut epithelial cell membrane of insect ( <i>Bacillus thuringiensis</i> の殺虫トキシンと昆虫中腸上皮細胞との相互作用の解明)
論文審査委員	主査 教授 堀 秀隆 副査 教授 三ツ井 敏明 副査 教授 渡邊 剛志 副査 教授 仲川 洋治 副査 教授 星野 力

#### 博士論文の要旨

*Bacillus thuringiensis* の生産する殺虫蛋白質、BT トキシンは生物農薬として世界的に広く使われている、人・家畜等に無害な農薬である。殺虫の機構として、BT トキシン蛋白質が昆虫幼虫中腸上皮細胞膜に存在する受容体に結合した後、細胞膜に貫入し穴をあけるとするセントラルドグマが広く認知されているが、多くの点が不明である。中腸上皮細胞膜上のアミノペプチデース(APN)とカドヘリン様蛋白質(CadLP)が BT トキシンの受容体として提唱されたが、この二つだけで BT トキシンの複雑で、狭い殺虫特異性を説明することは出来ない。本論文はこの様な観点から新しい受容体候補者を同定し、詳細な性格付とその局在性をイムノヒストケミカルに追求した論文である。

本研究の中で、著者は新規膜蛋白質 P252 をカイコ蛾幼虫の中腸上皮細胞膜から発見、精製し *kd* 値が Cry1Aa に対して 29nM、Cry1Ab に対して 178nM、Cry1Ac に対して 20nM であることを測定し、現在有力な Cry1A トキシンの受容体候補の APN の 70nM より低く、CadLP の 2nM より高いが十分に生理的条件下で受容体として機能する解離定数であることを実証した。P252 は分子サイズ 252kDa と推定されたが、ゲル濾過クロマトグラフィーから親分子として 985kDa の蛋白質が同定された。更にネイティブ PAGE において単一バンドが検出されたため、P252 をホモサブユニットとするホモテトラマーと判断した。P252 は抗·APN·抗血清と、抗·CadLP·抗血清に反応せず、両受容体と全く異なる蛋白質であることを証明した。

抗·P252·抗血清を用いたイムノヒストケミカルな実験から、中腸上皮細胞膜上に P252 が存在することを示した。更に、中腸上皮細胞膜に結合する各トキシンの全量の約 30%が P252 への結合であることが判明した。Cy3 標識した 3 種 Cry1A トキシンと FITC 標識した 2 次抗体を用いた 2 重染色実験から、P252 は中腸組織の上皮組織を中心に存在し、更には杯状細胞、円筒細胞の側壁部にも分布することを示した。また分布の様子から 3 種のそれぞれのトキシンの中腸上皮細胞への結合の様式は互いに顕著に異なることが示唆された。

## 審査結果の要旨

平成 16 年 8 月 23 日（月）に専攻の博士論文公開発表会を行いその後審査委員会を開催し、各委員の本論文に対する意見交換を行い、以下の諸点をオリジナリティーのある研究とする点で意見が一致した。

1. 新規な Cry1A トキシン結合性 P252 蛋白を発見し、トキシンとの結合から測定した解離定数から、この蛋白質が十分に受容体蛋白として働いている可能性を示した。
2. P252 のトキシン結合様式はアミノペプチデースとの結合で示されている GalNAc を介するものではないことを示した。
3. イムノヒストケミストリー的手法を用いて、P252 と Cry1A との結合は Cry1A 全結合の 30% 程であることを示した。また 2 重蛍光染色法を用いて P252 が中腸上皮細胞周辺に主に存在し、Cry1A トキシンの結合部位と一致することを示した。

これらの新発見は *Bacillus thuringiensis* の殺虫トキシンの殺虫機構を解明する上で重要な貢献をしたものと全審査委員が認め、本論文は学術博士の学位論文に十分であることが全審査委員によって認定された。