

令和 4 年 10 月 18 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03397

研究課題名（和文）殺虫タンパクの進化原理を模倣した抵抗性害虫出現に負けないタンパク質殺虫システム

研究課題名（英文）Insect pest managing system based on directed evolution of a bacterial insecticidal protein

研究代表者

佐藤 令一（Sato, Ryoichi）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：30235428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：BT菌殺虫タンパクが、ドメイン II に「様々なタンパク質に結合するキャビティ」を持つこと、またそこには昆虫が持つ多様なABCトランスポーターが結合して低機能受容体として機能することを示し、そのような受容体の中から特に結合親和性の高い関係を持つものがABCB1やABCA2のように「感受性を決定する受容体」になるとする仮説を提示した。得られた基礎知見と確立した進化分子工学の手法を用いたなら「BT殺虫性タンパクを用いた持続可能な殺虫システム」を作り上げることができると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BT殺虫タンパク質はオーガニック殺虫剤や遺伝子組換え食品に利用される世界で最も利用されている虫を殺すタンパク質である。本研究はその応用の幅を広げるために最も欠かすことができない基盤知識である「受容体」と「受容体結合部位」を幾つかの殺虫タンパク質に関して世界で初めて明らかにした。また、この殺虫タンパク質を害虫による抵抗性獲得に負けない持続可能な素材とすることを可能にする「ABCトランスポーターを進化の対象にした進化分子工学の手法」を確立した。

研究成果の概要（英文）： We showed that domain II of the BT insecticidal protein has cavities that can bind to several proteins including low- and high-functional receptors existing at the same time in the midgut cells. We hypothesized that this character of the insecticidal protein contributed to the diverse evolution of BT. We also showed that BmABCA2 is a high-functional receptor for Cry2Aa and Cry2Ab and that BmABCB1 is a high-functional receptor for Cry1Ia, Cry1Ba and Cry9Da. Basic knowledge and technologies made up in this study can contribute to SDGs by generating a sustainable insecticidal system which is composed of BT insecticidal proteins.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：Bacillus thuringiensis Cry toxin ABCトランスポーター Bombyx mori 遺伝子組換え食品 進化分子工学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫だけに病原性を持つ土壌細菌 BT (*Bacillus thuringiensis*) は太古からこの地球上に生存し、我々人類とは比べものにならないほど地球にとってはおなじみの古株である。BT の殺虫の仕組みの本質はそれが作る殺虫タンパク (Cry 毒素) にある。我々人類は多様に進化した各系統の BT 菌が作る、少しずつ殺虫スペクトルが違う殺虫タンパクをいろいろな害虫に適用し、50 年以上前からオーガニック殺虫剤「BT 剤」として使ってきた。また、アメリカがその遺伝子を組み込んだ食品を害虫抵抗性食品として利用し始めて 26 年になる。すなわち、殺虫タンパクは世界で最も農業利用されている、30 億もの人が口にしているタンパク毒素である。ところで、現実には手に入る多くの殺虫タンパクの殺虫活性は一般的に低すぎるうえ、殺虫スペクトルも狭く効かない害虫がたくさんある。しかし、BT 菌を含めた地球上の生物が、あり得る全てのタンパク質 (多少のアミノ酸配列が違ってても類似構造と類似機能を持つタンパク質) のうちのほんの一部しか使っておらず、変異体には無限の可能性があることが知られている。したがって、もし殺虫タンパク変異体のすべてをスクリーニングにかけられるなら、今よりもっと活性の高いものが見つかるはずであり、対象となる害虫の幅も広がるはずである。とは言え、100 種の変異体を作り調べるだけでも大変なこれまでのタンパク質工学の手法では、有り得る 10 の何百乗と言う変異体を調べつくすことなど不可能である。しかし、ファージディスプレイと言う手法で多様な結合部変異体を提示したファージのライブラリーを用い、受容体に対して結合性が向上した変異体を選抜する進化分子工学の手法ならそれに近いことが可能である。そこで、我々はこの「殺虫タンパク版」の進化分子工学手法を確立した。よって「受容体に対する結合性が向上したなら活性が上がる」という薬理的な大原則の通りに殺虫活性が改良でき、自在に目的害虫に効く殺虫タンパクが作れる時、すなわち、「進化分子工学でタンパク質殺虫剤を創る」時が来た。

一方、BT 殺虫タンパクが利用している受容体の解明が進んだ結果、多くの種類の BT 殺虫タンパクが ABC トランスポーターのサブクラスの幾つかを受容体に行っていることが示唆され始めた。すなわち、実際の BT 菌の殺虫タンパクがどのような分子を対象にして進化してきたかが明らかになり始めた。これまでにカイコガを殺す殺虫タンパクとしては Cry1A, Cry1B, Cry1D, Cry1I, Cry9D などが知られている。一方で、カイコの消化管に発現する ABC トランスポーターが明らかになってきた。そこで、これらの殺虫タンパクのカイコに於ける受容体が明らかになる下地が整った。

## 2. 研究の目的

昆虫病原細菌 BT 菌の活性本体「殺虫タンパク」が昆虫の ABC トランスポーターなど受容体に対して適応進化し、結果 BT 菌は広範囲の昆虫を宿主とすることに成功したと考えられるが、その成功の根幹には殺虫タンパク結合部の受容体に対する柔軟な結合特性があると考えられる。そこでまず、(1) この柔軟な結合を達成する構造の中心領域を明らかにする。また次に、(2) ABC トランスポーターを含めたどのような分子群を受容体にするかを具体的に示し、これらから明らかになる「殺虫タンパクの進化の実態と原理」に真似て自在に新しい殺虫タンパクを生み出す「進化分子工学の方法」の基盤的知識とする。また、実際の害虫防除の現場でものを言う「殺虫タンパクの進化分子工学のモデル」の構築を進めた。すなわち、(3) 「活性が弱い殺虫タンパクの活性向上を図る進化分子工学モデル」(4) 殺虫タンパクに抵抗性を獲得した害虫に対する「異なる ABC トランスポーター分子を利用した抵抗性打破モデル」の方法完成を目指した。これらにより、SDGs の時代に日本で珍重される要素を持つ「タンパク殺虫剤」を念頭に置きながらも「遺伝子組換え食品」にも同様に適用できる、抵抗性害虫の出現に負けない「持続的殺虫システム」の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 殺虫タンパクの受容体結合部位の解析のために、Cry1Aa 型殺虫タンパクに 2 タイプの変異体を作製した。1 つ目として、ループ部位に 2 か所のシステイン置換を導入し、S-S 架橋してキャビティ (へこみ) をふさぎ、ループが作るどのキャビティ が殺虫タンパク質の結合部位かを調べた。また、その結合に関与するアミノ酸残基をアラニン置換法などで調べた。多くの Cry1Aa 変異体は、従来の毒素前駆体として作りトリプシンで活性化する方法では調製できなかったので、大腸菌体内に低温下で活性型分子として発現させた。これらの処理の効果の確認は SPR (Surface Plasmon Resonance) 法による受容体分子、BmABCC2 および BtR175 に対する結合親和性解析とこれらが発現した Sf9 細胞を用いた毒性試験で行った。

(2) 「どの ABC トランスポーターが各種毒素の受容体になるか」に関しては、HEK293T 細胞あるいは Sf9 細胞に各種 ABC トランスポーターを発現させ、感受性を獲得するかどうかを観察して検討した。

(3) 「殺虫タンパクの活性向上を図る進化分子工学モデル」では、Cry8Ca が弱い親和性でしか結

合できないコクヌストモドキの ABC トランスポーター、TcABCC4 に対して結合親和性を増した Cry8Ca 変異体を選抜するパニング選抜系の構築を目指した。すなわち、FLAG タグをつけた TcABCC4 はシスメックス社の Baculovirus/カイコガ蛹発現システムで大量生産し、抗 FLAG タグピーズで精製して、パニング選抜システムに用い、結合性が向上した Cry8Ca 変異体を提示する T7 ファイージを選抜できる各種条件を検討した。

(4)「異なる ABC トランスポーター分子を利用した抵抗性打破モデル」では、「Cry1Aa が普段カイコを殺す際に利用していないと考えられた BmABCC3 を利用できるように進化した Cry1Aa の取得」を目指した。すなわち、Baculovirus/カイコガ蛹発現システムで FLAG タグをつけた BmABCC3 を大量に生産し、精製してパニング選抜システムに用い、結合性が向上した Cry1Aa 変異体を提示する T7 ファイージを選抜できる各種条件を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1)Cry1Aa 殺虫タンパク上の受容体結合部位

###### 結合キャビティ

Cry1Aa 殺虫タンパクのループ領域には、受容体結合領域と考えられてきた大きく分けて 3 つのキャビティ（空洞）がある。S-S 架橋してキャビティをふさいだ変異体の解析により、BmABCC2 に対しては、ループ 8 とループ 2 が構成するキャビティが最も主要な結合部位であることが SPR 解析と Sf9 細胞を用いた毒性試験によって明らかになった。また、ループ 8 とループ 3 が構成するキャビティも重要であることが明らかになった。一方、BtR175 に対しては、ループ 8 とループ 2 が構成するキャビティ、ループ 8 とループ 3 が構成するキャビティ、およびループ 2、ループ 3、ループ 1 が構成するキャビティの全てが結合に関与することが明らかになった。すなわち、Cry1Aa 上の受容体結合キャビティは BmABCC2 と BtR175 との間でオーバーラップするが全く同じではないことが示された。すなわち、進化分子工学で殺虫タンパクのどこに変異を導入すべきかを考える際の非常に重要な基盤知識が得られた。

###### 結合に重要なアミノ酸残基

BmABCC2 結合に関与するアミノ酸残基を、アラニン置換や他のアミノ酸への置換により結合親和性が落ちるかを SPR 測定で評価し検討した。その結果、ループ 8 とループ 2 が構成するキャビティの根元にある R368 と、このキャビティの側面にある Y366 と R367 が重要な役割をもつことが明らかになった。この後のセクションで述べた殺虫タンパクの進化分子工学に用いた変異体ライブラリー作製時においては、このような結合部位情報が明らかになっていなかった。今後はこれらの情報をライブラリー作りに生かすことができるようになった。

##### (2)各種殺虫タンパクの受容体になる ABC トランスポーター

発表されトランスクリプトーム解析の結果から、約 40 種類の ABC トランスポーターがカイコガ中腸で発現している事が明らかになった。そこで、それらを HEK293T 細胞もしくは Sf9 細胞に発現させて各種殺虫タンパクを添加し、細胞が膨潤反応を示すようになったか、すなわち、発現させた ABC トランスポーターのサブクラスが受容体の機能を果たしたか、を観察した。その結果、BmABCB1 が Cry11a、Cry1Ba と Cry9Da に対して高い受容体機能を示すことが明らかになった。また、BmABCA2 が Cry2Aa や Cry2Ab に対して高い機能の受容体であることが判明した。これまで Cry1A や Cry3A など、2、3 の BT 殺虫タンパクに対して、ABCC2、ABCB1 や Cadherin が受容体として機能することが分かっていたが、より広く BT 毒素を眺めるとどういった分子が受容体なのかと言う実体がようやく明らかになってきたことになる。また、これらの結果により、BT 菌の殺虫タンパクがどのような ABC トランスポーターに適応して進化して来たかが少しずつ明らかになってきた。

一方、Cry1Aa は BmABCC2、BmABCC3 以外に、BmABCC4 と BmABCC8 を、また、Cry1Ca は BmABCC7 と BmABCC1 を、Cry1Da は BmABCC4、BmABCC7、BmABCC8 を、Cry8Ca は BmABCC4 を、Cry9Aa は BmABCC1、BmABCC3、BmABCC7、BmABCC8 を低機能受容体として使えることが明らかになった。なお、低機能受容体とは、昆虫固体の感受性決定因子とはなり得ないが、高濃度の殺虫タンパクがそれを利用して細胞に障害活性を発現できる分子である。BT 菌の一つの殺虫タンパクは、ある昆虫に対して殺虫活性を発現することを可能にする受容体を 1 種類持つばかりか、同時に、殺虫活性には直接的には関与しないが、ある変異を機会に、受容体として機能しうるポテンシャルを持つ ABC トランスポーターを多数種類持つ現実が明らかになった。BT 殺虫タンパクは、1. で述べたように複数種の分子に結合できるキャビティを持つが、そこには多種類の ABC トランスポーターに様々な結合親和性で結合しうる性状が備わっていることが明らかになった。この、多様な ABC トランスポーターに結合しうる性状が、BT 殺虫タンパクが現在実際にみられるように高い親和性で結合するように進化し、殺せる昆虫種を広めて来た理由の一つであろうと考えられた。

##### (3)活性向上を図る進化分子工学モデル

Cry8Ca は TcABCC4 を受容体として細胞を殺すことはできるが非常に弱い活性しか示すことができない。すなわち、この関係は、結合親和性を向上させることができたなら、殺虫活性が上がる

るパターンのモデルである。そこでまず、TcABCC4 をコーティングしたビーズでワイルドタイプ T7 ファージ中から Cry8Ca を提示した T7 ファージを選抜できるように諸条件を決定した。すなわち、Cry8Ca 変異体を発現するライブラリー中から TcABCC4 に対して結合親和性が向上した変異体を持つファージを選抜する系が確立できた。そこで次に、Cry8Ca のループ 2 とループ 3 に変異を導入した変異体のライブラリーを T7 ファージ提示型で作製した。これらを使って現在までの数度の選抜を試みている。しかし、残念ながら、今のところはまだ、結合親和性が著しく向上し、結果として TcABCC4 を発現する細胞をより良く殺せるようになった変異体の取得には成功していない。

#### (4) 受容体の役割を果たしていない ABC トランスポーター分子を利用した抵抗性打破モデル

Cry1Aa が普段カイコを殺す際に使っていないと考えられた ABC トランスポーター分子、BmABCC3 に対して、Cry1Aa の結合親和性を向上させてカイコを殺せる変異体に進化させる方法の構築は、抵抗性を獲得した害虫に対してそれまで使っていた殺虫タンパクを進化させて再度使えるようにする方法構築のモデルである。まず、(3)と同様にして、T7 ファージ中から Cry1Aa を提示した T7 ファージを選抜できるように諸条件を決定した。すなわち、Cry1Aa 変異体を発現するライブラリー中から BmABCC3 に対して結合親和性が向上した変異体を持つファージを選抜する系が確立できた。そこで次に、Cry1Aa のループ 2 とループ 3 に変異を導入した変異体のライブラリーを T7 ファージ提示型で作製した。これらを使って現在までの数度の選抜を試みているが、今のところまだ、結合親和性が著しく向上し、結果として BmABCC3 を発現する細胞をより良く殺せるようになった変異体の取得には成功していない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li X, Miyamoto K, Takasu Y, Wada S, Iizuka T, Adegawa S, Sato R, Watanabe K.	4. 巻 12
2. 論文標題 ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 2 Is a Functional Receptor for Bacillus thuringiensis Cry2A Toxins in Bombyx mori, but Not for Cry1A, Cry1C, Cry1D, Cry1F, or Cry9A Toxins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins (Basel)	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12020104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato R, Adegawa S, Li X, Tanaka S, Endo H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Function and Role of ATP-Binding Cassette Transporters as Receptors for 3D-Cry Toxins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxins (Basel)	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins11020124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤令一
2. 発表標題 持続可能なオーガニック殺虫システムを目指すBt毒素の進化分子工学
3. 学会等名 TIA「かけはし」連携セミナー「生態系を損なわない農害虫・衛生害虫駆除手法の検討」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部賢司, 阿出川さとみ, 岩淵可奈, 佐藤令一, 宮本和久.
2. 発表標題 カイコにおいてABCB1により感受性が支配されるCry毒素.
3. 学会等名 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第91回大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王永浩, 阿出川さとみ, 宮本和久, 高須陽子, 飯塚哲也, 和田早苗, 李校一, 忙定沢, 佐藤令一, 渡部賢司.
2. 発表標題 カイコにおける3種のCry1毒素の感受性決定因子の解析.
3. 学会等名 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第91回大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Adegawa, S., Sato R.
2. 発表標題 Receptor analysis of Cry1Ca toxin expressed on Sf9 cells.
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿出川さとみ・佐藤令一
2. 発表標題 受容体ABCトランスポーターへの結合に寄与するCry毒素ドメインIIのループ根元領域
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li Xiaoyi, Kazuhisa Miyamoto, Yoko Takasu, Sanae Wada, Tetsuya Iizuka, Ritsuko Murakami, Kenji Watanabe, and Ryoichi Sato
2. 発表標題 Determination of a role of Bombyx mori ABC transporter A family member 2 in insect host susceptibility and functional receptor to Bacillus thuringiensis Cry2A toxins.
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横手翔太・王永浩・金承元・阿出川さとみ・佐藤令一
2. 発表標題 ABC transporterへの親和性向上をめざすCry1Aa変異体選抜系の構築
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Endo, Haruka Endo, Shiho Tanaka, Satomi Adegawa, Xiaoyi Li, Kenji Watanabe and Ryoichi Sato
2. 発表標題 Function and role of ATP-binding cassette transporters as a Cry toxins receptor.
3. 学会等名 The 51th Annual meeting of Society for Invertebrate Pathology (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	天竺桂 弘子  (TABUNOKI HIROKO)  (80434190)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授    (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------