

自己評価報告書

平成23年 4月11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008~2011

課題番号：20380036

研究課題名 (和文) Cryトキシンをオーダーメイド化するための基礎研究

研究課題名 (英文) Basic research to design "Order-made" Cry toxin

研究代表者

早川 徹 (HAYAKAWA TORU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：30313555

研究分野：昆虫病理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：*Bacillus thuringiensis*、殺蚊トキシン、Cry4Aa、遺伝子組換え、害虫防除

1. 研究計画の概要

(1) Cry4Aa ドメイン II に存在する loop 構造の

機能解析：Cry4Aaの殺虫活性及び特異性に関与する機能構造の特定を目指す。特にドメイン II に存在する loop 構造(Cryトキシン一般で殺虫活性及び特異性に関与すると考えられている)の機能構造解析を行う。

(2)高機能化Cry4Aaの構築：Cry4Aaを遺伝子工学的に改変してCry4Aaの高機能化を試みる。特にドメイン II loop2を標的とした変異導入を行う。

(3)効率の良い防除法の検討：Cry4Aaを利用した効率の良い防除法を模索する。

2. 研究の進捗状況

(1) 様々な Loop 置換変異体及びアラニン置換変異体を構築して Cry4Aa loop1~3 の役割を解析した。その結果、loop の長さを大きく変化させない限り、顕著な殺虫活性の低下なしにこれら loop の配列を改変できることが明らかにした(雑誌論文②、③)。また、loop1~3 と同様に Cry4Aa の分子表面に露出する loops $\beta 1-\alpha 8$ 、 $\beta 4-\beta 5$ 、 $\beta 8-\beta 9$ についても解析を行い、これらが改変可能であることを明らかにした(未発表データ)。

Cry4AaはCry1Aと極めて類似する3D構造を持つものの、Cry1Aとは異なる様式で受容体結合することが示唆された。

(2) Cry4Aaの生産系に大腸菌を用いるため、大腸菌で高発現する人工遺伝子 *cry4Aa-S1* を構築した(雑誌論文④)。Cry1Aで受容体結

合に関与する loop2 も Cry4Aa では改変可能であることが判明しているため、本研究では loop2 にランダム変異を導入した Cry4Aa 変異体ライブラリーの構築を進めた。当初は作製効率の低さ(0.3-0.5%)に問題があったが、プライマーの配列に改良を加えることで効率を 4.2%にまで上昇させることに成功した。

(3) 様々な効率的防除法の開発を進めた。

①バキュロウイルス(XcGV)由来のプロテアーゼ (エンハンシン 3)がカイコに対する Cry1Aa の殺虫活性を促進した(未発表)。

②人工遺伝子 *cry4Aa-S2* を pUC303(シヤトルベクター)に組み込み、ラン藻(*Synechococcus* PCC7942 R2-SPc)の形質転換を行った。弱いながらもアカイエカに対する殺虫活性が観察された(未発表)。

③Cry4Aa の C 末端領域をペプチドタグとして利用し、タンパク質を凝集体として生産するシステムを開発した(雑誌論文①)。この成果により可溶性トキシンの製剤化に道が開けた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)概要にある項目(1)に関して、予定していた変異体構築を通した loop 構造の解析は終了している。項目(2)に関してもライブラリーの構築は順調であり、研究はクローンの性状を解析する段階にある。項目(3)でもペプチドタグの開発などで成果が上がっている。

4. 今後の研究の推進方策

- (1) Cry4Aa 由来のポリペプチドを用いた競合実験を行い、受容体と相互作用する Cry4Aa 機能構造の特定を目指す。
- (2) ライブラリーを拡充するとともに、変異体の性状解析を進める。
- (3) 開発したペプチドタグを利用して可溶性トキシンの製剤化を試みる。以って新しい害虫防除剤の開発を行う。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Hayakawa T., Sato S., Iwamoto S., Sudo S., Sakamoto Y., Yamashita T., Uchida M., Mtsushima K., Kashino Y. and Sakai H., Novel strategy for protein production using a peptide-tag derived from *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa. *FEBS Journal*, 277, 2883-2891 (2010) 査読有
- ② Howlader M.T.H., Kagawa Y., Miyakawa A., Yamamoto A., Taniguchi T., Hayakawa T. and Sakai H., Alanine scanning analyses of the three major loops in domain II of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry4Aa. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 860-865 (2010) 査読有
- ③ Howlader M. T. H., Kagawa Y., Sakai H. and Hayakawa T., Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry4Aa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(3), 179-183 (2009) 査読有
- ④ Hayakawa T., Howlader M. T. H., Yamagiwa M. and Sakai H., Design and construction of a synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa gene: Hyperexpression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(6), 1033-1037 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ① 早川徹、小野雄祐、駒田卓也、中尾早織、有吉育子、HOWLADER M.T.H.、酒井裕、殺蚊トキシンCry4Aaの殺虫機構におけるドメインIIループの重要性、第33回日本分子生

物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、(2010年12月9日) 神戸

- ② Hayakawa T., Ono Y., Howlader M.T.H. and Sakai H., Mutational analyses of loops in Domain II of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry4Aa toxin. 43rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (2010年7月12日) Karadeniz Technical University, Trabzon-Turkey.
- ③ 早川徹、小野雄祐、Mohammad Howlader、足立毅、賀川康裕、酒井裕、ドメインIIのループ構造を標的とした高活性型Cry4Aa変異体構築の試み、第32回 (2009年12月12日) 日本分子生物学会年会、横浜
- ④ Howlader M.T.H.、賀川泰裕、宮川亜衣、山本彩華、谷口哲也、早川徹、酒井裕、Cry4AaのドメインIIに位置する代表的な3つのloop構造の解析、平成21年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、(2009年3月21日) 東京
- ⑤ Howlader M.T.H.、Kagawa Y.、Sakai H. and Hayakawa T., Loop2 in Cry4Aa domain II, but not loops 1 and 3, is essential for the mosquitocidal activity against *Culex pipiens.*, 41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. (2008年8月4日) University of Warwick, UK

〔図書〕(計2件)

- ① 早川徹、オーム社、応用生物学入門、(2010) pp87-103
- ② 早川徹、共立出版、分子昆虫学-ポストゲノムの昆虫研究、(2009) pp261- 266.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計1件)

名称：タンパク質製造方法、融合タンパク質及び抗血清

発明者：酒井裕、早川徹

権利者：国立大学法人 岡山大学、有限会社 ジャパンラム

種類：特許

番号：特許第 4604231 号

取得年月日：2010年10月15日

国内外の別：国内