

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310051

研究課題名（和文） 土壌細菌殺虫性タンパク質からの安心安全なタンパク質殺虫剤の実現

研究課題名（英文） Realization of a secure and safe proteinaceous-insecticide based on the directed evolution of the insecticidal toxin from soil bacterium, *Bacillus thuringiensis*.

研究代表者

佐藤 令一 (SATO RYOICHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30235428

研究成果の概要（和文）：殺虫性タンパク質のループ2およびループ3部位に変異を導入してファージディスプレイし、それをカドヘリン様受容体でパニングスクリーニングすることでカドヘリン様受容体に対して結合親和性が増した殺虫性タンパク質変異体が比較的容易に獲得できることが明らかになった。すなわち、既存の殺虫性タンパク質を進化分子工学的方法で目的とする害虫に効くものへと変換するための基盤技術が完成した。

研究成果の概要（英文）：It was indicated that Cry toxin mutants affinity-maturated to cadherin-like receptor is expected to be easily acquired, if mutation is introduced in loop 2 or loop 3 of Cry toxin, mutant Cry toxins are displayed on the T7 phage, and mutant-toxin-displaying phages are screened by bio-panning using cadherin-like receptor. That is to say, base technology was developed for the directed evolution of Cry toxin by which any available Cry toxins are possible to be changed to be highly active to any insect pests.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境負荷低減技術、殺虫剤、Cry toxin、進化分子工学、*Bacillus thuringiensis*、タンパク質殺虫剤、カドヘリン様受容体

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 B T (*Bacillus thuringiensis*) 菌の殺虫の仕組みの本質はそれが作る多様な殺虫性タンパク

質にある。我々人類は多様に進化した各系統の菌が作る、少しずつ活性スペクトルが違う殺虫性タンパク質をいろいろな害虫に当てはめて、B T 剤として利用している。一方、

殺虫性タンパク質は受容体（受け取る分子）への結合を介して作用する。そこで、昆虫の受容体に対する殺虫性タンパク質の結合性を人為的に改変あるいは向上させたなら、殺虫スペクトルや殺虫活性が改良できる。現実にはB T菌がこの薬学の大原則に即した改変に相当することを「進化」を通してやってきた。よって、多様な殺虫性タンパク質は多様な殺虫スペクトルをもつ。ところで、B T菌を含めた地球上の生物が、あり得る全ての変異タンパク質のうちのほんの一部しか作っておらず、変異体には無限の可能性があることが知られている。しかし、100 種の変異体を作り調べるだけでも大変である既存のタンパク質工学の手法では、有り得る 10 の何十乗と言う変異体を調べつくすことなどまったく不可能である。ところが最近、「進化分子工学」が生まれ、そこにおける最強の手法「ファージディスプレイ（ファージ上提示）」でこの処理能力問題のかなりの部分が解決できることを「抗体の進化分子工学」が証明した。よって、この進化分子工学の方法がB T殺虫性タンパク質に利用できるなら、そのスペクトルや活性を自在に改変する方法が確立できるはずである。また、「殺虫性タンパク質から目的害虫に対してオーダーメイドで作るタンパク質殺虫剤」という新概念を世界に送り出す事が可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、ファージディスプレイとパニングといった進化分子工学的技術を主要技術とする効率的な殺虫性タンパク質の改良技術を完成させ、同時に害虫により効く殺虫性タンパク質を実際に作出する方法の完成を目指して3つの実験を並行して進めることとした。

(1) 殺虫性タンパク質上の受容体結合部位の解明

殺虫性タンパク質上のカドヘリン様受容体結合部位が解明できれば、効果的な変異導入が可能になり、受容体に高い結合親和性をもつ殺虫性タンパク質変異体が容易に作れるようになると期待できる。そこで、変異導入法と障害物導入法を用いて、殺虫性タンパク質上のカドヘリン様受容体結合部位を明

らかにすることとした。

(2) カドヘリン様受容体高親和性変異体をとる変異導入法の確立

これまでの知見と(1)の結果を総合的に考慮した殺虫性タンパク質上の受容体結合候補領域に変異を入れ、殺虫性タンパク質をディスプレイしたファージから成る変異体ライブラリーを作り、カイコを受容体に結合親和性が増した変異体をカドヘリン様受容体に対しパニング法でスクリーニングし、どの部位の変異体ライブラリーから効果的にカドヘリン様受容体に対して結合親和性が向上した変異体が取れるかを明らかにすることとした。

(3) 実際の害虫により効く変異体取得に向けた方法の構築

(1)(2)はカイコとそれにより良く効く殺虫性タンパク質を作り出すための基礎実験とモデル実験である。一方、最終目標は、実際の害虫に高い殺虫活性を持つ殺虫性タンパク質の作り方の完成である。当初は、(1)(2)で得た知識と技術から、オオタバコガに対して殺虫活性を増した殺虫性タンパク質を取得する方法の構築を目指した。しかし、モデル実験をより高度な目標に定め直すこととした。すなわち、カイコに効く殺虫性タンパク質をチャイロコメノゴミムシダマシといった系統発生的に大きく離れた昆虫に効くものへと変換する技術の構築を目指すこととした。なぜならば、この技術が完成すれば、手持ちの殺虫性タンパク質から目的とする害虫に効く殺虫性タンパク質を自在に作り出すことが可能になると期待されるからである。

3. 研究の方法

(1) 殺虫性タンパク質上のカドヘリン様受容体結合部位の解析

大腸菌の発現系を利用して、カドヘリン様受容体結合部位の候補になっているCry1Aa型殺虫性タンパク質のループ部位のアミノ酸をシステインに置換し、あるいは更にそのシステインに2kDa程度の立体障害を結合させ、カドヘリン様受容体への結合親和性への影響を表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー-Biacoreを用い

て調べ、結合部位を解析した。

(2) カドヘリン様受容体高親和性変異体をとる変異導入法の確立

(1)で得られた情報をもとにループ1、ループ2、ループ3領域に、また既知の文献で示唆されている情報をもとに更にループ α 8領域に、連続した4アミノ酸がランダムな配列になるように変異を入れ、それをファージ上に発現させ、変異導入場所が異なる合計11種類のファージディスプレイライブラリーを構築した。このライブラリーをカイコガのカドヘリン様受容体でパニングによりスクリーニングし、どのライブラリーから効率的にカドヘリン様受容体に結合親和性を増した変異体が取れるかを解析した。また、得られた殺虫性タンパク質変異体が大腸菌で生産し、カイコガ幼虫に活性が向上したかをバイオアッセイで調査した。また、カイコガのカドヘリン様受容体を発現させた昆虫培養細胞 Sf9 に対する傷害活性を評価した。

(3)実際の害虫により効く変異体取得に向けた方法の構築 —カイコガに効く殺虫性タンパク質にチャイロコメノゴミムシダマシのカドヘリン様受容体に結合親和性を獲得させる方法の構築—

カイコに効く殺虫性タンパク質からチャイロコメノゴミムシダマシといった系統発生的に大きく離れた昆虫に効くものへと変換する技術の構築を目指し、Cry1Aa型殺虫性タンパク質のループ3領域に連続した4アミノ酸がランダムな配列になるように変異を入れた。そして、その殺虫性タンパク質変異体をファージ上にディスプレイしたファージライブラリーに対し、大腸菌で用意した組換え型チャイロコメノゴミムシダマシカドヘリン様受容体でパニングによるスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1)殺虫性タンパク質上の受容体結合部位

アミノ酸のシステインへの置換とそのシステインへの立体障害の導入を利用してCry1Aa型殺虫性タンパク質の受容体結合部位を解析した。その結果、ループ1、2およびループ α 8部位は共にカドヘリン

様受容体に接近・密着する部位であることが示唆された。また、特にループ2はカドヘリン様受容体への直接的な結合に与する部位であることが示唆された(図1)。ま

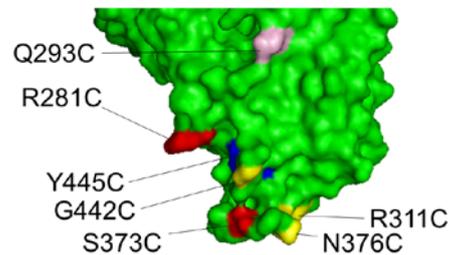


図1. システイン置換とそこへの立体障害の導入によりカドヘリン様受容体に対する結合性が阻害される部位。R281Cはループ α 8、R311Cはループ1、S373CとN376Cはループ2、またG442CとY445Cはループ3上にある。

た、ループ1、2部位は、他の分子と結合すると殺虫性タンパク質をオリゴマー化する性質を持つことが明らかになった。すなわち、これらの部位は、Cry1Aa型殺虫性タンパク質が受容に結合した際にオリゴマー化して細胞膜に穴をあける機能を獲得するためのスイッチの機能を持つことが明らかになった。この様に、受容体に対する結合親和性を増大させるために適すると期待される殺虫性タンパク質上の部位が明らかになったとともに、殺虫性タンパク質の分子機能に関する重要な情報が得られた。

(2)カドヘリン様受容体高親和性変異体を獲得する変異導入法の確立

Cry1Aa型殺虫性タンパク質のループ3部位に変異を導入した異なる2つのライブラリーからカドヘリン様受容体に対して結合親和性が10倍以上向上した変異体が3種類採れた。一方、ループ2部位に変異を導入した1つのライブラリーからもカドヘリン様受容体に対して結合親和性が30倍以

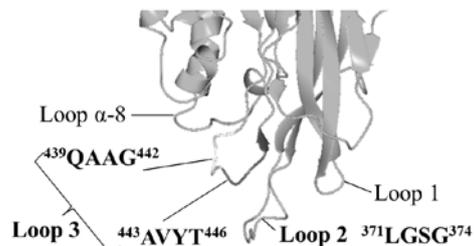


図2. 4アミノ酸ランダム変異の導入によりカドヘリン様受容体に対して結合親和性が上昇した変異体タンパク質が容易に獲得できることが分かったCry1Aa型殺虫性タンパク質ループ2の³⁷¹LGSG³⁷⁴領域とループ3の⁴³⁹QAAG⁴⁴²および⁴⁴³AVYT⁴⁴⁶領域。

上向上した変異体が3種類採れた。よって、殺虫性タンパク質のループ2, 3のこれらの領域に変異を導入してファージディスプレイし、それをカドヘリン様受容体でパニングスクリーニングすることでカドヘリン様受容体に対して結合親和性が増した変異体が比較的容易に取れることが明らかになった(図2)。

現在までにループ3変異体に対してしか評価は終了していないが、カドヘリン様受容体に対して結合親和性が向上したにもかかわらずそれらの変異体のカイコガ幼虫に対する殺虫活性はほとんど向上していなかった。しかし、幼虫に対する活性に関しては、消化液に対する耐性の変化(消化液により分解しやすくなること)など様々な要因が影響を与えるるので、変異体の細胞傷害活性が本当に向上していないかについては培養細胞に受容体を発現させた系を用意して評価する必要があった。そこで、カイコガのカドヘリン様受容体を発現させた昆虫培養細胞 Sf9 に対する傷害活性を評価した。しかし、この傷害活性も2倍程度にしかなかった。このことから、導入した変異がカドヘリン様受容体に対して結合親和性を向上させたが、同時に殺虫性タンパク質の他の機能に不具合を生みだしたために結果的に殺虫活性が相殺されたか、あるいはカドヘリン様受容体が真の受容体ではなく、より重要な受容体が存在するために効果が出なかったと考えられた。

以上のような結果に対しては、今後の殺虫性タンパク質の進化分子工学的改変において大きな意味を持つ知見であると評価できる。すなわち、現在の感触の範囲では、おそらく殺虫性タンパク質が作用する上でより重要な意味を持つ「真の受容体分子」を同定し、更にその分子に対する殺虫性タンパク質上の結合部位を明らかにして今回と同じ作業に持ち込めば、必ず殺虫性タンパク質の殺虫活性を自在に向上させる方法が完成できると期待される。

(3)カイコガに効く殺虫性タンパク質にチャイロコメノゴミムシダマシのカドヘリン様受容体に結合親和性を獲得させる方法の構築

チャイロコメノゴミムシダマシのカドヘリン様受容体への結合性を獲得した変異体の選抜をバイオパニングで実施し、Cry1Aa型殺虫性タンパク質のループ3部位に変異を導入したライブラリーから、結合性が全くないところから出発して明らかに結合性を獲得した変異型殺虫性タンパク質を1クローン獲得した。すなわち、ある既存の殺虫性タンパク質を出発材料にして、それを全く効かない害虫の受容体に結合親和性を持つものに変える方法が完成したと言える。現在はこの変異型殺虫性タンパク質がチャイロコメノゴミムシダマシに殺虫活性をも獲得したか否かを詳細に解析中である。もし殺虫活性が見られたなら、カドヘリン様受容体に対して結合親和性を持たせることで殺虫活性を獲得したことになる。また、もし、殺虫活性が見られなかったなら、カドヘリン様受容体が真の受容体でなかったことが原因である可能性が高いと考えられる。もし後者が正しいなら、「真の受容体分子」の同定を介して、ここで完成した受容体に結合親和性を高める技術を真の受容体に対して適用することができる。

5. 主な発表論文等

(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3件)

①Tanaka S, Yoshizawa Y, Sato R. Response of midgut epithelial cells to Cry1Aa is toxin-dependent and depends on the interplay between toxic action and the host apoptotic response. FEBS Journal 査読有, 279, 1071-1079 (2012). DOI:10.1111/j.1742-4658.2012.08499.x

②Kitami M, Kadotani T, Nakanishi K, Atsumi S, Higurashi S, Ishizaka T, Watanabe A, Sato R. *Bacillus thuringiensis* Cry toxins bound specifically to various proteins via domain III, which had a galactose-binding domain-like fold. Bioscience Biotechnology Biochemistry 査読有 75, 305-312 (2011).

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bb/75/2/75_100689/_article

③Obata F, Kitami M, Inoue Y, Atsumi S, Yoshizawa Y, Sato R. Analysis of the region for receptor binding and triggering of oligomerization on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. FEBS Journal 査読有, 276, 5949-5959 (2009).
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07275.x

〔学会発表〕(計11件)

①佐藤令一 Bt 殺虫性毒素の作用機構 第84回日本生化学会大会(招待講演)2011年9月11日 国立京都国際会館

②Tanaka S, Miyamoto K, Noda H, Sato R. Two molecular components from the midgut cells of *Bombyx mori* required for making Sf9 cell susceptible to Cry1A toxins. 第84回日本生化学会大会 2011年9月11日 国立京都国際会館.

③Fujii Y, Kotani T, Morimoto C, Harashima Y, Hoshino Y, Sato R. Analysis on the role of *Bacillus thuringiensis* Cry toxin loop regions in binding affinity to the cadherin-like receptor using Cry toxin mutants. 44TH Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Aug. 8. 2011 Halifax, Canada.

④Shiho S, Tsukamoto H, Miyamoto K, Noda H, Sato R. Variation of host cell components required for toxic actions of different subclasses of Cry1 toxin. 44TH Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Aug. 8. 2011 Halifax, Canada.

⑤Fujii Y, Otsuki M, Hoshino Y, Sato R. Binding affinity improvement of the Cry1Aa toxin to the cadherin-like protein, BtR175 from *Bombyx mori* using phage display of loop 3 mutant toxins and bio-panning. 44TH Annual Meeting of the

Society for Invertebrate Pathology.
Aug. 8. 2011 Halifax, Canada.

⑥Tanaka S, Yoshizawa Y, Sato R. *Bombyx mori* midgut epithelial cells' reaction induced by Cry1Aa includes both or either of osmotic swelling and apoptosis depending on toxic condition. 44TH Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Aug. 8. 2011 Halifax, Canada.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 令一 (SATO RYOICHI)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 30235428

(2) 研究分担者

国見 裕久 (KUNIMI YASUHISA)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 50195476

(3) 連携研究者

なし