

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310054

研究課題名(和文) BT殺虫性タンパク質のエッセンスでタンパク質殺虫剤を創る

研究課題名(英文) Generation of a new category, "Proteinaceous Insecticide" based on mechanisms which cause specificity diversity of *Bacillus thuringiensis* 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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：環境に優しい「タンパク質殺虫剤」の創生を目指して「BT菌が作り出す殺虫性タンパク質を人類が自在に改善し、使い勝手を格段に上げる方法」の構築を目指した。殺虫性タンパク質の一部はABCトランスポーターC2(ABCC2)を受容体として利用し宿主昆虫を殺すことが、しかもCry1A型殺虫性タンパク質に限れば、それがチョウ目昆虫に有効な理由はその細胞がCry1A型毒素が利用できるABCC2を持つからであることを明らかにした。これらの知見を基盤にして殺虫性タンパク質を各種昆虫のABCC2に適応進化させる方法を作るために、ABCC2大量生産・精製法を確立し、スクリーニング系の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)： To generate "Proteinaceous Insecticide" we attempted to make a method which can improve activity of the insecticidal protein made by BT. A group of insecticidal protein was indicated to act insect host using ABC transporter C2 as a receptor. It was also suggested that susceptibility of lepidopteran insects to Cry1A toxins largely depend on ABCC2s they have on the cells. To make a method by which we can evolve the binding affinity of insecticidal protein toward ABCC2 of target insects, we established large scale production system and purification system for ABCC2. We also made a platform for the screening system for the improved insecticidal proteins.

研究分野：昆虫病理学，昆虫生理学

キーワード：Bacillus thuringiensis Cry toxin ABCC2 receptor

1. 研究開始当初の背景

人口の爆発的急増で食糧増産は急務となり、殺虫剤は益々不可欠なものになってきた。しかし、過去の多くの化学殺虫剤が人間にとって有害であり、残留して地球生態系に負担をかけるものであったのは事実である。そこで、このような食糧と環境の問題を同時に解決するため、本研究ではこれまでに安全性が十分証明され使用実績が豊富な *Bacillus thuringiensis* (BT) 菌が作り出す殺虫性タンパク質を「人類が自在に改善し、使い勝手を格段に上げる方策」を模索することとした。すなわち、殺虫性タンパク質の作用機構と、安全性の基となる特異的な作用の仕組みを解明し、殺虫性タンパク質に進化分子工学の手法を導入して、Bt菌に依存せずに安全な殺虫剤を人類がいろいろな害虫に向けてオーダーメイドで創り出す方法の構築に挑むことにした。

これまでの試みで、殺虫性タンパク質の真の受容体の一つが毒物の排出装置ABCトランスポーターC2 (ABCC2) であることが明らかになって来た。しかし、極めて多様である殺虫性タンパク質の全てがこの分子を受容体にするか否かについては疑問であった。また、昆虫も多様であり、全ての昆虫のABCC2が同様に殺虫性タンパク質の受容体になり得るかは疑問であった。また、殺虫性タンパク質に対する昆虫の感受性がその昆虫のABCC2に殺虫性タンパク質が結合できることに由来するかもはっきりしていなかった。一方、進化分子工学とは受容体への結合性の向上を人工的に促進する行為であるが、これを実現するためには「殺虫性タンパク質が結合性を進化させたことを評価する系」が必要であった。また、これらの目的のためには受容体タンパク質の粗精製標品の調製法の確立が必要であった。さらに、念願の進化分子工学に向けて変異体ライブラリーを作る必要があった。

2. 研究の目的

以上の背景から本研究では以下を目的として実験を行った。

- (1) ABCC2が全ての殺虫性タンパク質にとって普遍的な受容体分子であるかを明らかにする。
- (2) Cry1Aa型殺虫性タンパク質にとってはどの昆虫でもABCC2が受容体として機能するかについて明らかにする。
- (3) カイコガのABCC2 (BmABCC2) 大量発現系構築とそれを用いた粗精製BmABCC2の調製法を確立する。
- (4) BiacoreによりBmABCC2への殺虫性タンパク質の結合の特性を明らかにする。

(5) 進化分子工学のためのCry8Ca型殺虫性タンパク質変異体ライブラリーを作製しパニング選抜系を構築する。

3. 研究の方法

(1) 受容体機能解析

バキュロウイルス発現システムによってSf9細胞に各種ABCC2分子を発現させ、各殺虫性タンパク質に対してSf9細胞が感受性を獲得したか(膨潤するようになったか)を位相差顕微鏡下で観察した。

(2) BmABCC2の大量発現と粗精製BmABCC2の調製

バキュロウイルス発現システムによってSf9細胞にFLAGタグを付けたBmABCC2を発現させ、膜画分を調製したのち、それを界面活性剤n-dodecyl-β-D-maltosideで可溶化した。次に、この溶液からBmABCC2を抗FLAG抗体アフィニティービーズで粗精製した。

(3) Biacore解析

粗精製したBmABCC2をチップに固定化し、各種殺虫性タンパク質の結合解離動態を解析した。

(4) 変異体ライブラリーとパニング選抜系

Cry8Ca型殺虫性タンパク質のループ3部位に4アミノ酸連続ランダム変異を導入し、T7ファージ上に提示させた。

4. 研究成果

(1) 殺虫性タンパク質受容体としてのABCC2の普遍性について

BT菌の殺虫性タンパク質はサブクラスが60種類程もある多様性にとんだタンパク質グループであり、それらは相互に30%程度

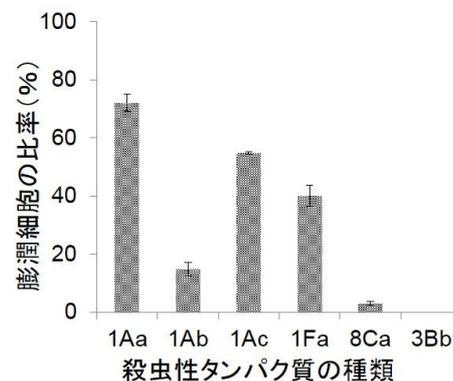


図1. ABCC2発現Sf9細胞の各種殺虫性タンパク質に対する感受性. BmABCC2発現Sf9細胞に殺虫性タンパク質を添加して細胞の膨潤を観察した。膨潤は殺虫性タンパク質によって細胞が死にゆく一過程であり、やがて破裂して死ぬ。

しか相同性がない。すなわち、各サブグループに属する殺虫性タンパク質が同じ分子種を受容体をしていると考える根拠はない。そこでどの範囲のサブクラスの殺虫性タンパク質にとってABCC2が受容体として機能するのかを検討した。その結果Cry1Aaと系統的距離の近いCry1Ab, Cry1Ac, Cry1FaはBmABCC2を受容体として利用することができた。一方、Cry1Aaと比較的距離に近いCry8Ca殺虫性タンパク質もさほど機能的とは言えないまでもBmABCC2を受容体として利用できることが明らかになった(図1)。しかし、Cry1Aaとは遠い関係にあるCry3AaはBmABCC2を受容体として利用できなかった。したがって、Cry1型殺虫性タンパク質は一般的にチョウ目昆虫のABCC2を受容体として利用でき、それ故にチョウ目昆虫を殺すことができるのであろうと予測された。また、系統的距離が離れると同じABCC2を利用できなくなることに起因してCry8Caはチョウ目昆虫に弱い活性しか示すことができないものと考えられた。一方、Cry1の中にはBmABCC2を受容体として利用できないものも見つかった。また、Cry8Caと比較的位置に近いCry9AaもBmABCC2を受容体として利用できなかった。よって、比較的Cry1Aaに近い殺虫性タンパク質の中にも何らかの理由でABCC2を利用できないものが散在するのであろうと予測された。

(2)Cry1Aa型殺虫性タンパク質にとってはどのチョウ目昆虫においてもABCC2が受容体として機能するかについて

コナガとアズキノメイガのを発現するSf9細胞を用意して(1)と同様の実験を行った結果、コナガとアズキノメイガにおいてもCry1AaはABCC2を受容体として利用していることが明らかになった。このことから、Cry1Aaのチョウ目昆虫における作用においてはABCC2が受容体として重要な役割を果たしているものと予測された。

(3)BmABCC2大量発現系構築とそれを用いた粗精製BmABCC2の調製法の確立

Baculovirus / Sf9システムを用いたBmABCC2発現細胞を数リットルレベルで培養し、n-dodecyl-β-D-maltosideで可溶化したBmABCC2を抗FLAG抗体アフィニティービーズで粗精製することに成功した。

(4)BiacoreによるBmABCC2への殺虫性タンパク質の結合特性の解析

バイオセンサーBiacoreを用いてCry1Aa型殺虫性タンパク質のBmABCC2との結合特性の解析を行った。その結果、BmABCC2分子にCry1Aaは高い速度の結合を示し、解離はきわ

めてゆっくりであることが明らかになった。一方、カイコに殺虫活性を持つCry1AbやCry1Acは同様の特徴を持つ結合解離パターンを示したが、ほとんど活性を持たないCry8CaはBmABCC2に相対的により低い速度の結合と比較的早い速度の解離を示した。また、カイコにまったく殺虫活性を持たないCry3AaはBmABCC2に対しほとんど結合性を示さなかった。これらのことから、殺虫性タンパク質の活性とABCC2への結合親和性との間には関係があると考えられた。

(5)進化分子工学のためのCry8Ca型殺虫性タンパク質変異体ライブラリーとパニング選抜系の構築

Cry8Ca型殺虫タンパク質のループ3部位に変異を入れてT7ファージに発現させて、 1.0×10^6 個の変異体を含むライブラリーを製作した。一方、粗精製したBmABCC2をスチレンプレートにコーティングし、このプレートがCry1Aa提示T7ファージを選択的に濃縮することができるかと言ったモデル実験を行った。結果、一回のパニングあたり5倍程度のCry1Aa提示T7ファージの濃縮が確認された。これによって、現在最も重要な受容体と考えられるABCC2を対象とした殺虫性タンパク質の進化分子工学の材料と方法の基盤は大方完成したと考えられ、次のステージへの前進に期待がもたれた。

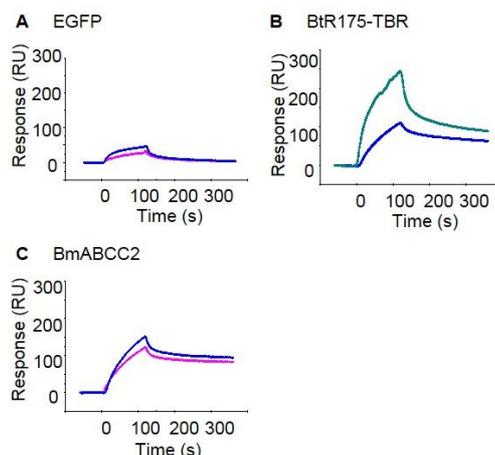


図2. Cry1Aa毒素とEGFP, BtR175-TBR, BmABCC2の結合動態を示すセンサーグラム。Sf9細胞にEGFP, BtR175-TBRあるいはBmABCC2を発現させ、分取した膜画分をDDMで可溶化した。この細胞膜可溶化サンプルをアミンカップリング法でBiacore CM5センサーチップ上に固定化し、Cry1Aa毒素との相互作用解析を行った。Cry1Aa毒素は200 nM(ピンク)、400 nM(青)、800 nM(緑)を2分間添加し、その後4分間流路をPBSTに置換した。

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 4 件)

1. Endo H, Kobayashi Y, Hoshino Y, Tanaka S, Kikuta S, Tabunoki H, Sato R. Affinity maturation of Cry1Aa toxin to the Bombyx mori cadherin-like receptor by directed evolution based on phage display and biopanning selections of domain II loop 2 mutant toxins. *MicrobiologyOpen* 査読有 (2014) 3(4):568-77. 10.1002/mbo3.188
2. Tanaka S, Miyamoto K, Noda H, Jurat-Fuentes JL, Yoshizawa Y, Endo H, Sato R. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *The FEBS J.* 査読有 (2013) 280(8):1782-94. 10.1111/febs.12200
3. Fujii Y, Tanaka S, Otsuki M, Hoshino Y, Endo H, Sato R. Affinity Maturation of Cry1Aa Toxin to the Bombyx mori Cadherin-Like Receptor by Directed Evolution. *Mol Biotechnol.* 査読有 (2013) 54(3):888-99. 10.1007/s12033-012-9638-0
4. Fujii Y, Tanaka S, Otsuki M, Hoshino Y, Morimoto C, Kotani T, Harashima Y, Endo H, Yoshizawa Y, Sato R. Cry1Aa binding to the cadherin receptor does not require conserved amino acid sequences in the domain II loops. *Bioscience Reports* 査読有 (2012) 33(1):103-12. 10.1042/BSR20120113.

【学会発表】(計 15 件)

1. Shiho Tanaka, Ami Iizuka, Kazuhisa Miyamoto, Hiroaki Noda, Shingo Kikuta, Ryoichi Sato. Mode of action of Cry1A toxins via two different types of receptors from Bombyx mori. 47th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, August 3-7, 2014. Mainz, Germany.
2. 田中詩穂, 宮本和久, 野田博明, 菊田真悟, 佐藤令一. Cry 毒素殺虫作用機構上で協調作用を示す 2 つの受容体の性状解析 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 2014 年 3 月 10 日 日大 藤沢.
3. 新川直雄規, 山口雅人, 佐藤令一. Cry 毒素殺虫活性発現におけるカドヘリン様受容体の重要性の検討 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 2014 年 3 月 10 日 日大 藤沢
4. Haruka Endo, Takeshi Fujii, Yukio Ishikawa, Ryoichi Sato. Analysis of factors determining

susceptibility levels of insect species against an insecticidal protein. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 5 日 神戸ポートアイランド 神戸

5. 遠藤悠, 藤井毅, 石川幸男, 佐藤令一. Bt 殺虫性タンパク質に対する昆虫の感受性決定因子の解析. 第 74 回昆虫病理研究会 2013 年 9 月 24 日 東京大学農学部 弥生
6. 田中詩穂, 宮本和久, 野田博明, 佐藤令一. カイコガ ABC トランスポーター BmABCC2 は殺虫性タンパク質 Cry 毒素とどのようにして相互作用するのか? 第 8 回トランスポーター研究会年会 2013 年 6 月 15 日 熊本大学薬学部 熊本
7. 田中詩穂, 宮本和久, 野田博明, 佐藤令一. Cry 毒素抵抗性を生み出す宿主昆虫 ABC transporter C2 の変異の解析. 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会 2013 年 3 月 29 日 日大 藤沢
8. 佐藤令一. カイコにおける Bt 毒素の受容体と殺虫機構に関する研究. 平成 25 年度日本蚕糸学会賞受賞記念講演会(蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 83 回大会) 2013 年 3 月 18 日 農林水産技術会議事務局筑波事務所 つくば.
9. 小林勇樹, 佐藤令一. カイコカドヘリン様受容体に対して結合親和性を高めた Cry1Aa 毒素のスクリーニング. 日本蚕糸学会関東支部第 63 回大会 2012 年 11 月 23 日 東京農工大小金井キャンパス 小金井.
10. 遠藤悠, 藤井毅, 石川幸男, 佐藤令一. アズキノメイガ幼虫の中腸円筒細胞において Cry 毒素に対する感受性を決定する受容体の解析. 日本蚕糸学会関東支部第 63 回大会 2012 年 11 月 23 日 東京農工大小金井キャンパス 小金井.
11. 田中詩穂, 宮本和久, 野田博明, 佐藤令一. Cry 毒素殺虫作用機構上で働く宿主受容体分子の評価 第 10 回昆虫病理研究会シンポジウム 2012 年 9 月 22 日 帯広大学農学 帯広.
12. Haruka Endo, Ryoichi Sato. Analysis of two molecules determining susceptibility to Cry1 toxin in *Ostrinia scapulalis*. 24th International Congress of Entomology, August 19-25, 2012 Daegu, South Korea.
13. Shiho Tanaka, Kazuhisa Miyamoto, Hiroaki Noda, Ryoichi Sato. Analysis of expression pattern of Bombyx mori gustatory receptors in the tissues and single cells of the taste organs. 24th International Congress of Entomology, August 19-25, 2012

- Daegu, South Korea,
14. 藤井勇樹, 大槻愛美, 星野康, 佐藤令一 バイオパニング法により選抜された Cry1Aa 変異体の結合親和性と種々の性状評価. 第 12 回日本タンパク質科学会年 2012 年 6 月 21 日 名古屋国際会議場 名古屋
 15. 田中詩穂, 宮本和久, 野田博明, 佐藤令一 カイコガ ABC transporter subfamily C2 が *Bacillus thuringiensis* Cry 毒素受容体として機能を発揮する仕組みの解明. 第 7 回トランスポーター研究会年会 2012 年 6 月 9 日 京都大学農学部 京都

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

岩淵喜久男 (IWABUCHI KIKUO)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 00203399

(3) 連携研究者

なし