

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380034

研究課題名(和文) 抵抗性昆虫の出現を許さない次世代型Cryトキシンの開発

研究課題名(英文) Development of novel mosquito-control system using *Bacillus thuringiensis* Cry toxins

研究代表者

早川 徹 (Hayakawa, Tohru)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：30313555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：蚊は重篤な症状を引き起こす流行病(デング熱、マラリア等)を媒介する要防除害虫である。本研究ではヒトや環境に安全且つ持続的に利用可能な蚊防除システムを土壌細菌*Bacillus thuringiensis*由来の昆虫特異的トキシンの利用して構築しようとした。本研究では様々な殺蚊トキシンを大腸菌で効率よく生産するシステムを構築すると共に、組換えトキシン間の作用機構上の差異、複数同時使用時のトキシン間干渉作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mosquitos are vectors of important diseases like malaria and viral hemorrhagic fevers. Therefore, I tried to develop novel mosquito-control system using mosquitocidal toxin derived from soil bacterium, *Bacillus thuringiensis*. This system were supposed to be safe and are able to prevent, or at least delay the development of resistance-insects. In this study, I established the production systems for several mosquitocidal toxins (e.g. Cry11Ba, Cyt1Aa, AahIT, Bj IT) and analyzed their mosquitocidal mechanisms by several procedures (e.g. alanine scanning, binding assay). We also observed the synergism of mosquitocidal activity between Cry4Aa and Cry11Ba.

研究分野：昆虫病理学

キーワード： *Bacillus thuringiensis* Mosquitocidal toxins Cry toxin Scorpion toxin Synergism

1. 研究開始当初の背景

ウエストナイル熱やデング熱、マラリア等、重篤な症状を引き起こす流行病の中には蚊によって媒介されるものが多く存在する。これらの病気が現在の日本で流行していないのは、病気を媒介する主な蚊(熱帯シマカ)が気候の関係で日本に定着しづらいことと、病気及び外来蚊の移入を水際で防ぐ努力の成果である。一方、日本でも地球温暖化に伴い蚊の生息域拡大や大量発生やそれに伴う蚊媒介病が蔓延する可能性があり、ヒトや環境に安全且つ効率の良い蚊防除システムの開発が喫緊の課題となっている。また殺虫剤を継続的に利用することを考えると、抵抗性昆虫の出現が大きな問題となる。抵抗性昆虫は殺虫剤の作用機構に関連する遺伝子の突然変異によって生じると考えられ、生活サイクルの速い蚊(約1ヶ月)などでは特に短期間で抵抗性を獲得する可能性がある。抵抗性昆虫の出現を阻害・抑制する何らかの工夫も必要である。

土壌細菌*Bacillus thuringiensis*が生産するトキシン(Cryトキシン)は非常に高い特異性を示し、ヒトや環境に極めて安全な微生物殺虫剤として利用されている。*B. thuringiensis*の中には蚊を含む双翅目昆虫に特異的な殺虫活性を示すトキシンを生産するものもあり、それらは安全な微生物殺虫剤として利用できる。特に亜種*israelensis*(Bti)は蚊に特異性を示す複数のトキシン(Cry4Aa, 4Ba, 10Aa, 11Aa)とCytトキシン(Cyt1Aa, 2Ba)を生産し、殺虫剤として30年以上使用されているものの、未だ抵抗性昆虫が出現したという報告がない。Btiトキシンの殺虫システムには、抵抗性昆虫の出現を防ぐ多くの工夫が含まれ、これらトキシンの解析はヒトや環境に安全且つ持続的に利用可能な害虫防除システムを構築する上で重要な知見を与えると考えた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標はヒトや環境に安全且つ持続的に利用可能な蚊防除システムを構築することである。そのためヒトや環境に対する安全性が高い*B. thuringiensis*由来のトキシンを主体として持続的な利用が可能な微生物殺虫剤を開発しようと考えた。特にBtiトキシンには抵抗性昆虫の出現を防ぐ多くの工夫が存在すると考えられ、トキシンの作用機構や相互作用の解析結果は本目的に大きく寄与すると考えられる。

Btiトキシンに対する抵抗性が発達しない、少なくともし難いのは、Btiトキシンが作用の異なるトキシンで構成されるためと考えられる。抵抗性が突然変異によって発達するものと仮定すれば、Btiトキシンに対する抵抗性が発達するには作用機構の異なる複数のトキシンに対する抵抗性遺伝子を同時に獲得する必要がある。

そこで本研究では、できるだけ多種類の組

換えトキシンを準備し、各々の作用機構を比較解析すると共に、同時使用による相互作用を詳しく解析しようと考えた。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌を用いた組換えトキシンの生産

本研究ではトキシンを大腸菌で生産した。まずトキシンをコードする人工遺伝子を大腸菌遺伝子の利用コドンに合わせてデザインした。人工遺伝子はリカーシブPCR法で合成し、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として発現させた。発現ベクターには *lac* プロモータを利用する pGEX 4T-2 (GE Healthcare)もしくは Cold ショック *cspA* プロモータを利用する pColdGST (Takara)を用いた。GST 融合トキシンの精製には glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare)を用いた。

一方、サソリトキシンについては発現タンパク質をアルカリ可溶性の凝集体として生産する 4AaCter タグを利用した発現ベクター-p4AaCter (Hayakawa et al., 2010)を用いて生産した。

(2) バイオアッセイ

トキシンの殺虫活性はアカイエカ幼虫を用いたバイオアッセイで評価した。アカイエカ卵は大日本除虫菊株式会社から供与していただき、25 のインキュベータ中で3齢幼虫まで飼育した。蚊の幼虫はある程度の粒径を持つものしか餌と認識しないため、トキシンはラテックスビーズ(径0.8 μm)に吸着させた。4AaCter タグと融合させたサソリトキシンは、それ自身がアルカリ可溶性の粒子(径0.5~1 μm)を形成するため、そのまま幼虫に投与した。アカイエカ幼虫に対するトキシンの殺虫活性は、投与48時間後の死虫率から評価した。50%致死濃度(LC₅₀)はプロビット法(Finney 1971)を用いて算出した。

(3) トキシン間相互作用の解析

トキシン間の相互作用は水晶発振子マイクロバランス(QCM)法で測定した。簡単に説明すると、QCM用センサーチップ表面にタンパク質を吸着させ、それに対するリガンドタンパク質の結合を観察した。具体的には加えたりガンドタンパク質の濃度増加に対するセンサー表面に吸着するタンパク質量の増加をプロットし、それを基に K_D 値を算出した。

4. 研究成果

本研究の目的を達成するには「ヒトや環境に安全な微生物防除資材を確保」し、それを持続的に使用するためのシステム、特に「抵抗性昆虫の出現を阻止・抑制する手法の開発」が必要となる。そこで本研究では主に次の3つのことに注目した研究を進めた。

- ・トキシンを安定生産する系を確立する。
- ・トキシンの作用機構、もしくは他のトキシンと作用機構の差異を明らかにする。
- ・複数のトキシンを混合して使用した場合のトキシン間相互(干渉)作用を明らかにする。

(1)組換え殺蚊トキシンの生産

人工遺伝子の作製

一般的に*B. thuringiensis*由来のトキシン遺伝子は大腸菌遺伝子と異なる構造を持つ。*B. thuringiensis*と大腸菌では遺伝子で利用されるコドンの違いが大きく、その結果としてGC含有率も大きく異なっている。利用コドンの違いはタンパク質の生産に大きく影響する可能性がある。実際、殺蚊活性を持つCry4Aaでは、大腸菌遺伝子の利用コドンを参考に人工遺伝子を作製することで、大腸菌での生産効率が大幅に上昇している(Hayakawa et al., 2008)。

本研究では殺蚊トキシンを生産するのに大腸菌様にコドンを改変した人工遺伝子を利用することにした。トキシンには殺蚊活性を持つことが報告されているBti由来のCry11Aa, Cry4Ba, Cyt1Aa, 亜種*jegathesan* (Btj)由来のCry11Ba, Cry19Aa, 亜種*kurstaki*由来のCry2Aa, TK-E6株由来のCry46Ab, *Lysinibacillus sphaericus*由来のBin (BinAとBinBの複合体), MTX1を採用した。また細菌以外の昆虫特異的トキシンとして、サソリトキシン(AahIT及びBjaIT)をコードする人工遺伝子も作製した。コドンを改変することで人工遺伝子のGC含有率は大腸菌遺伝子と同様の50%付近の値をとるようになった。

トキシタンパク質の生産

組換えトキシンの発現量をSDS-PAGEで解析した結果、組換えCry19Aaを除く全てのトキシンが大量に発現した。組換えCry19Aaについては発現ベクターを導入した大腸菌の増殖が抑制されており、発現タンパク質が大腸菌の増殖に影響した可能性が考えられた。また組換えCry11AaやCry4Ba, Cry2Aaについては、発現タンパク質のほとんどが不活性なタンパク質凝集体を形成した。組換えトキシンを可溶性のタンパク質として生産する目的でpColdGSTベクターを用いる生産方法を試みたが、未だに問題の解決に至っていない。トキシタンパク質を欠失させる等の方策を検討中である。一方、これら以外の組換えトキシンについてはその多くが可溶性画分に局在し、大量調製に成功した。

組換えトキシンの生物活性はアカイエカ幼虫を用いたバイオアッセイで調査した。その結果、組換えCry11Baのアカイエカ幼虫に対するLC₅₀値は約0.1 µg/mlと見積もられた。これは比較的強い殺蚊活性を示すと考えられるBti由来のCry4AaやCry11Aa (LC₅₀ = 1 µg/ml)よ

りも10倍強い活性であった。また組換えCyt1Aa自体は殺蚊活性を示さなかったものの、Cry11Aaの殺蚊活性を大幅に助長する活性が検出された。Cry11Ba及びCyt1Aaに関しては高い活性を持つ組換えトキシンが生産できたことを示唆していた。組換えCry46Ab及びBin、MTX1トキシンの殺蚊活性は現在も解析の過程にある。

(2) 殺蚊トキシンの作用機構に関する研究

作用の異なる殺蚊トキシンの利用は抵抗性昆虫の出現を阻止、少なくとも抑制すると考えられる。本研究ではBtiに由来する殺蚊トキシンCry4Aa及びCry11Aa, Cyt1Aaの作用機構を解析し、他のCryトキシンとの差異を明らかにしようとした。

殺蚊トキシンCry4Aa

Cry4Aaは他の多くのCryトキシンと類似する3ドメイン構造を持つ。構造の類似性は機能における類似性を示唆するものであるが、実際には大きな違いが観察されている。

本研究では作用機構上の差異を明らかにする目的でCry4Aaの殺蚊活性に關与する因子の探索を進めた。具体的にはCry4Aaドメインに位置するループ1~3及びループα8、β4-β5 (between β4-β5)、β8-β9 (between β8-β9)をアラニンスキャニング法で解析した。また同時にこれらループ構造を含むポリペプチドを作製し、アカイエカ幼虫から抽出した中腸刷子縁膜タンパク質との結合親和性をQCM法で解析した。その結果、Cry4Aaドメインのループ構造は何れもアラニン残基に置換可能であった。またQCM解析ではドメインのループα8及びβ1、ドメインがアカイエカ由来の中腸タンパク質と比較的高い結合親和性を示した。この結果はCry4Aaの殺蚊活性に複数の機能構造が補完的・協調的に機能している可能性を示唆していた。またCry4Aaを単糖(GalNAc, GlcNAc, Galactose, Mannose, Fucose)で処理し、バイオアッセイを行った結果、GalNAc処理したCry4Aaの殺蚊活性が大きく上昇した(2倍以上)。このことはCry4Aaの殺蚊活性に受容体糖鎖との相互作用が關与することを示唆していた (*in preparation*)。以上、Cry4Aaは一般的なCryトキシンと異なる作用機構を持つことが考えられた。

殺蚊トキシンCry11Aa

Cry11AaはBtiに由来する殺蚊トキシンで、Cry4Aaと同様な3ドメイン構造を持つと考えられている。本研究ではCry11Aaの殺蚊活性に關与するループ構造を特定する目的で、トキシンの分子表面に露出し、且つ受容体結合に強く關与すると予想されるループ構造(8, 1~3)を標的として変異を導入(アラニンスキャニング解析)した。その結果、ループ2を除く

全ての変異体で殺虫活性が失われた。これはCry4Aaで観察された結果と異なっており、Cry11Aaが他の多くのCryトキシンのような様式で受容体を認識していることを示唆していた。

殺蚊トキシンCyt1Aa

Cyt1AaもBtiに由来する殺蚊トキシンであるが、Cry4AaやCry11Aaとは全く異なる構造(β シートを主体とする1ドメイン構造)を持つ。Cyt1Aaは標的組織の脂質膜に直接結合して膜上に小孔を形成すると考えられている。また標的組織膜に結合したCyt1AaがCry11Aaの受容体として機能することも報告されている。Cyt1Aaの存在はBtiトキシンの作用機構を複雑化していると考えられる。

バイオアッセイの結果、本研究で調製した組換えCyt1Aaは単独でアカイエカ幼虫に殺虫活性を示さなかった。しかし様々な比率で作製したCyt1AaとCry11Aaの混合トキシンは、Cyt1Aaの濃度依存的に強い殺虫活性を示した。またCry4Aaに対しても約2倍程度の殺虫活性助長効果を示した。本研究で生産した組換えCyt1Aaはフォスファチジルコリンで作製したりリポソームに吸着した。これはCyt1Aaが非特異的に膜結合することを示唆していた。一方、アカイエカ幼虫の中腸刷子縁膜(BBM)から調製した脂質を用いてリポソームを作製し、それに結合した組換えCyt1Aaを解析した結果、Cyt1Aaの多量体が検出された。一般的に小孔形成にはトキシンの多量体形成が必要と予想される。Cyt1Aaの多量体形成を促す脂質種についての解析を現在も進めている。

(3) トキシン間の相乗効果に関する研究

本研究では生産した組換えトキシンを組み合わせ合わせた混合トキシンを調製し、複数トキシンを同時使用した場合のトキシン間干渉作用を観察した。

3Dトキシン間の相互作用

Cry4AaとCry11AaはBtiトキシンの主要成分であり、Cry11BaはBtjトキシンの主要成分である。これらは全て3つのドメインで構成される類似の構造を持つトキシンである。本研究では防除にBtiとBtjを同時使用することを想定して、Cry11Baに対するCry4AaもしくはCry11Aaの干渉作用を解析した。

アカイエカ幼虫を用いるバイオアッセイの結果、Cry11BaとCry4Aaの混合トキシン(1:1)は非常に強い活性を示し、LC₅₀値は約0.03 $\mu\text{g/ml}$ と見積もられた。これはCry4Aa (LC₅₀ = 0.85 $\mu\text{g/ml}$)やCry11Ba (LC₅₀ = 0.10 $\mu\text{g/ml}$)を単独で使用した場合よりも極めて高い殺虫活性であり、Cry11BaとCry4Aaが何らかの形で協調して作用していることを示唆していた。一方、Cry11BaとCry11Aaの混合トキシン(1:1)の

LC₅₀値は約0.13 $\mu\text{g/ml}$ と見積もられた。Cry11AaのLC₅₀値が約1 $\mu\text{g/ml}$ であることを考慮すると、Cry11BaとCry11Aaが独立して作用するか、少なくとも低レベルの助長作用しか働いていないことが示唆された。

Cry11Baが構造の類似するCry11Aaではなく、Cry4Aaと協調することは非常に興味深く、Cry11Ba-Cry4Aa間の相互作用についての解析を現在も継続中である。

異種トキシン間の相互作用

本研究ではCryトキシンと全く異なる作用を持つサソリトキシン(神経トキシン)に注目し、これがCryトキシンの殺虫活性を増強、もしくは補完できないかと考えた。

2種の昆虫特異的サソリトキシン(BjaIT及びAahIT)を4AaCterタグ融合タンパク質として大腸菌で生産した結果、サソリトキシンはアルカリ可溶性の凝集体として菌体内に蓄積された。アカイエカ幼虫を用いたバイオアッセイの結果、組換えサソリトキシン自体に殺虫活性は認められなかった。しかしサソリトキシンとCry4Aaの混合トキシンはCry4Aa単独よりも約2倍強い殺虫活性を示した(Matsumoto et al., 2014)。サソリトキシンはNaチャンネルに作用する神経毒であり、体腔内に取り込まれない限り効果が発揮できないと考えられるが、Cry4Aaと同時使用することによって中腸組織が破壊され、作用点である神経組織に到達できたのではないかと考えられた。

以上、本研究ではヒトや環境に安全且つ持続的に利用可能な蚊防除システムに微生物由来のトキシンを活用するための研究をすすめた。項目(1)では遺伝子組換え及びタンパク質生産が容易であること、*B. thuringiensis*のように孢子(芽胞)を形成しないので、組換えトキシン遺伝子が環境中に拡散する危険性が低いことなどを勘案し、組換えトキシンを大腸菌で生産した。その結果、Btiに由来するCry4AaやCry11Aa、Cyt1Aa、Btjに由来するCry11Baなどのトキシンの生産系を確立した。特にCry11Baは日本の優占種であるアカイエカに非常に高い殺虫活性を示すことが明らかになった。また項目(2)における作用機構の解析の過程で、特にCry4Aaが他のCryトキシンとは異なる作用機構を持つことを明らかにした。項目(3)では複数トキシンを同時使用した場合のトキシン間干渉作用を解析し、同タイプのトキシンであるCry4AaとCry11Baが何らかの形で協調して殺虫活性を大幅に増強することを明らかにした。また明らかに作用機構の異なるサソリトキシンとの併用もある程度有効であることを明らかにした。

本研究では開始時に設定した課題の多くをこなし、目標につながる多くの重要な知見を得た。一方、完了できていない部分や新たに

生じた疑問(課題)も多く残された。ただ当初の目標(期待)への道筋(筋書き)は着実にたどれており、本研究をさらに発展させることで、「ヒトや環境に安全且つ持続的に利用可能な蚊防除システム」を構築できると確信するに至った。本研究の結果は、政府・自治体等が進める大規模な蚊の防除作戦を構築する上で重要な示唆を与えるものと考えている。「蚊の効率的防除」は、関連業界に大きな経済的波及効果を及ぼし、蚊媒介病の大流行(パンデミック)を予防することにより医療費の抑制などにもつながると考えている。

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)

Matsumoto R., Shimizu Y., Howlader M.T.H., Namba M., Iwamoto A., Sakai H., Hayakawa T., Potency of insect-specific scorpion toxins on mosquito control using *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol. 117, No. 6, 2014, 680-683, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.004.

Hayashi M, Iwamoto S, Sato S, Sudo S, Takagi M, Sakai H, Hayakawa T., Efficient production of recombinant cystatin C using a peptide-tag, 4AaCter, that facilitates formation of insoluble protein inclusion bodies in *Escherichia coli.*, *Protein Expression and Purification*, 査読有, Vol. 88, 2013, 230-234, doi: 10.1016/j.pep.2013.01.011.

Kuroda S, Begum A, Saga M, Hirao A, Mizuki E, Sakai H, Hayakawa T., Parasporin IAc2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain., *Current Microbiology*, 査読有, Vol. 66, No. 5, 2013, 475-480, doi: 10.1007/s00284-013-0301-1.

[学会発表](計14件)

檜垣亜由子(早川徹)、BT菌亜種 *israelensis* に由来するCyt1Aaの大腸菌を用いた効率的生産法、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

米田直也(早川徹)、殺蚊トキシンCry11Baを用いた効率的蚊防除システムの構築を目指して、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

岡田光司(早川徹)、殺蚊トキシンCry4Aa

の作用機構に関する研究、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

早川徹(早川徹)、効率的且つ持続的蚊防除システムの構築に向けた最近の取り組み(シンポジウム、招待)第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

早川徹(早川徹)、Bt菌が産生する殺蚊トキシンCry4Aaの複雑な作用機構について、日本蚕糸学会第84回大会、2014年3月10日-11日、神奈川県藤沢

早川徹(早川徹)、大腸菌を用いて殺蚊トキシンCry11Aaを効率的に生産する方法、第36回分子生物学会年会、2013年12月3日-5日、神戸

Mohammad T. H. Howlader (Tohru Hayakawa), Interactions between mosquitocidal Cry4Aa and the brush border membrane proteins of *Culex pipiens* larvae. 46th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2013年8月11-15日, Pittsburgh, U.S.A.

Tohru Hayakawa (Tohru Hayakawa), Novel protein production system using a peptide-tag derived from *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry4Aa toxin. 46th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2013年8月11-15日, Pittsburgh, U.S.A.

Mohammad T. H. Howlader (Tohru Hayakawa), Functional structures of Cry4Aa toxin that are responsible for the mosquitocidal activity against *Culex pipiens*. CARES2013 International Conference on Biotechnology, 2013年5月25-26日, Dhaka, Bangladesh

早川徹(早川徹)、殺蚊トキシンCry4Aaとサソリトキシン(Bj-IT及びAahIT)を利用する新規害虫防除法の可能性、日本蚕糸学会第83回大会、2013年3月18-19日、筑波

金治正泰(早川徹)、殺蚊トキシンCry11Aの受容体結合部位と考えられるドメインIIループ構造への変異導入、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡

林雅浩(早川徹)、不溶性凝集体形成を促す新規ペプチドタグ(4AaCter)を利用したシスタチンCの効率的生産と精製、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、

福岡

Mohammad Tofazzal Hossain Howlader
(Tohru Hayakawa), Detection of domainII
loops that are responsible for mosquitocidal
activity of Cry4Aa from Bacillus thuringiensis.,
第35回日本分子生物学会年会、2012年12
月11-14日、福岡

早川徹(早川徹)、Bt菌B0462株に由来する
新規パラスポリン(PS1Ac2)の解析、第5
回パラスポリン研究会、2012年12月8日、熊
本

〔図書〕(計1件)

早川徹、他、講談社、最新昆虫病理学(国
見裕久・小林迪弘 編著) 2014、pp237-242
ISBN978-4-06-153740-8

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: Protein production method, fusion protein,
and antiserum

発明者: Hiroshi Sakai, Toru Hayakawa

権利者: Okayama University, Japan lamb Co.,
Ltd.

種類: 特許

番号: Patent No: 8865428

取得年月日: 2014 / 10 / 21

国内外の別: 国外(USA)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)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