

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450463

研究課題名(和文) B. thuringiensis Cry44Aa トキシンの力類殺虫活性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of insecticidal activity mechanism of B. thuringiensis Cry44Aa toxin

研究代表者

浅野 眞一郎 (ASANO, SHINICHIRO)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：60222585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯性伝染病を媒介するシマカやイエカに対して強い殺虫活性を示すことが知られている、*Bacillus thuringiensis entomocidus* INA288の産生するCry44Aaトキシンのネッタイシマカに対する殺虫活性機構の解明を目標に研究を進めてきた。殺虫活性機構において重要な役割を果たすレセプター分子の検索を行ったところ、アルカリフォスファターゼやABCとランスフェラーゼが候補分子として同定された。

研究成果の概要(英文)：I have been conducting research aiming at elucidating the insecticidal activity mechanism of Cry44Aa toxin produced by *Bacillus thuringiensis entomocidus* INA 288, which is known to have highly insecticidal activity against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* which intermediate tropical infectious diseases. As a result of research for Cry44Aa toxin receptor molecules in *A. aegypti* which play an important role in insecticidal activity mechanism, alkaline phosphatase and ABC transferase were identified as candidate molecules.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：entomocidus INA288 Cry44Aa トキシン B. thuringiensis トキシンレセプター アルカリフォスファターゼ ABCトランスポーター ネッタイシマカ

1. 研究開始当初の背景

*Bacillus thuringiensis entomocidus* INA288 は、シマカやイエカといった熱帯性伝染病を媒介する蚊類に強い殺虫活性を示すことが知られており、世界中で広く利用されている *B. thuringiensis israelensis* (Bti) 由来の製剤に代わる新規の Bt 製剤として期待されている。しかしながら、INA288 の蚊類に対する殺虫活性機構については未だに不明な点も多く、近年 Bti 由来の Cry4Aa や Cry11Aa トキシンに対する抵抗性蚊の出現も危惧される中、その殺虫活性機構解明は急務である。

2. 研究の目的

INA288 由来の Cry44Aa トキシンは、先行研究からネッタイシマカやアカイエカに強い殺虫活性を示し、その強さは Bti 由来の Cry4a や Cry11Aa トキシンに勝るものであることが明らかとなっている。また、Cry44Aa トキシンレセプターは、ネッタイシマカやアカイエカにおいて、Cry4Aa や Cry11Aa トキシンレセプターとは競合しないと考えられている。そこで、ネッタイシマカから Cry4Aa や Cry11Aa トキシンレセプター分子と考えられるタンパク質(アミノペプチターゼ N、アルカリフォスファターゼ、カドヘリン様タンパク質、ABC トランスポーター等) 遺伝子をクローニングして、レセプター分子としての機能を調査することにした。

3. 研究の方法

(1) ネッタイシマカからのレセプター候補分子遺伝子のクローニング

ネッタイシマカ終齢幼虫中腸を摘出し、Trizol を用いて組織を破碎したのち、total RNA を調整した。mRNA からリバーストランスクリプターゼにより cDNA を合成し、ネッタイシマカゲノムデータベース(TIGER Base) の情報を元に、各レセプター候補分子の遺伝子の特異的なプライマーを用いて PCR により増幅させた。増幅された DNA 断片は、PCR 産物をクローニングする pGEM-T TA クローニングキットでクローニングしたのち、塩基配列の決定をシーケンサーで行った。

(2) レセプター分子の Cry44Aa トキシンとの結合調査

クローニングした各レセプター候補分子の遺伝子は、タンパク質大量発現系である pGEX ベクターにつなぎこみ GST 融合タンパク質として発現させた。GST カラムにて融合タンパク質を精製し、グルタチオンセファロースカラムを用いてブルダウンアッセイにより結合調査を行なった。

(3) AaeALP による Cry44Aa トキシンのネッタイシマカ殺虫活性阻害試験

GST 融合タンパク質として発現させた、AaeALP1 もしくは AaeALP3 と、Cry44Aa トキシンをネッタイシマカに同時に供与するこ

とで、レセプター分子による殺虫活性阻害試験を行った。

(4) 昆虫培養細胞発現系を用いた Cry44Aa トキシンアッセイによる細胞損傷解析

AcMNPV 発現系を用いて、クサヨトウ由来の昆虫培養細胞 (Sf9) 細胞系で、上記レセプター候補分子を発現させ、Cry44Aa トキシンを添加し、細胞損傷について観察した。

4. 研究成果

(1) ネッタイシマカにおける Cry44Aa トキシンレセプター候補遺伝子

ネッタイシマカに殺虫活性を示す *B. thuringiensis* 由来の Cry トキシンとそのトキシンレセプター候補分子の調査を行なった(表1)。ネッタイシマカにおける Cry トキシンレセプターは、殺虫活性機構において、GPI アンカー型の中腸上皮組織上に提示される、アミノペプチターゼ N やアルカリフォスファターゼに Cry トキシンが結合したのち、カドヘリン様タンパク質に集められ、オリゴマー化したのちに、ABC トランスポーターを介して細孔が形成され上皮細胞を崩壊させる役割を果たしていると考えられる。

表 1 レセプター候補分子とネッタイシマカ殺虫活性 Cry トキシン

レセプター候補分子	Cry トキシン
カドヘリン様タンパク質	Cry4Aa トキシン Cry4Ba トキシン Cry11Aa トキシン Cry11Ba トキシン
アミノペプチターゼ N	Cry4Ba トキシン Cry11Aa トキシン Cry11Ba トキシン
アルカリフォスファターゼ	Cry4Ba トキシン Cry11Aa トキシン Cry11Ba トキシン
ABC トランスポーター	Cry11Aa トキシン

ここに示された、候補分子の遺伝子をネッタイシマカからクローニングした。

カドヘリン様タンパク質 (*AaeCad-1* gene)、アミノペプチターゼ N (*AaeAPN1* gene)、アルカリフォスファターゼ (*AaeALP1, 3, 4* gene)、ABC トランスポーター (*AaeABC* gene) の各遺伝子に特異的なプライマーを合成し、ネッタイシマカ中腸から作成した cDNA をテンプレートとして PCR により増幅したのち、シーケンサーにて塩基配列を確認した。

(2) レセプター候補分子の大腸菌での発現と Cry44Aa トキシンとの結合調査

クローニングした各レセプター候補分子を pGEX 発現ベクターシステムにて大腸菌 (BL21) で発現させた。AaeCad-1 は、カドヘリンリピート領域を分割して発現させた。AaeABC は、Cry11Aa トキシン結合領域と考えられるアウトラーブ領域を含む部分を発現させた。AaeAPN1 と AaeALP1, 3, 4 は、シグ

ナル配列部分と GPI アンカー領域を除いた部分を発現させた。

大腸菌で発現させた GST 融合タンパク質を GST カラムにて精製したのち、SDS-PAGE にて精製を確認したのち、グルタチオンセファロースを充填したカラムに精製した GST 融合タンパク質を流し込んだ。そこに、ビオチンラベルした Cry44Aa トキシンを流し込み、GST 融合レセプタータンパク質と Cry44Aa トキシンとをカラム内で結合させた。結合させた Cry44Aa トキシンとともに GST 融合タンパク質を、還元型グルタチオンで溶出し、結合したトキシンを検出した (表 2)。

表 2 プルダウンアッセイによるレセプターと Cry44Aa トキシンとの結合調査

レセプター分子	トキシン結合シグナル
AaeCad-L CR4-7	無
AaeCad-L CR8-11	無
AaeAPN1	無
AaeALP1	有
AaeALP3	無
AaeALP4	有
AaeABCt	有

(3) AaeALP による Cry44Aa トキシンのネットアイシマカ殺虫活性阻害試験

Cry44Aa トキシンとの結合試験で、結合の見られた AaeALP1 と見られなかった AaeALP3 による殺虫活性阻害実験を行なった。ネットアイシマカ 2 齢幼虫に対して、Cry44Aa トキシン 1.5 µg と AaeALP 75 µg を同時に与えて、24 時間後の死亡幼虫数を計測した (表 3)。

表 3 AaeALP による Cry44Aa トキシンのネットアイシマカ殺虫活性阻害

試験区	死虫率	標準誤差
Cry44Aa	86.67 %	7.70
Cry44Aa + AaeALP1	37.78 %	5.88
Cry44Aa + AaeALP3	93.33 %	3.85

標準誤差は、3 回の反復実験を行なって算出を行い、死虫率は有意水準 5% の t 検定で有意差があった。

AaeCad-L の CR4-7 や CR8-11 についても同様の殺虫活性阻害実験を行なったが、有意な殺虫活性阻害効果は認められなかった。

AaeAPN1、AaeALP4、AaeABCt については十分量の GST 融合タンパク質が得られず阻害実験を行えなかったことから、AcMNPV による Sf9 細胞での発現、および Cry44Aa トキシンによる細胞損傷活性について調査することにした。

(4) AcMNPV を用いた昆虫培養細胞発現系での Cry44Aa トキシンアッセイによる細胞損傷解析

pFastBac Dual (pFBD) バクミドシステムを用いて、p10 プロモーター下流に *egfp* 遺伝子を組み込み (pFBD-EGFP)、*polyhedrin* プロモーター下流に、それぞれのレセプター分子の遺伝子を組み込んだバクミドを作成した。レセプター分子の末端側に FLAG タグを付加したことにより、Sf9 細胞で発現させたレセプター分子は FLAG 抗体での検出が可能となった。

組換えバクミドは、pFBD-AaeAPN1、pFBD-AaeALP1、pFBD-AaeALP3、pFBD-AaeALP4 ならびに pFBD-AaeABC を作成した。作成したバクミド (2 µg) とリポフェクション試薬 (6 µl) を Sf9 細胞に添加し、3 日間培養した。3 日後に蛍光実体顕微鏡にて約半数の細胞での EGFP の発現を確認した。

各組換え AcMNPV を Sf9 細胞に播種し、ブランク法によりウイルス力価を測定した。

各組換え AcMNPV を MOI=2 で Sf9 細胞に接種し、3 日後に培養細胞を回収し SDS-PAGE ならびに Western プロットに供試した。末端に付加した FLAG タグにより、FLAG 抗体での発現産物の確認を行なった (表 4, 図 1)。

表 4 各組換え AcMNPV の FLAG 抗体による発現確認

組換え AcMNPV	FLAG 抗体シグナル
EGFP-AcMNPV	-
AaeAPN1-AcMNPV	140 kDa
AaeALP1-AcMNPV	70 kDa
AaeALP3-AcMNPV	70 kDa
AaeALP4-AcMNPV	100 kDa
AaeABC-AcMNPV	150 kDa
非組換え AcMNPV	-

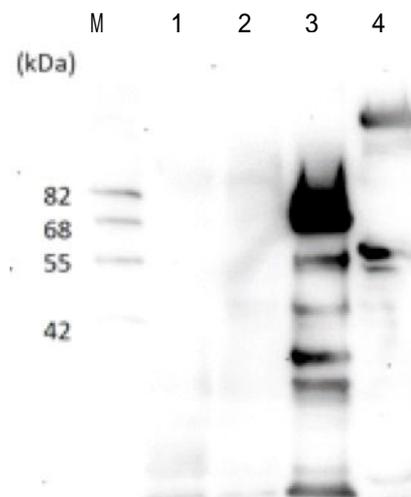


図 1 FLAG 抗体による組換え Sf9 細胞における発現産物の確認

M: Western 分子マーカー

1: 非組換え AcMNPV を接種した Sf9 細胞膜

2: EGFP-AcMNPV を接種した Sf9 細胞膜

3: AaeALP1-AcMNPV を接種した Sf9 細胞膜

4: AaeABC-AcMNPV を接種した Sf9 細胞膜

非組換え AcMNPV、EGFP-AcMNPV、

AaeALP1-AcMNPV ならびに AaeABC-AcMNPV を接種した Sf9 細胞に Cry44Aa トキシンを添加し、1 時間後にトリパンブルーで染色することで、死細胞の数を計測した(表 5)。

表 5 各ウイルス接種した Sf9 細胞に Cry44Aa トキシンを添加後(1 時間)の死細胞数の平均値(mean)と標準偏差(Standard Error)

供試 No	AaeALP1	AaeABC	EGFP	AcMNPV
No.1	44.59	29.27	12.41	0.55
No.2	44.00	25.22	11.39	0.84
No.3	36.90	25.42	8.98	0.54
No.4	43.57	17.82	16.18	0.85
No.5	44.44	37.14	16.28	1.37
No.6	44.26	40.00	15.03	0.40
mean	42.96	29.14	13.38	0.76
SE	1.22	3.36	1.20	0.14

AaeALP1-AcMNPV と AaeABC-AcMNPV を接種した Sf9 細胞に Cry44Aa トキシンを添加した場合、膨潤ならびに破裂した細胞が観察され、1 時間後には、AaeALP1-AcMNPV 接種細胞では 43% 程度の死細胞が、AaeABC-AcMNPV 接種細胞では 29% 程度の死細胞が観察された。程度の差はあるが、有意に Cry44Aa トキシンによる細胞損傷効果が認められた。しかしながら、AaeALP1-AcMNPV と AaeABC-AcMNPV に死細胞率で差があることから、トキシンレセプターとしての機能の違いか、もしくは発現量の違いにより差異が認められるのではないかと考えられた。

AaeAPN1-AcMNPV および AaeALP3-AcMNPV、AaeALP4-AcMNPV を接種した Sf9 細胞に Cry44Aa トキシンを添加した場合、EGFP-AcMNPV 接種した Sf9 細胞の場合と同様、Cry44Aa トキシンによる細胞損傷は観察されなかった。

Cry トキシンによる中腸細胞への細孔形成については、レセプターへの結合とオリゴマー化と細孔形成に繋がる一連の作用機作が考えられており、2 つもしくは 3 つのレセプター分子の協働関係が考えられる。AaeALP1 と AaeABC を同時に組込んだ AcMNPV を作成し、さらなる作用機作の解明に繋げたい。

ネッタイシマカにおける Cry44Aa トキシンレセプターとして、AaeALP1 と AaeABC が機能していることが明らかとなったが、殺虫活性作用機構の完全解明には至らなかった。

本研究では、Cry44Aa トキシンの有するネッタイシマカに対するレセプターの同定とその機能については明らかにすることができたが、アカイエカに対するレセプターの同定とその機能については明らかにすることができなかった。今後、イエカ類に対する殺虫活性機構解明を行いたいと考えている。

## 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 5 件)

小野山雄亮・伴戸久徳・浅野眞一郎、ネッタイシマカ ABC トランスポーターについて、東北蚕糸・昆虫利用研究報告、査読無し、39 巻、2014、3-4  
 K. Iiyama, H. Mon, K. Mori, T. Mitudome, J. M. Lee, T. Kusakabe, K. Tashiro, S. Asano, and C. Yasunaga-Aoki, Characterization of KfrA proteins encoded by a plasmid of Paenibacillus popilliae ATCC14706T, Meta Gene、査読有り、Vol. 4、2015、29-44、doi;10.1016/j.mgene.2015.03.001  
 中神あゆみ・伴戸久徳・浅野眞一郎、Cry44Aa トキシンの殺虫活性作用機構について、東北蚕糸・昆虫利用研究報告、査読無し、40 巻、2015、8-9  
浅野眞一郎、細菌による昆虫の病気、昆虫と自然、査読有り、51 巻、2016、4-7  
 中尾悠太・中神あゆみ・佐藤昌直・伴戸久徳・浅野眞一郎、東北蚕糸・昆虫利用研究報告、査読無し、41 巻、2016、9-11

### [学会発表](計 4 件)

中神あゆみ、Cry44Aa トキシンのネッタイシマカ殺虫活性作用に終えるアルカリフォスファターゼのレセプターとしての機能調査、日本蚕糸学会、2016 年 9 月 26 日、北海道大学(北海道・札幌市)  
 小野山雄亮、Cry11Aa トキシン受容体の機能解析、日本蚕糸学会、2016 年 9 月 26 日、北海道大学(北海道・札幌市)  
浅野眞一郎、新規殺虫性タンパク質遺伝子の発見、機能解析ならびに応用に関する研究、日本蚕糸学会、2016 年 3 月 17 日、京都工芸繊維大学(京都府・京都市)  
浅野眞一郎、ネッタイシマカにおける Cry44Aa トキシンレセプターについて、日本蚕糸学会、2017 年 3 月 21 日、農林水産技術会議事務局(茨城県・つくば市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野眞一郎 (ASANO, Shinichiro)  
 北海道大学大学院・農学院・准教授  
 研究者番号：10882826