

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 4月24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

研究成果の概要（和文）：

本研究では受容体結合部位に関する機能構造解析を進め、殺蚊トキシン Cry4Aa のループが改変可能であること、殺虫にはこれらが補完・協調する形で関与することを示唆した。またランダムなアミノ酸配列を含む変異体ライブラリーから新しいタイプと考えられる変異体を選抜した。Cry トキシンと併用しうる防除資材を探索すると共に、タンパク質をアルカリ可溶性の凝集体として生産できる画期的なペプチドタグ、4AaCter の開発にも成功した。

研究成果の概要（英文）：

The biological functions of loops in domain II of Cry4Aa were analyzed by mutagenesis. The results showed that all loops can be engineered without a loss of toxicity. This suggested that the multiple loops working cooperatively for receptor binding may be spread out in domain II and perhaps in domain III of Cry4Aa. This model was new, and was different from that of well characterized Cry1A toxins. Based on this hypothesis, mutant Cry4Aa library that contained random amino-acid sequences in domain II loop 2 region was constructed. Upon screening by bioassay using mosquito larvae (*Culex pipiens*), several unique mutants that may kill mosquitos with novel mode of action were isolated. Investigation to characterize these Cry4Aa mutants is still going on. On the researches to develop efficient insect-pest management, we showed that the virus metarprotease, Enhancin3 from *Xestia c-nigrum* granulovirus and the insect-specific scorpion toxin, AaIT can be used as bio-pesticide to enhance the toxicity of Cry toxin. In addition, we developed novel peptide-tag, 4AaCter from the C-terminal region of Cry4Aa. We demonstrated that the use of 4AaCter may provide an innovational strategy for the efficient production of recombinant proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,900,000 | 2,670,000 | 11,570,000 |
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 13,500,000 | 4,050,000 | 17,550,000 |

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. 研究開始当初の背景

Bacillus thuringiensis (バシラス・チュ

ーリンゲンシス)は、世界のどこからでも分離される一般的な好気性土壌細菌であり、芽胞形成期にクリスタルと呼ばれるタンパク質結晶を産生する。クリスタルの構成タンパク質の中には特異的な殺虫活性を示すもの(Cryトキシシン)があり、微生物農薬としての利用が進んでいる。

Cryトキシシンは標的細胞の選択性が高く、極めて安全性の高い害虫防除資材であるが、逆に「殺虫スペクトルが狭すぎる点」が障害となり、利用場面が限られている。また最近では、トキシシン抵抗性害虫の出現が様々な昆虫で報告されており、問題となっている。海外ではこの問題を克服するため、遺伝子組換え技術を導入した高機能化Cryトキシシンの開発が進められている。特に受容体結合に関与すると考えられているドメインIIのループ構造を標的とした変異導入により、Cryトキシシンの殺虫スペクトルが拡大する可能性を示唆している。一方、日本では遺伝子組換えによるCryトキシシンの高機能化に関する研究は行われていない。

本研究では、自然環境から新しい活性を示すCryトキシシンの発見がそう頻繁に望めない状況を考え、遺伝子組換え技術を駆使してCryトキシシンの殺虫スペクトルや活性をコントロールする技術を開発しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Cryトキシシンの殺虫スペクトルや活性をコントロールする技術を遺伝子組換え技術を駆使して開発することである。そのためまず、「Cryトキシシンの機能構造」を解析して、殺虫活性に直接関与する構造や改変可能な構造を特定する。その情報を基にCryトキシシンの一部を改変して「殺虫スペクトルや活性のコントロール法」を模索する。また「Cryトキシシンの殺虫活性を助長する資材」に関しても研究を進める。

3. 研究の方法

本研究ではCryトキシシンとして双翅目昆虫(蚊)特異的な殺虫活性を示すCry4Aaを選択した。蚊はマラリアやデング熱、日本脳炎などの重篤な病気を媒介する衛生害虫であり、定期的に水溜りが出来る場所であれば簡単に発生するため、根本的な対策が難しい。

(1) 殺虫活性に関与する機能構造の解析

Cry4Aaを含む多くのCryトキシシンは3つのドメインで構成される極めて類似した構造を持つと考えられている。機能構造についても幾つかの知見が得られており、ドメインII、特に分子表面に露出するループ構造が受容体結合に機能していると考えられている。そこで本研究でもCry4Aaの分子表面に露出するループ構造(ループ1, 2, 3)を標的にして次のような解析を進めた。

- ①遺伝子操作が簡便な大腸菌を用いて効率の良いCry4Aa生産系を構築した。
- ②Cry4Aaのループ1, 2, 3の内の一つを他のループ構造に置き換えた変異体を構築して殺虫活性の変動を調査した。
- ③Cry4Aaのループ1, 2, 3のアミノ酸配列をそれぞれアラニンに置換した変異体を構築して殺虫活性の変動を調査した。
- ④ループ1, 2, 3以外のループ構造についてもアラニン置換変異体を構築して殺虫活性の変動を調査した。
- ⑤ループ構造を含むポリペプチドをCry4Aaと競合させ、ポリペプチドによる殺虫活性阻害を観察した。

(2) 殺虫スペクトルや活性のコントロール

(1)の研究から、Cry4Aaの分子下部に露出するループ構造を改変しても殺虫活性を大きく減少させないことが示された。そこで鱗翅目昆虫特異的なCry1Aトキシシンで受容体結合に関与することが示唆されているループを標的に以下のような変異体を構築して解析した。

- ①ループ2をランダムなアミノ酸配列に置換した変異体ライブラリーを構築。そこから特徴的な活性を示す変異体をスクリーニングした。
- ②ループを鱗翅目昆虫特異的Cry1AaやCry1Abのループ構造と置換した変異体を構築して殺虫スペクトルの変化を観察した。

(3) Cryトキシシンの殺虫活性を助長する資材

Cryトキシシン抵抗性害虫の出現を防ぐ方法として、「作用機構の異なる複数のトキシシンを利用する」というものがある。抵抗性の獲得には害虫遺伝子の変異が関与すると考えられるが、複数のトキシシンに対応する変異を同時に獲得する可能性は極端に低くなるためである。そこで本研究ではCry4Aaの殺虫活性を強化・補完する資材の探索を行った。

- ①シロイチモジヨトウ顆粒病ウイルス由来の

メタロプロテアーゼ (Enhancin) を微生物殺虫剤として利用した。

- ②昆虫特異的のサソリトキシンを製剤化し、微生物殺虫剤としての利用を試みた。

またトキシンの安定性や将来の製剤化を考慮して、可溶性タンパク質をアルカリ可溶性の凝集体として発現する新しいコンセプトのタンパク質生産システムを構築した。

- ③Cry4AaのC末端領域に由来するポリペプチドを解析してタンパク質を凝集体として生産・蓄積するペプチドタグを開発した。

4. 研究成果

(1) 殺虫活性に関する機能構造の解析

- ①大腸菌を用いて効率よく Cry4Aa を生産するシステムを構築した(雑誌論文⑤)。一般的に大腸菌と *B. thuringiensis* 間ではコドンの利用率が異なる。そこで *cry4Aa* 遺伝子のコドンで大腸菌の遺伝子に適応させた人工遺伝子を構築し、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させた結果、Cry4Aa の生産量が 2-3 倍上昇した(図 1)。

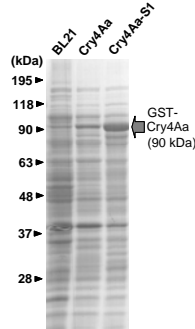


図 1 人工遺伝子の発現

- ②Cry4Aa ドメイン II のループ 1~3 を他のループに置換した変異体を構築して解析した結果、殺虫活性にはループ 2 のみが必要で、ループ 1 及び 3 は改変しても殺虫活性に大きく影響しないことが明らかになった(雑誌論文④)。

- ③Cry4Aa のループ 1~3 を構成するアミノ酸をアラニン残基に置換した変異体を構築して解析した結果、ループの構造(長さ)を大きく変化させない限り、ループ 1~3 の全てが改変可能であることが示唆された(雑誌論文③)。これは Cry4Aa の殺虫活性に複数のループ構造が協調的・補完的に関与することを示唆しており、一般的な Cry トキシンに対する Cry4Aa の特異性が示された。

- ④三次元構造モデルを精査すると、Cry4Aa ではループ 1~3 以外にも $\beta 1-\alpha 8$ (I³³⁴-S³³⁹)、 $\beta 4-$

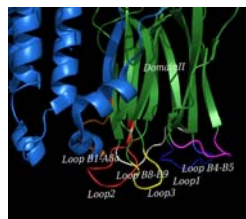


図 2 Cry4Aa のモデル

$\beta 5$ (N⁴⁰³-D⁴⁰⁸)、 $\beta 8-\beta 9$ (G⁴⁶¹-D⁴⁶⁸) 間のループ構造が分

子下部に露出しており、受容体との相互作用に

関与する可能性が考えられる(図 2)。そこでこれらのループ構造についても構成するアミノ酸をアラニン残基に置換した変異体を構築して解析した。その結果、これらのループ構造についても Cry4Aa では改変可能であることが明らかになった(未発表データ)。

- ⑤タンパク質に変異を導入する場合、変異の蓄積が許容範囲を超えると分子構造自体が不安定になる。Cry4Aa も同様で、例えループ構造であっても 2 箇所以上の変異導入により、構造が不安定化する。そこで分子表面に露出するループを 1 つ含むポリペプチドをデザインし、Cry4Aa と競合させることで機能構造を特定しようと考えた。まず本研究の過程で開発したペプチドタグ (4AaCter, (3)-(③参照)) を利用してループ (1, 2, 3, $\beta 1-\alpha 8$, $\beta 4-\beta 5$, $\beta 8-\beta 9$) を 1 つずつ含む 6 種類のポリペプチドをアルカリ可溶性の凝集体として大量生産することに成功した。そして競合実験の結果、単独のポリペプチドだけでは Cry4Aa の殺虫活性を大きく阻害しないことが明らかになった(未発表データ)。様々な組み合わせのポリペプチドを用いた競合実験については現在も進行中である。

(2) 殺虫スペクトルや活性のコントロール

- ①Cry トキシン、特に鱗翅目昆虫特異的な Cry1A は受容体にループ 2 を介して結合すると考えられている。一方、本研究(1)の結果から、Cry4Aa のループ 2 は改変可能であることが判明している。構造上の類似性から Cry4Aa のループ 2 も Cry1A と同様に受容体結合部位として機能することが考えられる。本研究では Cry4Aa のループ 2 領域にランダムなアミノ酸配列を挿入した変異体ライブラリーを構築して、そこから新規の受容体を介して殺虫活性を発揮する変異体をスクリーニングしようとした。まず、ランダム変異を導入した Cry4Aa 変異体ライブラリーの構築についてであるが、当初は殺虫活性を示す変異体が得られる効率の低さ (0.3-0.5%) に問題があったが、プライマーの配列に改良(アミノ酸を指定するコドン

として nnn から nnt に変更した)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(未発表データ)。現在変異体の解析を進めており、ライブラリーからユニークな構造を持つ3つの変異体を選抜している(#18-4, -14, -25)。これらはループ2に野生型と異なるアミノ酸配列を含み、それ以降が欠失した変異体であった(投稿準備中)。これらの変異体は野生型Cry4Aaと大きく異なる構造を持つため、既知のCryトキシンとは全く異なる様式で殺虫活性を発揮していることが考えられた。現在、この変異体の作用機構についてさらに詳細な解析を進めている。

②双翅目昆虫特異的なCry4Aaのループを鱗翅目昆虫特異的なCry1AaやCry1Abのループ構造と置換した6種類のCry4Aa変異体を構築した(未発表データ)。変異体はGST融合タンパク質として問題なく発現したものの、期待したような鱗翅目昆虫(カイコ)に対する殺虫活性は付加されなかった。また野生型Cry4Aaの標的であるアカイエカ幼虫に対する殺虫活性も失われた(図3)。

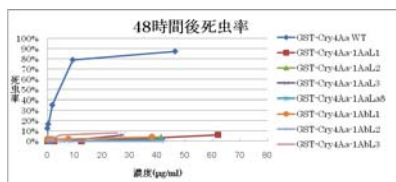


図3 ループ置換変異体の殺虫活性

変異体において高次構造が変化している可能性を調査するため、変異体を精製してトリプシン処理などによる解析を進めた結果、変異体の構造不安定性が明らかになった。その結果、構築した変異体は昆虫消化液中のプロテアーゼによって分解されてしまう可能性が考えられた。変異体構築において、変異導入による構造変化を予測する必要があると考えられ、変異体トキシンの三次元構造モデリングの方法を検討中である。

(3) Cryトキシンの殺虫活性を助長する資材

①シロイチモジヨトウ顆粒病ウイルス(XcGV)はバキュロウイルス科に属する昆虫特異的なウイルスである。XcGVは標的昆虫の囓食膜(腸組織の保護膜)の主要構成成分であるムチン(糖タンパク質, IIM)を分解するメタロプロテアーゼ(Enhancin3, E3)を生産する。本研究ではE3をCryトキシンと併用するこ

とを考え、E3をGST融合タンパク質として発現させた。発現タンパク質は不溶性の封入体を形成したものの、8M尿素で可溶化後、リフォールディングするとカイコに対するCry1Aaの殺虫活性を助長する効果が観察された(図4)。E3による囓食膜破壊がCryトキシンの殺虫力増強に有効である事が示された。

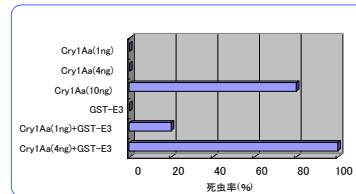


図4 E3によるCry1Aaの殺虫助長効果

②作用機構の異なる3種類の昆虫特異的サソリトキシン(AahIT1, LqhdpIT3, BjaIT)をCry4Aaの殺虫増強剤として利用することを考えた。遺伝子を人工合成し、4AaCterタグを利用してタンパク質を調製することに成功した。アカイエカ幼虫を用いたバイオアッセイの結果、AahIT1についてはCry4Aaの殺虫活性を最大3.5倍助長した(投稿準備中)。

③Cryトキシンはアルカリ可溶性の凝集体として生産され、プロテアーゼによる分解から保護されている。Cryトキシンのようなタンパク質凝集体の形成は可溶性タンパク質の製剤化を容易にし、防除法の開発における選択肢も広げる。そこで本研究では、Cry4Aaの活性化過程で除かれるC末端領域に注目して、凝集体形成を促す因子(ポリペプチド、4AaCter)を特定した(雑誌論文①、②)。4AaCterは連結したタンパク質をアルカリ可溶性の凝集体として生産するもので、発現タンパク質の生産量上昇や精製手順の簡略化など、タンパク質生産に様々な利便性を付与することを示した。

以上、本研究ではCry4Aaのループ構造に注目して包括的な機能構造解析を行った。これは本分野における最初の本格的な研究であり、Cry4Aaの変異体を構築する上で重要な基礎的知見を多く得ることができた。また本研究ではループ2にランダムな配列を挿入する方法で、全く新しいタイプのCryトキシンを創製することが可能であることが示した。これはCryトキシンのオーダーメイド化を進める上で大きな意味を持つと考えている。

またCryトキシンと併用可能なトキシンを

探索する過程で、エンハンシンやサソリトキシンなどの有望な微生物防除資材も得ることができた。同時にタンパク質をアルカリ可溶性の凝集体として生産できる画期的なペプチドタグ、4AaCterの開発にも成功した。4AaCterは可溶性トキシンなどの大量生産を可能とするだけでなく、調製が困難なタンパク質を生産するためにも利用できる便利なツールになると考えられる。

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)

- ① Hayakawa T., Shimizu Y., Ishida T., Sakai H., Mutational analyses of Cry protein block 7 polypeptides that facilitate the formation of protein inclusion in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有、90(6)、2011、1943-1951
- ② Hayakawa T., Sato S., Iwamoto S., Sudo S., Sakamoto Y., Yamashita T., Uchida M., Mtsushima K., Kashino Y., Sakai H. Novel strategy for protein production using a peptide-tag derived from *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa. *FEBS Journal*, 査読有、277、2010、2883-2891
- ③ Howlader M. T. H., Kagawa Y., Miyakawa A., Yamamoto A., Taniguchi T., Hayakawa T., Sakai H. Alanine scanning analyses of the three major loops in domain II of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry4Aa. *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有、76(3)、2010、860-865
- ④ Howlader M. T. H., Kagawa Y., Sakai H., Hayakawa T. Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry4Aa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有、108(3)、2009、179-183
- ⑤ Hayakawa T., Howlader M. T. H., Yamagiwa M., Sakai H. Design and construction of a synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa gene: Hyperexpression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有、80(6)、2008、1033-1037

[学会発表] (計20件)

- ① 酒井裕 (早川徹)、BT菌由来の新規なペプチドタグは効率的なタンパク質生産を可能にする、第34回 日本分子生物学会年会、(2011年12月13日)

横浜

- ② 早川徹 (酒井裕)、昆虫特異的Cryトキシンの新しい利用法—タンパク質を凝集体として発現・蓄積させる新規なペプチドタグの開発—、第84回日本生化学会大会、(2011年9月22日) 京都
- ③ 早川徹 (酒井裕)、ドメインIIのループ構造は殺蚊トキシンCry4Aaの活性に関与するか?、平成23年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、(2011年3月21日) 東京
- ④ 小野雄佑 (酒井裕)、殺蚊トキシンCry4Aaをオーダーメイド化する試み—ランダム変異を導入した変異体ライブラリーの構築— 日本農芸化学会中四国支部 第29回講演会、(2011年1月22日) 徳島
- ⑤ 酒井裕 (早川徹)、BT菌由来のペプチドをタグとして利用した効率的なタンパク質の生産システム—凝集体形成に必要なアミノ酸配列の特徴— 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
- ⑥ 早川徹 (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
- ⑦ Sakai H. (Hayakawa T.)、Innovative strategy for efficient protein production using a novel peptide tag derived from Cry toxin. OzBio2010, Melbourne Convention and Exhibition Centre, (2010年9月27日) Melbourne, Australia.
- ⑧ Hayakawa T. (Sakai H.)、Conserved Block7 sequence of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. -The innovational peptide-tag for efficient protein production- OzBio2010, Melbourne Convention and Exhibition Centre, (2010年9月27日) Melbourne, Australia.
- ⑨ Hayakawa T. (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.
- ⑩ 酒井裕 (早川徹)、蛋白質クリスタル形成機能を利用した新規な蛋白質生産、日本農芸化学会2010年度大会、(2010年3月29日) 東京
- ⑪ 早川徹 (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 日本分子生物学会年会、(2009

- 年12月12日) 日本分子生物学会年会、横浜
- ⑫酒井裕 (早川徹)、タンパク質をクリスタルとして効率的に発現させるポリペプチドタグ4AaCterの解析—クリスタル化における保存配列Block 7の役割—第32回 日本分子生物学会年会、(2009年12月12日) 日本分子生物学会年会、横浜
- ⑬酒井裕 (早川徹)、蛋白質のクリスタル形成機能を有するポリペプチドの探索、2009年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部及び日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会、(2009年10月31日) 那覇
- ⑭小野雄佑 (酒井裕)、Cry4Aa ループ2の改変による新たな殺虫活性を示す変異体の構築、日本農芸化学会中四国支部第24回講演会、(2009年5月23日) 松江
- ⑮酒井裕 (早川徹)、大腸菌におけるクリスタル化を利用した異種蛋白質の効率的生産、日本農芸化学会2009年度大会、(2009年3月28日) 福岡
- ⑯Howlader, M. T. H. (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
- ⑰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
- ⑱早川徹 (酒井裕)、難発現性蛋白質を大腸菌で高発現させる簡便な技術の開発(その1) — *Bacillus thuringiensis* Cry4Aaトキシンに由来する画期的なタグの利用—、第31回 日本分子生物学会年会、第81回 日本生化学会大会合同大会、(2008年12月10日) 神戸
- ⑲賀川泰裕 (酒井裕) Cry4Aaの受容体結合部位と考えられるDomain II loop構造への変異導入とその解析、第31回 日本分子生物学会年会、第81回 日本生化学会大会合同大会、(2008年12月10日) 神戸
- ⑳Howlader M. T. H. (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, 他、オーム社、応用生物学入門、(2010) pp87-103
- ②早川徹, 他、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: 22年10月15日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.biotech.okayama-u.ac.jp/labs/bt/field5sakai.html>

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

(2) 連携研究者

酒井 裕 (SAKAI HIROSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 60089117