

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05603

研究課題名(和文) 複数の標的生物種を持つ食毒性タンパク質の標的細胞認識機構を利用した生物農薬の設計

研究課題名(英文) Design of biopesticide using target cell recognition mechanism of dietary toxic protein with multiple target species

研究代表者

武部 聡 (TAKEBE, So)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20227052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ボウフラ、スクミリンゴガイやチャコウラナメクジなどの有害生物に食毒性を示すCry46Abは、型膜孔形成毒素のひとつで、このタンパク質の標的生物認識機構を利用すれば、安全かつ環境負荷の小さい有害生物駆除法を確立できる。Cry46Abの標的生物認識は、受容体との結合が重要なステップと考えられる。そこで、このタンパク質の表面に配置される2つの芳香族アミノ酸クラスターのアミノ酸置換変異体を多数作製して活性の変化を検討し、受容体との結合には両方のクラスターが必要であることを示した。この領域の受容体との結合機構の解明は、優れた選択毒性をもった生物農薬の開発につながると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スクミリンゴガイは水田に生息し、イネの害虫とみなされる。日本には食用として持ち込まれ、その後養殖場から逃げ出して野生化した。生息域は日本海側や北関東におよんでおり、被害は拡大している。また、東南アジアでは水田の脅威となっている。チャコウラナメクジは1950年代後半に侵入した外来種で、今では本州以南でごく普通に見られる。アブラナ科の農作物に被害が生じている。蚊はジカ熱などの感染症を媒介する。2014年に起きたデング熱の国内感染から、温帯性の蚊でも熱帯性感染症を媒介することが示され、駆除の重要性が増している。本研究が目指す選択毒性の高い生物農薬の開発は、これら有害生物の効果的駆除法のひとつになる。

研究成果の概要(英文)：Cry46Ab is a β -type pore-forming toxin that is toxic to harmful organisms such as mosquito larvae, apple snails, and slugs. The target organism recognition mechanism of this protein will help establish a safe and environmentally friendly pest control method. In the mechanism of action of Cry46Ab, binding to the receptor is considered to be an important step in target organism recognition. Therefore, we created many amino acid substitution mutants of the two aromatic amino acid clusters located on the surface of this protein and examined changes in activity, suggesting that both clusters are required for binding to the receptor. Investigation of the binding mechanism of this region to receptors will lead to the development of biopesticides with excellent selective toxicity.

研究分野：分子生物学

キーワード：膜孔形成毒素 広域選択毒性 Bacillus thuringiensis 生物農薬 スクミリンゴガイ チャコウラナメクジ ヒトスジシマカ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Cry46Ab は土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt)由来の B 型膜孔形成タンパク質毒素 (BPFT) で、ボウフラのほかスクミリングガイやチャコウラナメクジに食毒性を示すが、魚類やセンチュウには作用しない。この優れた標的細胞認識機構を解明して効果的な駆除法の確立に役立っている。

外来生物であるスクミリングガイとチャコウラナメクジの農作物被害はともに深刻であるが、農薬等による効果的な駆除法はこれまで無かった。また、蚊が媒介する感染症は重篤な被害をもたらすものが多い。

スクミリングガイは 1980 年代に食用として持ち込まれたものが養殖場から逃げ出し、野生化した。イネ苗などの柔らかい植物を好んで食餌し、水田における発生面積は 2001 年には 68,000 ha であり、その 15% のイネが被害を受けた。2012 年には発生面積は 110,000 ha になり、その後の統計は取られていないが、生息域は日本海側や北関東におよんでおり、被害は拡大していると予想される。また、東南アジアでは水田の脅威となっている。

チャコウラナメクジは 1950 年代後半に侵入した外来種で、在来種を駆逐して生息域を広げ、今では本州以南でごく普通に見られる。被害の統計は取られていないが、芽や葉、実を食害し、特にアブラナ科の農作物に大きな被害が生じている。

これら有害生物は地球温暖化により生息域の広がりや活動期間の延長が見られるため、効果的駆除法の確立が急がれる。従来使われているメタアルデヒド粒剤などは、有害生物が水中や湿った環境に生息しているので薬品の溶出や流失があり、さらに他の生物への毒性などから効果的な駆除法とは言えない。

蚊は 2016 年の南米でのジカ熱、2003 年の北米での西ナイル熱の流行などに見られるように重度の疾患を媒介する。2014 年に起きたデング熱の国内感染から、国内に生息する温帯性の蚊でも熱帯性感染症を媒介することが示唆され、蚊の駆除の重要性が増している。

2. 研究の目的

Cry46Ab は節足、軟体、環形動物に致死作用を示すが線形、脊椎動物には作用しないという生物種を跨った選択毒性を持つ。Cry46Ab の標的細胞認識を司るアミノ酸またはペプチド領域を利用すれば、有害生物の効率的駆除および安全かつ環境負荷の小さい生物農薬の設計に役立つと考えられる。そこで、アミノ酸置換変異体を数多く作成することにより、Cry46Ab の標的細胞認識領域を特定した。

3. 研究の方法

Cry46Ab のアミノ酸配列から立体構造モデルを作成し、他の BPFT との比較から標的細胞認識部位を推測した。その領域のアミノ酸置換変異体を作成し、生物検定により活性を失った変異体を選別した。

Cry46Ab のアミノ酸配列と立体構造モデル

Cry46Ab のアミノ酸配列 (図 1) を既に立体構造が決定されている Cry46Aa のアミノ酸配列とのアライメントを CLUSTAL W を用いて取り、SWISS-MODEL の “Optimize (project) mode” と Swiss-Pdb Viewer により Cry46Ab の立体構造を作成した (図 2)。

Cry46Ab は 3 ドメイン構造をとり、構造的特徴は lysenin や aerolysin など 型膜孔形成毒素に共通している。これらの毒素はドメイン (青色の 2 次構造) に受容体認識部位があると考えられる。Cry46Ab のドメイン

には 2 つの芳香族アミノ酸クラスター (図 1 の青色のボックス) があるので、そのアミノ酸をアラニンに変えた変異体を作製して殺ボウフラ活性を検討した。

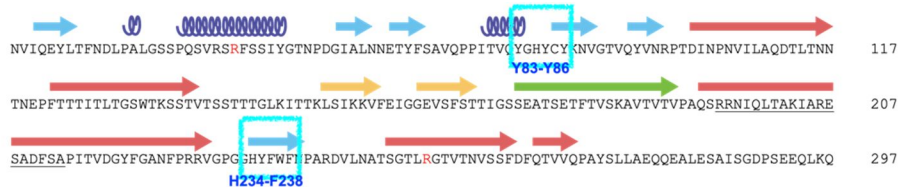


図 1 Cry46Ab のアミノ酸配列と 2 次構造

アミノ酸配列の上の矢印とコイルは 2 次構造予測における ストラ
ンドと ヘリックスを示す。

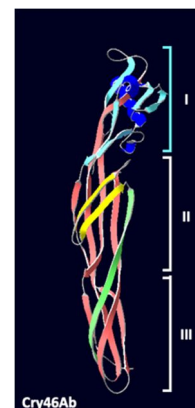


図 2 Cry46Ab の
立体構造モデル

Cry46Ab 発現用プラスミドの構築 (図 3)

大腸菌の発現系を用いて Cry46Ab を調製するため、アミノ酸配列からコドン最適化をした塩基配列を持つ合成遺伝子を作成した。そこから DNA 鎖の半合成を行いリカーシヴ PCR により Syn_cry46Ab を作製した。同様に Syn_egfp も作製した。pGEX-2T は BamHI-EcoRI で線状化し、3 つの DNA 断片を連結して pGEX-Syn_cry46Ab-egfp を構築した。これを大腸菌 BL21 に導入して、IPTG で発現誘導すると、GST(ベクター由来)-Cry46Ab-eGFP 融合タンパク質(86.2 kDa) が得られた。

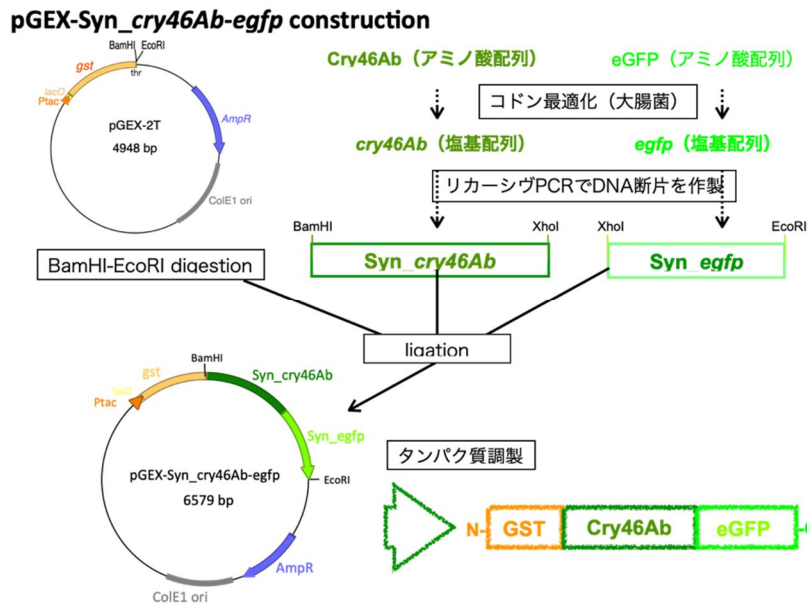


図3 Cry46Ab 発現用プラスミドの構築法

Cry46Ab 変異体発現用プラスミドの構築

あらかじめアミノ酸置換を組み込んだ塩基配列をもつ順向き(F)と逆向き(R)のプライマーを設計し(図4) pGEX-Syn_cry46Ab-egfpを鋳型にPCRを行った。

PCR産物を In-Fusion (Clontech) で環化し、E. coli BL21に導入した。

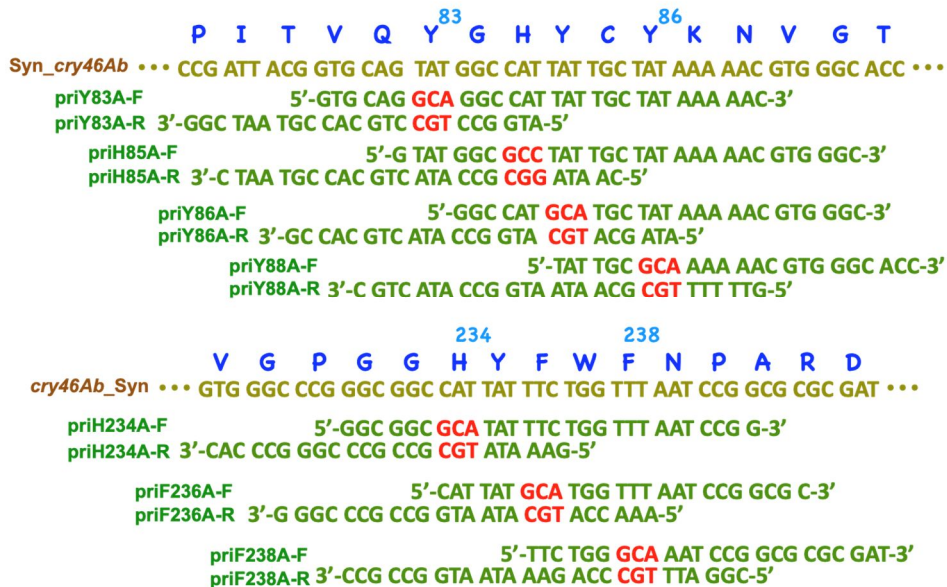


図4 Cry46Ab アミノ酸置換変異体作成用プライマー

Cry46Ab およびアミノ酸置換変異体の調製

- ・ LB +75 µg/mL ampicillin に pGEX-Syn_cry46Ab-egfp/E. coli BL21 一晚培養液を 1/20 vol 加え、30 °C で 振盪培養した。
- ・ OD600 =0.8 で IPTG を加え (終濃度 1 mM) さらに 4 時間振盪培養を続けた。
- ・ 集菌後、沈殿を PBS 2.0 mL (1 mM Pefabloc SC を含む)に懸濁し、菌体を超音波破碎した (BRANSON SFX150 micro tip, 出力 30%, ON 20 秒, OFF 20 秒, Total 発振時間 6 分)。
- ・ 超音波破碎後の液を遠心分離により上清と沈殿を分け、沈殿は 2% Triton X-100-0.5 M NaCl で 2 回、0.5 M NaCl で 3 回、滅菌水で 1 回洗浄したのち滅菌水 1.0 mL に懸濁した。
- ・ この懸濁液を粗タンパク質試料として以降の実験に用いた。
- ・ 懸濁液を 50 mM Carbonate buffer (pH10.5) で可溶化(煮沸 5 分間)し、Bradford 法によりタンパク質濃度を求めた。
- ・ Cry46Ab のアミノ酸置換変異体も、同様に調製した。

ボウフラを用いた生物検定

Cry46Ab およびアミノ酸置換変異体の粗タンパク質試料の2倍希釈系列を作製し、96穴プレートを用いて200 µL/well分注した。ヒトスジシマカ幼生の2齢虫を1匹/well入れ、48時間後の死虫数を数え、半数致死濃度 (LC50) を求めた。

表1 Cry46Ab および1アミノ酸置換変異体 (Y83-Y88) の生物検定

| 毒素濃度 (µg/mL) | 供試数 | Cry46Ab | | Y83A | | Y86A | | Y88A | |
|---------------------------|-----|----------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|-----------------------|------------|
| | | 死虫数 | 死虫率 (%) | 死虫数 | 死虫率 (%) | 死虫数 | 死虫率 (%) | 死虫数 | 死虫率 (%) |
| 32.0 | 6 | 5 | 83.3 | 6 | 100.0 | 6 | 100.0 | 4 | 66.7 |
| 16.0 | 30 | 27 | 90.0 | 24 | 80.0 | 28 | 93.3 | 21 | 70.0 |
| 8.0 | 30 | 9 | 30.0 | 17 | 56.7 | 23 | 76.7 | 11 | 36.7 |
| 4.0 | 30 | 3 | 10.0 | 6 | 20.0 | 14 | 46.7 | 0 | 0.0 |
| 2.0 | 30 | 0 | 0.0 | 1 | 3.3 | 2 | 6.7 | 0 | 0.0 |
| LC50 (µg/mL) (95%信頼限界) | | 9.51 (7.98-11.56) | | 7.62 (6.22-9.50) | | 4.87 (4.01-5.89) | | 11.95 (9.63-15.82) | |

表2 1アミノ酸置換変異体 (H234-8F238) の生物検定

| 毒素濃度 (µg/mL) | 供試数 | H234A | | F236A | | F238A | |
|---------------------------|-----|------------------------|------------|-----------------------|------------|----------------------|------------|
| | | 死虫数 | 死虫率 (%) | 死虫数 | 死虫率 (%) | 死虫数 | 死虫率 (%) |
| 64.0 | 12 | 10 | 83.3 | 12 | 100.0 | 12 | 100.0 |
| 32.0 | 24 | 17 | 70.8 | 15 | 62.5 | 23 | 95.8 |
| 16.0 | 24 | 11 | 45.8 | 3 | 12.5 | 22 | 91.7 |
| 8.0 | 24 | 2 | 8.3 | 1 | 4.2 | 9 | 37.5 |
| 4.0 | 12 | 0 | 0.0 | 1 | 8.3 | 0 | 0.0 |
| LC50 (µg/mL) (95%信頼限界) | | 21.13 (16.49-27.89) | | 26.2 (21.67-32.51) | | 9.44 (7.68-11.30) | |

表3 2アミノ酸置換変異体 (Y83A-H234~8F238) の生物検定

| 毒素濃度 (µg/mL) | 供試数 | Y83A-H234A | | Y83A-F236A | | Y83A-F238A | |
|---------------------------|-----|-------------------|------------|------------|------------|------------------------|------------|
| | | 死虫数 | 死虫率 (%) | 死虫数 | 死虫率 (%) | 死虫数 | 死虫率 (%) |
| 64.0 | 12 | 5 | 83.3 | 0 | 0.0 | 7 | 58.3 |
| 32.0 | 12 | 5 | 70.8 | 0 | 0.0 | 6 | 50.0 |
| 16.0 | 12 | 11 | 45.8 | 0 | 0.0 | 3 | 25.0 |
| 8.0 | 12 | 0 | 8.3 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| LC50 (µg/mL) (95%信頼限界) | | 59.19 (29.48-) | | - | | 40.63 (26.70-94.28) | |

4. 研究成果

Cry46Ab の立体構造解析から、このタンパク質はアエロリジンタイプの型膜孔形成毒素(-PFT)で、3つのドメインからなる。他の-PFTとの構造比較から、ドメインには受容体結合に関わる標的細胞認識領域があると推測される。そこで、ドメインにある2つの芳香族アミノ酸クラスター (Y83-Y88, H234-F238) のアミノ酸置換変異体を作製し、それらの殺ボウフラ活性を比較検討した。その結果、どちらの芳香族アミノ酸クラスターも1アミノ酸置換変異体では殺ボウフラ活性の有意差はほとんど見られなかったが、それぞれのクラスターで一つずつ置換した二重変異体では殺ボウフラ活性を失う組み合わせが見つかった。このことから、芳香族アミノ酸クラスターY83-Y88とH234-F238の複数のアミノ酸残基が、標的細胞のレセプターとの結合に関与していることが示唆された。

Cry46Abの標的細胞認識部位が明らかになったことにより、この領域を利用した生物農薬の開発が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 武部 聡、岡本 郁佳、坂本 将義、青山 雅寧、東 慶直、早川 徹 |
| 2. 発表標題 殺ポウフラ活性を示すCry46Abの受容体認識部位について |
| 3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 武部聡、勝部柊斗、東慶直、早川徹 |
| 2. 発表標題 Cry46Abの殺ポウフラ活性に関する受容体認識部位について |
| 3. 学会等名 第68回日本応用動物昆虫学会大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 So Takebe, Yoshinao Azuma, and Tohru Hayakawa |
| 2. 発表標題 Receptor recognition site of insecticidal pore-forming toxin Cry46Ab |
| 3. 学会等名 Society for Invertebrate Pathology Annual Conference 2024 (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|