

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658048

研究課題名(和文) Cryトキシンのクリスタル形成機構を利用する画期的なタンパク質生産技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel protein production system using peptide-tag derived from *Bacillus thuringiensis* Cry toxin.

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) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では殺蚊トキシnCry4Aaに由来するペプチドタグ4AaCter及び4AaB7のタンパク質凝集体形成機構及びその利用に関する研究を進めた。様々な変異体の構築を通して4AaB7内の機能構造を解析した結果、保存されている疎水性アミノ酸の配置がタンパク質凝集体の形成に関与することを示唆した。またペプチドタグ4AaCterを利用して臨床検査薬資材(シスタチンC)や微生物殺虫剤(サソリトキシンの生産を試み、これらが効率よく且つ安価に生産できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：4AaCter and 4AaB7 are peptide-tags derived from mosquitoicidal Cry4Aa toxin. These peptide-tags facilitate inclusion formation of fused protein in *Escherichia coli*. In this study, the ability of 4AaCter and 4AaB7 to form protein inclusion were analyzed. Mutational analyses revealed that the hydrophobic amino acids in 4AaB7 significantly affected the formation of protein inclusion, suggesting some important roles of these hydrophobic amino acid residues. Application of 4AaCter-tag to the production of cystatin C as an endogenous marker of renal dysfunction yielded excellent results, including a dramatic increase in the production level, simplification of the product purification and high immunogenicity. Similarly, scorpion toxins were produced well as alkali-soluble protein inclusion in *E. coli*, and shown to be a good supplements for Cry toxin-based bioinsecticides.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：Bacillus thuringiensis Cry4Aa 大腸菌 ペプチドタグ4AaCter シスタチンC サソリトキシン

## 1. 研究開始当初の背景

土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* (BT 菌)はクリスタルと呼ばれる特殊なタンパク質凝集体を産生する。昆虫幼虫によって食べられたクリスタルはアルカリ性の消化液中で速やかに可溶化し、主成分である  $\delta$  内毒素(Cry トキシン)を放出する。Cry トキシンがこのようなクリスタルとして生産されることには、「限られたスペースに大量のタンパク質を収納する」、「環境中のプロテアーゼによる分解からタンパク質を保護する」、「高発現による悪影響から BT 菌自身を保護する」等の意味があると考えられる。これらは一般的なタンパク質を生産する上でも大きな利点になると考えられる。

Cry トキシンのクリスタル形成機構については不明な部分が多く、Cry トキシンの種類でも異なるようである。130 kDa 型のプロトキシンとして生産される Cry トキシンの場合、トキシンの活性化過程で除かれる C 末端領域がクリスタル形成に関与すると

こと以外ほとんど不明であり、それを利用するタンパク質生産系の開発も全く進められていなかった。

本研究では殺蚊トキシン Cry4Aa を解析する中で C 末端側領域のポリペプチド ( $I^{696} \sim P^{851}$ , 4AaCter)を融合させたタンパク質が大腸菌で凝集体(クリスタル)形成することを観察した。これは 4AaCter を構成するアミノ酸配列内にクリスタル形成に関与する機能構造が存在することが示していた。本研究は 4AaCter を利用すればタンパク質をアルカリ可溶性の凝集体として生産する極めて効率の良い生産システムを構築できると考えて始められたものである。

## 2. 研究の目的

本研究では4AaCterを構成するアミノ酸配列内で、タンパク質凝集体(クリスタル)形成に関与する機能構造を特定し、最終的には4AaCterによるタンパク質凝集体形成の原理

を解明する。4AaCterをタグとして利用するシステムを構築し、様々なタンパク質の生産を通して有効性を実証していく。本研究の目的が達成できれば、従来法では生産することが困難であったタンパク質でも容易に大量調製できると期待される。また凝集体形成により精製作業が簡略化され、タンパク質生産の大幅なコストダウンが達成できると期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 人工遺伝子の合成

ペプチドタグ4AaCter ( $I^{696} \sim P^{851}$ )をコードする遺伝子は人工遺伝子 *cry4Aa-S2* (Hayakawa et al., 2010)を鋳型としたPCR法で増幅した。またCryトキシンのクリスタル形成に関与すると考えられる保存配列Block7 (B7)やヒトシスタチンC(CysC, 腎機能マーカー)、昆虫特異的サソリトキシン(AahIT及びBjaIT)をコードする人工遺伝子はRecursive PCR法で合成した (Hayakawa et al., 2010; 2011; Hayashi et al., 2013)。構築した人工遺伝子はグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子をマーカーとして含むpGEXベクター(GE Healthcare)、もしくはそこからGST遺伝子を除いたp GSTベクターに挿入した。

### (2) タンパク質の発現

タンパク質は大腸菌BL21を用いて発現させた。大腸菌菌体内における凝集体の形成は光学顕微鏡(Axio Observer A1, CarlZeiss)下で観察した。同時にSDS-PAGE法による解析結果から発現タンパク質の凝集体形成率を計算した。凝集体に由来する発現タンパク質の生物活性は目的に応じた方法で解析した。簡単に説明すると、GST活性はCNDB assay (Hayakawa et al., 2010; 2011)、ヒトCysCの抗体反応性はELISA (Hayashi et al., 2013)、サソリトキシンの殺虫活性はアカイエカ幼虫を用いるバイオアッセイ (Matsumoto et al., 2014)で評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 凝集体形成原理の解明に関する研究

Cry4Aaのクリスタル形成には4AaCter内の一部の配列(4AaB7, F<sup>802</sup> ~ E<sup>834</sup>)が関与している(Hayakawa et al., 2010)。本研究ではタンパク質凝集体形成に関与する4AaB7内の機能構造を明らかにするための以下の研究を進めた。

##### 様々なCryトキシンに由来するB7配列の

**比較解析：**Cry4Aa以外の130 kDa型Cryトキシンから14種(Cry1, 5, 7, 8, 9, 12, 14, 21, 26, 28, 32, 43, 47, 48)を選抜し、B7配列をコードする人工遺伝子を構築した。各種B7をGSTとの融合タンパク質として発現させ、大腸菌におけるタンパク質凝集体の形成を観察した。その結果、凝集体形成の効率はB7の由来によって異なることが明らかになった。Cry4Aaに由来するB7(4AaB7)と同様な高い凝集体形成率(95%)を示したものはCry5Baや32Aa、48Aa由来のものだけで、特にCry47Aa由来のものでは10%以下の低い形成率しか観察されなかった(Hayakawa et al., 2011)。B7内にはタンパク質凝集体形成に関与する機能構造が含まれるもののそれだけでは不十分であり、4AaCterタグの様に他の機能構造も含めた広い範囲のペプチドタグをタンパク質生産に利用すべきであると考えられた。

**4AaB7の変異導入解析：**様々なCryトキシンに由来するB7のアミノ酸配列を比較した結果、全てのB7配列は可溶性タンパク質に特徴的なGRAVY値(タンパク質の疎水性を示す指標)を示した。また全体的に高い相同性を示したものの、特に特徴的な疎水性アミノ酸の配置(HxxHHHxxH, H: 疎水性アミノ酸、x: 親水性アミノ酸)が配列内で見つかった。そこで4AaB7を用いて疎水性アミノ酸をアラニンに置換した変異体を構築した結果、この疎水性アミノ酸の特徴的な配置が凝集体形成率に大きく影響することが示唆された(Hayakawa et al., 2011)。また4AaB7のアミノ酸配列をC末端側から欠失させた変異体では、保存された

疎水性アミノ酸の欠失が多くなるに伴って凝集体形成率も低下した。以上の結果はB7内で見つかったこの特徴的な疎水性アミノ酸の配置が凝集体形成に何らかの役割を持つことを示唆していた。興味深いことに今回作製した最小の欠失変異体はわずか8アミノ酸の短いポリペプチド(F<sup>802</sup>PTYIFQK<sup>809</sup>)であったが、それでも約50%程度の凝集体形成率を示し、この領域内にも必要最小限の機能構造が存在すると考えられた。

##### (2) 4AaCterタグを利用するタンパク質生産

ペプチドタグ4AaCter及び4AaB7の有用性を実証するため、これらを導入した発現ベクターを構築して実際にタンパク質を生産した。

##### 4AaCterタグを利用したヒトシスタチンC

**の効率的生産：**シスタチンC(Cys C)は急性腎炎などの腎臓病を診断するためのバイオマーカーとして利用されており、臨床検査薬市場での需要も高い。一方、既存の生産システムは十分に効率的とは言えず、市場価格も比較的高いものとなっている。本研究では4AaCterタグとの融合タンパク質を発現させるベクター(p4AaCter)を構築し、それを用いて組換えCys Cの生産を試みた。4AaCterを融合させることで組換えCys Cは大腸菌の菌体内で大きな凝集体を形成し、4AaCterタグを利用しない場合と比べて発現量も大幅に上昇した。Cys C凝集体の回収は容易であり、簡単な精製操作(アフィニティカラムによる精製)で大量のタンパク質(7.1±1.1 mg/L culture, 純度87±5%)が生産できた(Hayashi et al., 2013)。組換えCys Cはヒト血清由来のCys Cと同様な高度な免疫原性と免疫反応性を備えており、本システムが抗原としての組換えCys Cの生産に適することが明らかになった。また生産コストも大幅に圧縮できることが示唆された。

##### 4AaCterタグを利用した昆虫特異的サソ

**リトキシンの生産：**抗原タンパク質以外の生産例として、昆虫特異的サソリトキシンであ

るAahIT及びBjαITの生産を試みた。一般的に昆虫幼虫中腸の消化液はアルカリ性（pH 10.5）であり、4AaCterを融合させて形成させたタンパク質凝集体が速やかに可溶化してサソリトキシンを放出することを期待した。実験の結果、4AaCterを融合させたAahIT及びBjαITはアルカリ可溶性の凝集体として大量生産された(Matsumoto et al., 2014)。アカイエカ幼虫を用いたバイオアッセイの結果、サソリトキシンの凝集体が単独で殺虫活性を示すことがなかったものの、Cry4Aaと同時に投与することでCry4Aaの殺虫作用を助長することが示された(Matsumoto et al., 2014)。4AaCterタグを用いてタンパク質を凝集体として生産する本方法は、経口で作用する殺虫トキシンの製剤化にも有効であることが示唆された。

**4AaB7を用いた新規発現ベクターの構築：**  
ペプチドタグ4AaB7をタンパク質生産に利用する目的で新規の発現ベクターを構築した。発現ベクターはpΔGST (Hayakawa et al., 2010) を基として、そこにHisタグ及び4AaB7タグ、HRV3Cプロテアーゼなどを組み合わせて作製した。これらを用いてCys C、もしくはフェリチン(腫瘍マーカー)の生産を試みた結果、4AaB7との融合は大腸菌における凝集体形成を促すと共に、融合タンパク質の発現量の上昇も観察された。しかし4AaB7自体の再凝集性が強く、精製過程でのロスが非常に多くなった。タンパク質の凝集活性をコントロールする技術の開発が今後の課題となっている。

#### 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 4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, 117, 1-4 (2014), 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, 88, 230-234, 2013, doi: 10.1016/j.pep.2013.01.011.

Kuroda S, Begum A, Saga M, Hirao A, Mizuki E, Sakai H, Hayakawa T., Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. *Current Microbiology*, 査読有, 66, 475-480, 2013, doi: 10.1007/s00284-013-0301-1.

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, 1943-1951, 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3216-4.

〔学会発表〕(計 13件)

早川徹、Howlader M.T.H.、中尾早織、井出徹、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、佐野乙香、井出徹、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

Howlader M.T.H., Nakao S., Sakai H., Hayakawa T., Interactions between mosquitoicidal Cry4Aa and the brush border membrane proteins of *Culex pipiens* larvae. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2013年8月11-15日, Pittsburgh, U.S.A.

Hayakawa T., Sato S., Iwamoto S., Sudo S.,

Howlader M.T.H., Sakai H., Novel protein production system using a peptide-tag derived from *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry4Aa toxin. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2013 年 8 月 11-15 日, Pittsburgh, U.S.A.

Howlader M.T.H., Nakao S., Sakai H., Hayakawa T., 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、松本陸、清水佳孝、酒井裕、殺蚊トキシン Cry4Aa とサソリトキシン(BjaIT 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 日-19 日、筑波

金治正泰、駒田卓也、Howlader M.T.H.、酒井裕、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 日-14 日、福岡

林雅浩、高木麻里、佐藤真也、岩本繁久、須藤薫雄、酒井裕、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 日-14 日、福岡

Howlader M.T.H., Nakao S., Sakai H., Hayakawa T., 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 日-14 日、福岡

早川徹、林雅浩、高木麻里、佐藤真也、岩本繁久、須藤薫雄、酒井裕、殺蚊トキシン Cry4Aa に由来するペプチドタグの開発と検査薬成分(抗原タンパク質)の効率的生産、日本蚕糸学会第 82 回大会、2012 年 3 月 18 日、福岡

林雅浩、高木麻里、山崎貴郁、山西勇輝、佐藤真也、岩本繁久、須藤薫雄、早川徹、酒井裕、BT 菌に由来するポリペプチドタグを利用した検査薬成分(抗原タンパク質)の効率的生産、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

酒井裕、林雅浩、佐藤真也、岩本繁久、須藤薫雄、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

早川徹、佐藤真也、岩本繁久、須藤薫雄、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

〔図書〕(計 1 件)

早川徹、酒井裕、講談社、最新昆虫病理学、2014、251 (pp237-242)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 徹 (HAYAKAWA TOHRU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：30313555

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：