

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660044

研究課題名(和文) 分泌型毒素の結晶化および細胞認識部位改変による水生有害生物駆除法の開発

研究課題名(英文) Development of an aquatic pest control with crystalline toxin modified cell recognition sites

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水生有害生物の駆除を目的として、細胞認識部位、細胞損傷作用部位とタンパク質結晶化タグを融合した不溶性タンパク質毒素の作製システムを構築した。不溶化することで毒素の濃度を上げ、それにより標的生物に致死量を摂取させることができる。さらに、水中での毒素の希釈や流失を抑え、不必要な環境汚染を防ぐことができる。

土壌細菌由来のCry46Abはボウフラやジャンボタニシなどに致死性を示すが、メダカには影響がないことが分かった。そこで、Cry46Abと結晶化タグを融合した不溶性毒素顆粒を調製し、この融合タンパク質が有害生物に対する致死性を保持していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In order to control aquatic pests, a system for preparing an insoluble protein toxin was constructed by fusing a cell recognition site, a cytotoxic site and a protein crystallization tag. Insolubilizing increases the concentration of toxin, it is possible to cause a target organism to take a lethal dose. insolubilizing also suppress dilution and loss of toxin in water, and unnecessary environmental contamination. Cry46Ab derived from soil bacteria showed lethal activities against mosquito instars and the apple snail, but not against medaka. Therefore, insoluble toxin granules of Cry46Ab with a crystallization tag was prepared, and it was confirmed that this fusion protein retained lethal activities.

研究分野：分子生物学

キーワード：微生物農薬 水生有害生物 選択毒性 タンパク質不溶化 *Bacillus thuringiensis*

1. 研究開始当初の背景

水生有害生物による被害は深刻であるが、効果的な駆除法は確立されていない。代表的な水生有害生物のスクリング貝の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、それ以降の統計は取られていないが、現在も被害は拡大し続けていると考えられている。カワヒバリ貝など他の水生生物の被害も増加している。

蚊はデング熱、ジカ熱、マラリアなどウイルスや原虫などが引き起こす感染症を媒介する。2014年にデング熱の国内感染のように、これらの感染症が国内で流行する恐れがあるため、対策を考えておく必要がある。蚊の幼生であるボウフラは水たまりやため池など比較的狭い止水域に生息するので、空中を飛び回る成虫より駆除は効率的で環境汚染等の危険も少ない。

水田やため池にはメダカやカエルなど、害を及ぼさない生物がいるので、それらに毒性を示さないものがよい。さらに水中散布によって薬剤の希釈、拡散、流出が起こらない形状が使いやすい。そこで、本研究は水溶性毒素の細胞損傷部位に他のタンパク質の水生生物細胞認識部位と土壌細菌バチルス・チューリンゲンシス(Bt)由来のタンパク質結晶化因子4AaCter(早川ら FEBS Lett., 277, 2883 (2010))を連結したカセット式タンパク質毒素の作製を考えた。標的有害生物細胞損傷性タンパク質を不溶化すれば、水生有害生物が摂食できる。また、毒素の受容体結合部位を交換すれば、特定の水生有害生物に対して選択的に毒性を示す生物農薬が開発できる。

2. 研究の目的

水生有害生物の効率的駆除のため、有害生物の消化管に結合するペプチドと毒素の細胞損傷部位を連結した選択毒性の高い融合タンパク質を作製する。さらに、タンパク質結晶化(不溶化)タグを付加し、水に不溶性食毒性タンパク質顆粒の調製法を確立する。

本法は、不溶化により水溶性毒素を濃縮し、それにより標的生物に致死量を確実に摂取させることができ、さらに、不溶化による流失を押さえることで不必要な環境汚染を防ぐことができる斬新な手法である。

3. 研究の方法

本研究で作製する食毒性タンパク質は、標的細胞認識部位、細胞損傷作用部位、結晶化因子(4AaCter)を連結したものである。標的細胞認識部位は標的細胞との結合性を指標に既知タンパク質毒素から探索し、必要領域のDNA断片を調製し、細胞損傷作用部位は毒性発現機能を失わないペプチド領域からDNA断片の必要領域を検討した。2つのDNA断片に4AaCterをつなげ、発現ベクターに連結してBt細胞による融合タンパク質発現システ

ムを構築した。

(1) 標的細胞認識ペプチドの探索

標的細胞認識ペプチドの探索は、本研究室で土壌などから分離したBtのコレクション数百株を対象に行った。Btが産生する殺虫タンパク質(Cry)は作用の昆虫目特異性がはっきりしており、例えばCry1Aaはチョウ目のみ殺虫性を示し、Cry4Aaはハエ目のみである。こういったCryの中には、スクリング貝などを認識するものがあると思われる、いくつかの候補が既に得られていた。

(2) 標的細胞認識ペプチド調製用発現システムの構築

市販の大腸菌用発現ベクターにGSTタグとGFPタグを繋ぎ、ペプチドの精製および追跡ができるようにした。

(3) 不溶化タンパク質顆粒調製用発現システムの構築

市販のパチルス属-大腸菌シャトルベクター-pHY300PLKにBtの孢子形成期に高い転写活性を示す2つのプロモーター配列³⁵と²⁸およびSD配列-クローニング部位-転写終結領域を配置したBt細胞用発現ベクターに4AaCterタグを繋ぎ、融合タンパク質を不溶化顆粒として調製できるシステムを構築した。

(4) 水生有害生物の生物検定

融合タンパク質の結晶をスクリング貝、ボウフラなどの水生有害生物に食取させ、毒性について検討する。選択毒性の対照として、メダカやセンチュウに対する毒性も調べた。

4. 研究成果

(1) 標的細胞認識ペプチドの探索

本研究室には土壌などから分離したBtのコレクションが数百株あり、これらを対象にボウフラに対して食毒性を示す菌株のスクリーニングを行った。候補として得られた数株について殺虫タンパク質遺伝子を探したところ、Bt TK-E6株が保有するcry46Abがコードするタンパク質に強い殺ボウフラ活性がみられた。このタンパク質Cry46Abは、殺ボウフラ活性を示すタンパク質として知られているCry4やCry11などの3D-Cry毒素とはアミノ酸配列類似性が低く、分子量も活性型3D-Cry毒素の70 kDa程度に比べて33 kDaと小さいので、標的細胞認識機構や細胞損傷機構などが3D-Cry毒素とは異なると思われる。

Cry46Abはガン細胞特異的な細胞損傷作用を示すパラスポリンとして見つけられたので、Parasporin2Abという名前もある。

Cry46Abの立体構造予測のため、既に立体構造解析されているParasporin2Aa(PS2Aa)との一次配列アライメントを行った(図1)。その結果、両者のアミノ酸配列の相同性は88%で、非常によく似た構造をとることが分かった。そこで、PS2Aaの立体構造をもとにCry46Abの立体構造をタンパク質立体構造予測フリーソフトSWISS-MODELを用いて予測

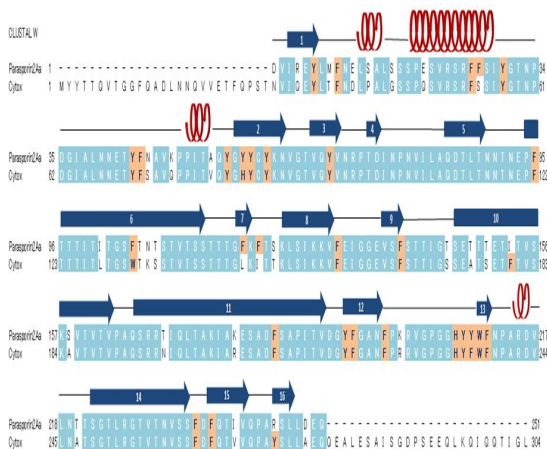


図1 CLUSTAL WによるCry46AbとPS2Aaの一次配列アライメント
矢印は シート、螺旋は ヘリックスを示している。アミノ酸配列で青色はアミノ酸が一致しており、オレンジは芳香族残基を表している。

した(図2)。それによるとCry46Abの構造は16本のシートと4つのヘリックスが含まれ、全体として細長い円筒状の構造をとると予測された。この構造は型膜孔形成毒素(β PFT)のグループに特徴的である。そこで、このグループに属し、毒素の作用機構の解析が進んでいるライセニンやアエロリシンなどの情報をもとにCry46Abの標的細胞認識部位を推測すると、N末端のシート(S1)から3つのヘリックス(H1、H2、H3)を経てS2のシートまでとH2とH3の間に割り込むような構造を取っているS12とS13が標的細胞認識部位を形成していると考えられた。

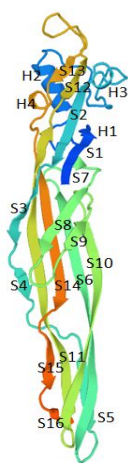


図2 SWISS MODELによるCry46Abの立体構造予測
Sはシート、Hはヘリックスを示す。数字はN末端からの配置順を表す。

(2) 標的細胞認識ペプチド調製用発現システムの構築

大腸菌用発現ベクター-pGEX-2Tに*egfp*のORFを含むDNA断片を繋ぎ、ベクターのマルチクローニングサイトに外来遺伝子のORFを挿入して発現させるとGSTとGFPのタグが付いたペプチドが得られ、精製および追跡が簡便にできるようにした。

このベクターに*cry46Ab*のORFを挿入し、

大腸菌 BL21 codon plus (DE3)-RIL (アジレント・テクノロジー社)に導入してIPTGでCry46Abを誘導発現させた生菌を、 1.7×10^8 CFU/mLの濃度で殻長3mmのスクリンゴ貝に摂取させたところ、3日後死亡率は100%であった。一方、ベクターのみを持つ大腸菌を同様に培養、誘導し、 2.5×10^8 CFU/mLの濃度で与えても3日後死亡率は0%であったことから、この大腸菌を用いた発現システムでBtの遺伝子を発現させることができ、調製したタンパク質はBt細胞内で発現したときと同じ性質を保持していることが分かった。したがって、この発現システムで融合タンパク質毒素の各パーツを調製し、機能解析に用いることができる。

(3) 不溶化タンパク質顆粒調製用発現システムの構築

Btは孢子形成期に菌体内に非常に大きなタンパク質顆粒を形成する。この顆粒はきれいな結晶構造を取るので、クリスタル(crystal)と呼ばれている。このような不溶性タンパク質顆粒を形成するという事は、孢子形成期にのみ転写活性が高くなるプロモーターをBtは持っているということなので、これを利用して不溶性タンパク質顆粒の調製システムを作成した。

Bt亜種*israelensis*がもつ*cyt1A*の2つのプロモーター配列³⁵と²⁸およびSD配列、*cry4Aa*の転写終結領域をマルチクローニングサイトで連結したDNA断片を作製し、市販のパチルス属-大腸菌シャトルベクター-pHY300PLKに挿入したBt細胞用発現ベクター-pPcyt-MCを構築した。このベクターに*cry46Ab*をクローン化し、クリスタルを産生しないBt変異株Bt亜種*kurstaki* CRY(-)Bに導入して孢子形成培地で30、24時間振盪培養したところ、菌体内に封入体の形成が観察された。菌体を超音波破碎して封入体を回収し、ボウフラに摂取させたところ、非常に強い致死活性を示した。このことから、本システムで不溶化タンパク質顆粒を調製できることが分かった。しかしながら、Cry46Abは比較的不溶化しやすいタンパク質なので、今後はBt細胞用発現ベクター-pPcyt-MCに結晶化因子4AaCterを組み込んだベクターを構築する予定である。

(4) 水生有害生物の生物検定

ボウフラを用いた検定

供試したボウフラは、ネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)とアカイエカ(*Culex pipiens*)である。

24穴プレートの1ウェルあたり瞬化後5日目の2齢虫(体長約3mm)のボウフラ6匹と600 μ Lのイオン交換水を入れ、6時間絶食状態に置いた。

Bt細胞用発現システムで調製したCry46Abの懸濁液を滅菌水で希釈して2倍希釈系列を作製し、ボウフラが入った各ウェルに600

μL 加え、計 1.2 mL になるようにした。48 時間後の死虫数を数え、半数致死濃度 (LC₅₀) を Probit 法で求めた(表 1)。Cry46Ab はネッタシマカ幼生とアカイエカ幼生のいずれにも非常に強い致死作用を示し、半数致死濃度は既に知られている Cry4 や Cry11 と同程度であった。

表 1 Cry46Ab の殺ボウフラ活性

<i>Ae. aegypti</i>			
毒素濃度 (ng/mL)	死虫数 (/24)	死虫率 (%)	LC50
22.9	24	100.0	4.5
11.5	21	87.5	(3.7-5.5)
5.7	15	62.5	
2.9	8	33.3	
1.4	0	0.0	
0.7	0	0.0	
0.0	0	0.0	
<i>Cx. pipiens</i>			
毒素濃度 (ng/mL)	死虫数 (/72)	死虫率 (%)	LC50
22.9	NT	NT	4.6
11.5	60	83.3	(4.0-5.3)
5.7	43	59.2	
2.9	25	34.7	
1.4	5	6.9	
0.7	0	0.0	
0.0	0	0.0	

スクミリング貝を用いた検定

6 穴プレートの 1 ウェルあたりスクミリングガイ稚貝(殻長 3 mm)を 10 匹ずつ入れ、イオン交換水 500 μL を加えた。Bt 細胞用発現システムで調製した Cry46Ab の懸濁液を滅菌水で希釈して 2 倍希釈系列を作製し、ボウフラが入った各ウェルに 500 μL 加え、計 1.0 mL になるようにした。48 時間後の死貝数を数え、半数致死濃度 (LC₅₀) を求めた(表 2)。Cry46Ab はスクミリング貝に対しても強い致死作用を示した。

表 2 Cry46Ab のスクミリング貝に対する生物検定

毒素濃度 (ng/mL)	死貝数 (10 匹中)
2.91	10
1.46	10
0.727	10
0.363	7
0.182	1
0.000	0

ヒメダカを用いた検定

24 穴プレートの 1 ウェルに、採水後 1 日間エアレーションしておいたイオン交換水と Bt 細胞用発現システムで調製した Cry46Ab の懸濁液を加え計 1 mL になるよう調製した。各ウェルに孵化後 7 日目、体長 4~5 mm のヒメダカ 1 匹ずつを入れ、48 時間後に観察したところ、385 ng/mL の濃度でも全てのヒメダカが生きていた。この結果から、Cry46Ab はヒメダカに対して致死活性を示さないことが分かった。

他の生物種を用いた検定

他の生物種についても生物検定を行ったところ、Cry46Ab はミジンコ、イトミミズ、チャコウラナメクジに対して致死活性を示したが、センチュウ(*C. elegans*)には致死性を示さなかった。このことから、Cry46Ab の致死活性には生物種特異的な選択毒性があることが示唆された。

以上の結果より、本研究室で収集した土壌細菌の中から Bt. TK-E6 株由来の Cry46Ab にスクミリング貝やボウフラなどの水生有害生物に対する強い食毒性致死作用があることがわかった。一方、ヒメダカなどには影響を及ぼさないことから、Cry46Ab を用いて水生有害生物に特異的に作用する微生物農薬を開発する可能性が示された。

また、Cry46Ab の立体構造予測、およびこのタンパク質が属するβPFT グループのライセニンやアエロリジン等の毒素の作用機序解析の情報から、Cry46Ab の標的細胞認識部位を予測できた。この認識部位とタンパク質結晶化因子 4AaCter に細胞損傷部位を繋げることで、標的有害生物に対する選択毒性の高い食毒性タンパク質毒素の生産システム構築が示唆された。

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)

[学会発表](計 6 件)

- So Takebe, Mosquitocidal activity of parasporin type 33-kDa Cry protein from *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan, 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2017 年 7 月 17 日(Singapore, Singapore)
- 武部 聡, *Bacillus thuringiensis* TK-E6 株由来の Cry46Ab の殺ボウフラ活性、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月 28 日(東京農工大、東京都小金井市)
- 植田 翔、武部 聡、ボウフラに対して食毒性を示す非 3-ドメイン Cry 型 33-kDa タンパク質、第 12 回昆虫病理研究会シンポジウム、2016 年 9 月 16 日(モンタナリゾート、宮城県岩沼市)
- So Takebe, Mosquitocidal activity of

non-3-domain Cry type 33-kDa protein from *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan, 49th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2016年7月 (Tours, France)

植田 翔、武部 聡、殺ボウフラ活性を示す *Bacillus thuringiensis* TK-E6 株がもつ巨大プラスミドの殺虫タンパク質遺伝子群の構成、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016年3月27日 (札幌コンベンションセンター、北海道札幌市)

根来 綾子、武部 聡、*Bacillus thuringiensis* TK-E6 が産生する非 3-ドメイン型 Cry タンパク質の殺ボウフラ活性、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015年3月27日 (岡山大学、岡山県岡山市)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：殺軟体動物剤
発明者：武部 聡、東 慶直
権利者：学校法人近畿大学
種類：特許
番号：特願 2017-075021
出願年月日：平成 29 年 4 月 5 日
国内外の別：国内

名称：双翅目昆虫用殺虫剤
発明者：武部 聡
権利者：学校法人近畿大学
種類：特許
番号：特願 2016-216238
出願年月日：平成 28 年 11 月 4 日
国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし