Mini Review

微生物殺虫剤（BT 剤）の改良と作用メカニズム Improvement and Mechanism of Action of Microbial Pesticides (Bt)

姫 野 道 夫
MICHIO HIMENO

大阪府立大学先端科学研究所 〒599-8570 堺市学園町 1-2
Research Institute for Advanced Science and Technology 1-2 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8570,
Japan

（受付 1999年8月11日—受理 1999年9月6日）

The spore-forming, gram-positive bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Bt), is a ubiquitous soil micro-organism. Since the first Bt was isolated as a pathogen of silkworm in 1901, it has become possible to group these isolates into 50 serovars. At present it has been estimated that over 60,000 isolates are being maintained in culture collections worldwide. The delta-endotoxin products in Bt during spore-forming stage are most widely used as biological control agents and pesticides that do not pollute the environment.

The delta-endotoxin is an insecticidal protein that be coded by *cry* gene to constructs a crystalline protein bodies. After a susceptible insect ingested these crystalline bodies, the proteins are dissolved in midgut by the digestive juice and changed to an active toxin protein. In this review, the mode of action of the delta-endotoxin, improvement of Bt products by gene manipulation for the development of biopesticides (recombinant microbes) against Bt-resistance pests and also transgenic plants incorporating the *cry* genes were introduced.

Key words: microbial pesticide, *Bacillus thuringiensis*, *cry* gene, Bt products

1. はじめに

農業技術の進歩と物流改革により、周年、鮮度の高い農産物が食卓を飾っている。その大きな支えの一つとなっているのが農薬である。かつて、生産性第一として非天然型の化学農薬を多用し、環境汚染と社会問題を引き起こしたため、厳しい規制の下での農薬使用が義務づけられている。しかし、一方で

は世界人口の急激な増加が予測されると共に、地球レベルでの気候の変化や耕地の砂漠化の進行が促進し、益々、飢餓人口の増加が問題となりつつある。このような状況の解決のために地球環境に影響を及ぼすことなく、単位面積あたりの高収穫と省エネルギー型の農薬が求められている。このような条件を満たす農薬として微生物農薬に注目が集まっている。通常、細菌、カビ、ウイルス以外に原生生物や線虫なども含めて微生物農薬と総称する。これ等は何れも昆虫病原菌や植物病原菌、さらに、拮抗バクテリアなどで何れも特異性が高いのが特徴である。即ち、これ等は目的の昆虫しか殺さないとか、目的

* Corresponding author; E-mail: himeno@riast.Osakafu-u.ac.jp

の雑草しか枯らさないなどを指し、残留性がなく人畜魚介類に無害である²³⁾。

2. 微生物殺虫剤

微生物殺虫剤としてバクテリア、糸状菌、ウイルス、原生生物や小型の線虫が製剤として開発が進められ利用されている (Table 1)。なかでも、速効性の高いバクテリア製剤が最も多く使用されている。特に、土壤微生物の一種である *Bacillus thuringiensis* がいろいろと開発されてい、Bt 剤と総称される。殺虫特異性の高い製剤である⁴⁾。

蚕の軟化病病原菌として発見された本菌株は現在血清型変異株として70株以上知られており²⁷⁾、種ごとに殺虫特異性もそれぞれ微妙に異なるが、大きくはその殺虫特異性から7グループに分けられる (Table 2)。それらは殺虫蛋白質の塩基配列の相同性からも分類され、分子系統樹も明らかにされている^{3,5,19)}。

3. 殺虫作用

Bt 剤の殺虫作用は主として前述の殺虫蛋白質に負うものである。この殺虫蛋白質は *B. thuringiensis* (Bt) 菌の孢子形成期に菌体内に結晶様蛋白質顆粒 (crystalline protein body; CPB) として生産されるため δ -内毒素 (δ -endotoxin) と呼ばれている。この δ -エンドトキシン蛋白質が *cry* 遺伝子により生産される。その遺伝子由来の蛋白質 (Cry) が殺虫性の本体である (insecticidal protein; ICP と呼ばれている)。この δ -内毒素以外に Bt 菌は α -毒素 (レンチナーゼの一種)、 β -外毒素 (β -exotoxin; スクレオチドの一種; RNA 合成阻害剤)、 γ -毒素 (レンチナーゼの一種)⁹⁾などの殺虫性毒素が知られている。 α -トキシン、 γ -トキシンはいづれもその活性は弱いものである。又、微生物の殺虫剤として使用する時には β -外毒素の生産しない株が要求される。現在、微生物殺虫剤として使用されるものは δ -内毒素、即ち、Cry 蛋白質そのものである。Bt 菌中の ICP は菌体内で CPB として生産される。CPB と成った ICP

Table 1. Microbial insecticides.

Type	Pathogenic Microorganism	Target Insect/Country
Viruses		
Baculovirus	Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV)	Butterflies and Moths/USA, Canada, Japan, USSR
	Granulosis Virus	Butterflies/USSR
	Non-occluded Baculovirus	Beetle/Fiji
Reovirus	Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (CPV)	Moths/Japan
Bacteria	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Butterflies, Moths, Beetles, Mosquitoes, Black Flies/USA, Canada, Europe, China, USSR
	<i>Bacillus popilliae</i>	Beetle/USA
	<i>Bacillus moritai</i>	Flies/Japan
Fungi	<i>Beauveria bassiana</i>	Beetles/USSR
	<i>Hirstella thompsoni</i>	Mites/USA, China, Israel
	<i>Verticillium lecanii</i>	Scale Insect, Mites, Aphids/England
	<i>Metarrhizium anisopliae</i>	Moths, Beetles/Brazil
	<i>Nomuraea rileyi</i>	Moths/USA, Brazil
	<i>Entomophthora</i> spp.	Moths/China, USSR
Protozoa		
<i>Microsporidia</i>	<i>Nosema locustae</i>	Grasshopper/USA
Nematodae	<i>Neoplectana carpocapsa</i>	Beetles/USA
	<i>N. glaseria</i>	Beetles/USA
	<i>Heterorhabdis</i> spp.	Beetles/USA

Table 2. Insecticidal activities of *B. thuringiensis* varieties.

Group	Target Insects	Varieties
Lepidopteran toxic (I)	Butterflies and moths	<i>aizawai</i> , <i>alesti</i> , <i>berliner</i> , <i>entomocidus</i> , <i>dendroliums</i> , <i>galleriae</i> , <i>sotto</i> , <i>thuringiensis</i> , etc.
Lepidopteran and Dipteran toxic (II)	Butterflies, moths mosquitoes and black flies	<i>aizawai</i> , <i>kurstaki</i> .
Coleopteran toxic (III)	Elm leaf beetle, boll weevil etc.	<i>tenebrionis</i> , <i>san diego</i> .
Dipteran toxic (IV)	Mosquitoes and black flies	<i>israelensis</i> , <i>morrisoni</i> , <i>kyushuensis</i> .
Lepidopteran and Coleopteran toxic (V)	Butterflies, moths and elm leaf beetle, boll weevil etc.	4835
Coleopteran toxic (VI)	Scarabs, japanese beetle	<i>japonensis</i> Buibui
Non-toxic (VII)		<i>finitimus</i> , <i>pakistani</i> , <i>dakota</i> , <i>indiana</i> , <i>kumamotoensis</i> , <i>colmeric</i> , <i>tochigiensis</i> , etc.

は安定であり低温暗所では長期間活性を失うことはない。通常、Bt 剤は生菌剤と死菌剤に分けられる。

いづれも CPB が感受性虫に摂食され、腸管の消化液中で CPB は溶解された時、約 130 KDa のプ

ロトキシンと成り、消化液中のプロテアーゼにより活性 δ -内毒素、約 70 KDa 分子と成る (Fig. 1)⁸⁾。活性化殺虫蛋白質は感受性昆虫の中腸微絨毛に存在する δ -内毒素受容体に吸着し、1 価カチオン特異的に

Fig. 1. Illustration of the Domains of a typical Cry toxin *cry IA(a)*. The 130 kD protein was cleaved by proteases in insect digestive juice, resulting in the loss of the C-terminal structural fragment, and converted to an active toxin. The active fragment is formed from the remaining N-terminal half. This active fragment is thought to consist of at least two domains, the toxic and cell-binding domains. Six conserved sites (shaded) are found in the active fragment. The toxic domain contains hydrophobic regions, of which three have been identified. The variable region probably plays a role in receptor binding. The C-terminal half of the 130 kD toxin may be important for structural conformation.

Activation of δ -endotoxin and its histopathological action on the epithelium

Fig. 2. The major steps involved in the mode of action of *B. thuringiensis* crystal protein (δ -endotoxin) in lepidopteran larvae have been illustrated. After ingestion, the crystal proteins (protoxin protein) are dissolved by the alkaline gut juices in the midgut lumen, and are converted by gut proteases into toxic core fragments (active toxin). Thereafter, the midgut epithelial cells swell and eventually burst. The interaction of toxins with high affinity binding sites at microvilli in the brush border of midgut epithelial cells predominantly determines the specificity. Specific binding to midgut receptors is essential for the crystal protein to be toxic, the level of toxicity could be determined by the efficiency of the pore formation in the epithelial membrane. The formation of pores in the membrane results in an influx of ions accompanied by an influx of water. As a consequence, the cells swell and finally lyse.

イオン制御の変化を起こし、細胞中へ1価イオンを取り込み、細胞は膨張してついには虫を死に至らしめる (Fig. 2)。CryIA(c) の受容体としてアミノペプチダーゼ N と¹²⁾、CryIA(b) の受容体としてカドヘリン様タンパク質²⁵⁾が知られている。我々もカイコより CryIA(a) の受容体として3種類のカドヘリン様タンパク質を抽出している。さらにアルカリホスタファーゼも CryIA(c) の受容体であるとも報告されている¹⁸⁾。細胞受容体に結合した活性殺虫蛋白質は細胞膜脂質に入り込み6分子が集合して小孔を形成して、1価イオン選択的イオンチャネルを形成すると考えられている²⁾。

我々は精製 CPB をカイコ消化液プロテアーゼで処理した活性殺虫蛋白質を鱗翅昆虫イラクサギンウバ由来の培養細胞 TN-368 細胞に作用させると培地中の K^+ イオンを細胞中に取り込み細胞膨張を引き起こし、終には細胞破裂をひき起こすことを観察している⁶⁾。この細胞膨張は1価カチオン特異的であり2価カチオンや NH_4^+ イオンなどでは起こらない (Fig. 3)⁷⁾。通常、植物葉を食害する昆虫にお

いて、消化液は強いアルカリ性を示し、消化液中に多量の K^+ イオンを有しているため、CPB を葉と一緒に摂食すれば、中腸中で活性な ICP と成り、中腸円筒状細胞の微絨毛に作用し、細胞は消化液中の K^+ イオンを多量に取り込み、続いて受動的に水を取り込み細胞膨張を引き起こすと同時に、 K^+ leak channel を通して体液 (hemolymph) 中へ K^+ イオンを排出し、体液の pH 上昇をもたらす、ついには細胞破裂を引き起こして、死に至らしめるものと考えられる^{9,16)}。

4. 殺虫蛋白質遺伝子

1981年、Schnepf と Whiteley²⁰⁾ により殺虫蛋白質 δ -内毒素遺伝子が単離、クローニングされてより多くの新しい遺伝子の発見が報じられている。最近の Crickmore らのレビュー^{5,19)}で cry 遺伝子は132種が上げられている。また、殺ボウフラ活性を有する亜種イスラエレンシス株より cry 遺伝子とは異なる細胞溶血活性を有する cyt 遺伝子がクローニング

Fig. 3. Effect of various monocations or dications in isotonic sucrose solution. Time course of the cytolytic response to δ -endotoxin in 160 mM sucrose solution containing 20 mM shown monocation. The 140 mM sucrose solution containing 20 mM dication, only 180 mM isotonic sucrose solution or PBS. The cells were treated with 18 μ g/ml δ -endotoxin.

され²⁰⁾て前述レビューで6株が系統的に分類されている。一方, *cry* 遺伝子や *cyt* 遺伝子の相同性の研究を通して殺虫蛋白質の構造と活性との関係が明らかにされ Höfte と Whiteley⁸⁾ はいづれの株にも保存されている相同性の高い5部位 (Block 構造) を明らかにした。最近では Schnepf ら¹⁹⁾は殺虫活性を示す最小領域以外にも相同性の高い部位を示し8 Block 構造の存在を示している。Li ら¹¹⁾は Cry3A 蛋白質結晶の X 線構造解析から3次元構造モデルを提示し, ドメイン構造を示し, それらのドメインの役割も示唆した。ドメインIはイオンチャネルの形成に関与し, ドメインIIとドメインIIIが細胞受容体との結合に関与していると考えられている^{3,19,24)}。

5. 殺虫蛋白質の改良

Cry 蛋白質の特定部位に変異を導入することにより, ドメイン構造の機能解析と殺虫活性の増強を試

みた実験が行われた^{17,22)}。しかし, これらの実験の大部分はその活性の減少をもたらした。また, 種々のバクテリアに *cry* 遺伝子導入が行われている (Table 3)¹⁹⁾。なかでも *Pseudomonas fluorescens* 中に *cry* 遺伝子が導入され発現されたものの死菌剤が日本でも販売されている。この製剤は Bt 菌中でより安定で活性も増強されるとされている。

Bt 剤には耐性虫が出現しないと考えられていたが, 広領域で Bt 剤が使用されるようになってより, 特に *cry* 遺伝子導入植物の育種により耐性虫の出現が多く報じられている¹⁹⁾。その原因は感受性虫中腸細胞の Cry 蛋白質の細胞受容体への結合親和力の低下によるものと考えられている¹⁴⁾。当初, 予想されたよりもっと速く Bt 耐性虫の出現が問題となって¹⁵⁾, 今後の大きな課題である。

我々は複数の Cry 蛋白質により形成される CPB を用いれば耐性虫の出現が低下するものと考え, CryIA(a) と CryIVB とのハイブリッド蛋白質の作成を試みた。カイコ殺虫性の *cry* 1A(a) 遺伝子の活性発現領域を荷なうプラスミド pNR-2A と, ボウフラ殺虫活性遺伝子 *cry* IVB を荷なうプラスミド pUAH3-C3 (Fig. 4) より, 各々活性領域を切り出して連結し, プラスミド pG-2AC3 を作成し, 大腸菌に導入し (Fig. 5), 同菌を培養・発現させた大腸菌の溶解液より Cry 蛋白質粗画分を抽出してカイコとアカイエカ (ボウフラ) に摂食実験を行ったところ, 作成された pG-2AC3 由来のキメラ蛋白質画分はカイコとボウフラの両者に殺虫活性を有するが, CryIVB のみを有する pG-C3 はボウフラのみに, pNR-2A 由来の pG-2A (CryIA(a) 生産性) から生産される蛋白粗画分はカイコのみに活性を示した (Table 4)。この様に多種の *cry* 遺伝子を連結し同時に, 多種類の Cry 蛋白質を生産するキメラ蛋白質を用いることにより耐性虫の発生を阻止ないし, 遅らせることが可能と考えられる。

6. *cry* 遺伝子導入形質転換植物

Cry 蛋白質を散布するより, より直接的に, *cry* 遺伝子を植物に導入して, 殺虫性蛋白質を植物体内中に生産させ, 虫が植物を食害すればその虫が死に至る耐性植物の育種が盛んに行われている²¹⁾。現在, その様にして生産された植物の食品として, ダイズ, トウモロコシ, ばれいしょう, なたね等が輸入されている。この様な *cry* 遺伝子を導入した形質

Table 3. Microbial transformation with *cry* gene.

<i>cry</i> gene	Mediator	Target pest
<i>cry</i> IA(c) <i>kurstaki</i>	Xylem-inhibiting endosymbiotic bacterium, in maize <i>Clavibacter xyli</i>	Lepidopteran, European corn moth, <i>Ostrinia nubilis</i>
<i>cry</i> IA(c) <i>kurstaki</i>	Leaf-inhabiting bacterium, <i>Pseudomonas fluorescens</i> (dead)	Lepidopteran, European corn moth, <i>Ostrinia nubilis</i> , <i>Plutella maelipennis</i>
<i>cry</i> IIIA <i>san diego</i>	Leaf-inhabiting bacterium, <i>Pseudomonas fluorescens</i> (dead) <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Coleopteran, Colorado potato beetle, <i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<i>cry</i> IA <i>kurstaki</i>	Root-colonizing bacterium <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lepidopteran, soil-inhabiting pest, (Increased persistence)
<i>cry</i> IVB <i>morrisoni</i> PG-14	Root-colonizing bacterium <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dipteran, crane fly (Increased persistence)
<i>cry</i> IVD <i>israelensis</i>	Root nodule bacterium <i>Bradyrhizobium</i>	Dipteran, paracite in nodule, larvae of fly, <i>Rivellia</i> (Increased persistence)
<i>cry</i> IVB <i>israelensis</i>	Aquatic bacteria, Cyanobacterium <i>Agmenellum quadruplicatum</i> , <i>Caulobacter crescentus</i>	Dipteran, mosquitoes, (Increased persistence)
<i>cry</i> IVA <i>israelensis</i>	Cyanobacterium <i>Synechocystis</i> PCC6803	Dipteran, mosquitoes, (Increased persistence)
<i>cry</i> IV mixture <i>israelensis</i>	Protozoa <i>Tetrahymena pyriformis</i>	Dipteran, mosquitoes, (Increased persistence)
<i>cry</i> IIIB <i>tenebrionis</i>	Bacterium <i>B. t. israelensis</i>	Dipteran and coleopteran
<i>cry</i> IA(b) <i>aizawai</i>	Bacterium <i>B.t. tenebrionis</i>	Lepidopteran and coleopteran
<i>cry</i> IA(c) <i>aizawai</i>	Nuclear polyhedrosis virus, AcNPV	Lepidopteran, <i>Trichoplusia ni</i>
<i>cry</i> IA(c) <i>kurstaki</i>	Nuclear polyhedrosis virus, AcNPV	Lepidopteran, <i>Trichoplusia ni</i>

Deletion Mutants of *cryIA(a)*

Plasmid		Lepidopteran toxic
pES1	1 1176	+
pNR-2A	12 772	+
pNR-2H	12 564	-
pNR-2AC'	39 772	-

Deletion Mutants of *cryIVB*

		Dipteran toxic
pUAH3	2 1135	+
pUAH3-C3	2 820	+
pUAH3-C6	2 635	+
pUAH3-7	2 602	-
pUCX'2	613 1135	+
pUAH3-C3X	560 820	-

Fig. 4. Various deletion mutants of *cry* genes and their insecticidal activities. Plasmid pES1 is carrying the total *cry* IA(a) gene, and pUAH3 also carrying total *cry* IVB gene. The caterpillarcidal *Cry*IA(a) and mosquitocidal *Cry*IVB activities were determined by 5th instar silkworms and 3rd instar mosquito larvae, respectively. The numbers show the amino acid residues.

Construction of Hybrid Protein with *Cry*IA(a) and *Cry*IVB

Fig. 5. Construction of hybrid protein with the caterpillarcidal *Cry*IA(a) and mosquitocidal *Cry*IVB. The plasmid pG-2A is carrying total *cry* IA(a) gene isolated from pNR2A and T7-gene10 promoter. After the pG-2A and pG-C3 carrying *cry* IVB gene from pUAH3-C3 were treated by restriction enzymes *Sfi*I and *Bam* HI, the hybrid plasmid pG-2AC3 was constructed with *cry* IA(a) and *Cry*IVB. *B*, *H* and *Sf* show the recognition site of the restriction enzymes, *Bam* HI, *Hind*III and *Sfi*I. The numbers show its of the amino acid residues.

Table 4. Insecticidal activity of hybrid protein in *E. coli*.

Sample	<i>Bombyx mori</i> ^{a)}	<i>Culex pipiens</i> ^{b)}
	LD ₅₀ (ng/larvae)	% (dead/total larvae)
pG-2AC3 : Hybrid	213	44.0
pG-2A : CryIA(a)	640	2.5
pG-C3 : CryIVB	≥1,000 ^{c)}	37.5

a) The cell pellets were fed to ten fifth instar silkworm larvae.

b) The pellets (200 ng/ml) were suspended in 25 ml distilled water with twenty 3rd instar mosquito larvae.

c) No mortality

転換植物 (トランスジェニック植物) は30種以上も数えられる。通常, Bt 菌中で発現している原核生物タイプの *cry* 遺伝子は A+T-rich であり植物体中での発現効率が低い, そこで, 植物タイプの Codon 使用頻度に変換するなど, 又 poly(A) や ATTA 配列や転写終結シグナル等を添加することにより植物中での生産性の向上を計る試みがなされている^{13,19)}。又, 原核生物型の遺伝子のままで葉緑体 DNA の *rbcL* と *accDD* 間に *cry* 遺伝子を導入して, 葉緑体中で高生産させることにも成功を治めている¹⁰⁾。この様に葉緑体 DNA を用いての形質転換は細胞質遺伝であり, 花粉による無作為な *cry* 遺伝子の伝播が阻止されるものと考えられる¹⁰⁾。ICP は加熱によりその活性を失うため加工食品中には Cry 由来の殺虫活性は存在しないと考えられる。しかし *cry* 遺伝子導入植物を選抜育種するに際して, 通常, 抗生物質耐性や除草剤耐性をマーカーとして使用するため, *cry* 遺伝子導入後もそれらの耐性マーカーが残ってしまうので目的の遺伝子が導入された植物が育つと同時に耐性マーカー遺伝子が脱落してしまうベクターの開発が進められている。*cry* 遺伝子導入植物では化学殺虫剤の散布がないかわずかであるため, 天敵害虫にも安全な環境となり作物に好結果をもたらすと考えられている。

7. おわりに

微生物殺虫剤では耐性虫が発生しないと考えられていたが, 実は Bt 耐性虫の発生が化学農薬より遅いと云うだけではないかと考えられるように成ってきている。微生物殺虫剤のみで害虫問題が解決するわけではなく安全な化学農薬も併用していく必要があり, 併用に際してはどのような化学農薬と併用した

ら良いのかなどいろいろな問題が残っている。しかし, 根本的には微生物殺虫剤の種類が少なく, もっと多くの場面に対応できる微生物殺虫剤の開発が必要である。又, 微生物殺虫剤は安全であるとはいえ, 大量に野外に特定の微生物を散布するわけで, 直接, 間接にどのような変化を環境にもたらすか, 今後も長く観察と研究が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Boucias, D.G. and J.C. Pendland, Exoenzyme and exotoxins of *Bacillus thuringiensis*, in "Principles of insect pathology", Kluwer Academic Publishers, 1998, pp.221-222.
- 2) Boucias, D.G. and J.C. Pendland, Endotoxin-induced pore formation, in "Principles of insect pathology", Kluwer Academic Publishers, 1998, pp.239-241.
- 3) Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. J. Bacteriol. 179: 2793-27801.
- 4) Cannon, R.J.C., *Bacillus thuringiensis* in pest Control, in "Biological Control: Benefits and Risks," Plant and Microbial Biotechnology Research Series. vol.4, eds. by H.M. Hokkanen and J.M. Lynch. Cambridge Univ. Press, 1995, pp.190-200.
- 5) Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 807-813.
- 6) Himeno, M., N. Koyama, T. Funato and T. Komano. 1985. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin on insect cells *in vitro*. Agric. Biol. Chem. 49: 1461-1468.
- 7) 姫野道夫. 1992. 微生物殺虫剤の開発. ケミカルエンジニアリング, 37: 35-41.
- 8) Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- 9) 飯塚敏彦. *Bacillus thuringiensis* の昆虫への病原機作, "微生物と環境の相互作用: 環境微生物と病原微生物の接点," 天野富美夫編, 学会出版センター, 1999, pp.112-126.
- 10) Kota, M., H. Daniell, S. Varma, S.F. Garczynshi, F. Gould and W.J. Moar. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 1840-1845.
- 11) Li, J.D., J. Carroll and D.J. Ellar. 1991. Crystal

- structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**: 815–821.
- 12) Masson, L., Y.J. Lu, A. Mazza, R. Brousseau and M.J. Adang. 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* **270**: 20309–20315.
 - 13) McBride, K.E., Z. Svab, D.J. Schaaf, P.S. Hogan, D.M. Stalker and P. Maliga. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology* **13**: 362–365.
 - 14) Mohammed, S.I., D.E. Johnson and A.I. Aronson. 1996. Altered binding of the CryIAc toxin to larval membranes but not to the toxin-binding protein in *Plodia interpunctella* selected for resistance to different *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4168–4173.
 - 15) Müller-Cohn, J., J. Chaufaux, C. Buisson, N. Gilois, V. Sanchis and D. Lereclus. 1996. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to CryIC and cross-resistance to often *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *J. Econ. Entomol.* **89**: 791–797.
 - 16) Nishiitsutsuji-Uwo, J. and Y. Endo. 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Relative roles of spores and crystals in toxicity to *Pieris*, *Lymantria* and *Ephestia* larvae. *Appl. Ent. Zool.* **15**: 416–424.
 - 17) Rajamohan, F., J.A. Cottrill, F. Gould and D.H. Dean. 1996. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **271**: 2390–2396.
 - 18) Sangadala, S., F.S. Walters, L.H. English and M.J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**: 10088–10092.
 - 19) Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 775–806.
 - 20) Schnepf, H.E. and H.R. Whiteley. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 2893–2897.
 - 21) Schuler, T.H., G.M. Poppy, B.R. Kerry and I. Denholm. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH.* **16**: 168–175.
 - 22) Smedley D.P. and D.J. Ellar. 1996. Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* **142**: 1617–1624.
 - 23) Tanada, Y., Microbial Control, in “Insect Pathology”, eds. by Y. Tanada and H.K. Kaya, Academic Press, 1993, pp.554–594.
 - 24) Thompson, M.A., H.E. Schnepf and J.S. Feitelson, Structure, function and engineering of *Bacillus thuringiensis* toxins, in “Genetic Engineering: Principles and methods, vol.17”, ed. by J.K. Setlow Plenum Press, New York, 1995, pp.99–117.
 - 25) Vadlamudi, R.K., T.H. Ji and L.A. Bulla, Jr. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berlineri*. *J. Biol. Chem.* **268**: 12334–12340.
 - 26) Waalwijk C, A.M. Dulleman, M.E. van Workum and B. Visser. 1985. Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28,000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucleic Acids Res.* **13**: 8207–8217.
 - 27) Zeigler, D.R., *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, in “*Bacillus* genetic stock center catalog of strains, 7th ed, vol.2,” *Bacillus* genetic Stock center. The Ohio State Univ., 1999, pp.17–18.