***B. thuringiensis* の殺虫活性と分子育種†**

清水 将年, 大川 秀郎

(住友化学工業株式会社 生命工学研究所)

1. はじめに

Bacillus thuringiensis (Bt と略記する) は, グラム陽性の土壌細菌で, 孢子形成期に δ -内毒素と呼ばれる結晶性蛋白を産生する. この蛋白を鱗翅目幼虫などが食下すると, 摂食を停止し, やがて脱水症状等を呈して死亡する. 培養した Bt 菌を製剤にしたものは BT 剤と呼ばれ, 農作物や森林の鱗翅目害虫, あるいは, 蚊の防除に使用されている. BT 剤は標的害虫に特異的に殺虫活性を示し, 人や環境に対する害作用が少ないなどの特徴を有する. しかし, 反面, 殺虫スペクトラムが狭い, 効力の持続性が劣るなどの欠点も指摘されている. Bt 菌には鱗翅目, 鞘翅目あるいは双翅目などに殺虫効力を示すものが知られているが, 本稿では, 鱗翅目に活性を示す Bt 菌に関する遺伝子工学的研究の最近の成果を概説する.

2. 殺虫蛋白遺伝子およびその発現

鱗翅目幼虫に殺虫活性を示す菌株には, *kurstaki*, *aizawai*, *berliner* 等がある. これらの菌株は 130 kDa~140 kDa の殺虫蛋白を産生し, それらの殺虫蛋白遺伝子はプラスミド, もしくは, 染色体に存在する.すでに種類の菌株から多くの殺虫蛋白遺伝子がクローニングされ, それらの塩基配列が決定され, 遺伝子構造, 殺虫蛋白の一次構造が明らかになった. その結果, 多くの菌株は1種, または, 複数の異なる遺伝子を保有すること, 異なる亜種にたがいに構造のよく似た遺伝子が存在することなどが判明した⁽¹⁾.

Bt 菌における殺虫蛋白の合成は孢子形成期に始まり, 7~8時間のうちに結晶形成が完了する⁽²⁾. Rothnie ら⁽³⁾は, *kurstaki* HD-1 4449 株の *kurhdd*, *kurhd 1* およ

び *kurhd 73* の3つの殺虫蛋白遺伝子に関して, プロモーター領域の解析を行った. その結果, 発現レベルの低い *kurhdd* は開始コドン ATG の上流-319 がAであるのに対し, 発現レベルの高い *kurhd 1* および *kurhd 73* はGであり, わずか1塩基の置換で発現に大きな相異のあることが判明した. Shivakumar ら⁽⁴⁾は, *kurstaki* HD-1 Dipel 株から 135 kDa 殺虫蛋白の遺伝子をクローニングし, それを枯草菌に発現させた. 形質転換体は Bt 菌と同様の結晶蛋白を産生したが, 殺虫蛋白遺伝子は構造的に発現し, しかも, 蛋白産生量は少なかった. 一方, Calogero ら⁽⁵⁾は, 枯草菌の染色体に2~3コピーの *kurstaki* HD-73 株の殺虫蛋白遺伝子を挿入した. この場合, 殺虫蛋白は孢子形成期にのみ産生され, したがって, 殺虫蛋白遺伝子のコピー数が少ない場合には枯草菌においても発現が制御されることが示唆された.

Oeda ら⁽⁶⁾および Shimizu ら⁽⁷⁾は, *aizawai* IPL 7 株の 130 kDa と 135 kDa の2種の殺虫蛋白遺伝子をクローニングし, それらの大腸菌での発現を試みた. クローニングした殺虫蛋白遺伝子上流に強力な *tac* プロモーターを, 下流に *rrnB* 遺伝子のターミネーターを接続した発現プラスミドを構築し, それらで形質転換した大腸菌 JM 103 株は, 130 kDa および 135 kDa の蛋白を生産した. これらの蛋白は大腸菌内で安定であり, 封入体を形成し, 産生量は菌体総蛋白の約 30~40% に達した. また, 大腸菌組み換え体の培養条件を至適化すると, Bt 菌と同様な重ヒラミッド型の結晶を形成した⁽⁸⁾ (図1). 大腸菌で生産した蛋白の封入体や結晶は, コナガ, ハスモンヨトウに対して *aizawai* IPL 7 株の相当する蛋白と同等の殺虫活性を示した. 大腸菌に異種遺伝子を高発現させると, 多くの場合, 産生蛋白は封入体を形成し, 生理的に不活性になる. それに対し, Bt 殺虫蛋白遺伝子大腸菌に発現した場合は, Bt 菌と同様の殺虫活性を示す結晶蛋白を産生するなどきわめて特徴的である.

† Insecticidal Activity and Molecular Breeding of *Bacillus thuringiensis*.

Masatoshi SHIMIZU and Hideo OHKAWA (Biotechnology Laboratory, Takarazuka Research Center Sumitomo Chemical Co., Ltd., Takarazuka, Hyogo 665)

図 1 *B. thuringiensis aizawai* IPL 7 株およびその 130 kDa 蛋白を産生した大腸菌組み換え体 JM 103/pTB 1 株の電子顕微鏡写真
A, *aizawai* IPL 7 株; B, 大腸菌組み換え体 JM 103/pTB 1 株 (130 kDa 蛋白産生株).

3. 殺虫蛋白の分子改変

鱗翅目幼虫に対して殺虫活性を示す 130 kDa~140 kDa の各種殺虫蛋白の一次構造を比較すると、たがい約 70% 以上の類似性が認められ、また、アミノ酸配列に変異の認められる領域は、比較的限定されている(図 2)⁽⁹⁾。

130 kDa~140 kDa の殺虫蛋白は、鱗翅目幼虫に摂取されると中腸消化液のプロテアーゼで消化されて約 60 kDa の活性フラグメントを生成し、それが腸管のリセプターと結合することによって生理作用を発現する。Höfte ら⁽¹⁰⁾は、*berliner* 1715 株の殺虫蛋白をトリプシンで消化し、生成した 60 kDa 蛋白を精製して、N 末端部分のアミノ酸配列を決定した。その結果、活性フラグメントは N 末端 29 番目のロイシン残基から始まる約 60 kDa のフラグメントであることが判明した。また、彼ら⁽¹⁰⁾は、*berliner* 1715 株の 130 kDa 殺虫蛋白遺伝子に種々の欠失を導入した遺伝子で大腸菌で発現させ、産生した蛋白の殺虫活性を測定することにより、殺虫活性に必須の領域を推定した。この領域は N 末端から 29 番目のロイシン、あるいは、35 番目のプロリンから始まり C 末端が 599 番目のイソロイシン、あるいは、607 番目のアラニンで終ることが判明した。

Nakamura ら⁽¹¹⁾は、*aizawai* IPL 7 株の 130 kDa 蛋

白がコナガに対して強い活性を示すのに対して、135 kDa 蛋白は弱い活性しか示さず、しかも、両蛋白のアミノ酸配列は 90% の相同性を示すことから、両蛋白遺伝子を組み換えて各種のキメラ遺伝子を作製し、それらが大腸菌に発現させた。産生キメラ蛋白のコナガに対する殺虫活性をテストした結果、N 末端の 333 番目から始まり 456 番目で終る領域が、コナガに対する殺虫活性に重要であることを示した。また、Ge ら⁽¹²⁾は *kurstaki* HD-1 株と *kurstaki* HD-244 株の殺虫蛋白遺伝子を組み換えたキメラ遺伝子を作製し、それらが大腸菌に発現させた。産生キメラ蛋白のカイコに対する殺虫活性を調べた結果、殺虫蛋白のカイコに特異的なドメインは、N 末端の 332 番目から始まり 450 番目で終る領域にあることを示した。これらの結果は、殺虫活性に重要な領域が、約 60 kDa の活性フラグメント内のアミノ酸変異が高頻度で見られる領域にあることを示唆している。

西岡ら⁽¹³⁾は、*aizawai* IPL 7 株の 130 kDa 殺虫蛋白のプロテアーゼ認識部位と予想されるアルギニン残基およびリジン残基を、グルタミン残基に改変した各種変異遺伝子を作製し、それらが大腸菌で発現させた。産生変異蛋白のハスモンヨトウに対する殺虫活性と、消化液による活性フラグメントの生成を調べた結果(図 3)、N 末端から 368 番目までにあるアルギニン残基をグルタ

図 2 鱗翅目幼虫に殺虫活性を示す各種 Bt 殺虫蛋白の一次構造の比較
白箱は殺虫蛋白の構造を示し、切断箇所は欠失を示す。aizawai IPL7 株の
130 kDa 蛋白のアミノ酸配列を基準にして、それと異なるアミノ酸残基を縦
線で示した。数字は N 末端からのアミノ酸残基数を示す。

ミン残基に変えた変異蛋白はいずれも殺虫活性が低下し、また、殺虫蛋白で保存されている領域の変異はほとんど活性が低下した。最も活性低下の著しかったのは 601 番目のアルギニン残基をグルタミン残基に変異した蛋白で、殺虫活性、および、60 kDa の活性フラグメントの生成は共に認められなかった。一方、活性フラグメントの外側にある 619 番目のアルギニン残基をグルタミンに変異した蛋白では、野生型蛋白と比較してわずかながら活性が上昇した。この変異蛋白は、野生型と比較して、昆虫消化液による活性フラグメントの生成が速やかで、そのことが活性の上昇と関連していると思われる。これらの結果は、殺虫蛋白遺伝子を人工的に改変することによって、殺虫活性、安定性などの向上した、もしくは、構造を単純化した新規殺虫蛋白を創製できる可能性を示している。

4. Bt 菌の形質転換

Bt 菌の形質転換法としてはプロトプラスト/ポリエチレングリコール法が知られており、形質転換の効率は最も良い場合で約 $2 \times 10^5/\mu\text{g}$ DNA 程度であった⁽¹⁴⁾。最近、Schurter ら⁽¹⁵⁾ はエレクトロポレーションにより、殺虫蛋白非産生である *kurstaki* HD-1 cryB (cry) 株を約 $1 \times 10^7/\mu\text{gDNA}$ の効率で形質転換した。この方法により *kurstaki* HD-1 株の殺虫蛋白遺伝子を導入した *kurstaki* HD-1 cryB (cry) 株は殺虫蛋白を産生し、この蛋白は *Heliothis virescens* に殺虫活性を示した。この結果は、Bt 菌株を分子改良できる可能性を示している。

5. おわりに

各種 Bt 菌の殺虫蛋白および遺伝子に関する研究が急速に進展し、殺虫蛋白の構造と活性の関係や遺伝子の構造、発現制御機構などが明らかになった。さらに、遺伝子工学的、あるいは蛋白工学的に殺虫蛋白、Bt 菌を分子

図3 *B. thuringiensis aizawai* IPL7 株の 130 kDa 殺虫蛋白の改変
 かこみは推定される殺虫活性フラグメントを示す。下線部は、これまでにク
 ローン化された鱗翅目、鞘翅目および双翅目幼虫に殺虫活性を示す各種殺虫
 蛋白で保存されている領域を示す。○は、アルギニン残基あるいはリジン残
 基をグルタミン残基に改変した箇所を示す。各変異蛋白のハスモンヨトウに
 対する殺虫活性を測定し、活性を ↗, 上昇; ↘, 低下; →, 野生型と同等
 で示した。

改良することが可能になってきた。一方, Bt 殺虫蛋白遺
 伝子を作物の根面に着生する *Pseudomonas fluorescens*
 などに導入し, 作出した殺虫蛋白産生菌株を根面に着生
 させることによって, 根を食害する害虫を防除すること
 が試みられた⁽¹⁶⁾。さらに, タバコ⁽¹⁷⁾やトマト⁽¹⁸⁾などに
 殺虫蛋白遺伝子を導入することによって耐虫性の品種が
 作出された。このように, Bt 殺虫蛋白や Bt 菌に関する
 遺伝子工学的, および, 蛋白工学的研究は作物保護の新
 しい方向を開拓するのに大きく寄与している。

- (1) A. I. Aronson, W. Beckman and P. Dunn : *Microbiol. Rev.*, **50**, 1 (1986).
- (2) D. B. Bechtel and L. A. Bulla, Jr. : *J. Bacteriol.*, **127**, 1472 (1976).
- (3) H. Rothnie : *Bacillus conference* (1989).
- (4) A. G. Shivakumar, G. J. Gundling, T. A. Benson, D. Casuto, M. F. Miller and B. B. Spear : *J. Bacteriol.*, **166**, 194 (1986).

- (5) S. Calogero, A. M. Albertini, C. Fogher, R. Marzari and A. Galizzi : *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 446 (1989).
- (6) K. Oeda, K. Oshie, M. Shimizu, K. Nakamura, H. Yamamoto, I. Nakayama and H. Ohkawa : *Gene*, **53**, 113 (1987).
- (7) M. Shimizu, K. Oshie, K. Nakamura, Y. Takada, K. Oeda and H. Ohkawa : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1565 (1988).
- (8) K. Oeda, K. Inoue, Y. Ibuchi, K. Oshie, M. Shimizu, K. Nakamura, R. Nishioka, Y. Takada and H. Ohkawa : *J. Bacteriol.*, **171**, 3568 (1989).
- (9) H. Höfte and H. R. Whiteley : *Microbiol. Rev.*, **53**, 242 (1989).
- (10) H. Höfte, H. de Greve, J. Seurinck, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Vandeckerckhove, H. Vanderbruggen, M. van Montagu, M. Zabeau and M. Vaeck : *Eur. J. Biochem.*, **161**, 273 (1986).

- (11) K. Nakamura, K. Oshie, M. Shimizu, Y. Takada, K. Oeda and H. Ohkawa : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 715 (1990).
- (12) A. Z. Ge, N. I. Shivarova and D. H. Dean : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 4037 (1989).
- (13) 西岡里佳, 押柄和幸, 清水将年, 中村啓子, 三木谷研一, 大江田憲治, 大川秀郎 : 日本農芸化学会 1989 年度大会要旨集, 1989, p. 706.
- (14) D. Shall : Ph. D Thesis, Universität Tübingen, (1986).
- (15) W. Schurter, M. Geiser and D. Mathé : *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 177 (1989).
- (16) M. G. Obukowicz, F. J. Perlak, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer and L. S. Watrud : *Gene*, **45**, 327 (1986).
- (17) M. Vaeck, A. Reynaerts, H. Höfte, S. Janssens, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. van Montagu and J. Leemans : *Nature*, **328**, 33 (1987).
- (18) D. A. Fischhoff, K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McCormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers and R. T. Fraley : *Bio/Technology*, **5**, 807 (1987).
- (19) H. Wabiko, K. C. Raymond and L. A. Bulla, Jr. : *DNA*, **5**, 305 (1986).
- (20) M. A. Hefford, R. Brousseau, G. Préfontaine, Z. Hanna, J. A. Condie and P. C. K. Lau : *J. Biotechnol.*, **6**, 307 (1987).
- (21) S. Kondo, N. Tamura, A. Kunitate, M. Hattori, A. Akashi and I. Ohmori : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 455 (1987).
- (22) H. E. Schnepf, H. C. Wong and H. R. Whiteley : *J. Biol. Chem.*, **260**, 6264 (1985).
- (23) Y. Shibano, A. Yamagata, N. Nakamura, T. Iizuka, H. Sugisaki and M. Takanami : *Gene*, **34**, 243 (1985).
- (24) M. J. Adang, M. J. Staver, T. A. Rocheleau, J. Leighton, R. F. Barker and D. V. Thompson : *Gene*, **36**, 289 (1985).
- (25) G. Honée, T. van der Salm and B. Visser : *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6240 (1988).