***B. thuringiensis* の生産する殺虫性毒素の昆虫特異性**

山 本 敬 司

(Sandoz Crop Protection)

1. 結晶タンパク質の種類

BT 結晶タンパク質の遺伝子は結晶 (crystal) を作る能力にちなみ「cry」と呼ばれ、それらの昆虫特異性によって4つの型に分類されている⁽¹⁾。I型遺伝子 (cry I) はほとんどすべての菌株に見られ、そのタンパク質は約 130 kDa で、主として鱗翅目に活性がある。この型は塩基配列と殺虫活性の違いによってAからD型まで分化されている。II型 (cry II) は限られた菌株に見られ、鱗翅目と双翅目両方に活性を持つ約 70 kDa のタンパク質を発現する。III型 (cry III) は *tenebrionis* 亜種より分離され、その約 70 kDa のタンパク質は鞘翅目に活性がある。IV型には双翅目に活性のある菌株から分離された遺伝子群が属している。

2. 結晶タンパク質の活性化

試験管内で BT 結晶をアルカリ処理すると、I型の場合は約 130 kDa のタンパク質が遊離される⁽²⁾。人為的にアルカリ遊離された結晶タンパク質は、消化器系を経由しない、すなわち昆虫体腔内への直接注入や人工培養された昆虫細胞に対しての、活性検定では活性を示さない。したがって結晶タンパク質は毒素前駆体 (プロトキシン) と呼ばれている。しかしながら中腸消化液で溶解された結晶タンパク質を、同様に非消化系 (昆虫体腔内注入) による活性検定によって調べてみると、すでに活性化された毒素 (トキシン) であることが古くより知られている⁽³⁾。そこで試験管内でアルカリ溶解された結晶タンパク質 (毒素前駆体) を人為的にトリプシンで活性化すると、タンパク質分子はそのC末端側ほぼ半分が低分子ペプチドにまで分解されるが、残り半分のN末端側は初めの 28 アミノ酸残基を除きそのまま分解を受ける

ことがない⁽⁴⁾。

II, III型の遺伝子はそれら自身I型タンパク質のN末端側半分に相当するタンパク質しかコードしておらず⁽⁵⁾、I型の場合必要なタンパク質分解酵素による活性化がこれらの型にも必要かどうかはよくわかっていない。結晶より遊離された 65 kDa のII型タンパク質は数千 Da のN末端をタンパク質分解酵素によって失うにすぎないが⁽⁶⁾、III型は約 17 kDa に相等するN末端を失っても活性を保持している⁽⁷⁾。

実際に昆虫中腸内では消化液の pH はそれほど高くなく、とくにI型の場合、結晶の溶解はアルカリだけでは起こり難い。おそらく消化液のアルカリによって構造の緩んだ結晶が、消化液中のタンパク質分解酵素による部分的分解で、溶解化されるものと考えられている。

3. 分子レベルの作用機構

昆虫中腸内で活性化された結晶タンパク質 (毒素) は、比較的短時間のうちに、中腸上皮細胞を膨張させ、ついに破壊、脱落せしめるのが電子顕微鏡で観察されている。

分子レベルでの作用機構としては、Harvey 等⁽⁸⁾や Himeno 等⁽⁹⁾が見るように、毒素は細胞膜のイオン輸送機構に働き、結果としてカリウムイオンの体液中への蓄積がなされるとしている。他方、ケンブリッジ大学の一派は、BT 毒素は蜜蜂の毒素 (mellitin) のように独自に細胞膜に取り込まれ、0.5~1 nm の半径を持つ細孔を形成する、と提唱している⁽¹⁰⁾。これらの細孔は水等の低分子に対する細胞膜の透過性を増大せしめ、結果として細胞は膨張し、破壊されるに至る。

4. リセプター

BT 毒素 (活性化された結晶タンパク質) の昆虫特異性は昆虫中腸の上皮細胞の表面に存在するリセプターに因らしい。スイスおよびベルギーの一派は^(11,12)、2つの違った昆虫特異性を持つI型毒素の上皮細胞への結合はそれぞれ特異性と一致する、すなわち活性のない昆虫

† Insect Specificity of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxins.

Takashi YAMAMOTO (Sandoz Crop Protection, 975 California Avenue, Palo Alto, CA 94304, USA)

図 1 BT 結晶タンパク質アミノ酸配列の比較

アミノ酸配列の比較は、ウィスコンシン大学によって VAX コンピューター用に発表された GCG プログラム⁽¹⁸⁾のうち、Compare/Dotplot を使ってなされた。黒点（ドット、つながると線になる）は縦、横軸に示されるタンパク質のアミノ酸配列の一致を示している。これら比較では Window=10, Stringency=8 を使用した。言い換えると、10 アミノ酸残基のうち 8 残基が一致する（厳密には個々のアミノ酸比較における類似性得点、たとえば Val-Leu=0.8, の合計が 8 を越える）と 1 ドットを与える。アウトプットはそれぞれマッキントッシュ SE/30 で受け、縦軸に CryIA(a), 横軸に他のタンパク質を並べた。

の細胞には BT 毒素は結合しない、と報告している。

一方、ケンブリッジ派は古くからレクチン様の活性を BT 毒素で見えており、殺虫活性は *N*-アセチルガラクトサミンで阻害されるとしている⁽¹³⁾。さらに、彼らは BT 毒素と結合する 146 kDa の昆虫細胞膜タンパク質をウェスタンブロットのような手法で同定している⁽¹⁴⁾。これらの報告はレセプターの存在を支持しているが、われわれは *N*-アセチルガラクトサミンの BT 活性阻害を追認することができず、さらにベルギーのグループは BT 毒素と昆虫細胞膜との結合は *N*-アセチルガラクトサミンで阻害されないと言っており⁽¹²⁾、この糖質の役割は今後の確認が必要であろう。

最近、BT 殺虫剤に対して抵抗性を持った昆虫の報告がなされている⁽¹⁵⁾。もし毒素に特異的なレセプターが失われることによって昆虫が抵抗性を得たのなら、レセプターは昆虫の生存に不可欠とは言えないであろう。

5. I 型 (cry I) 結晶タンパク質の昆虫特異性

レセプターを認識する領域を毒素分子上限定する研究も近年成果をあげている。ここで今まで分離され、塩基配列（すなわちアミノ酸配列）が決められている幾つか

の結晶タンパク質を比較してみれば、図 1 に示すようにアミノ酸配列の変異が多く見られる領域が認められる。この領域は可変域と呼ばれ、おおよそ 300 から 600 番目のアミノ酸残基にまたがっている。この可変域の一部を IA (a) と IA (c) 型遺伝子間に取り替えた実験によれば、(a) 型に特異な家蚕の活性が (c) 型に移ることが認められた⁽¹⁶⁾。この実験は可変域が昆虫特異性を決定する、すなわちレセプターに結合する、領域であることを示している。さらに IA (a) 型毒素の活性中心を見てみれば、活性化された毒素は 66 kDa で、29 番目から 618 または 621 番目のアミノ酸残基でできていることがわかっている^(4,17)。これは 133 kDa の結晶タンパク質（毒素前駆体）をトリプシンで人為的に活性化したものであるが、この活性化中に約 68 kDa の活性を持たない中間体が見られた。68 kDa の中間体は結晶タンパク質が 636 番目の Lys 残基で切断されたものと考えられているが、これらトリプシンによる切断部位をコンピューターをつかって構造解析したところ図 2 のようになった。図 2 に示すように、結晶タンパク質は 622 から 636 番目までのペプチド鎖がトリプシンによって切断され初め

図2 トリプシンによる Cry IA(a) 結晶タンパク質の活性化

活性化に必要なトリプシン切断点, 621 および 636 アミノ酸残基, はC末端側領域 (637-1176) によって覆われており, トリプシンの接近が妨げられている (図, 左). 結晶タンパク質はトリプシンによってN末端側が 28 Arg で切断され, 同時にC末端側が順次切断される. やがて 636Lys が露出, 切断されタンパク質分子は 68 kDa の中間体となる (図, 中央). この中間体は活性を持っておらず, 最後に約 2kDa のペプチド鎖, 622-636, がトリプシンによって除去され, 初めてタンパク質は活性化される (図, 右). 構造の推定は VAX コンピューターを使用し Chou, & Fasman⁽¹⁰⁾ の方法によってなされた.

て殺虫活性を持つことより, これらのアミノ酸残基によって覆われているレセプター認識領域が露出することが活性に必要であることを示している.

レセプターに結合した毒素はイオン輸送機構に働くのか, また独自に細孔を細胞膜に形成するのか, 現時点では定かでないが, いずれにせよ細胞膜透過性を変換する. 図1に示すように, 毒素は 29 から 300 番目のアミノ酸残基で構成される領域のアミノ酸配列を比較的一定に保っており, この領域が細胞膜透過性を変換する活性に関与していると思われる.

6. II, III 型 (cry II, III) 結晶タンパク質の昆虫特異性

II, III 型結晶タンパク質は I 型の約半分の大きさを持つ. これらのタンパク質はアミノ酸配列の比較で見れば (図 1), II 型は IA (a) と大きく異なっているが, III 型では比較的良好な類似性が認められる. さらに, 二次構造を比較すれば II, III 型とも I 型とよく似通っており, I 型と進化上何らかの関連があるものと思われる. これらの型もそれぞれの昆虫のレセプターを認識す

る領域と, 細胞の透過性を変える領域を分子中に持っているとしたら, IIA 型の約 150 から 200 番目のアミノ酸配列 (図1矢印) が他の型と類似していることより, おそらくこの領域が活性に, とくに細胞膜透過性変換に, 不可欠なものと考えられる.

II, III 型は I 型に比べ分子レベルでの研究があまりなされておらず, 昆虫特異性を理解するうえで今後一層の研究が必要である.

- (1) H. Höfte and H. Whiteley : *Microbial. Rev.*, **53**, 242 (1989).
- (2) H. E. Hüber, P. Lüthy, H.-R. Ebersold and J. L. Cordier : *Arch. Microbiol.*, **129**, 14 (1981).
- (3) T. A. Angus : *Can. J. Microbiol.*, **2**, 416 (1956).
- (4) T. Yamamoto, A. Ehmann, J. M. González, Jr. and B. C. Carlton : *Curr. Microbiol.*, **17**, 5 (1988).
- (5) W. P. Donovan, C. C. Dankocsik, M. P. Gilbert, M. C. Gawron-Burke, R. G. Groat and B. C. Carlton : *J. Biol. Chem.*, **263**, 561 (1988).

- (6) T. Yamamoto and T. Iizuka: *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**, 233 (1983).
- (7) J. Carroll, J. Li and D. J. Ellar: *Biochem. J.*, **261**, 99 (1989).
- (8) W. R. Harvey, M. Cioffi, J. A. T. Dow and M. G. Wolfersberger: *J. Exp. Biol.*, **106**, 91 (1983).
- (9) M. Himeno, N. Koyama, T. Futano and T. Komano: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1461 (1985).
- (10) B. H. Knowles and D. J. Ellar: *Biochem. Biophys. Acta*, **924**, 509 (1987).
- (11) C. Hofmann, P. Lüthy, R. Hütter and V. Pliska: *Eur. J. Biochem.*, **173**, 85 (1988).
- (12) C. Hofmann, H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens and H. Van Mel-laert: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 7844 (1988).
- (13) B. H. Knowles, W. E. Thomas and D. J. Ellar: *FEBS Lett.*, **168**, 197 (1984).
- (14) B. H. Knowles and D. J. Ellar: *J. Cell. Sci.*, **83**, 89 (1986).
- (15) W. H. McGaughey: *Science*, **299**, 193 (1985).
- (16) A. Z. Ge, N. I. Shivarova and D. H. Dean: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **86**, 4037 (1989).
- (17) T. Yamamoto: "The Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*," ed. by L. Hickie and B. Fitch, ACS Books, 1990.
- (18) J. Devereux, P. Haerberli and O. Smithies: *Nucl. Acids Res.*, **12**, 387 (1984).
- (19) P. Y. Chou and G. D. Fasman: *Adv. Enzymol.*, **47**, 45 (1978).