Bacillus thuringiensis が産生する特異的細胞損傷タンパク質

岡山大学工学部生物機能工学科

酒井 裕 Hiroshi SAKAI

山際 雅詩 Masashi YAMAGIWA

Key words: *Bacillus thuringiensis*; crystal protein; Cry 4A; insecticidal protein; cytotoxic protein

はじめに

グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* (Bt) はカイコ卒倒病の病原菌として 1901 年に日本の石渡によって世界で最初に発見され、後に別の亜種を発見したドイツの Berliner によって *Bacillus thuringiensis* と命名された。Bt は孢子形成時にクリスタルと呼ばれるタンパク質封入体を形成する。クリスタルには、特異的殺虫活性、特異的ガン細胞破壊活性またはレクチン活性を示すタンパク質が含まれている場合がある。これらは、クリスタルタンパク質、Cry タンパク質、 δ -内毒素あるいは δ -エンドトキシンなどとも呼ばれる。また殺虫活性をもつ場合には ICP (insecticidal crystal protein) と呼ばれることもある。

Bt には多くの亜種があり、それらが産生するクリスタルタンパク質の種類は 100 種類をはるかに超える。Cry 殺虫タンパク質は特異的で強い殺虫活性を有する。例えば、Cry1Aa は鱗翅目昆虫（ガ、チョウなど）の、Cry3Aa は鞘翅目昆虫（コガネムシなど）の、また Cry4Aa および Cry11Aa は双翅目昆虫（カ、ブヨなど）の幼虫に対して、それぞれ特異的殺虫活性を示す。なお、Cry2Aa は鱗翅目および双翅目昆虫の双方に殺虫活性を示す（図 1）。これらは環境および人体に蓄積する危険性が著しく低いため、環境に優しく安全性の高い害虫防除剤として欧米を中心に 30 年あまりにわたって害虫の防除に用いられてきた。

B. thuringiensis が産生する Cry 殺虫タンパク質

Bt の Cry 殺虫タンパク質は、そのサイズから 130 kDa タイプと 70 kDa タイプの二つに分けられる（図 1）¹⁾。Cry 1Aa と Cry4Aa は前者に、Cry2Aa、Cry3Aa、および Cry11Aa は後者に属する。これらは前駆体（プロトキシン）であり、その内部に約 600 アミノ酸残基からなる殺虫活性決定領域を含む²⁾。活性型分子は殺虫活性決定領域からなり、ドメイン I、II、および III を含んでいる。X 線結晶構造解析

により明らかにされた Cry1Aa、Cry2Aa、および Cry3Aa の三次元構造によると^{3)~5)}、ドメイン I は七つの α -ヘリックスの束から構成されている。ドメイン II は β -シートからなるプリズム状構造を、またドメイン III は β -サンドイッチ構造をとっている。各ドメインの機能的役割の全体像はいまだ明らかではないが、Cry1 殺虫タンパク質群の研究によれば、ドメイン I は標的細胞膜への小孔形成に、ドメイン II は受容体（標的細胞膜上の特異的結合タンパク質）の認識・結合に、またドメイン III は分子の構造安定化と受容体の認識・結合に、それぞれ関与していると考えられる^{6), 7)}。また殺虫活性決定領域にはアミノ酸配列高度保存領域が 5 カ所存在している。すなわちブロック 1, 2, 3, 4, および 5 である。さらに 130 kDa タイプの場合は、殺虫活性決定領域の外側（C 末端側）にブロック 6, 7, および 8 が認められる。また、分子全体の三次元構造も相互によく類似している。これらの事実から Cry 殺虫タンパク質は共通の祖先から進化して類似性の高い基本構造を保ちつつ、微細な部分構造の変化によって現在のような機能的多様性を備えた集団に至ったことが推測される⁸⁾。

Cry 殺虫タンパク質の作用過程は、およそ次のように進行すると考えられている（図 2）。Bt の菌体あるいはクリスタルが植物の葉などの餌とともに昆虫の幼虫に摂食され

図 1 Cry 殺虫タンパク質の構造模式図

■はブロックを示す。ただし、□はアミノ配列の保存性が低いことを示す。

ると、中腸に達し、そのアルカリ性条件下で可溶化される。さらに、Cry 殺虫タンパク質は消化液中のプロテアーゼによるプロセッシングを受け、殺虫活性決定領域以外の部分が分解除去されて活性型分子を生成する。この活性型分子は、中腸上皮細胞に結合し、細胞膜への挿入と、その後起こる集合体形成を経て細胞膜に小孔を形成する。その結果、細胞内外の浸透圧バランスが崩壊して細胞が膨張・破壊され、標的昆虫は死に至ると考えられている⁷⁾。

双翅目昆虫特異的 Cry 殺虫タンパク質

B. t. subsp. israelensis (Bti) が産生するクリスタルは、双翅目昆虫特異的な Cry4Aa, Cry4Ba, および Cry11Aa を含んでおり、各種の熱帯病を媒介するカの幼虫に対する害虫防除剤としての優れた性質を備えている。筆者らのグループでは Cry4Aa の作用機構の解析を進めている。130 kDa の Cry4Aa は、アカイエカ幼虫（ボウフラ）に摂食されると中腸内でプロセッシングを受け、20 kDa および 45

kDa の小断片を生成する。Cry4Aa が *in vitro* でボウフラ中腸抽出液で処理されると、N 末端側と C 末端側の領域が分解除去され、Gly⁵⁸ を N 末端とする 60 kDa 中間体が生成する。さらに 60 kDa 中間体が分子内切断を受けて Gly 58 を N 末端とする 20 kDa 断片と、Gln²³⁶ を N 末端とする 45 kDa 断片が生成する（図 3A）。両者は会合してボウフラに対して殺虫効力を有する 60 kDa 複合体を形成する。これが Cry4Aa の活性型分子であると考えられる（図 3B）⁹⁾。このような活性型分子の生成過程および形態は Cry1 殺虫タンパク質群の場合とは異なっている。

Cry4Aa 活性型分子においては、①ドメイン I の α -ヘリックスのうち、 $\alpha 4$ と $\alpha 5$ のいずれかあるいは両方がボウフラに対する殺虫活性の決定に必須である；②ドメイン I の α -ヘリックスのうち、少なくとも $\alpha 6$ が 20 kDa および 45 kDa 断片の会合体形成に必須である。さらに、Cry4Aa 活性型分子が実際にボウフラの中腸上皮細胞に結合することが免疫組織染色法によって実証され、またこの結合が特異的であることが示唆された¹⁰⁾。

主に Cry1 殺虫タンパク質群を用いたこれまでの研究によれば、Cry 殺虫タンパク質は二つの過程を経て標的細胞に結合すると考えられる（図 2）。第一段階は活性型分子と標的細胞膜上の受容体との特異的かつ可逆的結合である。第二段階は活性型分子の構造変化を伴って起こる細胞膜への挿入であり、この過程は不可逆的である。しかし Cry4Aa の場合は、活性型分子と標的細胞との最初の結合は受容体に依存した結合だけではなく、これに依存しない活性型分子-細胞膜間の結合がかなり起こることが示唆された¹⁰⁾。

このように、これまで主として Cry1 殺虫タンパク質群の研究に基づいて提唱されてきた Cry 殺虫タンパク質の作用機構と比較して、Cry4Aa の作用機構には異なる点が

図 2 Cry 殺虫タンパク質の作用過程

(B) Cry4Aa活性型分子の模式図

図 3 Cry4Aa の活性化と活性型分子

あることを上記の実験事実は示している。Cry4Aa 以外の Cry 殺虫タンパク質についても作用機構における相違点が指摘されている例が少なからずある。このことは、Cry 殺虫タンパク質の微細な部分構造の違いが機能的多様性を引き起こしていることを示唆する。Cry 殺虫タンパク質の作用機構の全貌を明らかにするには Cry1 グループに加えて、その他の種類の Cry 殺虫タンパク質の解析が不可欠であり、それらを解明することによって有効利用への道すじがいっそう具体性を帯びたものとして開けるであろう。

Cry4Aa などの双翅目昆虫特異的 Cry 殺虫タンパク質は、微粒子 (Bt 菌体、クリスタルなど) としてボウフラ生息水域に投与されるが、流亡および沈降によってボウフラの摂食水域から失われ、また太陽光によって失活するため殺虫効力が持続しない。これを克服するためにはボウフラの餌の一つであるラン藻に Cry 殺虫タンパク質を発現させ、投与することが一つの有力な方法である。筆者らが Cry4Aa を発現する遺伝子導入ラン藻を用いて実験室の閉鎖容器内で調査した結果は、この方法でボウフラの防除が可能であることを示している。これを実用化するには、殺虫効力の増強および安全性の確保が今後の課題である。

ま と め

Bacillus thuringiensis のクリスタルタンパク質は貴重

な生物資源であり、その多様な生物機能を有効利用すれば、地球温暖化の進行に伴ってますます重要な意味をもちつつある環境保全と害虫防除、および医療の分野で大きく貢献できる。筆者らのグループではその実現を目指して、作用機構の解析および新規利用法に関する研究を進めている。

- 1) H. Höfte and H. R. Whiteley: *Microbiol. Rev.*, **53**, 242-255 (1989).
- 2) C. T. Choma, W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay, and H. Kaplan: *J. Prot. Chem.*, **9**, 87-94 (1990).
- 3) J. Li, J. Carroll, and D. J. Ellar: *Nature*, **353**, 815-821 (1991).
- 4) P. Grochulski, L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler: *J. Mol. Biol.*, **254**, 447-464 (1995).
- 5) R. J. Morse, T. Yamamoto, and R. M. Stroud: *Structure*, **9**, 409-417 (2001).
- 6) E. Schnepf, N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean: *Microbiol. Mol. Rev.*, **62**, 775-806 (1998).
- 7) F. Rajamohan, M. K. Lee, and D. H. Dean: *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **60**, 1-27 (1998).
- 8) A. Bravo: *J. Bacteriol.*, **179**, 2793-2801 (1997).
- 9) M. Yamagiwa, M. Esaki, K. Otake, M. Inagaki, T. Komano, T. Amachi, and H. Sakai: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3464-3469 (1999).
- 10) M. Yamagiwa, S. Kamauchi, T. Okegawa, M. Esaki, K. Otake, T. Amachi, T. Komano, and H. Sakai: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2419-2427 (2001).