

# 遺伝子の解析と利用

— 微生物農薬の開発 —

京都大学農学部 教授 駒野 徹

今日、医学、農学、工学の各分野で、それぞれ有用遺伝子の利用について多くの関心が払われている。機能的に類似の反応に関わっているタンパク質でも、生物の種類により性質が著しく異なっているものがあり、そのタンパク質をコードする遺伝子の構造や、遺伝子の発現調節機構にもまたそれぞれ特徴的なものがある。それ故、遺伝子を単離し、解析することは、生物の分化的側面からのみならず、遺伝子を利用する立場からも極めて重要である。

本日は、遺伝子の利用の1つの可能性として、将来生物農薬としての期待のある、微生物の産生する、昆虫に対してのみ毒性を示すタンパク質について、その遺伝子の解析と微生物に対する作用等について述べる。

## 1. Bacillus属のプラスミドがコードする殺虫性タンパク質

Bacillus thuringiensis (BT) には種々の亜種が存在し、その生活環の過程で胞子を形成するとき、結晶状のタンパク質の集合体、クリスタル (crystal) を作る。クリスタルは1-数種類のタンパク質からなり、異なる亜種がそれぞれ異なる昆虫の幼虫に対して強い毒性を示す。それ故このタンパク質を $\delta$ -内毒素 ( $\delta$ -endotoxin) とよんでいる。このクリスタルタンパク質をコードしている遺伝子は多くの場合BT菌に含まれるプラスミ

ド上にあり、cryと命名されている。クリスタルタンパク質の大部分は昆虫に対してのみ毒性を有し、人畜に対しては無害である。昆虫に対して毒性を示すタンパク質はBTのみが産生するのではなく、Bacillus cereusやBacillus sphaericusのある種の亜種もまた産生している。しかし、BTについての研究が進んでいることから、BTについて述べる。BT  $\delta$ -endotoxinをコードする遺伝子、そのプラスミドを含有するBTの亜種、及び殺虫スペクトルを表1に示した。

表1 BT $\delta$ -エンドトキシンの遺伝子

遺伝子 (130 kDa)	<i>B. thuringiensis</i> の亜種	殺虫スペクトル
<i>cryIA(a)</i>	<i>aizawai</i> , <i>solto</i> , <i>kurstaki</i> HD-1, <i>entomocidus</i> など	Lepidoptera
<i>cryIA(b)</i>	<i>berliner 1715</i> , <i>kurstaki</i> HD-1, <i>aizawai</i> IPL-7 など	Lepidoptera
<i>cryIA(c)</i>	<i>kurstaki</i> HD-73	Lepidoptera
<i>cryIB</i>	<i>thuringiensis</i> HD-2, <i>entomocidus</i> HD-110	Lipidoptera
<i>cryIC</i>	<i>aizawai</i> HD-137, <i>entomocidus</i> 601, <i>entomocidus</i> HD-110	Lepidoptera
<i>cryID</i>	<i>aizawai</i> HD-68	Lepidoptera
<i>cryIIA</i> (70 kDa)	<i>kurstaki</i> HD-263, <i>kurstaki</i> HD-1	Lepidoptera and Diptera
<i>cryIIB</i> (70 kDa)	<i>kurstaki</i> HD-1	Lepidoptera
<i>cryIIIA</i> (70 kDa)	<i>san diego</i> , <i>tenebrionis</i> など	Coleoptera
<i>cryIVA</i>	<i>israelensis</i>	Diptera
<i>cryIVB</i>	<i>israelensis</i>	Diptera
<i>cryIVC</i> (70 kDa)	<i>israelensis</i>	Diptera
<i>cryIVD</i> (70 kDa)	<i>israelensis</i>	Diptera

Lepidoptera；鱗翅目昆虫， Diptera；双翅目昆虫，  
Coleoptera；鞘翅目昆虫。

## 2. 殺虫活性の発現

殺虫活性は2段階で進行すると考えられている。最初の段階は、昆虫の幼虫がクリスタルタンパク質を食下すると、高アルカリ性の消化液によってクリスタルタンパク質は可溶化され、消化管の中でタンパク質分解酵素により分解される。その結果クリスタルタンパク質はプロトキシン(130kDa)の状態から、プロテアーゼ耐性のN末端側60-70kDaの殺虫活性を有するタンパク質断片、トキシン、となる。

次の段階は、トキシンが消化管組織である中腸皮膜細胞のルーメン側の細胞膜上に存在するレセプターによって確認され、これと結合することによって、腸管の細胞膜のイオン透過調節機構に異常をもたらす。その結果、細胞は膨潤し、破壊される。

CryIB活性型トキシンを、その標的昆虫であるオオモンシロチョウの幼虫の中腸膜ホモジェネートに作用すると、両者は結合したのに対し、非標的昆虫であるタバコスズメガの中腸膜ホモジェネートに対しては結合能を示さなかったとの報告がある。この事実はそれぞれの昆虫の中腸膜には異なるレセプターが存在していることを示していて興味がある。また調べられた限りにおいてBTトキシンは脊椎動物由来の細胞膜ホモジェネートには結合しなかった。

## 3. BTトキシンの遺伝子

クリスタルタンパク質の遺伝子はBT菌に含まれているプラスミド上にコードされている。亜種sottoは1種類のプラスミドしかもたないが、亜種israelensisは7種類ものプラスミドを有し、BTクリスタルタンパク質遺伝子は、それらの中の大型のプラス

ミド上に存在している。プロトキシンであるクリスタルタンパク質の分子サイズは約130kDaであり、それに相当する遺伝子は次々とクローン化され、塩基配列の決定がなされ、相互に比較されている。

殺鱗目昆虫の130kDaタンパク質遺伝子では、由来が亜種 kurstaki, aizawai, belinerと異なっているが、塩基配列にかなり相同性は高いが、殺双目昆虫の130kDaタンパク質 (is-raelensis由来) とでは著しく異なっている。殺虫性を示す領域を含むと考えられているN末端側60kDaのタンパク質のアミノ酸配列は必ずしも高い相同性を示さないが、C末端側は比較的相同性が高い。

#### 4. 殺虫活性を担う領域の探索

亜種 israelensis では殺双目昆虫活性を示す130kDaタンパク質に対応する遺伝子が2種類見いだされている。cryIVA(ISRH4遺伝子)とcryIVB(ISRH3遺伝子)である。両遺伝子産物(タンパク質)はそれぞれ130kDa、135kDaの分子サイズを有し、クリスタル中ではほぼ等量含まれている。興味あることは、両タンパク質のC末端側約40%に相当する467アミノ酸残基が完全に一致していることである。これらの遺伝子を、タンパク質のC末端に相当する遺伝子の塩基配列から順次脱落させ、N末端領域に相当する塩基配列を有する短くなった遺伝子を大腸菌で発現させ、得られたタンパク質について殺虫活性を調べると、C末端側約50%に相当するDNA断片から得られるペプチドも殺虫活性を示した(図1)。

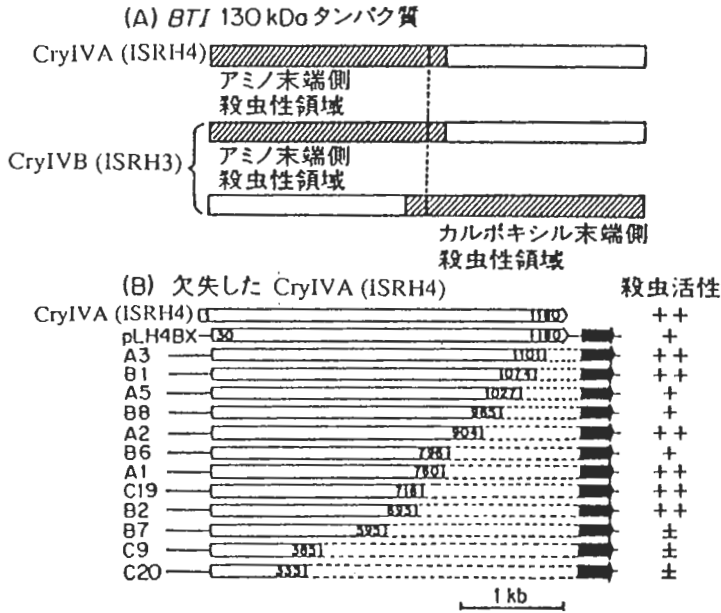


図1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* の  $\delta$ -エンドトキシン CryIVA (ISRH4) と CryIVB (ISRH3)

(A) CryIVA と CryIVB の殺虫性領域(斜線部分)。中央部の黒い部分には互いに保存されたアミノ酸配列がみられる

(B) CryIVA 遺伝子のカルボキシル末端欠失遺伝子とその産物の殺虫活性。点線で示した部分は欠失している領域を示している。殺虫活性はカの幼虫20匹当たりの死虫数を示している

## 5. 殺虫性タンパク質遺伝子の発現調節

亜種 *israelensis* の有する 130kDa 殺虫性タンパク質遺伝子 *cryIVA* について、枯草菌内で発現させると、枯草菌の孢子形成期に多く発現していることが認められた。これは枯草菌内で孢子形成中期以降に作動する  $\sigma^E$  (*BT* では  $\sigma^{35}$  に相当) が *cryIVA* のプロモーターに作用していると考えられる。実際 *cryIVA*, *cryIVB* のそれぞれについて解析して見ると、翻訳開始点の上流約 370 および約 320bp の位置に  $\sigma^E$  のコンセンサス配列が存在して

いた。また、130kDaタンパク質の発現が、枯草菌では孢子形成能を欠く変異株 (spo<sup>-</sup>) で著しく低下することも明らかとなった。

#### 6. 昆虫由来の培養細胞に対するCryIVAおよびCryIVBの作用

しばしば用いられる手法であるが、本来の遺伝子にマーカーとなる識別し易い遺伝子を結合し、マーカーの挙動を追跡することによって、元の遺伝子の発現状況を知ることができる。cryIVAおよびcryIVBにそれぞれlacZ'を結合し、生成する融合タンパク質が、CryIVに感受性および非感受性の昆虫に由来する培養細胞に対して与える影響について調べたところ、①融合CryIVA、融合CryIVB共に培養細胞表面に結合し、②細胞を膨潤させ、破壊させた。また、先に述べたCryIVAのC末端側から脱落させたタンパク質で殺虫活性を示した分子の融合タンパク質も同様に細胞を膨潤させる活性を示した。培養細胞では腸管組織のように、特異性の高いレセプターによる認識がないのかも知れないし、あるいは非特異的吸着があるのかも知れない。