

微生物農薬による害虫の防除と環境保全

酒井 裕・山際雅詩

岡山大学工学部生物機能工学科
〒700-8530 岡山市津島中3-1-1

1. はじめに

今日、食糧などの農産物の生産・流通過程において、害虫を防除するために化学合成物質を主成分とするいわゆる化学農薬が用いられている。それにもかかわらず農産物の生産量全体の20%程度が害虫による被害を受けているのが現状である。また病気を媒介する衛生害虫の防除においても殆どの場合、化学農薬が用いられている。一方、このように農薬を継続的に使用しているため、農薬それ自身とこれらの製造過程で生じる廃棄物の地球環境及び人体への蓄積に起因する環境及び人類の健康への悪影響が懸念されている。このような状況に鑑み、化学農薬の使用を極力抑制し、より環境に優しい方法による害虫防除が模索されてきた。その中で考慮されてきた選択肢のうち、最も有力なものの一つが天敵微生物を用いた害虫の防除である。

天敵微生物とは主に病原微生物である。すなわち、ある生物（害虫）に病気を引き起こしてこれを死滅させる。病気を引き起こすウイルス、細菌、糸状菌、原生動物、線虫などが知られている。森林の害虫であるガの一種に軟化症状を引き起こして死滅させるウイルスは天敵微生物の例である。

カイコの卒倒病（軟化病）は、グラム陽性土壌細菌の一種である*Bacillus thuringiensis* (Bt) によって引き起こされる。Btが餌とともにカイコの消化管に取り込まれると、Btの殺虫タンパク質の作用で腸管マヒが起こり、カイコは死に至る。した

がって、Btは養蚕業にとっては有害な病原菌である。しかしBtにはその他に多くの種類があり、多様な有害昆虫に対して強い特異的殺虫効力を示すものが多く知られている。したがって、これらは農林業害虫及び衛生害虫を防除する立場からは有益な細菌である。本稿ではBtが産生する特異的殺虫タンパク質、特に双翅目昆虫特異的殺虫タンパク質の性質とその有効利用について述べる。

2. *Bacillus thuringiensis* と殺虫タンパク質

Btはカイコ卒倒病の病原菌として1901年に日本の石渡博士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、孢子形成期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、特異的ガン細胞致死活性またはレクチン活性など極めて多様な生物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。また殺虫活性を持つ場合にはICP (insecticidal crystal protein) と呼ばれることもある。

Btの殺虫作用の標的となる昆虫の代表的な種類は、鱗翅目昆虫（ガ、チョウなど）、鞘翅目昆虫（コガネムシなど）、及び双翅目昆虫（蚊、ブヨなど）である。農林業害虫すなわち農作物や樹木の害虫の多くは、鱗翅目昆虫及び鞘翅目昆虫である。

また、双翅目昆虫には人間に病気を媒介するものがある。したがって、Btの殺虫タンパク質を微生物農薬として有効利用することは、環境を保全しつつ効率的な害虫防除を実現するためにとり得る一つの有力な選択肢である。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。たとえば、Cry1Aaは鱗翅目昆虫の、Cry3Aaは鞘翅目昆虫の、またCry4AおよびCry11Aは双翅目昆虫の幼虫に対して、それぞれ特異的殺虫活性を示す¹⁾。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。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年余りに渡って害虫の防除に用いられてきた。

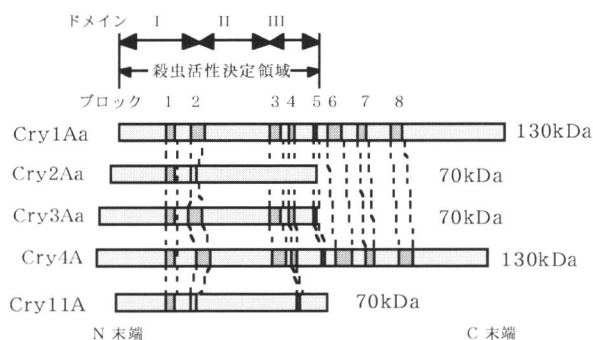


図1 *Bacillus thuringiensis* が産生するCry殺虫タンパク質

3. Cry殺虫タンパク質とその作用

Cry殺虫タンパク質はBt細胞内で前駆体（プロトキシン）として生合成され、クリスタルを形成して蓄積される。プロトキシンはそのサイズによって大きく二つに分類できる。一つは分子質量130kDaのグループで、Cry1A群、Cry1C及びCry4Aなどが含まれる。もう一つは70kDaのグループで、Cry2Aa、Cry3AaおよびCry11Aなどが含まれる（図1）。殺虫活性決定領域はプロトキシン内部にある約600アミノ酸残基から成る領域で

ある。活性型分子は殺虫活性決定領域から成り、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^{2~4)}、ドメイン I は7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。また、アミノ酸配列の相違にもかかわらず、分子全体の三次元構造が相互に良く類似していることも判明した（図2）。各ドメインの機能的役割の全体像は未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^{1, 5)}。また殺虫活性決定領域にはアミノ酸配列が高度に保存された領域が5ヶ所存在している。すなわちブロック1, 2, 3, 4, および5である。さらに130kDa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（図1）。

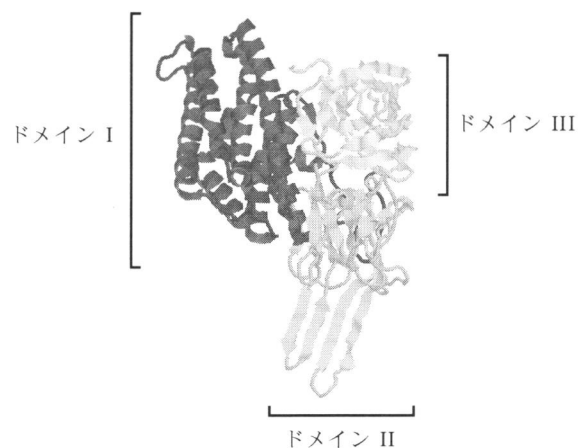


図2 Cry2Aa活性型分子の三次元構造⁴⁾

これまで主としてCry1殺虫タンパク質群の研究成果に基づいて提唱されてきたBt 殺虫タンパク質の作用機構は次のようである（図3）。Bt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ると、消化管（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、活性型分子が生成する。中腸内で生成した活性型のCry殺虫タンパク質は、中腸上皮細胞の表面にある受容体を認識してこれに結合し、さらに分子の一部が細胞膜に挿入された後、会合して小孔が形成される。その結果、細胞内外の浸透圧バランスが崩壊する。すなわち細胞外にある電解質と水が、細胞膜に形成された小孔を経由して細胞内に流入するために中腸の上皮細胞が膨張・破壊され、消化管としての構造・機能の崩壊によって標的昆虫は死に至ると考えられている^{1, 6)}。

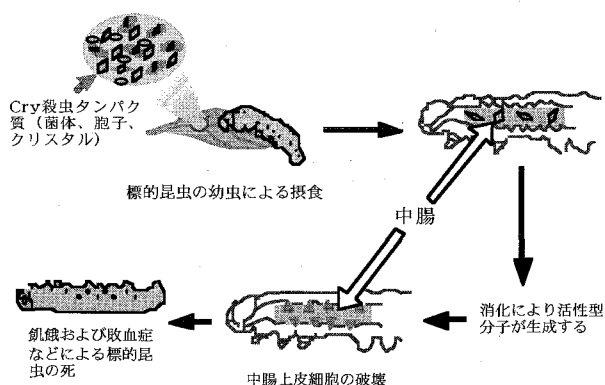


図3 Cry殺虫タンパク質の作用過程

4. *Bacillus thuringiensis* の殺虫タンパク質の優れた特徴

化学農薬が人の健康に悪影響を及ぼすことが指摘されて久しいが、現在でも害虫の防除には殆どの場合、化学農薬が用いられ、人類の生活は化学農薬による害虫の防除にほぼ全面的に依存していると言わざるを得ない。とりわけ開発途上国における状況は深刻であり、化学農薬による悪影響の拡大が懸念されている。また、十分な解明は今後

の課題であるが、化学農薬が環境ホルモン生成の原因物質であると考えられるケースもある。製造技術の進歩によって、現在では分解されやすく、また作物や土壌に残留しにくい化学農薬が開発されている。しかしながら、現在用いられている化学農薬の殆どは昆虫、さらにその他の無脊椎動物及びより高等な脊椎動物とも共通性の高い生化学反応を標的とし、これを阻害することによって殺虫効力を発揮するものである。したがって、害虫のみならずヒトを含めた幅広い多様な生物が悪影響を受けることになる。これを根本的に回避することは容易ではない⁷⁾。

これに対して*Bacillus thuringiensis* が産生する殺虫タンパク質は化学農薬には見られない優れた性質を備えている。Cry殺虫タンパク質の殺虫特異性は作用過程のいくつかの段階で決定される。その中の主要なものの一つとして、標的昆虫幼虫の中腸上皮細胞表面に存在する受容体の性質によってその昆虫の殺虫タンパク質感受性、つまり殺虫特異性が決定される機構が知られている¹⁾。したがって、Cry殺虫タンパク質の特異性は明確であり、標的昆虫以外の生物は殆ど悪影響を受けることがない。むしろ殺虫スペクトルが狭いため、実際には複数種類存在することが多い害虫を効果的に防除するには一種類のCry殺虫タンパク質では十分でなく、複数種類のCry殺虫タンパク質を組み合わせる必要があるケースが少なくない。したがってCry殺虫タンパク質による害虫防除においては自然環境中の生物の動的均衡状態を大規模に攪乱する危険性は著しく低いと考えられる。またCry殺虫タンパク質は容易に生物的分解を受け、自然環境中に長期間残留する危険性が著しく低い。このようにCry殺虫タンパク質は環境を保全しつつ害虫防除を効果的に行うために必要とされる特徴を備えた安全性の高い殺虫性物質の一つである。これらを現行の化学農薬と組み合わせることで害虫の防除をより効率的かつ安全なものにすることが望ましく、また可能であると考えられる⁷⁾。

5. 双翅目昆虫特異的Cry殺虫タンパク質

Btの亜種の一つである*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Cry殺虫タンパク質であるCry4A, Cry4B及びCry11Aを含んでおり、各種の熱帯病を媒介する蚊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Cry4Aの作用機構の解析を進めている。Cry4Aの130kDaプロトキシンは、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、20kDa及び45kDaの小断片を生成する。Cry4A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60kDa中間体が生成する。さらに60kDa中間体が分子内切断を受けてGly58をN末端とする20kDa断片と、Gln236をN末端とする45kDa断片が生成する。両者は会合してボウフラに対して殺虫効力を有する60kDa複合体を形成する。これがCry4Aの活性型分子であると考えられる⁸⁾。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（図4）。

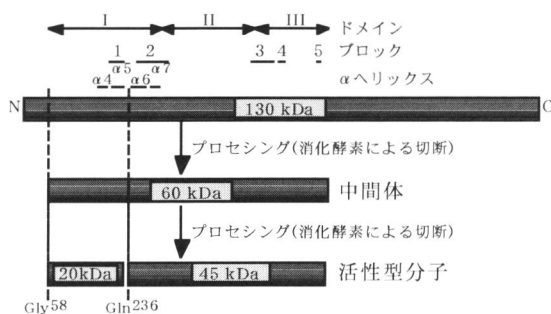


図4 Cry4Aのプロセッシング経路と活性型分子

Cry4A活性型分子の突然変異体の作成と解析によって次のことが示唆された。すなわち、①ドメインIのαヘリックスのうち、α4とα5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α6が20kDaおよび45kDa断

片の会合体形成に必須である。さらに、Cry4A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⁹⁾。

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。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Cry4A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⁹⁾。

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、Cry4Aの作用機構には異なる点があることを上記の実験事実は示している。Cry4A以外のCry殺虫タンパク質についても従来提唱されてきた作用機構とは異なる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している。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が有効利用への出発点となるであろう。

6. Cry殺虫タンパク質の利用

Cry殺虫タンパク質はこれまで欧米を中心に30年以上にわたって生物農薬として害虫防除に用いられてきた。その間に行なわれた研究の過程で多くのCry殺虫タンパク質遺伝子がクローン化、解析されてきた。1990年前後にはこれらを用いて鱗翅目昆虫特異的Cry殺虫タンパク質遺伝子を導入し、発現させることによって害虫に対する抵抗性

を付与した農作物がアメリカを中心に盛んに開発されるようになった。1990年代半ばに至ってこのようなトウモロコシ、ワタ、ダイズなどが商業的に栽培され始めた。しかしながら、ヨーロッパ諸国と日本を含むその他の国々においてはこうして生産された遺伝子組み換え農産物は、安全性に対する懸念から未だ消費者によって受け入れられているとは言い難い。

Cry4A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）の形で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。このような考え方にに基づき、筆者らの研究室ではCry4Aを高発現する遺伝子導入ラン藻を作成した（図5）。これを用いて実験室の閉鎖容器内で調査した結果は、この方法によって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、殺虫効力のいっそうの増強および安全性の検討が課題であり、今後の研究の成果に待つところが多い。

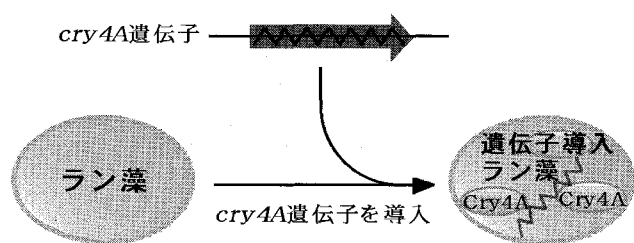


図5 Cry4Aを発現する遺伝子導入ラン藻の作成

7. おわりに

Btのクリスタルタンパク質は多様な生物機能を有する貴重な生物資源であり、特異的殺虫活性に限らず他にも特徴的な生物活性を持つ。たとえば、

殺虫活性を全く示さないクリスタルタンパク質の中にはガン細胞に対して特異的細胞致死活性を有するものが少なからず知られている。これらの多岐にわたる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持ちつつある環境保全と害虫防除、さらには医療の分野で大きく貢献できる。その実現を目指して新規Bt菌株の探索、作用機構の解析および新規利用法に関する研究をさらに推進することが求められている。

参考文献

- 1) E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806 (1998).
- 2) J. Li, J. Carroll, and D. J. Ellar. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353, 815-821 (1991).
- 3) P. Grochulski, L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J. -L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447-464 (1995).
- 4) R. J. Morse, T. Yamamoto, and R. M. Stroud. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 9, 409-417 (2001).
- 5) F. Rajamohan, M. K. Lee, and D. H. Dean. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* 60, 1-27 (1998).
- 6) 飯塚敏彦. *Bacillus thuringiensis* の産生する殺虫性タンパク質とその病原機作 — 現在までの歴史をたどって —. *日本蚕糸学雑誌*, 66, 311-322 (1997).
- 7) 堀 秀隆. 昆虫を殺すバクテリア. 「微生物からのメッセージ — 21世紀に活かす道 —」(福田雅夫, 大山卓爾, 堀秀隆, 小島 誠, 早川 徹 共著) 産学社, 129-207 (2001).
- 8) M. Yamagiwa, M. Esaki, K. Otake, M. Inagaki, T. Komano, T. Amachi, and H. Sakai. Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3464-3469 (1999).
- 9) M. Yamagiwa, S. Kamauchi, T. Okegawa, M. Esaki, K. Otake, T. Amachi, T. Komano, and H. Sakai. Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin to the apical microvilli of larval midgut of *Culex pipiens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2419-2427 (2001).