



Title	PCR 法による <i>Bacillus thuringiensis</i> cry 遺伝子同定法の確立と新規 <i>B. thuringiensis</i> 菌株の発見
Author(s)	浅野, 真一郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 19(7), 529-563
Issue Date	1996-03-15
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/12170">http://hdl.handle.net/2115/12170</a>
Type	bulletin (article)
File Information	19(7)_p529-563.pdf



[Instructions for use](#)

# PCR 法による *Bacillus thuringiensis cry* 遺伝子同定法の確立と 新規 *B. thuringiensis* 菌株の発見\*

浅野 眞一郎

(北海道大学農学部応用分子昆虫学講座)

(平成 8 年 1 月 10 日受理)

## Identification of *cry* Gene from *Bacillus thuringiensis* by PCR and Isolation of Unique Insecticidal Bacteria

Shin-ichiro ASANO

(Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

### 目 次

- I. 緒 言
- II. PCR 法による *Bacillus thuringiensis cry* 遺伝子同定法の確立
  - A. *B. thuringiensis* 菌株における *cryI* 遺伝子の同定
    - 1. 目 的
    - 2. 材料と方法
    - 3. 結 果
    - 4. 考 察
  - B. *B. thuringiensis* 菌株における *cryII* 遺伝子の同定
    - 1. 目 的
    - 2. 材料と方法
    - 3. 結 果
    - 4. 考 察
  - C. *B. thuringiensis* 菌株における *cryIII* 遺伝子の同定
    - 1. 目 的
    - 2. 材料と方法
    - 3. 結 果
    - 4. 考 察
  - D. *B. thuringiensis* 菌株における *cryIV* 遺伝子の同定
    - 1. 目 的
    - 2. 材料と方法
    - 3. 結 果
    - 4. 考 察

### III. 新規 *B. thuringiensis* 菌株の発見

#### A. *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 株の結晶タンパク質遺伝子のクローニングならびに構造解析

- 1. 目 的
- 2. 材料と方法
- 3. 結 果
- 4. 考 察

### IV. 総合考察

- 摘 要
- 謝 辞
- 引用文献
- Summary

### I. 緒 言

*Bacillus thuringiensis* は、わが国では古くからカイコに卒倒性軟化病を起こす病原細菌として知られている。*Bacillus thuringiensis* は *Bacillus cereus* にきわめて類似した細菌で、芽胞嚢形成時に芽胞と結晶性タンパク質を形成することによってのみ *B. cereus* と区別されている。

*B. thuringiensis* の発見は 1901 年石渡が死亡した家蚕幼虫から病原菌を分離し、“sotto Bacillen”として記載したのが始まりである。その後、BERLINER<sup>1)</sup> が Thuringia という町でスジコナマダ

\*北海道大学審査学位論文(1996)の一部

ラメイガ (*Ephesia kühniella*) 幼虫から再び病原菌を分離し、町の名にちなんで“*Bacillus thuringiensis*”と命名された。この株は Berliner 株と呼ばれ type strain として世界に知られている<sup>34)</sup>。この後、TOUMANOFF and VAGO<sup>73)</sup> がカイコの軟化病死体から病原菌を分離し、亜種の 1 つ *B. cereus* var. *alesti* が追記された。HEIMPEL and ANGUS<sup>25)</sup> は *B. thuringiensis* が、芽胞形成時に芽胞囊の中に菱形の結晶物を産生することを確かめ、*B. cereus* とは別種であることを初めて明らかにした。また、この結晶は経口的に昆虫の消化管内に取り込まれると、中腸の消化液中でアルカリ分解、ひきつづき消化酵素の分解をうけて、腸管麻痺ならびに全身麻痺をとともう毒性を示すことが報告された<sup>26)</sup>。また、 $\alpha$ -exotoxin (ホスホリパーゼ C) および  $\beta$ -exotoxin (耐熱性の菌体外毒素) と区別して  $\delta$ -endotoxin ( $\delta$ -外毒素) と呼ばれている<sup>26)</sup>。 $\delta$ -endotoxin は昆虫の消化液で分解されると 130~145 kDa のプロトキシンとなり、ひきつづき 55~65 kDa のトキシンにまで酵素分解をうける<sup>34)</sup> が、この  $\delta$ -endotoxin は自然界においても極めて易分解性のポリペプチドであり、環境を汚染しない微生物農薬 (BT 製剤) として 1970 年代初頭から実用化されている。

*B. thuringiensis* の各菌株の産生する結晶性タンパク質は、一般に菱形を呈し鱗翅目昆虫に対して選択的に殺虫活性を示すことで知られていた。しかし、近年、通常の菱形結晶タンパク質以外に、結晶形態が通常の菱形とは異なる不定形立方体 (irregular) あるいは、サイコロ状 (Cuboidal) 結晶として産生する亜種が次々と見出された<sup>7,12,31)</sup>。また、通常、1 芽胞あたり 1 個の結晶タンパク質が形成されるが、1 芽胞当たり 2 個ないし 3 個形成される菌株も発見された<sup>51)</sup>。さらに、菱形結晶とサイコロ状結晶を様々な割合で産生する *B. thuringiensis* 分離菌株も報告されている<sup>40)</sup>。現在、*B. thuringiensis* の産生する結晶性タンパク質の形態としては、ダイヤモンド型 (diamond shaped)、菱形 (bipyramidal)、偏菱形立方体 (rhombohedral) 等が知られ、結晶タンパク質は芽胞囊内で、芽胞とならんで形成されることから paraspore inclusion body と呼ばれる。結晶性タンパク質は芽胞囊の時期を経て芽胞とともに菌体外に遊離する<sup>26)</sup> が、その時期は各亜種によって異なり、早いもので 24 時間から遅いもので約 10 日間である<sup>24,31)</sup>。

一方、*B. thuringiensis* の産生する結晶タンパク質は従来、鱗翅目幼虫に強い病原性を有することが報告されていた。REEVES and GARCIA<sup>57)</sup> が *B. thuringiensis* BA-068 株が蚊の幼虫に病原性を示すことを初めて見いだして以来、いくつかの亜種、すなわち subsp. *kurstaki* HD-1, *tolworthi*, *galleriae*, *kenyae*, *entomocidus*, *aizawai*<sup>23)</sup>, subsp. *israelensis*<sup>21)</sup>, subsp. *kyushuensis*<sup>51)</sup>, subsp. *darmstadtensis* 73-E-10-2, 73-E-10-16<sup>55)</sup> において蚊の幼虫に対する病原性が見いだされ、*B. thuringiensis* の微生物農薬としての利用範囲が広がった。現在ではさらに鞘翅目昆虫に対して殺虫活性を示す *B. thuringiensis* 菌株も見いだされている<sup>44)</sup>。

また、遺伝子工学の進展を背景に *B. thuringiensis* の結晶性タンパク質遺伝子 (Crystal Protein gene: cry 遺伝子) の同定も始められた。IZUKA ら<sup>30)</sup> は独自に開発した *B. thuringiensis* 菌株から plasmid DNA を効率よく抽出する方法を用いて、*B. thuringiensis* 菌株から単離された各々の plasmid DNA を検討した結果、50~150MDa の分子量をもつ plasmid DNA が全ての *B. thuringiensis* 菌株に共通して存在していることを見出し、*B. thuringiensis* 菌株のこれらの plasmid DNA が結晶性タンパク質をコードする可能性を持つことを指摘した<sup>22,30)</sup>。これに基づいて、同じく 1981 年 SCHNEPF and WHITELEY<sup>62)</sup> によって初めて subsp. *kurstaki* HD-1 Dipe 1 株の cry 遺伝子のクローニングがなされ、SCHNEPF ら<sup>63)</sup> が subsp. *kurstaki* HD-1 で SHIBANO ら<sup>66)</sup> が subsp. *sotto* において、ADANG ら<sup>1)</sup> が subsp. *kurstaki* HD-73 等それぞれ全塩基配列を報告して以来、多くの亜種で cry 遺伝子がクローニングされ、塩基配列の決定もなされた<sup>34)</sup>。現在、結晶性タンパク質は、菌体内の複数の大きな plasmid DNA (通常 1~数個) と chromosomal DNA にコードされていることが明らかにされている。

*B. thuringiensis* 菌株の様々な cry 遺伝子の塩基配列が明らかになるに従って、鱗翅目・双翅目・鞘翅目昆虫に殺虫活性を有するそれぞれの cry 遺伝子の特徴も明らかとなり cry 遺伝子の分類が行われる<sup>28)</sup> とともに目下、cry 遺伝子とその産物の殺虫活性発現機構の解明<sup>42)</sup> が進められている。

これら新しい cry 遺伝子の解析の結果、画期的な殺虫性タンパク質の利用法が HÖFTE ら<sup>27)</sup> によつ

て示された。すなわち、cry 遺伝子をアグロバクテリウムのバイナリーベクターとつないでタバコの細胞内に移行させ、植物体における cry 遺伝子の発現に成功させたことである。これによって害虫耐性植物の作出が可能となった。現在、各種の植物、トマト<sup>15)</sup>、ワタ<sup>56)</sup>、ナタネ<sup>37)</sup>等に、選択的な殺虫活性を有する cry 遺伝子を導入する研究が盛んに行われ、実用化実験ならびに圃場での実験が進められるようになった。また、微生物に cry 遺伝子を導入し新規 BT 製剤を開発する試みもなされている。例えば、*B. thuringiensis* では双翅目昆虫に強い活性を示す subsp. *israelensis* に鞘翅目昆虫に活性を有する *cryIII* 遺伝子を導入・発現させることで殺虫活性範囲を広くしたり<sup>10)</sup>、*Pseudomonas fluorescens* に *cryIA(c)* 遺伝子を導入して圃場での残効性を高める試み<sup>20)</sup> がなされたり、さらにはすでに微生物農薬として広く利用されている *Autographa californica* 多角体病ウイルス (NPV) に *cryIA(b)* 遺伝子を組み込んで AcNPV の殺虫活性を高めようとする試みもなされている<sup>49)</sup>。一方、*B. thuringiensis* の殺虫活性機構の解明を分子生物学的に進める動き、*B. thuringiensis* 殺虫性結晶タンパク質感受性昆虫中腸に存在するレセプタータンパク質の解析<sup>42)</sup>、ならびに結晶性タンパク質 (CryIIIa) の X 線結晶構造解析<sup>48)</sup> によって提唱された結晶タンパク質 3 次構造モデルをもとに感受性昆虫中腸に存在するレセプタータンパク質との関連<sup>79)</sup> など基礎的な研究においても長足の進歩が見られた。これらの研究は、殺虫性結晶タンパク質の感受性昆虫に対する殺虫活性機構を解明し、さらには感受性昆虫に対する選択的殺虫活性を高める上でも重要である。特に、近年多くの国と地域で発見されている BT 製剤に対する抵抗性獲得昆虫、例えば *Plodia interpunctella* (indianmeal moth) の *cryIA(b)* タンパク質に対する抵抗性獲得<sup>75)</sup> や、*Plutella xylostella* (diamondback moth) の *cryIA(b)* タンパク質に対する抵抗性獲得<sup>18)</sup> などの抵抗性獲得機構解明にも、感受性昆虫における殺虫性結晶タンパク質に対するレセプタータンパク質の研究は重要である。

このように *B. thuringiensis* 菌株の cry 遺伝子の研究が進むにつれ、cry 遺伝子の改変ならびにその利用が今後の BT 殺虫製剤の大きな 1 つの方向であることが認識されると同時に、未だ自然界に埋もれたままになっている新しい殺虫活性の cry 遺伝子

を有する *B. thuringiensis* の分離ならびにその菌株の有する cry 遺伝子同定が重要な課題となってきた。

*B. thuringiensis* の分類は現在 DE BARJAC and BONNEFOI<sup>11)</sup> の提案による鞭毛抗原 (H-antigen) に基づいて行なわれており、serotype 45 までの亜種ならびに鞭毛抗原をもたない亜種 *wuhanensis* とあわせて約 50 亜種が報告されている (表 1)<sup>47)</sup>。しかし、同じ serotype の中にも異なる性質をもった菌株が見いだされており<sup>55,35,40,61)</sup>、同じ serotype 内に存在する殺虫活性の異なる *B. thuringiensis* 菌株の分類や、新しい殺虫活性スペクトルを有する菌株の分類には不適當であると言える。近年、菊田<sup>40)</sup> は、従来の H-serotype の分類によらず、走査電子顕微鏡による結晶形態の観察、結晶性タンパク質の SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法による解析、plasmid DNA プロフィールなどを考慮した *B. thuringiensis* 菌株の分類を報告した。しかしながら、この方法ではやはり *B. thuringiensis* 菌株の有する殺虫活性ならびに cry 遺伝子の種類を推定することはできない。これらのことから、*B. thuringiensis* 菌株の有する殺虫活性スペクトルならびに cry 遺伝子によるあらたな *B. thuringiensis* 菌株の分類法が求められてきた。

HÖFTE and WHITELEY<sup>28)</sup> は、*B. thuringiensis* の結晶性タンパク質についてのレビューの中で、それまでに報告された数十種類の cry 遺伝子を、殺虫活性スペクトルならびに cry 遺伝子の相同性によって、*cryI*~*cryIV* 遺伝子に分類しようという提案を行った。すなわち、*cryI* 遺伝子は、鱗翅目昆虫に対して殺虫活性を有する結晶タンパク質をコードする遺伝子であり、*cryII* 遺伝子は鱗翅目と双翅目昆虫に対して、*cryIII* 遺伝子は鞘翅目昆虫に対して、そして *cryIV* 遺伝子は双翅目昆虫に対して殺虫活性を有する遺伝子として、それぞれの cry 遺伝子を分類した。そして、異なった殺虫活性スペクトルを有する、いくつかの cry 遺伝子についての殺虫活性特異領域が示された<sup>79)</sup>。また、浅野・飯塚<sup>3)</sup> は、*cryIA(a)* 遺伝子の家蚕殺虫活性特異領域<sup>19)</sup> をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより家蚕に対する殺虫活性が予測できることを明らかにした。さらに、cry 遺伝子を同定することで、*B. thuringiensis* 菌株の殺虫活性の予測が可能であるか否かが検討されてきた<sup>4,5,8,9,38)</sup>。

表1 *Bacillus thuringiensis* 菌株の分類  
Table 1 Classification of *B. thuringiensis* strains

H-antigen	Serovar	Abbreviation	First mention and/or first valid description
1	<i>thuringiensis</i>	THU	Berliner, 1915; Heimpel & Angus, 1958
2	<i>finitimus</i>	FIN	Heimpel & Angus, 1958
3a, 3c	<i>alesti</i>	ALE	Toumanoff & Vago, 1951; Heimpel & Angus, 1958
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	KUR	de Barjac & Lemille, 1970
3a, 3d	<i>sumiryoshiensis</i>	SUM	Ohba & Aizawa, 1989
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	FUK	Ohba & Aizawa, 1989
4a, 4b	<i>sotto</i>	SOT	Ishiwata, 1905; Heimpel & Angus, 1958
4a, 4c	<i>kenyae</i>	KEN	Bonnefoi & de Barjac, 1963
5a, 5b	<i>galleriae</i>	GAL	Shvetsova, 1959; de Barjac & Bonnefoi, 1962
5a, 5c	<i>canadensis</i>	CAN	de Barjac & Bonnefoi, 1972
6	<i>entomocidus</i>	ENT	Heimpel & Angus, 1958
7	<i>aizawai</i>	AIZ	Bonnefoi & de Barjac, 1963
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	MOR	Bonnefoi & de Barjac, 1963
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	OST	Gaixin, Ketian, Minghua & Xingmin, 1975
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	NIG	Wiser & Prasertphon, 1984
9	<i>tolworthi</i>	TOL	Norris, 1964; deBarjac & Bonnefoi, 1968
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	DAR	Kreig, de Barjac & Bonnefoi, 1968
10a, 10c	<i>londorina</i>	LON	Arantes et al. (not published)
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	TOU	Kreig, 1969
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	KYU	Ohba & Aizawa, 1979
12	<i>thompsoni</i>	THO	de Barjac & Thompson, 1970
13	<i>pakistanii</i>	PAK	de Barjac, Cosmao Dumanoir, Shaik & Viviani, 1977
14	<i>israelensis</i>	ISR	de Barjac, 1978
15	<i>dakota</i>	DAK	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
16	<i>indiana</i>	IND	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
17	<i>tohokuensis</i>	TOH	Ohba, Aizawa & Shimizu, 1981
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	KUM	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981
18a, 18c	<i>yosoo</i>	YOS	Lee H. H. (not published)
19	<i>tochigiensis</i>	TOC	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	YUN	Wan-Yu, Qi-Fang, Xue-Ping & You-Wei, 1979
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	PON	Rajagopalan et al. (not published)
21	<i>colmeri</i>	COL	De Lucca, Palmgren & de Barjac, 1984
22	<i>shandongiensis</i>	SHA	Ying, Jie & Xichang, 1986
23	<i>japonensis</i>	JAP	Ohba & Aizawa, 1986
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	NEO	Rodriguez-Padilla et al., 1988
24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	NOV	Burtseva, Kalmikova et al., (to be published)
25	<i>coreanensis</i>	COR	Lee H. H. et al., 1994
26	<i>silo</i>	SIL	de Barjac & Lecadet (not published)
27	<i>mexicanensis</i>	MEX	Rodriguez-Padilla & Galan-Wong, 1988
28a, 28b	<i>monterry</i>	MON	Rodriguez-Padilla (not published)
28a, 28c	<i>jegathesan</i>	JEG	Lee L. H. (to be published)
29	<i>amagiensis</i>	AMA	Ohba (not published)
30	<i>medellin</i>	MED	Orduz, Rojas, Correa, Montoya & de Barjac, 1992
31	<i>toguchini</i>	TOG	Hodirev (not published)
32	<i>cameroun</i>	CAM	Jacquemard, 1990; Juarez-Perez et al. (to be published)
33	<i>leesis</i>	LEE	Lee H. H. et al., 1994
34	<i>konkukian</i>	KON	Lee H. H. et al., 1994
35	<i>seoulensis</i>	SEO	Shim (not published)
36	<i>malaysiensis</i>	MAL	Ho (not published)
37	<i>andalousiensis</i>	AND	Santiago-Alvarez et al. (to be published)
38	<i>oswaldocruzi</i>	OSW	Rabinovitch et al. (to be published)
39	<i>brasiliensis</i>	BRA	Rabinovitch et al. (to be published)
40	<i>huazhongensis</i>	HUA	Yu Ziniu (to be published)
41	<i>sooncheon</i>	SOO	Lee H. H. (not published)
42	<i>jinghongensis</i>	JIN	Rong Sen Li (not published)
43	<i>guiyangensis</i>	GUI	Rong Sen Li (not published)
44	<i>higo</i>	HIG	Ohba (not published)
45	<i>roskildensis</i>	ROS	Hirinschen and Hansen (not published)

本報においては、*B. thuringiensis* 菌株の有する *cry* 遺伝子 (*cryI*~*cryIV* 遺伝子) を PCR 法を用いて増幅し、各 *cry* 遺伝子のプローブを作成するとともに、*B. thuringiensis* 菌株の有する *cry* 遺伝子の同定方法を確立した。さらに、結晶性タンパク質の形態ならびに結晶性タンパク質のペプチド解析と併せて考慮することで、有用な新規 *B. thuringiensis* 菌株のスクリーニングが可能であることを示した。本方法により新規 *B. thuringiensis* 菌株を検索した結果、ドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*) に殺虫活性を有する subsp. *japonensis* N141 株を得た。その N141 株の有する *cry* 遺伝子 (*cryN141*) のクローニングならびに塩基配列決定を行い、決定された塩基配列をもとに推定された *cryN141* 遺伝子のアミノ酸配列とすでに報告されている同種の活性を有する *cry* 遺伝子<sup>29)</sup> との相同性について検索したところ、*cryN141* 遺伝子は新しいタイプの *cry* 遺伝子であることが判明した。以上、本報では PCR 法を中心とした *B. thuringiensis* 菌株の *cry* 遺伝子同定法を確立するとともに、同方法により、新規有用 *B. thuringiensis* 菌株を発見したのでこれらを取りまとめて報告する。

## II. PCR 法による *Bacillus thuringiensis* *cry* 遺伝子同定法の確立

### A. *B. thuringiensis* 菌株における *cryI* 遺伝子の同定

#### 1. 目的

*B. thuringiensis* 菌株における *cryI* 遺伝子の同定は、*B. thuringiensis* 菌株の有する鱗翅目昆虫に対す

る殺虫活性を認識する上で重要である。*B. thuringiensis* の鱗翅目昆虫に強い殺虫活性を示す、*cryI* 遺伝子由来の殺虫活性タンパク質は、菱形形態を有する結晶タンパク質で、130 kDa 程度の分子量のプロトキシンからなる。*B. thuringiensis* 菌株の結晶タンパク質の形態とプロトキシンの SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) によるペプチドの解析が、*B. thuringiensis* の標準株 (type strain) を用いて行なわれている<sup>2,31,33,35)</sup>。さらに、*cryIA(a)* 遺伝子由来の家蚕殺虫活性特異領域<sup>19)</sup>を用いたサザンハイブリダイゼーションによって、浅野・飯塚<sup>3)</sup>は家蚕殺虫活性と *cryIA(a)* 遺伝子の関係を明らかにした。

本報では、*B. thuringiensis* 菌株で菱形結晶を産生している標準株の、*cryI* 遺伝子を、PCR 法とサザンハイブリダイゼーションを組み合わせた方法を用いて同定した。さらに、この *cryI* 遺伝子同定法を用いて、北海道大学農学部応用分子昆虫学講座で分離・同定された菌株について *cryI* 遺伝子の同定ならびに数種鱗翅目昆虫に対して殺虫活性試験を行った。

#### 2. 材料と方法

a 供試菌株：本報告に供試した *B. thuringiensis* 標準株の由来は、浅野・飯塚<sup>2)</sup>に示した。北海道大学農学部応用分子昆虫学講座において分離・同定された菌株の分離源は菊田<sup>40)</sup>ならびに佐々木<sup>60)</sup>に示した。

b *cryI* 遺伝子プライマーの合成ならびに PCR 法による遺伝子の増幅：*cryI* 遺伝子同定のためのプライマー合成は、KALMAN ら<sup>38)</sup>の方法にもとづき、DNA シンセサイザー (Applied Bio System 社

表2 *cryI* 遺伝子検索に使用したプライマー  
Table 2 Characteristics of primers used for *cryI* screening

Primer	Sequence	Gene	Size <sup>a</sup> (bp)
TYIAA	5'-GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC	<i>cryIA(a)</i>	724
TYIAB	5'-TCGAATTGAATTTGTTCGGCAGAAGTA	<i>cryIA(b)</i>	238
TYIAC	5'-TCACTTCCCATCGACATCTACC	<i>cryIA(c)</i>	487
TYIB	5'-GTCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC	<i>cryIB</i>	830
TYIC	5'-CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTTC	<i>cryIC</i>	288
TYID	5'-GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC	<i>cryID</i>	414
TYIE	5'-CTTAGGGATAAATGTAGTACAG	<i>cryIE</i>	880
TYIF	5'-CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	<i>cryIF</i>	368
TYIUNI	5'-ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTACTTTCTC	<i>cryI</i>	

<sup>a</sup> The sizes of DNAs amplified by using *cryI*-specific primers

製)で行った(表2)。

*cryI* 遺伝子の増幅は, IIZUKA ら<sup>30)</sup>の方法で抽出されたDNAをテンプレートとして, TaqポリメラーゼはAmpliTaq(Takara社製)を用い, 条件はその酵素に付属するマニュアルに従って行った。増幅されたDNAは3%アガロースゲル電気泳動により解析された。

c 各 *cryI* 遺伝子プローブの作成: 各 *cryI* 遺伝子プローブは, YAMAMOTO and POWELL<sup>79)</sup>に従い, それぞれの *cryI* 遺伝子を有している *B. thuringiensis* 菌株からPCR法にて増幅し, プラスミドベクター(pUC119)にクローニングした後, ダイデオキシ法<sup>59)</sup>にてシークエンスを行い作成した。

d 鱗翅目昆虫に対する殺虫活性試験: カイコに対する殺虫活性試験は, 菊田<sup>40)</sup>の方法に従い, 経口投与によって4齢起蚕幼虫を用いて行った。コナガ・ハスモンヨトウに対する殺虫活性試験は, それぞれの終齢幼虫を用いて, 人工飼料に供試した菌株の乾燥粉末を混合して食下させ殺虫活性の検定は48時間後に観察してとりまとめた。

### 3. 結 果

本報告に供試した *B. thuringiensis* 標準株は, 鱗翅目昆虫に殺虫活性を有する菌株において多く観察される, 菱形結晶を産生する菌株で, それらの家蚕に対する殺虫活性試験は, 浅野・飯塚<sup>2)</sup>に示した。

PCR法による *cryI* 遺伝子同定のオリゴヌクレオチドDNAプライマーは, KALMAN ら<sup>38)</sup>のプライマーの塩基配列をもとに合成した。それらの合成したプライマーを用い, それぞれの *cryI* 遺伝子を, すでにクローニングならびに遺伝子構造解析が報告されている<sup>79)</sup> *B. thuringiensis* 菌株からPCR法によって増幅し, ダイデオキシ法による遺伝子構造解析を行って各 *cryI* 遺伝子のプローブとした。

供試した *B. thuringiensis* 標準株(20株)の *cryI* 遺伝子の同定の結果は, 表3に示した。それぞれの *cryI* 遺伝子のコードする殺虫性タンパク質について, 鱗翅目昆虫に対する特異的な殺虫活性が明らか

表3 *B. thuringiensis* の *cryI* 遺伝子の由来  
Table 3 Occurrence of *B. thuringiensis cryI* genes

Gene	Occurrence
<i>cryIA(a)</i>	<i>kurstaki, sotto, japonensis, entomocidus</i>
<i>cryIA(b)</i>	<i>kurstaki, thuringiensis, darmstadiensis, tolworthi, entomocidus, japonensis, wuhanensis</i>
<i>cryIA(c)</i>	<i>kurstaki, kenya, wuhanensis</i>
<i>cryIB</i>	<i>thuringiensis, entomocidus</i>
<i>cryIC</i>	<i>subtoxicus, entomocidus</i>
<i>cryID</i>	<i>galleriae, darmstadiensis, toumanoffi, wuhanensis, japonensis</i>
<i>cryIE</i>	<i>kenya, darmstadiensis, tolworthi</i>

表4 鱗翅目昆虫に対する各種 *cryI* トキシンの殺虫活性  
Table 4 Activity spectra of *cryI* toxins against some lepidoptera insects

Species	<i>cryI</i> type							
	<i>IA(a)</i>	<i>IA(b)</i>	<i>IA(c)</i>	<i>IB</i>	<i>IC</i>	<i>ID</i>	<i>IE</i>	<i>IF</i>
<i>Spodoptera exigua</i>	±	±	—	—	+	+	±	+
<i>Spodoptera littoralis</i>	—	—	—	—	+	—	+	
<i>Actebia fennica</i>	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Trichoplusia ni</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Heliothis virescens</i>	+	+	+	—	±	—	±	+
<i>Ostrinia nubilalis</i>	+	+	+				+	+
<i>Mamestra brassicae</i>	+	+	—	—	+	—	—	
<i>Pieris brassicae</i>	+	+	+	+	+	—	—	
<i>Manduca sexta</i>	+	+	+	—	+	+	+	
<i>Choristoneura fumiferana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lymantria dispar</i>	+	+	±	—	±	+	—	+
<i>Orgyia leucostigma</i>	+	+	±	—	+	±	—	+
<i>Malacosoma disstria</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bombyx mori</i>	+	±	—	—	+	+	+	
<i>Plutella xylostella</i>	+	+	+	+	+	—	—	
<i>Lambina fiscellaria</i>	+	+	+	—	+	+	+	

にされている (表 4)<sup>74)</sup>。

供試した *B. thuringiensis* 標準菌株の *cryI* 遺伝子の同定は、まず *cryI* 遺伝子の増幅を PCR 法を用いて行い、さらに増幅された DNA を作成した *cryI* 遺伝子プローブによってサザンハイブリダイゼーションを行うことで同定した。

供試した *B. thuringiensis* 標準株のカイコ (*Bombyx mori*)、コナガ (*Plutella xylostella*)、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) に対する殺虫活性については、表 5 に示した。殺虫活性は、カイコ・コナガでは供試した *B. thuringiensis* 菌株の乾燥粉体を滅菌蒸留水に懸たくし、 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  で殺虫活性の認められた菌株について (+) の表示とした。ハスモンヨトウについては同様にして  $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  において殺虫活性の認められた菌株を (+) の表示した。

カイコに対して殺虫活性を有する *cry* 遺伝子として、*cryIA(a)*、*cryIC*、*cryID*、*cryIE* 遺伝子が報告されている<sup>66,76)</sup>。また、コナガに対して殺虫活性を有

するタンパク質遺伝子として、*cryIA(a)*、*cryIA(b)*、*cryIA(c)*、*cryIB*、*cryIC* 遺伝子が報告されている<sup>18)</sup>。ハスモンヨトウについては近縁の種である、*Spodoptera littoralis* に対する殺虫活性を有するタンパク質遺伝子として *cryIC*、*cryIE* 遺伝子が報告されている<sup>75)</sup>。

カイコに殺虫活性の認められた *B. thuringiensis* 菌株については、表 3 に示したカイコに殺虫活性を有するタンパク質をコードしている *cryI* 遺伝子のいずれかを有していることが明らかとなった。さらに、コナガ、ハスモンヨトウについてもそれぞれの殺虫活性を有するタンパク質遺伝子が存在していることが明らかとなった。しかしながら、供試した *B. thuringiensis* 標準株の中で、subsp. *wuhanensis* 株のように、ハスモンヨトウに対する殺虫活性を有しているのに、*cryIC* ならびに *cryIE* 遺伝子を有していない株や、subsp. *tolworthi* 株ならびに subsp. *darmstadiensis* 株のように、*cryIE* 遺伝子を有しているのにも拘わらずハスモンヨトウに対して殺虫活性を示さない株も存在していた。

菊田<sup>40)</sup>ならびに佐々木<sup>60)</sup>の *B. thuringiensis* 分離株について、カイコ、コナガ、ハスモンヨトウに対する殺虫活性試験ならびに *cryI* 遺伝子の検索を行った (表 6)。

カイコについては、*cryIA(a)* 遺伝子由来のタンパク質が強い殺虫活性を示し、供試した *B. thuringiensis* 分離株においては、カイコに殺虫活性を示した菌株すべてにおいて *cryIA(a)* 遺伝子を有していた。

コナガに関しては、*cryIA(b)* ならびに *cryIA(c)* 遺伝子由来のタンパク質が強い殺虫活性を示し、供試した *B. thuringiensis* 菌株の内、これらの *cryI* 遺伝子を有する菌株全てにおいて、コナガに殺虫活性を有していた。コナガについては、*cryIA(a)*、*cryIB* ならびに *cryIC* 遺伝子ともに殺虫活性が報告されており、供試した菌株の内ではこれらの遺伝子を有する subsp. *aizawai* に属する菌株が殺虫活性を示した。

ハスモンヨトウに関しては、*cryIC* ならびに *cryIE* 遺伝子由来のタンパク質が強い殺虫活性を示し、供試した菌株について *cryIC* 遺伝子を有している菌株 (subsp. *aizawai* IPL) は、殺虫活性が認められたが、*cryIE* 遺伝子を有している菌株 (subsp. *kenyae*) は、殺虫活性は認められるものの弱かった。

表 5 3 種鱗翅目昆虫に対する *B. thuringiensis* 菌株の殺虫活性

Table 5 Toxicity against some insects

subsp.	Toxicity		
	<i>B. m</i> <sup>a</sup>	<i>P. x</i> <sup>b</sup>	<i>S. I</i> <sup>c</sup>
<i>thuringiensis</i>	—	+	—
<i>finitimus</i>	—	—	—
<i>kurstaki HD-1</i>	+	+	—
<i>sotto</i>	+	+	—
<i>subtoxicius</i>	+	+	—
<i>entomocidus</i>	+	+	+
<i>oyamensis</i>	—	—	—
<i>tolworthi</i>	+	+	—
<i>darmstadiensis</i>	+	+	—
<i>toumanoffi</i>	+	+	—
<i>dakota</i>	—	—	—
<i>indiana</i>	—	—	—
<i>tohokuensis</i>	—	—	—
<i>kumamotoensis</i>	—	—	—
<i>tochigiensis</i>	—	—	—
<i>yunnanensis</i>	—	—	—
<i>wuhanensis</i>	+	+	+
<i>colmeri</i>	—	—	—
<i>shandongensis</i>	—	—	—
<i>japonensis</i>	+	+	—

a: *Bombyx mori*, b: *Plutella xylostella*,

c: *Spodoptera litura*



表6 3種鱗翅目昆虫に対する殺虫活性とその保有 *cryI* 遺伝子  
Table 6 *CryI* genes and toxicity against three insects

Strain No. (serotype)	<i>cryI</i> gene type	Toxicity		
		<i>B. m</i> <sup>a</sup>	<i>P. x</i> <sup>b</sup>	<i>S. I</i> <sup>c</sup>
<i>alesti</i>	<i>cryIA(b)</i>	+	+	-
<i>alesti</i> KMK9-20	not detected	-	-	-
<i>kurstaki</i> HD-1	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> Pdk2-2	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> Pdk7-3	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> Pdk8-6	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> Pdr2-3	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> Pdr5-1	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> Pdr10-1	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> DN2-1	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> Me6-18	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>kurstaki</i> KMK7-5	<i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	-	+	-
<i>kurstaki</i> Mo1-1A	<i>cryIF(a)</i> , <i>cryIA(c)</i>	+	+	-
<i>sotto</i>	<i>cryIA(a)</i>	+	+	-
<i>sotto</i> KMK1-36	<i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i>	-	+	-
<i>kenyae</i>	<i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i> , <i>cryIE</i>	-	+	±
<i>kenyae</i> Acp10-4	<i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i> , <i>cryIE</i>	-	+	±
<i>kenyae</i> GSK1-1	<i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i> , <i>cryIE</i>	-	+	±
<i>galleriae</i>	<i>cryIA(b)</i>	-	+	-
<i>galleriae</i> Acp10-8	<i>cryIA(b)</i>	-	+	-
<i>aizawai</i> IPL	<i>cryIA(a)</i> , <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIC(c)</i> , <i>cryID</i>	+	+	+
<i>aizawai</i> HU	not detected	-	-	-
<i>aizawai</i> TMM3-32	<i>cryIA(a)</i>	+	+	-

a: *Bombyx mori*, b: *Plutella xylostella*, c: *Spodoptera litura*

subsp. *galleriae* Acp10-8株のように、*cryIA(b)* 遺伝子のみを有しているにもかかわらず殺虫活性を示した株が存在していた。

#### 4. 考 察

HÖFTE and WHITELEY<sup>28)</sup>によって、*B. thuringiensis* の有する *cry* 遺伝子の特異的殺虫活性ならびに *cry* 遺伝子の相同性によって *B. thuringiensis* 菌株の分類が行われた。本報では、*B. thuringiensis* 標準菌株の中で浅野・飯塚<sup>3)</sup>により家蚕殺虫活性と *cryIA(a)* 遺伝子との関連が調査された鱗翅目昆虫の殺虫活性と関連が深い、菱形結晶を産生する株を供試して、それぞれの菌株の有する *cryI* 遺伝子と数種鱗翅目昆虫の殺虫活性との関連性を明らかにした。

供試した昆虫は、カイコ (*Bombyx mori*)、コナガ (*Plutella xylostella*)、ハスモンヨトウ (*Spodoptera*

*litura*)であり、それぞれの昆虫に対して殺虫活性を有する *cryI* 遺伝子が報告されている<sup>74)</sup>。

カイコに対する殺虫活性試験では、殺虫活性が認められた供試 *B. thuringiensis* 標準菌株のすべてが、*cryIA(a)*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE* 遺伝子のいずれかの遺伝子を有していた、これらの *cryI* 遺伝子をPCR法を用いて同定することで *B. thuringiensis* 菌株のカイコ殺虫活性を推定できると考えられた。コナガに対しても、同様に殺虫活性が認められた菌株すべてが、*cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIB*, *cryIC* 遺伝子のいずれかを有しており、これらの *cryI* 遺伝子をPCR法を用いて同定することで *B. thuringiensis* 菌株のコナガ殺虫活性を推定できると考えられた。しかしながら、ハスモンヨトウに対して殺虫活性が認められた subsp. *entomocidus* 株においては、*cryIC* 遺伝子を有していたが、subsp.

wuhanensis 株においては *cryIC* および *cryIE* 遺伝子は有していなかった。subsp. *darmstadiensis* 株ならびに subsp. *tolworthi* 株においては、*cryIE* 遺伝子を有していたが、ハスモンヨトウに対する殺虫活性はなかった。VAN FRANKENHUYZEN<sup>74)</sup>の報告している *cryIC* ならびに *cryIE* 遺伝子の殺虫活性は、*Spodoptera littoralis* に対しての殺虫活性であり、供試したハスモンヨトウとは近縁であるが同種ではないので、*cryIC* ならびに *cryIE* 遺伝子をクローニングしその発現産物のハスモンヨトウ殺虫活性を調べる必要があると考えられた。また、subsp. *wuhanensis* 株においては、どの *cryI* 遺伝子がハスモンヨトウの殺虫活性に関与しているかについて、この株の *cryI* 遺伝子のクローニングならびに構造解析が行われている<sup>50)</sup>。これら3種類の昆虫種に対しては、PCR法によって *B. thuringiensis* 菌種の *cryI* 遺伝子同定を行うことにより、殺虫活性判定が可能であると考えられた。

さらに、KALMAN ら<sup>38)</sup>の報告によれば、*cryI* 遺伝子を同定するにあたり、用いたプライマーでPCR法による *cryI* 遺伝子の増幅・同定を行うと、同じクラスに分類された *cryI* 遺伝子間でわずかな相同性の違いによって、その遺伝子のコードしている殺虫性タンパク質の殺虫活性範囲が異なることがあるとされている。従って、本報における *B. thuringiensis* 標準株の2株から増幅・同定された *cryIE* 遺伝子に関しては、クローニングならびに構造解析を行う必要があると考えられた。

また、*cryI* 遺伝子が検出されなかった供試した *B. thuringiensis* 標準株については、殺虫活性試験に供試した昆虫種についての殺虫活性が認められず、*cryI* 遺伝子の同定を行うことで、鱗翅目昆虫についての殺虫活性の有無を推定できると考えられた。しかしながら、*B. thuringiensis* 標準株の有する殺虫活性の強さに違いが認められることから、それぞれの *CryI* タンパク質の殺虫活性の強さならびに発現量の比較、どの遺伝子の組み合わせが殺虫活性の強さに関係するかを今後調べていく必要があると思われる。

本実験では、さらに菊田<sup>40)</sup>ならびに佐々木<sup>60)</sup>が分離・同定した *B. thuringiensis* 菌株について殺虫活性試験ならびにPCR法による *cryI* 遺伝子の同定が行われた(表6)。いくつかの例外を除けば、*cryI* 遺伝子の同定を行えば供試した昆虫に対する殺虫活

性を予測できると考えられた。subsp. *galleriae* Acp10-8株のみが、ハスモンヨトウに対する殺虫活性が *cryI* 遺伝子の同定からでは予測できなかった。このことは、subsp. *galleriae* Acp10-8株が有する *cryIA(b)* 遺伝子がハスモンヨトウの殺虫活性と関連しているのか、もしくは新しい *cry* 遺伝子を有しているのか不明であり今後検討が必要である。一方、SASAKI ら<sup>61)</sup>によれば、TAILOR ら<sup>71)</sup>の報告した *cryV* 遺伝子がハスモンヨトウに殺虫活性を示すことから、この *cryV* 遺伝子の性質についても検討する必要があると考えられた。

*B. thuringiensis* 分離株において *cryI* 遺伝子の同定を行うことで、標準株とは異なる性質を持つ菌株のスクリーニングが可能であることが明らかとなった。このスクリーニング方法は、有用な *B. thuringiensis* 菌株の選抜に応用できると考えられた。本報では、*B. thuringiensis* 菌株の *cryI* 遺伝子の同定を行った場合、供試した3種の昆虫に関してはほぼ殺虫活性が予測できた。今後は、さらに昆虫種を増やしそれぞれの *cryI* 遺伝子がどの昆虫に特異的殺虫活性を有するのかまた、それらの殺虫活性の強さについてもさらに詳細に検討する必要があると考えられた。

## B. *B. thuringiensis* 菌株における *cryII* 遺伝子の同定

### 1. 目的

農薬製剤としてはじめて利用された subsp. *kurstaki* HD-1株は、鱗翅目昆虫に対して殺虫活性を有する菱形の殺虫活性結晶タンパク質 (insecticidal crystal protein; ICP)の主タンパク質 P1 と、P2 と名付けられた双翅目昆虫と鱗翅目昆虫双方に殺虫活性のあるサイコロ状の結晶由来のタンパク質が報告されている<sup>32,78)</sup>。さらに、P1ならびにP2を発現する *cry* 遺伝子はそれぞれクローニングされ、塩基配列も決定されている<sup>43,63,77)</sup>。浅野・飯塚<sup>3)</sup>は、subsp. *kurstaki* HD-1の ICP 遺伝子である *cryIA(a)* をプローブとしたハイブリダイゼーションによって、*cryI* に分類される鱗翅目昆虫(特に家蚕)に対して殺虫活性を示す ICP 遺伝子の検索ができることを明らかにした。しかしながら、*B. thuringiensis* の菌株には *cryI* に分類される遺伝子と *cryII* に分類される遺伝子をあわせ持つ菌株が多数存在することが報告されている<sup>17)</sup>。本報では *cryII* 遺伝子の特異領域のオリゴヌクレオチド DNA プライマーを合成す

ることにより、PCR法によって、subsp. *kurstaki* HD-1の *cryII* 遺伝子が増幅され、*B. thuringiensis* 菌株の有する *cryII* 遺伝子同定が可能であることを明らかにした。従って、この方法を用いて従来記載されている *B. thuringiensis* の標準株の *cryII* 遺伝子を検索したところ、数亜種の *B. thuringiensis* 菌株が *cryII* 遺伝子を有していることが明らかになった。

さらに、菊田<sup>40)</sup>によって、北海道各地の死亡幼虫ならびに土壌から分離された *B. thuringiensis* 菌株の中には、菱形とサイコロ状結晶をとともに産生し、菱形結晶とサイコロ状結晶の割合が通常とは異なる新しいタイプの *B. thuringiensis* 菌株が報告されている。これらの *B. thuringiensis* 分離株の H-serotype による同定を行うとともに、PCR法による *cryII* 遺伝子の同定も行い、これらの株のヤマトヤブカに対する殺虫活性と *cryII* 遺伝子との関係を調査した。

## 2. 材料と方法

a 供試菌株：供試した *B. thuringiensis* 菌株は、北海道大学農学部応用分子昆虫学講座保存の標準株と菊田<sup>40)</sup>が北海道各地の土壌ならびに死亡昆虫から分離した *B. thuringiensis* 菌株とした。

b カに対する殺虫活性試験：供試昆虫としてヤマトヤブカ (*Aedes japonicus*) を用い、殺虫活性試験は菊田ら<sup>41)</sup>の方法に従った。

c オリゴヌクレオチドプライマーの合成：オリゴヌクレオチドプライマーは、subsp. *kurstaki* HD-1の *cryIIA* 遺伝子の翻訳開始点から321-341番目の塩基の5'-CAGATACCCTTGCTCGTGTA A、リバースプライマーとして1370-1390番目の塩基の5'-ATAGGCCCGTGCTCTCCACCAGGをDNAシンセサイザー (Applied Biosystems 社製) によって合成した。

d *cryII* 遺伝子の増幅：*B. thuringiensis* 各菌株の *cryII* 遺伝子の増幅は、IIZUKA ら<sup>30)</sup>の方法で抽出されたDNAをテンプレートとして、PCRの反応条件は市販のTaqポリメラーゼ (Takara 社製) に備え付けてある条件に従って、上記の *cryII* プライマーを用いて行った。

e *cryII* 遺伝子の同定：*cryII* 遺伝子の同定は増幅されてきた遺伝子を、制限酵素 (*HincII*) によって処理し、1%アガロースゲル電気泳動によって行った。即ち、増幅された *cryII* 遺伝子の内、制限酵素

*HincII* の処理によって約700 bpと400 bpの大きさに切り出される遺伝子を *cryIIB* 遺伝子とし、切り出されない遺伝子を *cryIIA* 遺伝子とした。

## 3. 結果

*cryII* 遺伝子は、subsp. *kurstaki* HD-1由来で、鱗翅目と双翅目昆虫の双方に殺虫活性を有する *cryIIA* と鱗翅目昆虫にのみ殺虫活性を有する *cryIIB* が報告されている<sup>17,77)</sup>。*cryII* 両遺伝子のアミノ酸配列の比較、*cryII* 遺伝子の特徴、ならびに本実験でオリゴヌクレオチドプライマーとして合成したDNAの領域を、図1に示した。*cryIIA* 遺伝子と *cryIIB* 遺伝子のアミノ酸配列は、図1に示したように、633番までに多くの相違が認められた。しかし、この中でも、169~204番目、ならびに612~633番目は他のICP遺伝子との比較においてもよく保存された領域として知られる。本実験では、この保存領域をさけ、塩基配列において321-341番目を5'末端ならびに1370~1390番目を3'末端としてプライマーを合成した。このプライマーを用いPCR法によって増幅されたHD-1株の *cryII* 遺伝子の大きさは1070 bpであった。増幅された *cryII* 遺伝子の末端が平滑化された後、プラスミドベクターであるpBluescript II SK(-)のマルチクローニングサイトの制限酵素 *Sma* I 切断点に連結され、大腸菌DH5  $\alpha$  にトランスフェクションされた。クローニングされた *cryII* 遺伝子は、ダイデオキシ法によって塩基配列が確認された。その結果、このプライマーから *cryIIA* 遺伝子と *cryIIB* 遺伝子が増幅されたことが明らかになった。*cryII* 両遺伝子を簡便に識別する方法としては、*cryIIB* 遺伝子には制限酵素 *HincII* によって認識される部位が存在しているが、*cryIIA* 遺伝子には制限酵素 *HincII* によって認識されるサイトが存在していないことが確かめられ、このことから、増幅された *cryII* 遺伝子は、制限酵素 *HincII* による処理により容易に *cryIIA* 遺伝子か *cryIIB* 遺伝子かを同定できた。

以上の方法によって *B. thuringiensis* 標準菌株の有する *cryII* 遺伝子を検索した。その結果は表7に示した。供試した *B. thuringiensis* 標準株、subsp. *thuringiensis* (serotype 1) から subsp. *japonensis* (serotype 27) までの中、subsp. *kurstaki* HD-1, *aizawai*, *galleriae*, *kenyae* から *cryII* 遺伝子が検出された。なお subsp. *kurstaki* については同時に供試したHD-87, HD-263 また subsp. *aizawai* について

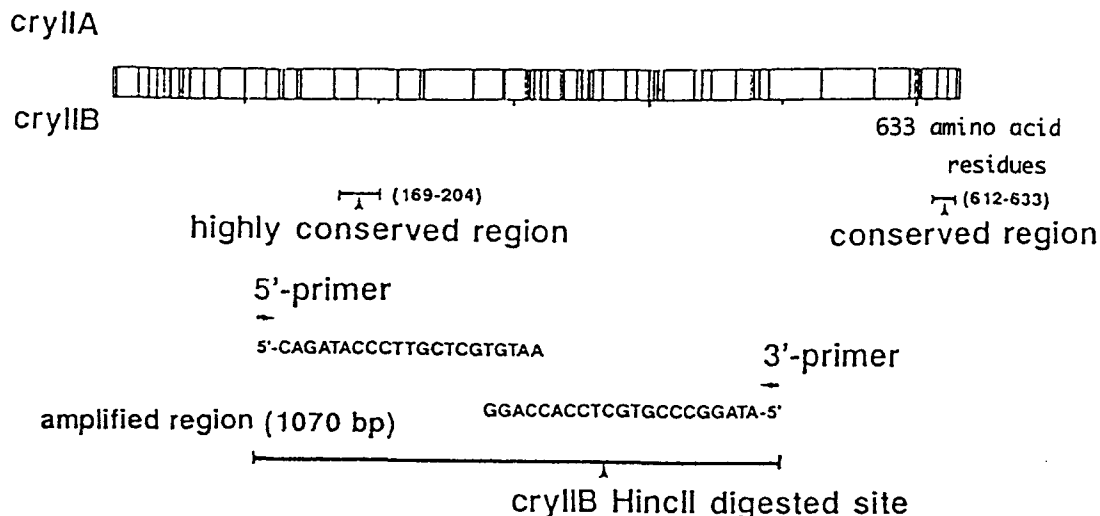


図1 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1の *cryIIA* と *cryIIB* 遺伝子にコードされるアミノ酸配列の比較  
縦線は双翅目活性結晶タンパク質 (*cryII*) で共通するアミノ酸を示す

Highly conserved region および conserved region は, Donovan *et al.* (1988) の記述に基づく

Fig. 1 Amino acid comparison of *cryIIA* and *cryIIB* genes in subsp. *kurstaki* HD-1

Vertical lines represent amino acids that are conserved for dipteran crystal proteins (*cryII*)

Highly conserved region and conserved region were described by Donovan *et al.* (1988)

表7 *cryII* 遺伝子が同定された *B. thuringiensis* 菌株  
Table 7 Identification of *cryII* genes from *B. thuringiensis* strains

Strain	<i>cryII</i> genes
<i>kurstaki</i> HD-1	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
<i>kurstaki</i> HN-87	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
<i>kurstaki</i> HD-263	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
<i>aizawai</i> IPL	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
<i>aizawai</i> juroi	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
<i>kenyae</i>	<i>cryIIA</i>
<i>galleriae</i>	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>

は IPL 株のほか juroi 株にも *cryII* 両遺伝子が検出された。

菊田<sup>40)</sup>によって分離された *B. thuringiensis* 菌株について SEM による結晶形態の観察ならびに SDS-PAGE による結晶タンパク質のペプチド解析によって、菱形結晶とサイコロ状結晶を産生し、菱形結晶とサイコロ状結晶の割合が異なっている *B. thuringiensis* 分離株の *cryII* 遺伝子の同定を行った。その結果、*B. thuringiensis* 分離株の内、H-serotyping によって subspp. *kurstaki*, *kenyae*, *galleriae* と同定された株において *cryII* 遺伝子が検出さ

表8 PCR 法により検索された *B. thuringiensis* 菌株の *cryII* 遺伝子構成

Table 8 Constitution of *cryII* genes in *B. thuringiensis* isolates by PCR method

Strain	<i>cryII</i> genes
<i>kurstaki</i> HD-1	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
Pdk2-2	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
Pdk7-3	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
Pdk8-6	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
-----	
<i>kenyae</i> type strain	<i>cryIIA</i>
Acp10-4	<i>cryIIA</i>
GSK1-1	<i>cryIIA</i>
-----	
<i>galleriae</i> type strain	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
Acp10-8	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
Acp10-66	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>
KNB5-1	<i>cryIIA</i> , <i>cryIIB</i>

れた (表8)。

#### 4. 考 察

本報において *B. thuringiensis* 菌株の *cryII* 遺伝子同定のために合成した *cryII* 遺伝子特異的プライマーによって増幅された DNA は、*cryIIA* ならびに *cryIIB* 両遺伝子であることが明らかとなった。さら

に、増幅された *cryII* 遺伝子は制限酵素 *HincII* による消化によって *cryIIA* 遺伝子であるか *cryIIB* 遺伝子であるかが同定できた。また、*cryIIA* ならびに *cryIIB* 遺伝子由来の DNA プローブを用いたザザンハイブリダイゼーションを行ったが、*cryII* 両遺伝子の相同性が高くザザンハイブリダイゼーションによる *cryII* 両遺伝子の同定はできなかった。

この PCR 法を用いた *cryII* 遺伝子同定法を用いて、*B. thuringiensis* の標準株について4つの亜種において *cryII* 遺伝子が検出された。この4つの亜種の内、*kurstaki* HD-1, *aizawai* IPL, *galleriae* では *cryIIA* ならびに *cryIIB* 遺伝子を有しており、*kenyae* においては、*cryIIA* 遺伝子のみを有することが明らかとなった。なお、これら *cryII* 遺伝子を有する4亜種は、ヤマトヤブカ (*Aedes japonicus*) に対し、殺虫活性を有することも確かめられた<sup>41)</sup>。*cryII* 遺伝子のコードしている殺虫活性結晶タンパク質 (ICP) は、*cryIIA* 由来のものが双翅目昆虫と鱗翅目昆虫に、*cryIIB* 遺伝子由来のものが鱗翅目昆虫に対して殺虫活性を有していることが明らかにされており<sup>7)</sup>、特に *cryIIA* 遺伝子を有している菌株をこのような簡単な方法でスクリーニングすることで、自然界に存在する双翅目昆虫に対して殺虫活性を有している *B. thuringiensis* 菌株を検索できることが明らかとなった。

菊田<sup>40)</sup> は、SEM の観察結果から *B. thuringiensis* 分離株の中で菱形結晶とサイコロ状結晶をともに産生し、しかもその産生割合が *subsp. kurstaki* HD-1 株と逆転している株を報告した。通常、HD-1 株の場合、菱形結晶：サイコロ状結晶の割合は、7:3 であるのに対し、本報では、この SEM 観察における1群の *B. thuringiensis* 菌株の中、サイコロ状結晶が重ピラミッド形結晶より多いと思われる8菌株を選び、血清型による分類、殺虫活性の相違、プロトキシンとして菱形結晶由来のペプチド (135 kDa) とサイコロ状結晶由来のペプチド (65 kDa) の発現量の差、8菌株の有する *cryII* 遺伝子構成等とヤマトヤブカに対する殺虫活性の強さの差の関連について検討した。この結果、いずれもヤマトヤブカに対して殺虫活性を有することが、中でも *subsp. kenyae* に分類された Acp10-4 株が最も殺虫活性が強く、また *subsp. kenyae* GSK1-1 株も *subsp. kurstaki*, *galleriae* に分類された他の6菌株より活性が強いことを示した。*subsp. kurstaki*, *galleriae* に属したグループ

は、*cryIIA* ならびに *cryIIB* 遺伝子をともに有するのに対し、*subsp. kenyae* は *cryIIA* 遺伝子のみを有していた。これらのことから、*cryII* 両遺伝子を持つ *B. thuringiensis* 菌株よりも *subsp. kenyae* 株がヤマトヤブカに対する殺虫性タンパク質 (Cry IIA) だけを発現させたために、殺虫活性に違いが認められることと関連していると考えられた。なお、SDS-PAGE とデンストメーターによるプロトキシン 135 kDa ならびに 65 kDa の定量が、ヤマトヤブカに対する殺虫活性の強さを比較する上で有効な方法とはならなかった。即ち、*subsp. kurstaki* に分類された Pdk8-6 株は、*subsp. kenyae* Acp10-4 株に比べて 65 kDa プロトキシンを 135 kDa より多く発現していたにもかかわらず、Acp10-4 株より活性は弱かったことがそのことを示していた。

本報において *cryIIA* 遺伝子のみを有する *subsp. kenyae* 株が、*cryIIA* ならびに *cryIIB* 遺伝子を有する *B. thuringiensis* 菌株よりヤマトヤブカに対して強い殺虫活性を示したが、他の種類のカに対しても同様な傾向を示すか否かは今後の検討が必要であると考えられる。

## C. *B. thuringiensis* 菌株における *cryIII* 遺伝子の同定

### 1. 目的

土壌細菌である *B. thuringiensis* はグラム陽性の芽胞形成菌で芽胞形成期に、ある種の昆虫に対して強い特異的殺虫活性を示す結晶タンパク質 (insecticidal crystal protein; ICP) を産生することが知られている。ICP をコードしている *cry* 遺伝子は、その ICP の特異的殺虫活性によって *cryI* から *cryIV* に分類されている<sup>28)</sup>。すなわち、*cryI* 遺伝子は鱗翅目昆虫に対して、*cryII* 遺伝子は双翅目・鱗翅目昆虫に対して、*cryIII* 遺伝子は鞘翅目昆虫に対して *cryIV* 遺伝子は双翅目昆虫に対して殺虫活性を有している。

*cryI* 遺伝子ならびに *cryII* 遺伝子については、前節において PCR 法を用いた *cry* 遺伝子同定法にて *B. thuringiensis* 菌株が有するそれぞれの遺伝子の同定ならびに特異的殺虫活性の推定が可能であることを明らかにした。

現在、*cryIII* 遺伝子は、*cryIIIA* 遺伝子<sup>64)</sup>、*cryIIIB* 遺伝子<sup>58,67)</sup>、*cryIIIC* 遺伝子<sup>46)</sup>、*cryIIID* 遺伝子<sup>45)</sup>、の4つの異なる塩基配列と殺虫活性をもつ遺伝子が報告されている。本報では、鞘翅目昆虫に対して殺虫

活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の *cryIII* 遺伝子を検索する目的で、各 *cryIII* 遺伝子の特異的なオリゴヌクレオチド DNA プライマーを合成した。本報では、これらの *cryIII* 遺伝子プライマーを用いて *B. thuringiensis* 標準株を供試して *cryIII* 遺伝子の同定ならびに *cryIII* 遺伝子プローブの作成を行った。

2. 材料と方法

a 供試菌株：供試した *B. thuringiensis* 菌株は、北海道大学農学部応用分子昆虫学講座保存の標準株 (serotype 1; *thuringiensis* から serotype 27; *japonensis* まで) とし、その由来は浅野・飯塚<sup>2)</sup> に示した。

b *cryIII* 遺伝子プライマー合成ならびに PCR 法による遺伝子の増幅：*cryIII* 遺伝子同定のためのプライマー合成は各 *cryIII* 遺伝子の特異的な塩基配列をコンピュータサーチによって検索し、DNA シンセサイザー (Applied Bio System 社製) で行った (表 9)。*cryIII* 遺伝子の増幅は、IZUKA ら<sup>30)</sup> の方法で抽出された DNA をテンプレートとして、Taq ポリメラーゼは Amplitaq (Takara 社製) を用い、条件はその酵素に付属するマニュアルに従って行った。増幅された DNA を 1% アガロースゲル電気泳動にて解析した。

c 各 *cryIII* 遺伝子プローブの作成：各 *cryIII* 遺伝子プローブは、それぞれの *cryIII* 遺伝子を有している *B. thuringiensis* 菌株から PCR 法にて増幅し、プラスミドベクター (pUC119) にクローニングした後、ダイデオキシ法<sup>59)</sup> にてシーケンスを行い作成した。

3. 結 果

*cryIII* 遺伝子は、鞘翅目昆虫に対して殺虫活性を有する *cry* 遺伝子として、HÖFTE and WHITELEY<sup>28)</sup> によって分類されて以来、*cryIIIA*

～*cryIIID* 遺伝子が報告されている<sup>79)</sup>。

本報においては、*B. thuringiensis* 標準株の有する *cryIII* 遺伝子を、各 *cryIII* 遺伝子特異的 DNA プライマーを合成し PCR 法によって検索を行った (表 9, 10)。

その結果、*cryIII* 遺伝子が増幅・同定された *B. thuringiensis* 標準株は、subsp. *morrisoni* tenebrionis 株だけであった。また、subsp. *morrisoni* tenebrionis 株から増幅・同定された *cryIII* 遺伝子は、*cryIIIA* 遺伝子のみであった (図 2)。

*cryIIIB* 遺伝子を有すると期待された subsp. *tolworthi* 株からは *cryIIIB* 遺伝子は増幅されなかった。そのほか、*cryIIIC* 遺伝子においては subsp. *thompsoni*, *cryIIID* 遺伝子については subsp. *kurstaki* からクローニング・塩基配列の決定がなされて

表 10 各種プライマーによる PCR 産物の分子量  
Table 10 Products of different PCR primers

PCR primers	PCR products(bp) from the following genes			
	<i>cryIIIA</i>	<i>cryIIIB</i>	<i>cryIIIC</i>	<i>cryIIID</i>
IIIABD5+IIIA3	1963			
IIIABD5+IIIB3		1356		
IIIABD5+IIID3			926	
IIIABD5+IIIuni3	1359	1369		1369
IIIC5 +IIIuni3			1073	

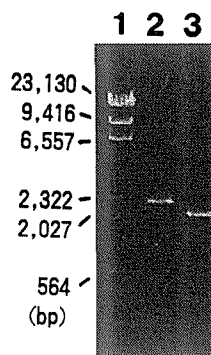


図 2 *B. thuringiensis* 菌株全 DNA を鋳型とした *cryIII* 遺伝子検索用特異プライマーによる遺伝子増幅

Fig. 2 Total DNA samples from *B. thuringiensis* strains analyzed by PCR with mixture of *cryIII*-specific primers. Lane 1,  $\lambda$ -HindIII marker  
Lane 2, subsp. *morrisoni* tenebrionis  
Lane 3, subsp. *tolworthi*

表 9 PCR 法による *cryIII* 遺伝子検索用オリゴヌクレオチドプライマー

Table 9 Oligonucleotide primers used in PCR screening

Primer	Sequence	Genes
IIIABD5	5'-CCGAACAATCGAAGTGAA	<i>cryIIIA</i> , <i>B</i> , <i>D</i>
IIIA3	5'-ATAGATGGTCACTACTT	<i>cryIIIA</i>
IIIB3	5'-GAATCCTGTGCACCTAA	<i>cryIIIB</i>
IIIC5	5'-CCTGAAAATTCGAGGCC	<i>cryIIIC</i>
IIIC3	5'-ATTGTTGACGGCAACAA	<i>cryIIID</i>
IIIuni3	5'-AATTGATCAATAGAATC	<i>cryIIIA</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i>

いるが、これらの標準株には *cryIII* 遺伝子は存在しなかった。

#### 4. 考 察

*cryIII* 発現タンパク質は、鞘翅目昆虫に対して殺虫活性を示すとされている。しかしながら、数種コガネムシ類に対する殺虫活性試験を行ったところ殺虫活性は認められなかった。今後、この *cryIII* 発現タンパク質の殺虫活性を示す昆虫種について検討する必要があると考えられた。

本報で供試した *B. thuringiensis* 標準菌株の内、*cryIII* 遺伝子が同定されたのは、subsp. *morrisoni tenebrionis* 株のみであった。subsp. *morrisoni tenebrionis* から増幅された *cryIII* 遺伝子は、*cryIIIA* 遺伝子であることがクローニングならびに塩基配列の決定によって明らかとなった。また、*cryIIIB* 遺伝子がクローニングされた subsp. *tolworthi* の標準株について、*cryIIIB* 遺伝子特異的 DNA プライマーを用いた PCR を行ったところ、約 1300 bp の DNA が増幅された(図2)。しかしながら、増幅された DNA をクローニングならびに塩基配列の決定を行った結果、類似しているが *cryIIIB* 遺伝子ではなかった。*cryIIIC*, *cryIIID* 遺伝子についても *B. thuringiensis* 標準株について PCR 法を用いて調査したが、それらの遺伝子を有している標準株はなかった。

今後、当教室で分離ならびに同定された *B. thuringiensis* 菌株の中で、*cryIII* 遺伝子を有する菌株が存在しているかどうかを調査するとともに、*cryIII* 遺伝子を有するような *B. thuringiensis* 菌株を供与してもらい、それぞれの *cryIII* 遺伝子特異的なプローブを作成するとともに、鞘翅目昆虫に活性の強い *B. thuringiensis* 菌株のスクリーニングに役立てる必要があると考えられた。

#### D. *B. thuringiensis* 菌株における *cryIV* 遺伝子の同定

##### 1. 目 的

SCHNEPF ら<sup>63)</sup> により、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 において、*cryIA(a)* 遺伝子のクローニングならびに塩基配列決定がなされて以来、現在までに、数十種類の *cry* 遺伝子が報告されている。また、HÖFTE and WHITELEY<sup>28)</sup> により、それらの *cry* 遺伝子の殺虫活性と塩基配列の相同性によって、*cryI* 遺伝子～*cryIV* 遺伝子まで分類されている。すなわち、*cryI* 遺伝子は鱗翅目昆虫に対して殺虫活性を持ち、*cryII* 遺伝子は鱗翅目・双翅目昆虫に対し

て、*cryIII* 遺伝子は鞘翅目昆虫に対して、*cryIV* 遺伝子が双翅目昆虫に対して活性を持つ *cry* 遺伝子として4つのグループに分類されている。前節までに PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法により、*B. thuringiensis* 菌株の有する *cryI* 遺伝子～*cryIII* 遺伝子の検索について述べた。

本報では、菊田<sup>40)</sup> および佐々木ら<sup>60)</sup> が北海道の土壌から分離した菌株の中で、H-serotype による同定により、subsp. *israelensis* とされた *B. thuringiensis* 菌株の *cryIV* 遺伝子について、PCR 法ならびにサザンハイブリダイゼーション法によって、それぞれの菌株の有する *cryIV* 遺伝子の同定を行った。

#### 2. 材料と方法

a 供試菌株：供試した *B. thuringiensis* 菌株の菌株名と分離源については表 11 に示した。また、対照として用いた subsp. *irsaelensis* 標準株は、北海道大学農学部応用分子昆虫学講座で継代されている ONR-60A 株とした<sup>30)</sup>。

b 供試菌株からの DNA の抽出：供試菌株からの DNA の抽出は、IIZUKA ら<sup>30)</sup> の方法で行い、さらに chromosomal DNA と plasmid DNA を分けるために CsCl による密度勾配遠心分離を行った<sup>36)</sup>。

c 供試菌株の *cryIV* 遺伝子の同定：供試菌株の *cryIV* 遺伝子の増幅は、SEN ら<sup>65)</sup> の *cryIVA* 遺伝子ならびに *cryIVB* 遺伝子、*cryIVC* 遺伝子<sup>72)</sup>、*cryIVD* 遺伝子<sup>16)</sup> の塩基配列をもとに、それぞれの特異的な遺伝子プライマー(表 12)を合成することにより、PCR 法によって ONR-60A 株から *cryIV* 遺伝子の増幅を試みた。増幅された DNA をプラスミドベクター pUC119 の *Sma* I 切断点にクローニングし、ダイデオキシ法にて塩基配列の決定を行った。

表 11 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 分離株  
Table 11 Isolates of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

Strain	Source	Reference
<i>israelensis</i>	type strain	
is-NKY 1-1	Kimobetu	Kikuta <i>et al.</i> (1989)
is-Tm 1-7	Ebetu	Kikuta <i>et al.</i> (1990)
is-Tm 1-8	Ebetu	Kikuta <i>et al.</i> (1990)
is-Fu 90-2-6	Furano	Sasaki <i>et al.</i> (1994)
is-KMK 1-10	Kaminokuni	Sasaki <i>et al.</i> (1994)
is-KMK 1-44	Kaminokuni	Sasaki <i>et al.</i> (1994)

表 12 cryIV 遺伝子検索に使用したプライマーの特徴  
**Table 12** Characteristics of primers used for cryIV gene screening

Primers set	Sequence
4D1 primers	4D15 5'-CGAGGTGAAATTTGCTCC
	4D13 5'-ATGGCTTGTTCGCTACATC
4D2 primers	4D25 5'-GGTGCTTCCTATCTTTGGC
	4D23 5'-ATGGCTTGTTCGTACATC
4D3 primers	4D35 5'-GGTGCTTCCTATCTTTGGC
	4D33 5'-TGACCAGGTCCTTGATTAC
4D4 primers	4D45 5'-ATGAATCCATATCAAAATAAG
	4D43 5'-AAGAAGCTTTGTTTAAATTAAC
4D5 primers	4D55 5'-ATGGAAGATAGTTCTTTAGAT
	4D53 5'-CTACTTTAGTAACGGATT

PCR 法による cryIV 遺伝子の増幅ならびにクローニングしたそれぞれの cryIV 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションによって、供試菌株の cryIV 遺伝子の同定を行った。

### 3. 結 果

本実験で合成した, cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD 遺伝子特異的なプライマーのセット (4D1, 4D2, 4D3, 4D4, 4D5 primers) を用いて, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ONR-60A 株の DNA をテンプレートとした PCR 法によって増幅された DNA についてクローニングし, 塩基配列決定による構造解析を行ったところ, 4D1 primers では cryIVB 遺伝子が増幅され, 4D3 primers によって cryIVA 遺伝子がそれぞれ増幅されていることが明らかとなった。また, 4D2 primers から増幅された DNA は cryIVA 遺伝子および cryIVB 遺伝子の共通領域であることが明らかとなった。さらに 4D4 primers で増幅された DNA が cryIVC 遺伝子であり, 4D5 primers によって増幅された DNA が cryIVD 遺伝子であることが確かめられた(図 3)。これらのことから, これらのプライマーを用いた PCR 法ならびに, それぞれの cryIV 遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによって, cryIVA, cryIVB, cryIVC ならびに cryIVD 遺伝子の同定が可能であることが明らかとなった。

そこで, 菊田<sup>40)</sup> ならびに佐々木<sup>60)</sup> によって, 分離・同定された *B. thuringiensis* 分離株の内, subsp. *israelensis* に同定された菌株の cryIV 遺伝子の同定を行った (表 13)。

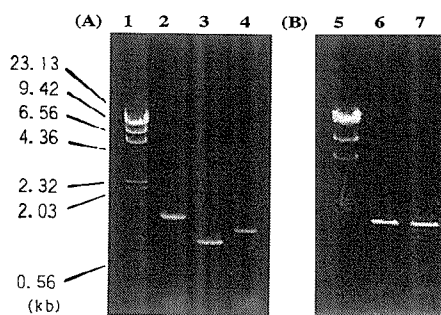


図 3 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ONR-60A 株全 DNA を鋳型とした cryIV 遺伝子検索用特異プライマーによる遺伝子増幅

**Fig. 3** Total DNA samples from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ONR-60A analyzed by PCR with mixture of cryIV-specific primers.

- (A)  
 Lane 1, λ-HindIII marker  
 Lane 2, amplified by 4D1 primers  
 Lane 3, amplified by 4D2 primers  
 Lane 4, amplified by 4D3 primers
- (B)  
 Lane 5, λ-HindIII marker  
 Lane 6, amplified by 4D4 primers  
 Lane 7, amplified by 4D5 primers

供試された subsp. *israelensis* 菌株すべてにおいて cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD 遺伝子が同定された。さらに, 供試菌株の plasmid DNA を, CsCl を用いた密度勾配遠心法<sup>36)</sup> で精製したところ, NKY1-1 株ならびに KMK1-44 株が, plasmid DNA 上に cryIVB 遺伝子を持たない株であることが明らかとなった (図 4)。

表 13 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 分離株より同定された cryIV 遺伝子

**Table 13** Identification of cryIV genes from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* isolates

Strain	cryIV genes
<i>israelensis</i>	cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD
is-NKY 1-1	cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD
is-Tm 1-7	cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD
is-Tm 1-8	cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD
is-Fu 90-2-6	cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD
is-KMK 1-10	cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD
is-KMK 1-44	cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD



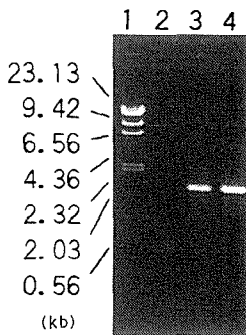


図4 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 株の染色体 DNA を鋳型とした 4D1 プライマーによる遺伝子増幅

Fig. 4 Chromosomal DNA samples from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strains analyzed by PCR with 4D1 primers.

Lane 1,  $\lambda$ -HindIII marker

Lane 2, subsp. *israelensis* ONR-60A

Lane 3, subsp. *israelensis* NKY1-1

Lane 4, subsp. *israelensis* KMK1-44

#### 4. 考 察

本報における供試した subsp. *israelensis* 菌株は、菊田<sup>40)</sup>ならびに佐々木<sup>60)</sup>によって走査電子顕微鏡観察が行われ、いずれも球状の結晶タンパク質を産生していた。また、SDS-PAGE によるプロトキシンペプチドの分析でもすべての菌株で、*cryIVA* ~ *cryIVD* 遺伝子のそれぞれの遺伝子由来のペプチドが検出された(図5)。さらに、菊田ら<sup>41)</sup>は、ヤマトヤブカ (*Aedes japonicus*) に対して殺虫活性試験を行ったところ、subsp. *israelensis* と同定されたこれらの菌株すべてにおいて殺虫活性が認められたとしている。しかしながら、殺虫活性の強さに差が認められたと報告しているため、供試菌株の *cryIV* 遺伝子の同定を行った。

通常、subsp. *israelensis* の *cryIV* 遺伝子は、巨大 plasmid DNA 上にコードされている<sup>65)</sup>。そこで *B. thuringiensis* 菌株の巨大 plasmid DNA を効率よく抽出する方法である Iizuka ら<sup>30)</sup>の方法で DNA を抽出し、さらに CsCl を用いた密度勾配遠心分離法<sup>36)</sup>により抽出した DNA を、chromosomal DNA 分画と plasmid DNA 分画とに分けた。それらの DNA をテンプレートとして *cryIVB* 遺伝子の増幅を行ったところ、plasmid DNA 分画からは標準株では *cryIVB* 遺伝子が増幅されたが、NKY1-1 株と KMK1-44 株からは *cryIVB* 遺伝子が PCR 法に

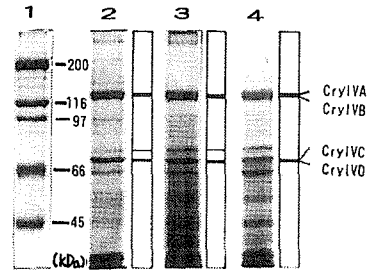


図5 SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) 電気泳動による *israelensis* 株結晶タンパク質の解析

Fig. 5 SDS-Polyacrylamide gel (10%) electrophoresis of crystal proteins from *israelensis* strains

Lane 1: Molecular weight marker

Lane 2: *israelensis* reference strain

Lane 3: *israelensis* KMK1-44

Lane 4: *israelensis* NKY1-1

よって増幅されなかった。しかしながら、両株とも *cryIVB* 遺伝子は、精製した chromosomal DNA 分画から PCR 法で増幅された(図4)。さらに、*cryIVB* 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、両株の *cryIVB* 遺伝子が、ほかの株とは異なり chromosomal DNA 上に存在していることが明らかとなった。

菊田ら (1990) が、NKY1-1 株がほかの subsp. *israelensis* 菌株よりヤマトヤブカに対して殺虫活性が強いことを報告していることと、NKY1-1 株が他の供試した菌株同様、*cryIV* 遺伝子を4種類有していることから、殺虫活性の強さと *cryIV* 遺伝子が chromosomal DNA 上にコードされることが関係するのではないかと考えられた。OHBA ら<sup>55)</sup>は、北海道の土壌から分離された *B. thuringiensis* 菌株の中で、subsp. *israelensis* に同定される菌株が、*cryIV* 遺伝子のいずれをも持たず双翅目昆虫に活性を有さない株が存在すると報告している。本報告で供試した北海道の土壌から分離された菌株にはこの *cryIV* 遺伝子を有さないタイプの subsp. *israelensis* 株は存在しなかった。

今後は、それぞれの *cryIV* 遺伝子を、*B. thuringiensis* の結晶非産生株等で発現させ、それぞれの *cryIV* 遺伝子の殺虫活性の強さを調べるとともに、chromosomal DNA 上に *cryIVB* 遺伝子がコードされている菌株のそれぞれの *cryIV* 遺伝子のプロ

モーター活性の強さを調べることで、より双翅目昆虫に殺虫活性の強い *B. thuringiensis* 株の選抜に応用できると考えられた。

### III. 新規 *B. thuringiensis* 菌株の発見

#### A. *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 株の結晶タンパク質遺伝子のクローニングならびに構造解析

##### 1. 目的

*B. thuringiensis* は、グラム陽性の土壌細菌であり、通常桿状の栄養細胞で増殖し、貧栄養条件下では芽胞を形成する。*B. thuringiensis* は、芽胞形成時には、殺虫性結晶タンパク質 (insecticidal crystal protein: ICP) を産生する。

*B. thuringiensis* の産生する ICP は、ひし型、サイコロ型、平板型、不定形等様々な形態を有することが知られている<sup>34)</sup>。これらの ICP は、鱗翅目、双翅目、鞘翅目昆虫の幼虫に対する特異的な殺虫活性が知られており、HÖFTE and WHITELEY<sup>28)</sup> は、それまでに報告された ICP 遺伝子の塩基配列の相同性ならびに特異的殺虫活性を基に *cryI* ~ *cryIV* 遺伝子に分類した。

鞘翅目昆虫に対し殺虫活性を示す *B. thuringiensis* として、ハムシ科 (Chrisomelidae) の昆虫に対し殺虫活性を示す subsp. *tenebrionis* が知られているが、コガネムシ幼虫に対し殺虫活性を示す *B. thuringiensis* の報告はなされていなかった。近年、*B. thuringiensis* 分離株中にドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*)、ヒメコガネ (*Anomala rufocuprea*)、マメコガネ (*Popillia japonica*) に対し殺虫活性を有する菌株が発見され、コガネムシ幼虫に対する新しい微生物農薬としての可能性を持っているため注目されている<sup>54)</sup>。分離された菌株は、H-serotype による同定により subsp. *japonensis* に分類され、strain Buibui と命名された。本教室保存の subsp. *japonensis* に属する *B. thuringiensis* 分離株についてドウガネブイブイに対して活性を有する株を検索したところ、*B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 株において活性が見出された。本報では、この N141 株の *cry* 遺伝子のクローニングならびに遺伝子構造解析を行い、Buibui 株の *cry* 遺伝子との比較を行った。さらに、クローニングした N141 株の *cry* 遺伝子を *B. thuringiensis* 結晶非産生株に導入ならびに発現させその性状を比較した。

## 2. 材料と方法

a 供試菌株：本実験では、本教室保存の *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 株 (日産化学工業(株)生物科学研究所由来) を用いた (図 6)。

b SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動：N141 株の産生するプロトキシンを解析するために、MINI PROTEAN II 1-D (BIO-RAD 社) を用いた SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (分離ゲル濃度 7.5%) を行った。プロトキシンの精製の方法は、飯塚・寺江<sup>35)</sup> の方法に従って行った。

c N141 株 ICP 抗体の作製：N141 株の ICP 遺伝子をクローニングするにあたり、抗体法を用いたスクリーニングを行うために、その ICP に対する抗体を作製した。抗体作製の方法は、“Guide to Protein Purification”を参考にした<sup>14)</sup>。N141 株の ICP 抗原は、SDS-PAGE (分離ゲル：7.5%) した後、ICP 由来のプロトキシバンドを切りだし、電氣的に溶出して回収した。回収したペプチドが単一なバンドであることを SDS-PAGE (分離ゲル：7.5%) を行い確認した後、1 M リン酸緩衝液を加え SDS を除去して抗体作成のための ICP 抗原とした。純化した ICP 抗原を用いてモルモットに対し免疫し、抗体を作製した。

d N141 株からの DNA 抽出：N141 株からの DNA 抽出は、IIZUKA<sup>30)</sup> に従って行った。

e  $\lambda$  gt11 を用いた N141 株の DNA ライブラリー ( $\lambda$  gtN141) の作成： $\lambda$  gt11 を用いた DNA ライブラリー作成は、Lambda gt11 CLONING KIT (STRATA GENE) を使用して行った。N141 株の DNA を制限酵素 *EcoRI* で部分消化を行った後、アガロースゲル電気泳動を行った。約 2~5 kbp の DNA 断片をゲルから切りだし回収し、インサート DNA 断片とした。 $\lambda$  gt11 predigest arms (1  $\mu$ g) とインサート DNA 断片 (1  $\mu$ g) とを混合した溶液に、10 mM ATP を含む 10 $\times$  Ligation buffer (KIT に備え付け) 0.5  $\mu$ l, T4 DNA Ligase 0.5  $\mu$ l (175 Unit) を加え、蒸留水で総量を 5  $\mu$ l とし、4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置した。

f  $\lambda$  gtN141 ライブラリーの N141 株 ICP 抗体によるスクリーニング： $\lambda$  gtN141 ライブラリーの *in vitro* パッケージングは、GIGAPACK PACKAGING KIT (STRATA GENE) を用い、そのマニュアルに従って行った。パッケージングした  $\lambda$

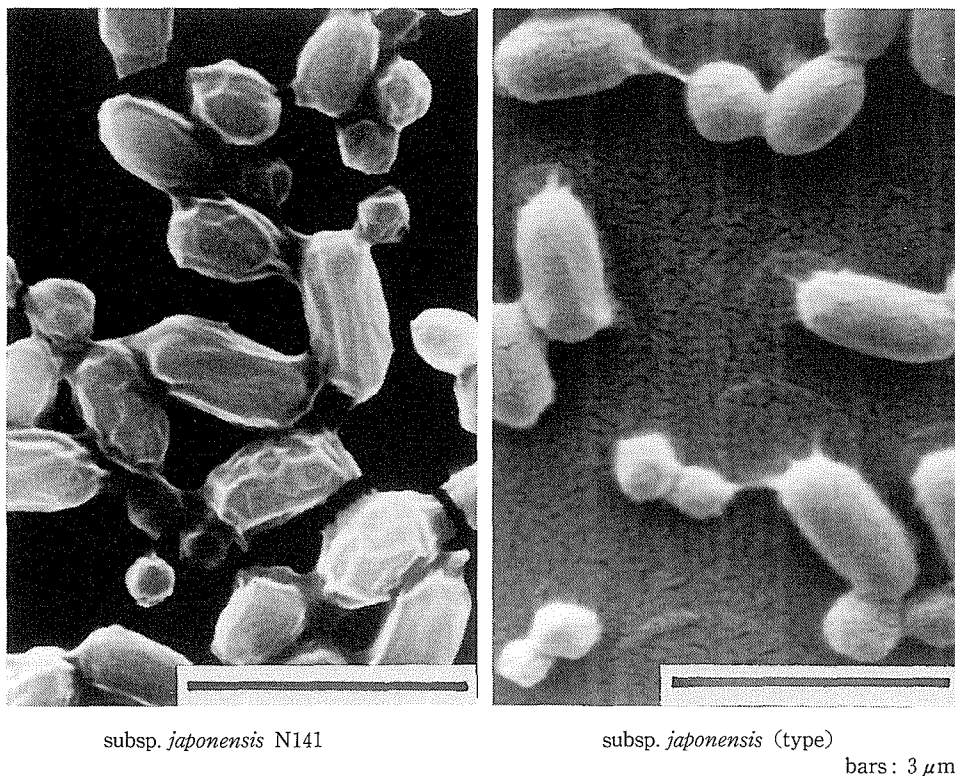


図6 *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 と subsp. *japonensis* (標準株) の走査電子顕微鏡写真  
 Fig. 6 Scanning electron micrographs of *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 and subsp. *japonensis* (type strain)

gtN141 ライブラリーのタイトレーションを行い、プレート上にプラークが数百個認められる濃度でプレーティングした。あらかじめオートクレーブで滅菌し 10 mM IPTG 溶液を染み込ませた後、乾燥させたニトロセルロースフィルターをプレート上にのせ、37°C で 3 時間、保温した。フィルターをプレートから剥し、TBST buffer (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween20) で洗浄した後、BLOTTO (3% Blocking reagent in TBST buffer) に浸し、4°C で 1 時間保存した。

ライブラリー ( $\lambda$  gtN141) のエンザイム免疫アッセイ (EIA) によるスクリーニングは、VECTASTAIN ABC Kit (Vector Lab. 社製) を使用し、そのマニュアルに従った。

g *cryN141* 遺伝子の塩基配列の決定：*cryN141* 遺伝子の塩基配列の決定は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP と T7 DNA ポリメラーゼを用いた、ダイデオキシ法<sup>59)</sup>で行った。塩基配列決定に用いたシーク

エンプライマーは、M13 プライマー-M4 と M13 プライマー-RV を用いた。

h *cryN141* 遺伝子の *B. thuringiensis* 結晶非産生株での発現ならびに殺虫活性判定：*cryN141* 遺伝子の発現は、SASAKI ら<sup>61)</sup>の方法をもとに、大腸菌 (DH5  $\alpha$  MCR)  $\cdot$  *B. thuringiensis* 結晶非産生株に *cry* 構造遺伝子 $\cdot$ プロモーター領域 $\cdot$ ターミナル領域を pHY300PLK (ヤクルト社製) に組み込んで、エレクトロポレーション法を用いて導入し、テトラサイクリン (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む培地上で 3 日間、30°C で培養した後、浅野 $\cdot$ 飯塚<sup>2)</sup>の方法で、*cryN141* 発現タンパク質のプロトキシン解析を行った。

### 3. 結 果

コガネムシ類に対する微生物農薬として、主に *B. popilliae* var. *popilliae* が用いられているが、近年、*B. thuringiensis* 分離株中に数種のコガネムシ幼虫に対し殺虫活性を示す菌株が発見され、新しい微生物農薬の可能性を持っていることで注目されてい

る<sup>54</sup>。分離された菌株は, subsp. *japonensis* に分類され, strain Buibui (以下 Buibui 株) と命名された。本教室保存の subsp. *japonensis* に属する *B. thuringiensis* 分離株についてドウガネブイブイ (*Anomalacuprea*) に対する活性を検索したところ, *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 株 (以下 N141 株) がドウガネブイブイに対し殺虫活性を有することが認められた。

初めに, N141 株の ICP 形態を SEM を用いて観察した(図 6)。N141 株は, subsp. *japonensis* の type strain<sup>52</sup>、Buibui 株<sup>54</sup> と同様に不定型の結晶を産生していた。また, N141 株の ICP を構成するペプチドを SDS-PAGE により解析したところ, type strain と同じ約 130 kDa 付近にペプチドが認められた(図 7)。このペプチドが N141 株の ICP の主要な構成要素であると考えられたため, この約 130 kDa のペプチドをコードする *cryNI41* 遺伝子のクローニングを行った。

N141 株の *cry* 遺伝子のクローニングを行うために, まず N141 株の ICP 抗体をモルモットにて作製した。抗原として SDS-PAGE により分画された約 130 kDa のペプチドをモルモットに対し免疫し, 得られた抗体を N141 株の ICP 抗体とした。作製した抗体の性状を調べるために, N141 株, subsp. *japonensis* (type strain), 鞘翅目に対し殺虫活性を

有する subsp. *morrisoni* tenebrionis の ICP のペプチドについて, ウェスタンブロットングおよび EIA による解析を行った。その結果, N141 株と type strain には, ICP 由来の約 130 kDa のバンドに対し, 抗体反応のシグナルが検出された(図 7)。この抗体を用いたイムノスクリーニングにより, N141 株の ICP 由来の約 130 kDa のペプチドをコードする遺伝子のスクリーニングを行った。

N141 株の遺伝子ライブラリー作製のため, N141 株の全 DNA を制限酵素 *EcoRI* で部分消化し, 約 2~5 kb の DNA 断片を回収した。この DNA 断片を  $\lambda$  gt11 にライゲーション後, *in vitro* パッケージングを行い N141 株の遺伝子ライブラリー ( $\lambda$  gtN141) とした。

この  $\lambda$  gt141 ライブラリーに対して, N141 株の ICP 抗体を用いたイムノスクリーニングを行った。その結果, N141 株の ICP 抗体と抗原抗体反応のシグナルを示すプラーク ( $\lambda$  gN1) が得られた。そこで,  $\lambda$  gN1 のインサート DNA の解析を行った。 $\lambda$  gN1 より DNA を抽出し制限酵素 *EcoRI* で処理した後, 0.8%アガロースゲルで電気泳動を行った。その結果, 3.4 kb のインサート DNA 断片が認められた(図 8)。このインサート DNA 断片をプラスミドベクター pBluescript II SK(-) にサブクローニングし (pBN1), 制限酵素地図を作製した(図 9)。

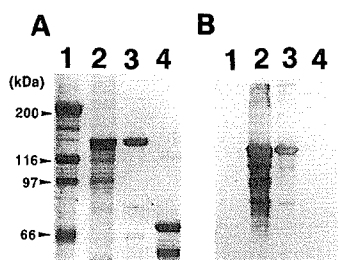


図 7 SDS-ポリアクリルアミドゲル (7.5%) 電気泳動 (A) とウェスタンブロット解析 (B)

Fig. 7 SDS-PAGE analysis and western blotting analysis

- (A) SDS-polyacrylamide gel (7.5%) stained with coomassie brilliant blue
- (B) Western blotting analysis
- Lane 1: Molecular weight marker
- Lane 2: subsp. *japonensis* strain N141
- Lane 3: subsp. *japonensis* (type strain)
- Lane 4: subsp. *morrisoni* tenebrionis

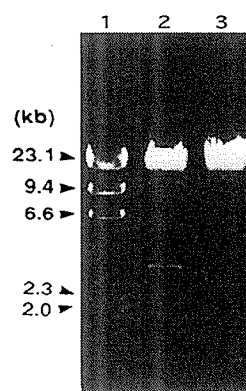


図 8  $\lambda$  gN1 と  $\lambda$  gt11 のアガロースゲル電気泳動結果

Fig. 8 Agarose gel electrophoretic analysis of  $\lambda$  gN1 and  $\lambda$  gt11

- Lane 1: Molecular weight marker
- Lane 2: *EcoRI*-digested  $\lambda$  gN1
- Lane 3: *EcoRI*-digested  $\lambda$  gt11

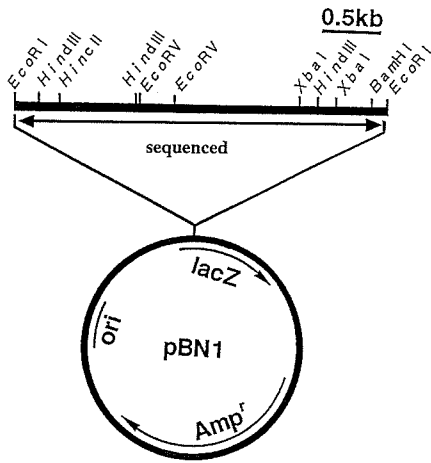


図9 pBN1の制限酵素地図

Fig. 9 Restriction map of pBN1

pBN1の0.8 kb *Hind*III断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行うことによって、pBN1がN141株由来のDNAであるか確かめた(図10)。N141株の全DNAにおいては、chromosomal DNAにハイブリダイズのシグナルが検出された。制限酵素 *Eco*RIと *Eco*RVで処理したN141株のDNAにおいてもそれぞれシグナルが検出され、制限酵素 *Eco*RIで処理したN141株のDNAには、pBN1のインサートDNAと同じ3.4 kbにシグナルが検出された。これらのことより、クローニングした3.4 kb DNA断片は、N141株のchromosomal DNA上に存在していることが示唆された。また、type strainのchromosomal DNAに対し、微弱なシグナルが検出された。

pBN1にコードされているペプチドを解析するために、pBN1で大腸菌(DH5  $\alpha$  TM)を形質転換しIPTGの誘導によって発現させたタンパク質を、ウエスタンブロットングおよびN141株のICP抗体を用いたEIAにより解析した。その結果、pBN1

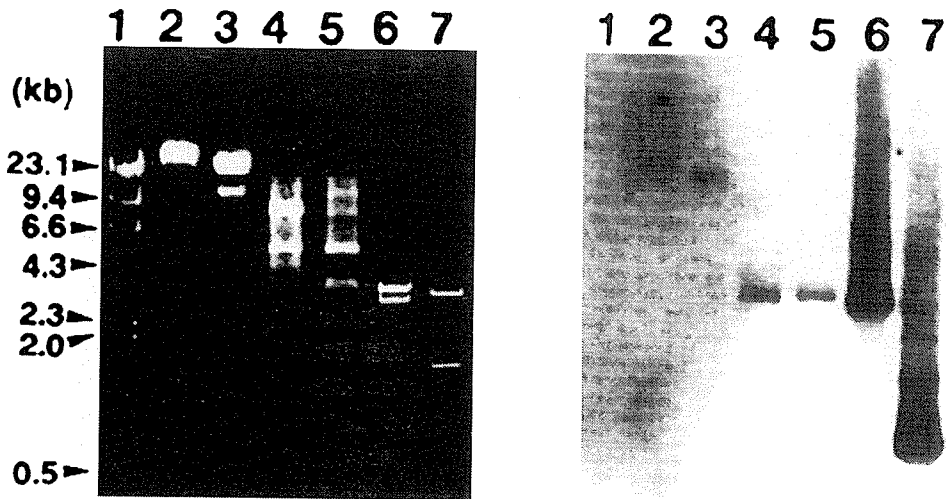


図10 サザンハイブリダイゼーション解析

Fig. 10 Southern hybridization analysis

- Lane 1: Molecular weight marker
- Lane 2: Genomic DNA of subsp. *japonensis* (type strain)
- Lane 3: Genomic DNA of subsp. *japonensis* strain N141
- Lane 4: *Eco*RI-digested genomic DNA of subsp. *japonensis* strain N141
- Lane 5: *Eco*RV-digested genomic DNA of subsp. *japonensis* strain N141
- Lane 6: *Eco*RI-digested pBN1
- Lane 7: *Hind*III-digested pBN1

を持つ形質転換体の約 130 kDa のペプチドに抗原抗体反応のシグナルが検出された (図 11)。

pBN1 の *Eco*RI の 3.4 kb 断片をダイデオキシ法により、塩基配列決定した (図 12)。決定した範囲における pBN1 の塩基配列について 3 つの枠についてオープンリーディングフレームの検索を行ったところ、1 つの大きなリーディングフレームが認められた。このフレームから推定されるアミノ酸配列をもとに Buihui 株の *cry* 遺伝子のアミノ酸配列<sup>29)</sup> とのホモロジー検索を行った。遺伝子情報処理ソフトウェア “SDC-GENETYX” によるドット・マトリクス法<sup>69)</sup> を用いたハープロット解析を行ったところ、いくつかの相同性の高い領域が認められた (図 13)。これらの領域は、*B. thuringiensis* の *cry* 遺伝子におけるアミノ酸配列コンサーブ領域<sup>28)</sup> を含んでいた。そこで pBN1 の今回解析を行ったフレームの

アミノ酸配列についてコンサーブ領域の検索を行った。その結果、このフレームのアミノ酸配列においても他の *cry* 遺伝子と同様に保存された 5 つの block が認められた (図 14)。以上の結果より、pBN1 は、N141 株の *cry* 遺伝子をコードしていた。しかしながら、pBN1 は塩基配列の決定によって、N141 株の *cry* 遺伝子の N 末端側の一部を含んでいないことが明らかとなった。

pBN1 が N141 株の *cry* 遺伝子の N 末端領域の一部をコードしていないことから、N141 の *cry* 遺伝子の N 末端領域のクローニングを行った。pBN1 の制限酵素地図と pBN1 インサート DNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果をもとに、N141 株の遺伝子ライブラリーから pBN2 クローンを得た。ダイデオキシ法による塩基配列の決定ならびに制限酵素地図作成により、この

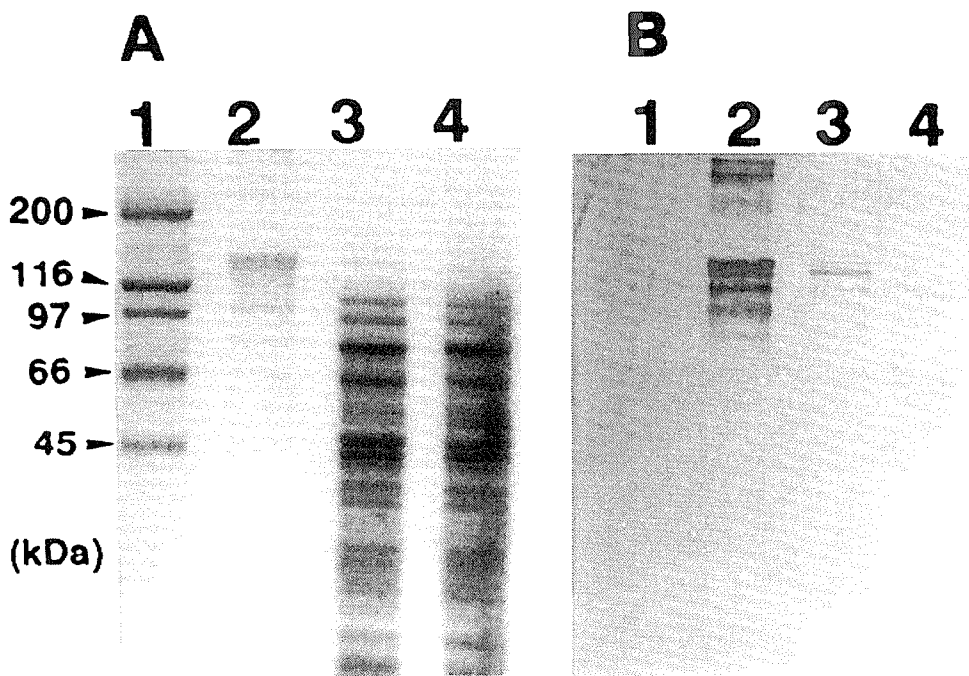


図 11 SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) 電気泳動 (A) とウエスタンブロット解析 (B)

Fig. 11 SDS-PAGE analysis and western blotting analysis

(A) SDS-polyacrylamide gel (10%) stained with coomassie brilliant blue

(B) Western blotting analysis

Lane 1: Molecular weight marker

Lane 2: subsp. *japonensis* strain N141

Lane 3: pBN1 (DH5 $\alpha$ )

Lane 4: pBluescript II SK(-) (DH5 $\alpha$ )

100  
 AATTCTGTATGGGACGCTTTTATGGAGAGAGTAGAAGAAGCTTATTGATCAAAAAATCTCAGAAGCAGTAAAGGGTAGGGCATTGGATGACCTAACTGGAT  
 N S V W D A F M E R V E E L I D Q K I S E A V K G R A L D D L T G L  
 200  
 TACAATATAATTATAATTTATATGTAGAAGCATTAGATGAGTGGGTGAATAGACCAAATGGCGCAAGGGCATCCTTAGTTTCTCAGCGATTAAACATTTT  
 Q Y N Y N L Y V E A L D E W L N R P N G A R A S L V S Q R F N I L  
 300  
 AGATAGCCTATTTACACAATTTATGCCAAGCTTTGGCTCTGGTCTGGAAGTCAAAAATTATGCAACTATATTACTTCCAGTATATGCACAAGCAGCAAAC  
 D S L F T Q F M P S F G S G P G S Q N Y A T I L L P V Y A Q A A N  
 400  
 CTTCATTTGTTATTATAAAGATGCAGACATTTATGGAGCTAGATGGGGCTGAATCAAACCTCAAATAGATCAATCCATTCTCGTCAACAAAGCCTTA  
 L H L L L L K D A D I Y G A R W G L N Q T Q I D Q F H S R Q Q S L T  
 500  
 CTCAGACTTATACAAATCATTGTGTTACTGCGTATAATGATGGATTAGCGGAATTAAGAGGCACAACCGCTGAGAGTTGGTTAAATACAATCAATATCG  
 Q T Y T N H C V T A Y N D G L A E L R G T T A E S W F K Y N Q Y R  
 600  
 TAGAGAAATGACTTTGACGGCAATGGATTTAGTGGCATTATCCCATATTATAATTTACGACAATATCCAGATGGGACAAATCCTCAACTTACACGTGAG  
 R E M T L T A M D L V A L F P Y Y N L R Q Y P D G T N P Q L T R E  
 700  
 GTCTATACAGATCCGATTGCATTTGATCCACTGGAACAACCAACTACTCAATTATGTCGATCATGGTACATTAACCCAGCTTTTGGAAATCATTGGAATT  
 V Y T D P I A F D P L E Q P T T Q L C R S W Y I N P A F R N H L N F  
 800  
 TCTCTGTACTAGAAAATTCATTGATTCGTCGCCCGCACCTTTTTGAAAGGTTAAGTAATTTGCAAATTTTAGTTAATTACCAAACAACGGTAGCGCTTG  
 S V L E N S L I R P P H L F E R L S N L Q I L V N Y Q T N G S A W  
 900  
 GCGTGGGTCAAGGGTAAGATACCATTATTTGCATAGTCTATAATACAGGAAAAAGTTACGGCCTCCTCAGTGATCCCGTTGGAGCTAATATCAATGTT  
 R G S R V R Y H Y L H S S I I Q E K S Y G L L S D P V G A N I N V  
 1000  
 CAAAATAATGATATTTATCAGATTATTTGCGAGGTTAGCAATTTTGCTAGTCTGTTGGCTCATCATATAGTGTGGGACACTAACTTTTATTGAGTT  
 Q N N D I Y Q I I S Q V S N F A S P V G S S Y S V W D T N F Y L S S  
 1100  
 CAGGACAAGTAAGTGGGATTTGAGGATATACACAGCAAGGTATACCAGCAGTTTGTCTTCAACAACGAAATCAACTGATGAGTTACCAAGCTTAAATCC  
 G Q V S G I S G Y T Q Q G I P A V C L Q Q R N S T D E L P S L N P  
 1200  
 GGAAGGAGATATCATTAGAAATATAGTCATAGTTATCTCATATAACCAATATCGTTTTCAAGCAACTCAAAGTGGTAGTCCATCAACTGTTAGCGCA  
 E G D I I R N Y S H R L S H I T Q Y R F Q A T Q S G S P S T V S A  
 1300  
 AATTTACCTACTTGTGTATGGACGCATCGAGATGTGGACCTTGATAATACCATTACTGCGAATCAAATTACACAAGTACCATTAGTAAAGGCATATGAGC  
 N L P T C V W T H R D V D L D N T I T A N Q I T Q L P L V K A Y E L  
 1400  
 TAAGTAGTGGTCTACTGTCGTGAAAGGTCCAGGATTCACAGGAGGAGATGTAATCCGAAGAACAATACTGGTGGATTCCGAGCAATAAGGGTGTGGT  
 S S G A T V V K G P G F T G G D V I R R T N T G G F G A I R V S V  
 1500  
 CACTGGACCGCTAACACAACGATATCGCATAAGGTTCCGTTAGCTTCGACAATAGATTTTGATTTCTTTGTAACACGTTGGGGAAGTACTATAAATAAT  
 T G P L T Q R Y R I R F R Y A S T I D F D F F V T R G G T T I N N  
 1600  
 TTTAGATTACACGTACAATGAACAGGGGACAGGAATCAAGATATGAATCCTATCGTACTGTAGAGTTTACAACCTCCTTTTAACTTTACACAAAGTCAAG  
 F R F T R T M N R G Q E S R Y E S Y R T V E F T T P F N F T Q S Q D  
 1700  
 ATATAATCGAACATCTATCCAGGGACTTAGTGGAAATGGGGAAGTATACCTTGATAGAATTGAAATCATCCCTGTGAACCCGGCAGGAGAAGCAGAAGA  
 I I R T S I Q G L S G N G E V Y L D R I E I I P V N P A R E A E E

図12 pBN1の塩基配列と推定アミノ酸配列

Fig. 12 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of pBN1 (continued)

```

                                                    1800
GGATTTAGAAGCAGCGAAGAAGCGGCTAGGCAGAAGCTGTTTACAGCTACAAGGGACGGATTACAGGTAATGTGACAGATTATCAAGTGGACCAAGCG
D L E A A K K A A R Q N L F T R T R D G L Q V N V T D Y Q V D Q A
                                                    1900
GCAAAATTTAGTGCATGCTTATCCGATGAACAATATGGGCATGACAAAAAGATGTTATTGGAAGCGGTAAGAGCGGCAAAACGCCTCAGCCGCGAAGCGCA
A N L V S C L S D E Q Y G H D K K M L L E A V R A A K R L S R E R N
                                                    2000
ACTTACTTCAAGATCCAGATTTTAATACAATCAATAGTACAGAAGAGAATGGCTGGAAGGCAAGTAACGGTGTACTATTAGCGAGGGCGGTCCATTCTT
L L Q D P D F N T I N S T E E N G W K A S N G V T I S E G G P F F
                                                    2100
TAAAGGTCGTGCACCTCAGTTAGCAAGCGCAAGAGAAAATTATCCAACATACATTTATCAAAAAGTAGATGCATCGGTGTTAAAGCCTTATACACGCTAT
K G R A L Q L A S A R E N Y P T Y I Y Q K V D A S V L K P Y T R Y
                                                    2200
AGACTGGATGGGTTGTAAGAGTAGTCAAGATTTAGAAAATGATCTCATTCACTATCATAAAGTCCATCTTGTGAAAAATGTACCAGATAATTTAGTAT
R L D G F V K S S Q D L E I D L I H Y H K V H L V K N V P D N L V S
                                                    2300
CCGATACTTACTCGGATGGTCTTGCAGTGAATGAATCGATGTGAGGAACAACAGATGGTAAATGCGCAACTGGAACAGAACATCATCATCCGATGGA
D T Y S D G S C S G M N R C E E Q Q M V N A Q L E T E H H H P M D
                                                    2400
TTGCTGTGAAGCGGCTCAAACACATGAGTTTTCTCCTATATTAATACAGGGGATCTAAATGCAAGTGTAGATCAGGGCATTGGGTTGTATTAAGTT
C C E A A Q T H E F S S Y I N T G D L N A S V D Q G I W V V L K V
                                                    2500
CGAACACAGATGGGTATGCGACGTTAGGAAATCTTGAATTTGGTAGAGTTGGGCCATTATCGGGTGAATCTCTAGAACGGGAACAAGAGATAATGCGA
R T T D G Y A T L G N L E L V E V G P L S G E S L E R E Q R D N A K
                                                    2600
AATGGAATGCAGAGCTAGGAAGAAAACGTGCAGAAATAGATCGTGTGATTTAGCTGCGAAACAAGCAATTAATCATCTGTTTGTAGACTATCAAGATCA
W N A E L G R K R A E I D R V Y L A A K Q A I N H L F V D Y Q D Q
                                                    2700
ACAATTAATCCAGAAATTTGGGCTAGCAGAAATTAATGAAGCTTCAAATCTTGTAGAGTCAATTCGGGTGTATATAGTGATACACTATTACAGATTCTT
Q L N P E I G L A E I N E A S N L V E S I S G V Y S D T L L Q I P
                                                    2800
GGGATTAACACGAAATTTACACAGAGTTATCCGATCGCTTACAACAAGCATCGTATCTGTATACGCTCGAAATGCGGTGCAAAATGGAGACTTTAAACA
G I N Y E I Y T E L S D R L Q Q A S Y L Y T S R N A V Q N G D F N S
                                                    2900
GTGGTCTAGATAGTTGGAATACAACCTACGGATGCATCGGTTACGCAAGATGGCAATATGCATTTCTTAGTTCTTTCGCATTGGGATGCACAAGTTTCTCA
G L D S W N T T T D A S V Q Q D G N M H F L V L S H W D A Q V S Q
                                                    3000
ACAATTGAGAGTAAATCCGAATTTGAAGTATGCTTACGTGTGACAGCAAGAAAAGTAGGAGGCGGAGATGGATACGTCACAATCCGAGATGGCGCTCAT
Q L R V N P N C K Y V L R V T A R K V G G G D G Y V T I R D G A H
                                                    3100
CACCAAGAACTCTTACATTTAATGCATGTGACTACGATGTAATGGTACGTATGTCATGACAATTCGTATATAACAGAAGAAGTGGTATTCTACCCAG
H Q E T L T F N A C D Y D V N G T Y V N D N S Y I T E E V V F Y P E
                                                    3200
AGACAAAACATATGTGGGTAGAGGTGAGTGAATCCGAAGTTTCACTTATATAGACAGTATTGAGTTTATTGAAACACAAGAGTAGAAGAGGGGGATCCT
T K H M W V E V S E S E G S F Y I D S I E F I E T Q E *
AACGTATAGCAACTATGAGAGGATACTCCGTACAACAAAAGATTAATAAGGTAATAAGTGAATGAAACCCCTACTGGTGAAGGTCTGGTAGGGGGTTC
ITACATGAAAAAATGTAGCTGTTTACTAAGGTATATAAAAAACAGCATATTTGATAGAAAAAATGAGTACCTTATAAAGAAAAGAAATTC

```

図 12 pBN1 の塩基配列と推定アミノ酸配列

図中の矢印は逆方向反復配列を示す

Fig. 12 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of pBN1

Arrows denote the inverted repeat described in the text



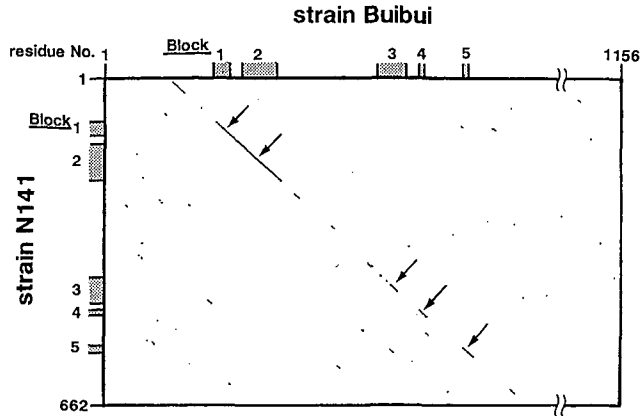


図13 N141株とBuibui株とのアミノ酸配列相同性のドットマトリックス比較  
サーチ条件 (Match  $\geq$  6/15, not scored)

Fig. 13 Dot matrix comparison of amino acid sequence homology  
between strain N141 and strain Buibui  
Under the searching condition (Match  $>$  6/15, not scored)

pBN2はN141株の *cry* 遺伝子のN末端領域を含んでいることが明らかとなった(図15)。

pBN2クローンの一部塩基配列を決定した結果(図16), このクローンはN141株の *cry* 遺伝子のプロモーター領域を含んでいることが明らかとなった。このpBN2クローンとpBN1クローンを組み合わせる(pBN3)ことで, N141株の *cry* 遺伝子のORFを完全にコードし, さらにその *cry* 遺伝子のプロモーター領域ならびにターミナル領域を含むプラスミド(pHY/*cry*N141E)を構築した(図17)。構築したプラスミドは, エレクトロポレーション法によって, *B. thuringiensis* 結晶非産生株に導入され, 結晶非産生株で結晶を産生していることが, SEMによる観察(図18)によって確かめられた。

#### 4. 考 察

近年, 数種コガネムシ幼虫に対し殺虫活性を有する *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* strain Buibui (Buibui株) が分離され<sup>54)</sup>, コガネムシ幼虫に対する微生物農薬としての可能性を持っていることで注目されている。本教室保存の subsp. *japonensis* に属する *B. thuringiensis* 分離株についてドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*) に対し活性を有する株を検索したところ, subsp. *japonensis* N141 (N141株) がBuibui株同様にドウガネブイブイに殺虫活性を有することが認められた。したがって, 本実験ではこのN141株が産生するICPがBuibui

株のICPと同じ *cry* 遺伝子によってコードされているのかを確かめるために以下の実験を行った。

N141株は, SEMによる観察により不定型のICPの産生が確認され(図6), またSDS-PAGEによる解析結果よりこのICPが主に約130kDaのペプチドにより構成されている(図7)と考えられた点において, subsp. *japonensis* の type strain<sup>2)</sup>, Buibui株<sup>70)</sup>と一致しており, 特に相違は認められなかった。しかしながら, type strainはコガネムシ類に対する殺虫活性の報告はなされておらず<sup>54)</sup>, N141株はBuibui株同様のICP遺伝子を有すると考えられた。そこで, N141株のICP由来のペプチドである

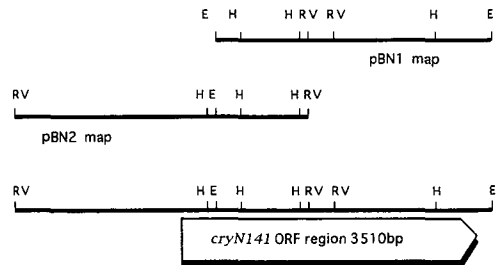


図15 pBN1, pBN2およびpBN3の制限酵素地図  
E: *Eco*RI, H: *Hind*III, RV: *Eco*RV  
Fig. 15 Restriction maps of pBN1, pBN2 and pBN3  
E: *Eco*RI, H: *Hind*III, RV: *Eco*RV

Block 1	
N141	87 YATILEPYYADAANCHLEEKDADLYGARW
Buibui	192 YETPLEETVYQAASCHLLVMDVQIYGKEW
cry I A(a)	153 YQVPLESYVQAANCHESVERQVSVFGQRW
cry I B	151 QEVPLEMVAQAANCHLEERDASLFGSEF
cry I G	186 AQILLESFASAAFFHELEERDATRIGTNE
cry IIIA	189 YEVLFETTYQAANTHLEEKDAQVFGEEW
cry IIIB	198 FEVLFETTYQAANTHLEEKDAQVFGEEW
cry IIIC	180 YEIPLLETVYQAANCHLEERDSTLYGDKW
cry IIID	187 YEVLFETTYQAANTHLEEKDAQVIGTDW
cry V	181 EEVPLEETVYQAANCHLEERDASIFGKEW
Block 2	
N141	137 YTNHCVTAVNDGLAELR--GTAESEIFKYNQYRREMTLETANDLVALEFPYINLROYPDGNTPOLTREYYE
Buibui	242 YSDHCQVWYNAGLNKLR--GTGAKQVDVYNFRRENNMVLDLVALFENYDARLYPLETNAELTREIFTE
cry I A(a)	203 YTDYAVRWYNTGLEERVW--GPDSDWVRYNQFRRELTEVLDDIVALEFNYDSRRYRIRIVSQLTREIYE
cry I B	201 YSDYCVWYNYNGENSLR--GTNAESVRYNQFRRLTEGLDLVALEFPSYDTRTYRINTSAQLTREYYE
cry I G	237 YTDYCVWYNYNGFNELRQGTSAWLEFHRYRREMTLWLDIVASESSLDITNYRLETDFQLSRVLYE
cry IIIA	239 YTDHCYKWNVNGDKLR--GSSYSEWVNFNRYRREMTLVLDEIATFELVDVRLYPKEVKTELETRDLTE
cry IIIB	248 YTDHCYKWNVNGENSLR--GSTYDAWVNFNRYRREMTLVLDEIIVLEFVDVRLYSKGVKTELETRDIFTE
cry IIIC	230 YSDHCYKWNVNGENSLR--GSTYEQHINYNFRREMTLMDLVALEFPHDPRYSMETSTQLTREYYE
cry IIID	237 YTNHCYKWNVNGDKLR--GSTEYEWVNFNRYRREMTLVLDEITELELYDVRTYTKGVKTELETRDLTE
cry V	231 YSYHCYKWNVNGENSLR--GTNAESVRYNQFRRLTEGLDLVALEFPSYDTRTYRINTSAQLTREYYE
Block 3	
N141	405 CVWTHRDVLDNTLTANQITQLPLKAYELSSGATVYKGPGETGGDVI
Buibui	495 FGVTHSSASRNFIYATKFSQIPINAKASRTSGGAVWVFQEGLYNGGPV
cry I A(a)	452 FSWTHRSAEFNNIIPSSQITQIPLETKSTNLGSGTSVYKGPGETGGDIL
cry I B	460 YSWTHRSADRTNTIGPNRIQIIPWKASELPGGTIVYRGPGETGGDIL
cry I G	502 YGVTHKSLARNNTINPDRITQIPELTKVDTRGTGVSYNDEPGFIGGALL
cry IIIA	491 LTNTHKSYDFFNMIDSKKITQLPLKAYELQSGASVWAGPRETGGDII
cry IIIB	502 FTWTHRSYDFFNTIDAEKITQLPEYKAYELSSGASVIEGPGGETGGNLL
cry IIIC	479 FSWTHRSAEYFNRIYPNKITKIPVYKMYKEDDPSTVYKGPGETGGDILV
cry IIID	494 FTWTHKSYDFFNTLDSEKITQIPFKAFIEVNSTSVWAGPGGETGGDII
cry V	489 YSWTHRSADRTNTIEPNSITQIPLVKAFNELSSGAAVVRGPGETGGDIL
Block 4	
N141	474 RYRIRERYAS
Buibui	567 RYRIRIRYAS
cry I A(a)	521 RYRVRIRYAS
cry I B	529 RYRIGERYAS
cry I G	561 QYRIRVRYAS
cry IIIA	560 KYRARIHYAS
cry IIIB	573 RYRVRIRYAS
cry IIIC	548 KYRVRVRYAT
cry IIID	564 YKIRIRYAS
cry V	558 RYRVRIRYAS
Block 5	
N141	549 VYLDRIEFIPVN
Buibui	648 LYIDRIEFIPVN
cry I A(a)	596 VYIDRIEFVPAE
cry I B	604 VYIDKIEIIPVT
cry I G	645 VYVDRIEFIPVN
cry IIIA	633 VYIDKIEFIPVN
cry IIIB	648 IYIDKIEFIPVQ
cry IIIC	626 FYVDSIEFIPVD
cry IIID	638 VYIDKIEFIPND
cry V	633 VYIDRIEFVVE

図 14 アミノ酸配列の保存領域群

この領域は *cry* 遺伝子にコードされる結晶タンパク質のすべてに保存されている

Fig. 14 Conserved amino acid sequence blocks

Amino acid sequence blocks conserved for all crystal proteins encoded by *cry* genes

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 TTTTAAATACATTGGAGTGAATAGACTGGTATTGGAGGAACAAGTATGAATCGAAATAATCAAATGAATATGAAGTTATTGATGCCCCACATTGTGGG  
 M N R N N Q N E Y E V I D A P H C G  
 TGTCGGGCAGATGATGTTGTAATAATCCTTTGACAGATGATCGGAATGCTGGATTGCAAAATATGAACATAAGGAATATTTACAAAACGTATGGTGGAG  
 C P A D D V V K Y P L T D D P N A G L Q N M N Y K E Y L Q T Y G G D  
 ACTATACAGATCCTCTTATTAATCCTAACTTATCTGTTAGTGGAAAAGATGTAATACAAGTTGGAATTAATATTGTAGGGAGATTACTAAGCTTTTTGG  
 Y T D P L I N P N L S V S G K D V I Q V G I N I Y G R L L S F F G  
 Eco RI  
 ATTCCTCTTTCTAGTCAATGGGTTACTGTATACCTATCTTTTAAACAGCTGTGGCCGGATGACGAGAATTCGTATGGGACGCTTTTATGGAGAGA  
 F P F S S Q W V T V Y T Y L L N S L W P D D E N S V W D A F M E R  
 500  
 GTAGAAGAAGTATTGATCAAAAAATCTCAGAAGCAGTAAAGGGTAGGGCATTGGATGACCTAACTGGATTACAATAAATTATAATTTATGTAGAAG  
 V E E L I D Q K I S E A V K G R A L D D L T G L Q Y N Y N L Y V E  
 CATTAGATGAGTGGCTGAATAGACCAAATGGCGCAAGGGCATCCTTAGTTCTCAGCGATTTAACATTTTAGATAGCCTATTTACACAATTTATGCCAAG  
 A L D E W L N R P N G A R A S L V S Q R F N I L D S L F T Q F M P S  
 CTTTGGCTCTGGTCTGGAAGTCAAAAATTGCAACTATATTACTTCCAGTATATGCACAAGCAGCAAACCTTCATTTGTTATTATTAAGATGCAGAC  
 F G S G P G S Q N Y A T I L L P V Y A Q A A N L H L L L L K D A D  
 ATTTATGGAGTAGATGGGGCTGAATCAAACCTCAAATAGATCAATTCCATTCTCGTCAACAAAGCCTTACTCAGACTTATACAATCATTGTGTTACTG  
 I Y G A R W G L N Q T Q I D Q F H S R Q Q S L T Q T Y T N H C V T  
 CGTATAATGATGGATTAGCGGAATTAAGAGGCACAACCGCTGAGAGTTGGTTTAAATACAATCAATATCGTAGAGAAATGACTTTGACGGCAATGGATT  
 A Y N D G L A E L R G T T A E S W F K Y N Q Y R R E M T L T A M D L  
 1000  
 AGTGGCATTATCCCATATTATAATTTACGACAATATCCAGATGGGACAAATCCTCAACTTACACGTGAGGTCTATACAGATCCGATTGCATTGTATCCA  
 V A L F P Y Y N L R Q Y P D G T N P Q L T R E V Y T D P I A F D P  
 CTGGAACAACCAACTACTCAATTATGTCGATCATGGTACATTAACCCAGCTTTTCGAAATCATTGAAATTTCTGTACTAGAAAATTCATTGATTCGTC  
 L E Q P T T Q L C R S W Y I N P A F R N H L N F S V L E N S L I R  
 CCCCGCACCTTTTTGAAAGGTTAAGTAATTTGCAAATTTAGTTAATTACCAAACAACGGTAGCGCTTGGCGTGGGTCGAAGGGTAAGATACCATTATTT  
 P P H L F E R L S N L Q I L V N Y Q T N G S A W R G S R V R Y H Y L  
 GCATAGTTCTATAATACAGGAAAAAAGTTACGGCCTCCTCAGTGATCCCGTTGGAGCTAATATCAATGTTCAAATAATGATATTTATCAGATTATTTGG  
 H S S I I Q E K S Y G L L S D P V G A N I N V Q N N D I Y Q I I S  
 CAGGTTAGCAATTTTGTAGTCTGTTGGCTCATATAGTGTGGGACTAATTTTATTTGAGTTCCAGGACAAGTAAGTGGGATTTCCAGGATATA  
 Q V S N F A S P V G S S Y S V W D T N F Y L S S G V S G I S G Y  
 Eco RV 1500  
 CACAGCAAGGTATACCAGCAGTTTGTCTTCAACAACGAAATTCAACTGATGAGTTACCAAGCTTAAATCCGGAAGGAGATATC  
 T Q Q G I P A V C L Q Q R N S T D E L P S L N P E G D I

図16 *cryNI41* の N 末端側塩基配列と推定アミノ酸配列

Fig. 16 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the N-terminal half in *cryNI41*

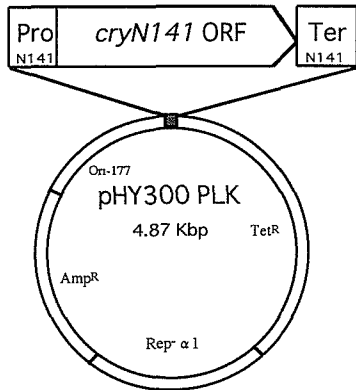


図 17 pHY/*cryN141* プラスミドの構築  
 Fig. 17 Construction of pHY/*cryN141*  
 Pro; Promoter  
 Ter; Terminator  
 Amp<sup>R</sup>; Ampicillin resistant  
 Tet<sup>R</sup>; Tetracycline resistant

130 kDa のペプチドを、モルモットに免疫し ICP 抗体を作製した。作製した N141 株の ICP 抗体を用いて、type strain と N141 株の ICP 由来のペプチドとの EIA を行った結果、どちらの株のペプチドにも抗原反応のシグナルが検出された (図 7)。このことにより、N141 株はコガネムシ類に活性のある ICP の他に、type strain と同様な ICP を有していることが示唆された。しかし、本実験では N141 株のコガネムシ類に対する殺虫活性に着目し、その活性を有す *cry* 遺伝子のクローニングを行った。

N141 株の *cry* 遺伝子 (*cryN141* 遺伝子) のクローニングは、まず  $\lambda$  gt11 を利用して N141 株の遺伝子ライブラリーを作製し、そのライブラリーを、N141 株の ICP 抗体によってスクリーニングした。その結果、3.4 kb のインサート DNA 断片をもつ  $\lambda$  gN1 が得られた (図 8)。この DNA 断片を解析するために、3.4 kb インサート DNA 断片をプラスミドベクター pBluescript II SK(-) の *Eco*RI 部位にサブク

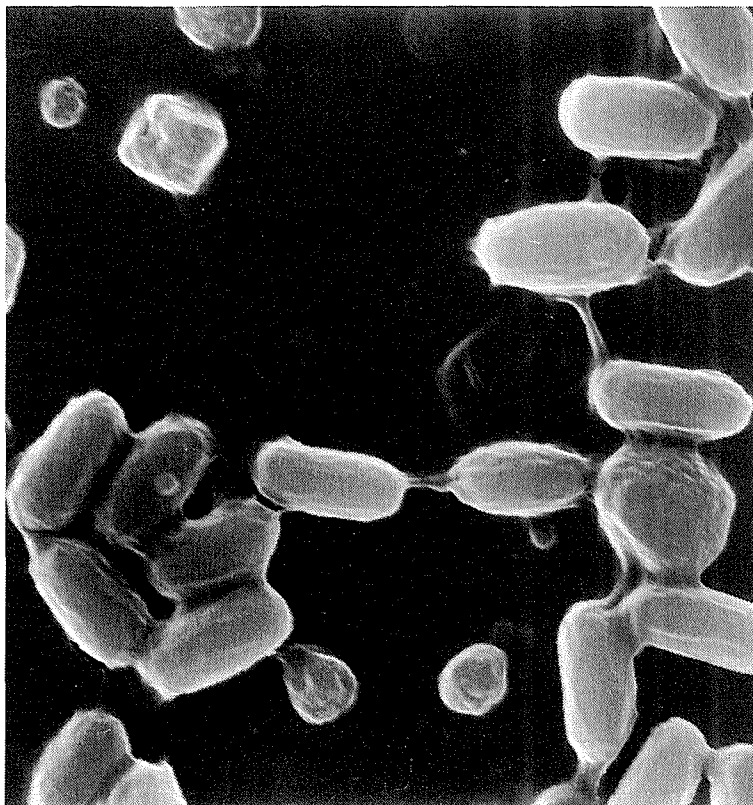


図 18 BT51 株で発現された *cryN141* タンパク質の電子顕微鏡写真  
 Fig. 18 Scanning electron micrograph of *cryN141* protein expressed in BT51 strain

ローニングした(図9)。

pBN1がN141株由来であることを確かめるために、pBN1の0.86 kb *Hind* III断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った結果、pBN1はN141株のchromosomal DNA上に存在していることが示唆された(図10)。また、type strainのchromosomal DNAに対して、微弱なシグナルが検出されたことから、type strainがプローブとして用いたpBN1の0.86 kb *Hind* III断片に対しホモロジーを有する領域を含んでいると考えられた。

pBN1にコードされている結晶タンパク質を解析するために、pBN1で大腸菌(DH5 $\alpha$ TM)を形質転換し、IPTGでの誘導によって発現させたタンパク質をN141株のICP抗体を用いたEIAにより解析したところ、pBN1を持つ形質転換体の約130 kDaのペプチドに抗原抗体反応のシグナルが検出された(図11)。以上の結果から、pBN1は*cryN141*遺伝子をコードしていると考えられた。そこでpBN1の構造解析を行うために、ダイデオキシ法によるpBN1塩基配列の決定を行った。

pBN1の*lacZ*遺伝子の5'側の*Eco*RI部位からインサートDNAの塩基配列を決定した(図12)。決定した範囲における3つの枠についてORFの検索を行ったところ、1つの大きなリーディングフレームが認められた。このフレームとベクターとして用いたpBluescript II SK(-)の*lacZ*遺伝子のフレームを検索したところ、これらのフレームは一致していた。このことからN141株のICP抗体に抗原抗体反応のシグナルを示したpBN1を持つ形質転換体の約130 kDaのペプチドは(図11)、*lacZ*遺伝子の $\beta$ -ガラクトシダーゼのN末端側の一部との融合タンパク質であると考えられた。

このフレームから推定されたアミノ酸配列とBuibui株の*cry*遺伝子のアミノ酸配列<sup>29)</sup>とのホモロジーをドット・マトリクス法により解析した。その結果、いくつかのホモロジーの高い領域が認められた(図13)。これらの領域は、*B. thuringiensis*の*cry*遺伝子に共通してみられる、アミノ酸配列における保存領域<sup>28)</sup>を含んでいた。そこでpBN1の解析を行ったフレームのアミノ酸配列について、保存領域(block 1~5)の検索を行ったところ、従来報告されている*cry*遺伝子と同様に保存された5つのblockが認められた(図14)。しかしながら、pBN1

とBuibui株の*cry*遺伝子が類似した遺伝子であると考えた場合、pBN1の解析した領域は、Buibui株の*cry*遺伝子のアミノ酸配列と比較してblock 1の上流域のアミノ酸の数が明らかに少なかったことから、pBN1は*cryN141*遺伝子の開始コドンからアミノ酸で100残基程度欠けていることが推察された。

pBN1の解析を行ったフレームのアミノ酸配列と、従来報告されている*cry*遺伝子のアミノ酸配列についてクラスター解析<sup>15)</sup>を行ったところ、pBN1は、Buibui株の*cry*遺伝子と*cryIG*遺伝子<sup>68)</sup>のグループとされた(図19)。このことから、*cryN141*遺伝子は、Buibui株の*cry*遺伝子の同様にドウガネブイブイに対し殺虫活性を有する可能性が考えられた。また、鱗翅目昆虫である*Galleria mellonella*に対する殺虫活性を有するICPをコードしている*cryIG*遺伝子とも類似していたことから、*cryN141*遺伝子は、鱗翅目昆虫に対しても殺虫活性を有する可能性も考えられ、興味が持たれた。

以上のことから、pBN1の解析したフレームのアミノ酸配列とBuibui株の*cry*遺伝子のアミノ酸配列において部分的に高いホモロジーが認められたものの*cryN141*遺伝子とBuibui株の*cry*遺伝子は、同一の遺伝子ではないことが示唆された。

*cryN141*遺伝子のN末端側の解析ならびにコードされている*cryN141*タンパク質の発現を解析するために、*cryN141*遺伝子ORFの全長クローンのクローニングを行った。pBN1の0.86 kb *Hind* III断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、制限酵素*Eco*RVで処理したN141株の全DNAの3.6 kb付近にシグナルが検出されたため(図10)、この3.6 kb付近の*Eco*RV断片の遺伝子ライブラリーを作製し、0.86 kb *Hind* III断片をプローブとしてスクリーニングを行った。その結果、pBN2がスクリーニングされ、このクローンが*cryN141*遺伝子の開始コドンおよび*cry*遺伝子のプロモーター領域に認められるモチーフを含むクローンであった(図15, 16)。一方、pBN1は、塩基配列決定によりN141株の*cry*遺伝子のstopコドンならびに*cry*遺伝子のターミネーターに特徴的に認められるinverted repeat(IR)を含むターミナル領域までコードしていた(図12, 16)。そこで、pBN1クローンとpBN2クローンを用いて、大腸菌ならびに枯草菌のシャトルベクターであるpHY300PLKに*cryN141*遺伝子発現プラスミドを構築した(図

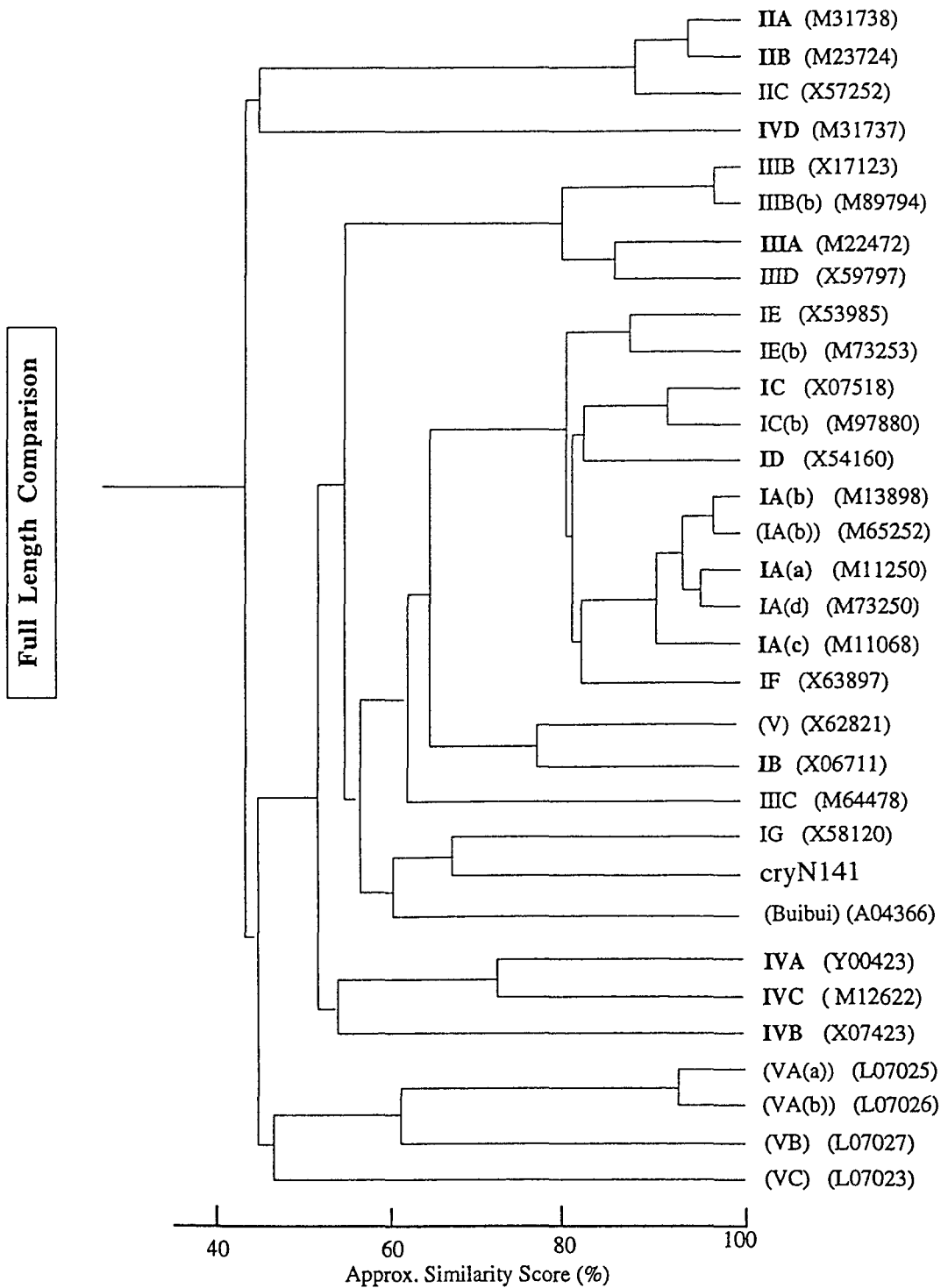


図 19 結晶タンパク質間におけるアミノ酸配列の相同性に基づくデンドログラム  
Fig. 19 Dendrogram showing amino acid sequence homology among crystal proteins

16, 17)。この構築された pHY/cryN141 は、大腸菌の MCR 株でのスクリーニングの後に、エレクトロポレーション法によって *B. thuringiensis* 結晶非産生株 (BT51 株) に導入した。その結果、BT51 株において結晶タンパク質を産生し (図 18) さらに、SDS-PAGE によるプロトキシン解析および N141 株の ICP 抗体を用いたエンザイムイムノアッセイによって cryN141 タンパク質が発現していることが明らかとなった。この発現タンパク質について数種鱗翅目昆虫 (カイコ、コナガ、ハスモンヨトウ) に対して殺虫活性判定を行ったが、殺虫活性は認められなかった。今後、その cryN141 発現タンパク質のドウガネブイブイに対する殺虫活性試験を行うことが必要である。また、cryN141 遺伝子のコガネムシ類の殺虫活性機構を解明することで、コガネムシ類に対する特異的殺虫活性機構の解明につながることを期待された。

#### IV. 総合考察

##### A *B. thuringiensis* の cry 遺伝子同定と新規 *B. thuringiensis* の cry 遺伝子について

本報告において、*B. thuringiensis* の ICP 遺伝子の同定を PCR 法を用いて行った。すなわち、cryI 遺伝子から cryIV 遺伝子それぞれの cry 遺伝子の特異的な領域を選び DNA プライマーを合成した。その結果、*B. thuringiensis* 菌株のそれぞれの cry 遺伝子同定を簡便に行うことができた。また *B. thuringiensis* 菌株における cryI 遺伝子の同定により数種鱗翅目昆虫に対する殺虫活性を推定することができた。*B. thuringiensis* 菌株における cryII 遺伝子の同定を行った結果、ヤマトヤブカに対して殺虫活性の強い *B. thuringiensis* 菌株の選抜が可能となった。cryIII 遺伝子の同定を行ったところ、当研究室保存の *B. thuringiensis* 分離株においては subsp. *morrisoni* tenebrionis の cryIIIA 遺伝子以外の cryIII 遺伝子は同定できなかった。今後、cryIIIB 遺伝子から cryIIID 遺伝子までの cryIII 遺伝子を有している *B. thuringiensis* 菌株を得、殺虫活性の調査ならびに cryIII 遺伝子のプローブ作成を行い、鞘翅目昆虫に対する殺虫活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の選抜を行う必要が考えられた。cryIV 遺伝子の同定を行ったことで、双翅目昆虫に対して強い殺虫活性を有している *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

の選抜が可能となった。

本実験において確立した PCR 法に基づいてこれらの *B. thuringiensis* 菌株の有する各 cry 遺伝子の同定を行った結果、ドウガネブイブイに活性を有する subsp. *japonensis* N141 株が選抜された。このため N141 株がコードしている cry 遺伝子のクローニングならびに塩基配列の決定を行ったところ、N141 株がコードしている ICP 遺伝子は、鱗翅目昆虫に殺虫活性を示す cryIA(a) 遺伝子ならびにドウガネブイブイに活性の他の cryN141 遺伝子を有することが明らかになった。cryN141 遺伝子は subsp. *japonensis* Buibui 株の ICP 遺伝子にアミノ酸配列において約 60% の相同性を有していた。ひきつづき cryN141 遺伝子を、結晶タンパク質を産生しない *B. thuringiensis* 菌株 (BT51) で大量に発現させた。今後は、さらに鞘翅目昆虫の詳細な殺虫活性検定を行う必要が考えられた。

以上のように *B. thuringiensis* 菌株の cry 遺伝子の同定を行うことでより殺虫活性の高い、また、殺虫活性スペクトラムの広い性質をもつ *B. thuringiensis* 菌株の選抜が可能となった。

#### 摘 要

本報告において、*B. thuringiensis* 菌株の有する cryI 遺伝子から cryIV 遺伝子までの同定を PCR 法によって簡単に行うことができた、この方法を用いて、当研究室で分離ならびに同定された *B. thuringiensis* 菌株の cry 遺伝子の同定を行った。その結果、ヤマトヤブカに対して強い殺虫活性を示す *B. thuringiensis* 菌株の選抜が可能となった。また、鞘翅目昆虫に対して殺虫活性を有する cryIII 遺伝子については、subsp. *morrisoni* tenebrionis 以外においては同定できなかった。

しかしながら、本報告において確立された PCR 法による *B. thuringiensis* 菌株の有する cry 遺伝子同定法によって、鞘翅目昆虫であるドウガネブイブイに対して殺虫活性を有する、新しい cry 遺伝子 (cryN141) を持つ subsp. *japonensis* N141 が選抜された。本報告では、この cryN141 遺伝子のクローニングならびに BT51 株での発現を行った。今後 cryN141 遺伝子発現タンパク質の殺虫活性検定を詳細に行う必要があると考えられた。

本報告で確立された、PCR 法を用いた *B. thuringiensis* 菌株の cry 遺伝子の同定により、有用な殺虫

活性を有する *B. thuringiensis* 菌株の選抜が可能となった。

### 謝 辞

本稿を草するにあたって、数々の御指導ならびに御助言をいただき、さらに本論文の御校閲をいただいた北海道大学農学部応用分子昆虫学講座教授飯塚敏彦博士に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の御校閲と適切な御助言を賜りました北海道大学農学部遺伝子制御学講座教授三上哲夫博士、植物ウイルス病学・菌学講座教授上田一郎博士、応用分子昆虫学講座助教授伴戸久徳博士に御礼申し上げます。

ならびに、本研究を遂行するにあたり御助言・御協力を賜りました北海道大学農学部応用分子昆虫学講座助手佐原健氏、*B. thuringiensis* 分離株等の供与ならびに御協力を賜りました北海道文理科短期大学微生物利用学講座助教菊田治典博士、Sandoz Agro 社山本敬司博士、北海道大学農学部応用分子昆虫学講座佐々木潤君、橋本直樹君、実験材料等の供与を賜りました北海道大学農学部農場養蚕部技官各位、応用分子昆虫学講座学生各位に心から御礼申し上げます。

### 引用文献

- ADANG, M. J., STAVER, M. J., ROCHELEAU, T. A., LEIGHTON, J., BARKER, R. F. and THOMPSON, D. V.: Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*, *Gene*, **36**: 289-300, 1985
- 浅野真一郎・飯塚敏彦: 菱形結晶を産生する *B. thuringiensis* のプロトキシンと家蚕に対する殺虫活性, 日蚕雑, **59**: 375-380, 1990
- 浅野真一郎・飯塚敏彦: DNA ハイブリダイゼーション法による *Bacillus thuringiensis* の家蚕殺虫活性判定, 日蚕雑, **60**: 475-479, 1991
- 浅野真一郎・伴戸久徳・菊田治典・飯塚敏彦: *cryII* 遺伝子プライマー合成による *Bacillus thuringiensis* 分離株の *cryII* 遺伝子同定, 日蚕雑, **62**: 210-215, 1993
- 浅野真一郎・佐々木潤・伴戸久徳・飯塚敏彦: *Bacillus thuringiensis* の *cryIIIa* 遺伝子の増幅と同定, 応動昆, **38**: 300-302, 1994
- BERLINER, E.: Über die Schlafsucht der Mehl-mottenraupe, *Z. Gesamte Getreidewesen (Berlin)*, **3**: 63-70, 1911
- BONNEFOI, A. and DE BARJAC, H.: Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire, *Entomophaga*, **7**: 221-229, 1963
- BOURQUE, S. N., VALERO, J. R., MERCIER, J., LAVOIE, M. C. and LEVESQUE, R. C.: Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 523-527, 1993
- CAROZZI, N. B., KRAMER, V. C., WARREN, W. G., EVOLA, S. and KOZIEL, M. G.: Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3057-3061, 1991
- CRICKMORE, N., NICHOLLS, C., EARP, D. J., HODGMAN, T. C. and ELLAR, D. J.: The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal delta endotoxin combinations, *Biochem. J.*, **270**: 133-139, 1990
- DE BARJAC, H. and BONNEFOI, A.: Essai de classification biocimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*, *Entomophaga*, **7**: 5-31, 1962
- DE BARJAC, H.: Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves d'*Aedes aegypti* et d'*Anopheles stephansi*, *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, **286**: 1175-1178, 1978
- DELANNAY, X., LAVALLEE, B. J., PROKSCH, R. K., FUCHS, R. L., SIMS, S. R., GREENPLATE, J. T., MARRONE, P. G., DODSON, P. B., AUGUSTINE, J. J., LAYTON, J. G. and FISCHHOFF, D. A.: Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein, *BioTechnology*, **7**: 1265-1269, 1989
- DEUTSCHER, P. M.: Guide to Protein Purification., 663-670, Academic Press, San Diego Calif., 1990
- DEVEREUX, J., HAEADRLI, P. and SMITHIES, O.: A comprehensive set of sequence analysis programs of the VAX, *Nucl. Acids Res.*, **12**: 387, 1984
- DONOVAN, W. P., DANKOSIK, C. and GILBERT, M. P.: Molecular characterization of a gene encoding a 72 kilodalton mosquito-toxic crys-



- tal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *J. Bacteriol.*, **170**: 4732-4738, 1988
17. DONOVAN, W. P., DANKOCSIK, C., GILBERT, M. P., GAWRON-BURKE, M. C., GROAT, R. G. and CARLTON, B. C.: Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. An insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *J. Biol. Chem.*, **263**: 561-567, 1988
  18. FERRE, J., REAL, M. D., VAN RIE, J., JANSSENS, S. and PEFFEROEN, M.: Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 5119-5123, 1991
  19. GE, A. Z., SHIVAROVA, N. I. and DEAN, D. H.: Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin protein., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 4037-4041, 1989
  20. GELERNTER, W. D.: Targetting insecticide-resistant markets: new developments in microbial based products. Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies, Series **4221**, 105-117, American Chemical Society, Washington, D. C., 1990
  21. GOLDBERG, L. and MARGALIT, J.: A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex nuivitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*, *Mosq. News*, **37**: 355-358, 1977
  22. GONZALEZ, J. M., DULMAGE, H. T. and CARLTON, B. C.: Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*, *Plasmid*, **5**: 351-365, 1981
  23. HALL, I. M., ARAKAWA, K. Y., DULMAGE, H. D. and CORREA, J. A.: The pathogenicity of strains of *Bacillus thuringiensis* to larvae of *Aedes* and *Culex* mosquitoes, *Mosq. News*, **37**: 2, 1977
  24. HANNAY, C. L.: Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria, *Nature (London)*, **172**: 1004, 1953
  25. HEIMPEL, A. M. and ANGUS, T. A.: The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus*, *Can. J. Microbiol.*, **4**: 531-541, 1958
  26. HEIMPEL, A. M.: A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria, *Ann. Rev. Entomol.*, **12**: 287-322, 1967
  27. HÖFTE, H., DE GREVE, H., SEURINCK, J., JANSSENS, S., MAHILLON, J., AMPE, C., VANDEKERCKHOVE, J., VANDERBRUGGEN, H., VAN MONTAGU, M., ZABEAU, M. and VAECK, M.: Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715, *Eur. J. Biochem.*, **161**: 273-280, 1986
  28. HÖFTE, H. and WHITELEY, H. R.: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Microbiol. Reviews*, **6**: 255-272, 1989
  29. HORI, H., SUZUKI, K., OGIWARA, K., MINAMI, M., HIMEJIMA, M., SAKANAKA, K., KAJI, Y., ASANO, S., SATO, R. and OHBA, M.: A new type of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin highly toxic to larvae of scarabaeidae, *Abstracts of SIP XXV Annual Meeting*, 236, 1992
  30. IZUKA, T., FAUST, R. M. and TRAVERS, R. S.: Isolation and partial characterization of extra-chromosomal DNA from serotypes of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to lepidopteran and dipteran larvae by Agarose gel electrophoresis, *J. Sericult. Sci. (Japan)*, **50**: 120-133, 1981
  31. 飯塚敏彦・石埜正穂・中島敏夫: 昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* の結晶性毒素の形態とプラスミド DNA, 北大農邦文紀要, **13**: 423-431, 1982
  32. IZUKA, T. and YAMAMOTO, T.: Possible location of the mosquitocidal protein in the crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *FEMS Microbiology Letters*, **19**: 187-192, 1983
  33. IZUKA, T. and GOTO, C.: Toxic effect of crystal protein from *Bacillus thuringiensis* on *Bombyx mori* and *Mamestra brassicae*, *J. Sericult. Sci. (Japan)*, **56**: 379-384, 1987
  34. 飯塚敏彦: 殺虫性タンパク質とその利用, 化学と生物, **27**: 287-302, 1989
  35. 飯塚敏彦・寺江尚子: *Bacillus thuringiensis* 結晶タンパク質の SDS-PAGE 解析, 日蚕雑, **58**: 308-314, 1989
  36. IZUKA, T., ARAKIDA, M., KIKUTA, H., ISHIDA, K., UYEDA, I. and SHIKATA, E.: Electron microscopic observation of the plasmid DNA bearing insecticidal crystal protein gene in *Bacillus thuringiensis*, *J. Sericult. Sci. (Japan)*, **58**: 448-456, 1989
  37. IZUKA, T., ISHIKAWA, S., ASANO, S., BANDO, H., ZHENG, Z. and MURAI, N.: Insecticidal

- activity of the CryIA(a) and CryIB delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* was related after the coding region of the gene was truncated and expression in *Escherichia coli*, *J. Sericult. Sci. (Japan)*, **63**: 303-309, 1994
38. KALMAN, S., KIEHNE, K. K., LIBS, J. L. and YAMAMOTO, T.: Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1131-1137, 1993
  39. 菊田治典・浅野真一郎・飯塚敏彦: 北海道の土壌から分離された *Bacillus thuringiensis* 一喜茂別町, 蘭越町, ニセコ町からの分離株一, 北大農邦文紀要, **16**: 383-389, 1989
  40. 菊田治典: 北海道における土壌および死亡昆虫から分離された *Bacillus thuringiensis* 株の検索, 酪農学園大学紀要, **15**: 1-69, 1990
  41. 菊田治典・土谷浩一・飯塚敏彦: 北海道から分離された *Bacillus thuringiensis* の蚊に対する殺虫活性株, 東北蚕糸研究報告, **15**: 39-40, 1990
  42. KNOWLES, B. H. and ELLAR, D. J.: Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific  $\delta$ -endotoxin, *J. Cell. Sci.*, **83**: 89-101, 1986
  43. KONDO, S., TAMURA, N., KUNITATE, A., HATTORI, A., AKASHI, A. and OHMORI, I.: Cloning and nucleotide sequencing of two insecticidal delta-endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis*, *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 455-463, 1987
  44. KREIG, A., HUGER, A. M., LANGENBRUCH, G. A. and SCHNETTER, W.: *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp, *Z. Ang. Entomol.*, **96**: 500-508, 1983
  45. LAMBERT, B., THEUNIS, T., AGUDA, K., VAN AUDENHOVE, K., DECOCK, C., JANSSENS, S., SEURINCK, J. and M. PEFEROEN: Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran-active crystal protein genes from strain BTII09P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Gene*, **110**: 131, 1992
  46. LAMBERT, B., HÖFTE, H., ANNYS, K., JANSSENS, S., SOETAERT, P. and M. PEFEROEN: Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2536-2542, 1992
  47. LECADET, M. M., FRACHON, E., COSMAO, D. V. and DE BARJAC, H.: An updated version of the *Bacillus thuringiensis* strains classification according to H-serotypes, *Abstracts of the Pacific Rim BT Conference*, 69, 1994
  48. LI, J., CARROLL, J. and ELLAR, D. J.: Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution, *Nature*, **353**: 815-821, 1991
  49. MARTENS, J. W. M., HONEE, G., ZUIDEMA, D., VAN LENT, J. W. M., VISSER, B. and VLAK, J.: Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells, *Appl. Env. Microbiol.*, **56**: 2764-2770, 1990
  50. 中谷育弘・浅野真一郎・伴戸久徳・飯塚敏彦: *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis cryIA(b)* 遺伝子の構造解析ならびに殺虫活性, 日蚕雑, **63**: 140-148, 1994
  51. OHBA, M. and AIZAWA, K.: A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenetic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*, *J. Invertebr. Pkthol.*, **33**: 387-388, 1979
  52. OHBA, M. and AIZAWA, K.: Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Japan, *Invertebr. Pathol.*, **47**: 12-20, 1986
  53. OHBA, M., YU, Y. M. and AIZAWA, K.: Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan, *System. Appl. Microbiol.*, **11**: 85-89, 1988
  54. OHBA, M., IWAHANA, H., ASANO, S., SUZUKI, N., SATO, R. and HORI, H.: A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles, *Appl. Microbiol. Lett.*, **14**: 54-57, 1992
  55. PADUA, L. E., OHBA, M. and AIZAWA, K.: The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae, *J. Invertebr. Pathol.*, **36**: 185-186, 1980
  56. PERLAK, F. J., DEATON, R. W., ARMSTRONG, T. A., FUCHS, R. L., SIMS, S. R., GREENPLATE, J. T. and FISCHHOFF, D. A.: Insect resistant cotton plants, *BioTechnology*, **8**: 939-943, 1990
  57. REEVES, E. L. and GARCIA, C. Jr.: Pathogenicity of bicrystalliferous *Bacillus* isolate for *Aedes aegypti* and other aedine mosquito larvae., *Proc. IV International Colloquium on*

- Insect pathology*, 219-228, 1970
58. RUPAR, M. J., DONOVAN, W. P., GROAT, R. G., SLANEY, A. C., MATTISON, J. W., JOHNSON, T. B., CRARLES, J. F., COSMAO-DUMANOIR, V. and DE BARJAC, H.: Two novel coleopteran toxic strains of *Bacillus thuringiensis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3337-3344, 1991
  59. SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**: 5463-5467, 1977
  60. 佐々木潤・浅野真一郎・伴戸久徳・飯塚敏彦: 北海道の土壌から分離した *Bacillus thuringiensis* 株の性状, *日蚕雑*, **63**: 361-366, 1994
  61. SASAKI, J., ASANO, S., IIZUKA, T., BANDO, H., LAY, B. W., HASTOWO, S. and YAMAMOTO, T.: Insecticidal activity of the protein encoded by the *cryV* gene of *Bacillus thuringiensis kurstaki* INA-02, (submitted) 1995
  62. SCHNEPF, H. E. and WHITELEY, H. R.: Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2893-2897, 1981
  63. SCHNEPF, H. E., WONG, H. C. and WHITELEY, H. R.: The amino acid sequence of a crystal protoein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence., *J. Biol. Chem.*, **260**: 6264-6272, 1985
  64. SEKAR, V., THOMPSON, D. V., MARONEY, M. J., BOOKLAND, R. G. and ADANG, M. J.: Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 7036-7040, 1987
  65. SEN, K., HONDA, G., KOYAMA, N., NISHIDA, M., NEKI, A., SAKAKI, H., HIMENO, M. and KOMANO, T.: Cloning and nucleotide sequences of the two 130 kDa insecticidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 873-878, 1988
  66. SHIBANO, Y., YAMAGATA, K., NAKAMURA, N., IIZUKA, T., SUGISAKI, H. and TAKANAMI, M.: Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein, *Gene*, **34**: 243-251, 1985
  67. SICK, A., GAERTNER, F. and WONG, A.: Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*, *Nucl. Acids Res.*, **18**: 1305, 1990
  68. SMULEVITCH, S. V., OSTERMAN, A. L., SCHEVELEV, A. B., KALUGER, S. V., KARASIN, A. I., KADYROV, R. M., ZAGNTIKO, O. P., CHES-TUKHINA, G. G. and STEPANOV, V. M.: Nucleotide sequence of a novel  $\delta$ -endotoxin gene *cryIG* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*, *FEBS Lett.*, **293**: 25-28, 1991
  69. STADEN, R.: An interactive graphics program for comparing and aligning nucleic acid and amino acid sequences, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 2951-2961, 1982
  70. SUZUKI, N., HORI, H. and ASANO, S.: Sensitivity of Cupreous clafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), in different larval stage to *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui, *Appl. Entomol. Zool.*, **28**: 403-405, 1993
  71. TAILOR, R., TIPPETT, J., GIBB, G., PELLIS, S., PIKE, D. JORDAN, L. and ELY, S.: Identification and characterization of novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae, *Molecular Microbiol.*, **6**: 1211-1217, 1992
  72. THORNE, L., GARMUNO, F., THOMPSON, T., DECKER, D., ZOUNES, M., WILD, M., WALFIELD, A. M. and POLLOCK, T. J.: Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*," *J. Bacteriol.*, **166**: 801-811, 1986
  73. TOUMANOFF, C. and VAGO, C.: PATHOLOGIE DES INSECTES- L'agent pathogene de la flacheris des Ver e aoie endemique dans la ragon des Cesnnes, *Bacillus cereus* var. *alesti* var. *nov.*, *Compt. Rend.*, **233**: 1504, 1951
  74. VAN FRANKENHUYZEN, K.: The challenge of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, 1-35, John Wiley & Sons Ltd. 1993
  75. VAN RIE, J., MCGAUGHEY, W. H., JOHNSON, D. E., BARNETT, D. and VAN MELLAERT, H.: Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, *Science*, **247**: 72-74, 1990
  76. VISSER, B., MUNSTERMAN, A., STOCKER, A. and DIRKSE, W. G.: A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein, *J. Bacteriol.*, **172**: 6783-

6788, 1990

77. WIDNER, W. R. and WHITELEY, H. R.: Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities, *J. Bacteriol.*, **171**: 965-974, 1989
78. YAMAMOTO, T. and MCLAUGHLIN, R. E.: Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to the mosquito larvae., *Aedes taenior-phynchus.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**: 414-421, 1981
79. YAMAMOTO, T. and POWELL, G. K.: *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: Recent Advances Understanding Its Insecticidal Activity, 3-42., Marcel Dekker, 1993

### Summary

A gene identification method utilizing polymerase chain reaction (PCR) was investigated in order to evaluate its application to *Bacillus thuringiensis cry* genes. A major objective of this study was to predict the insecticidal spectrum of a newly isolated *B. thuringiensis* strain based on its gene contents.

*B. thuringiensis* is known for its production of insecticidal proteins. Since these proteins are crystallized in the bacterial cells, they are called crystal proteins and their genes "cry." Numerous cry genes encoding for the insecticidal proteins have been identified. In this study, those genes were cloned and expressed in *Escherichia coli* to obtain pure proteins individually. Insecticidal activities of these proteins were determined in *Bombyx mori*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera litura*, *Aedes japonicus*, *Anomala cuprea*.

Proteins encoded by seven type-I cry genes, *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID* and *cryIE*, were found to be active against these lepidopteran species. However, activity level of each protein differed significantly. For example, the *CryIAa* protein was found to be very active against *B. mori* but not active against *S. litura*. The study

further indicated that the *CryIIA*, *CryIVA*, *CryIVB*, *CryIVC* and *CryIVD* proteins were active against *A. japonicus*, the mosquito species used in this study, while *CryIIB* was not. The *CryIIIA* protein has been reported to be active against coleopteran species such as *Leptinotarsa decemlineata*, but no activity was found against *A. cuprea*.

In order to determine cry gene types in *B. thuringiensis* isolates by the PCR method, a set of specific primers were designed for each gene and synthesized by a DNA synthesizer. The study demonstrated that these primers were specific enough to determine cry gene types in *B. thuringiensis* strains. A number of *B. thuringiensis* isolates were then screened with this PCR method, and their cry gene types were determined. When two sets of information, gene types and insecticidal activity spectra of individual gene products, became available, it was found that identification of gene types in a *B. thuringiensis* isolate could be used to obtain an accurate prediction of its insecticidal activity. Using this technique, several interesting *B. thuringiensis* strains with unique activities against dipteran and coleopteran species were isolated.

This study further describes cloning of a novel coleoptera-active cry gene. A *B. thuringiensis* strain called N141 was isolated from deceased *A. cuprea* and found to be quite active against this insect. A 135-KDa crystal protein was isolated from the N141 isolate. After the insecticidal activity of the isolated protein was confirmed an antiserum was produced against this protein. In order to clone the cry gene coding for this scarab beetle-active protein, a gene library was made in  $\lambda$ gt11. Cloning of this gene was made by antiserum screening of the  $\lambda$ gt11 library. The cloned gene was tentatively called *cryN141* and its full nucleotide sequence was determined. Sequencing revealed that this *cryN141* gene is quite unique as it differs by 40% from the previously known scarab beetle-specific cry gene (U04366).