

## *Bacillus thuringiensis* が産生する結晶性殺虫タンパク質 (クリスタル) の 臭化ナトリウム連続密度勾配遠心法による精製

向井 真也<sup>1</sup>, 岩山 順<sup>1</sup>, 森永 真二<sup>1</sup>, 武部 聡<sup>1,2</sup>

### 要旨

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*)が産生する結晶性殺虫タンパク質(クリスタル)の精製法を、双翅目特異的殺虫クリスタル生産菌 *Bt. subsp. israelensis* HD522 株およびその変異株を用いて検討した。クリスタル、孢子および細胞破砕物を含む粗抽出液を 30-40% NaBr 連続密度勾配遠心法を用いて分離したところ、クリスタルは 33% NaBr 付近に層を形成した。この濃度における密度の理論値は 1.318 g/cm<sup>3</sup>で、Ang & Nickerson の報告にある *Bt* クリスタルの密度 1.32 g/cm<sup>3</sup> と合致している<sup>(1)</sup>。SEM を用いた観察では、クリスタル層に孢子の混入はほとんど認められず、SDS-PAGE による構成タンパク質の確認では、殺虫タンパク質 (Cry) の分子量である 130 kDa タンパク質がメインバンドとして検出された。また、ネッタイシマカ幼生を用いた生物検定では、精製による殺虫活性の低下は認められなかった。

### 1. はじめに

*Bt* は土壌中や植物の葉の裏などに広く生息し、孢子形成期にクリスタルと呼ばれる八面体様の結晶構造をもったタンパク質顆粒を産生する。クリスタルに含まれる Cry タンパク質には殺虫性を示すものがあり<sup>(2,3)</sup>、殺虫効力の昆虫目特異性に優れているため生物農薬として利用されている<sup>(4)</sup>。また、*Bt* の殺虫タンパク質遺伝子は、農業害虫による食害対策のために遺伝子組換え作物に使われている。クリスタルの殺虫機構にはモデルが幾つかあり<sup>(5, 6, 7)</sup>、標的昆虫の中腸上皮細胞刷子縁膜にある膜タンパク質<sup>(8, 9)</sup>の認識が選択毒性に重要であると考えられている。しかしながら、クリスタルの殺虫機構や化学的な性質にはまだ不明な点も多く、この解明には純度の高いクリスタルの調製法が必須である。

クリスタルの精製は、まず孢子と分離する必要がある。クリスタルと孢子には密度差がある(1.32 g/cm<sup>3</sup> と 1.34-1.38 g/cm<sup>3</sup>)ので<sup>(1,10)</sup>、これを利用してスクロース<sup>(11)</sup>、塩化セシウム<sup>(12)</sup>、レノグラフィン<sup>(13)</sup>など密度勾配遠心法を用いた様々な方法が考案されてきた。しかし、スクロースは段階グラディエントのため精製度が低く、塩化セシウムやレノグラフィンはコストがかかりすぎる欠点がある。臭化ナトリウムは安価で粘性が低く扱いやすいという利点があるが、精製法は大量のサンプルを特殊な遠心分離機でバッチ処理するための報告<sup>(1, 14)</sup>しかなく、これを研究室レベルでの精製に用いるには不適當であった。そこで、私たちは *Bt. subsp. israelensis* HD522 株から抽出したクリスタル、および Cry4A タンパク質のみを発現する *Bti* 4Q7/pSI431 から抽出した単一 Cry タンパク質結晶を用いて、臭化ナトリウムによる実験室レベルでのクリスタル精製条件の検討を行った。

### 2. 材料・方法

#### 2. 1 菌株、プラスミド、試薬等

*Bt. subsp. israelensis* HD522 株は USDA より分与された。また、*Bt. subsp. israelensis* 4Q7 株(野生型 *Bti*4Q2 株の全プラスミド欠失株)は BGSC (*Bacillus* Genetic Stock Center, USA)から分与された。pSI431 は

原稿受付 2006年11月24日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.04-IV-14, 2005 の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院 生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

*Bacillus-E.coli* のシャトルベクター pHY300 PLK (*tel*, TAKARA) に *Bti* HD522 の *cry4Aa* (プロモーター領域およびターミネーター領域を含む) を挿入した組換えプラスミドである<sup>(15)</sup>。Cry4A タンパク質の調製に用いた。

プロテアーゼ阻害剤 Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, hydrochloride) はロシュ・ダイアグノスティクス社から、タンパク量定量試薬 Coomassie Protein Assay Reagent は PIERCE 社から、抗生物質 tetracycline、培地用試薬、その他の試薬はナカライテスク社から調達した。殺虫活性検定に用いたネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) は大日本除虫菊株式会社のご好意により、提供を受けた。

LB 培地 (1L): Tryptone Peptone 10 g, Yeast extract 5 g および NaCl 10 g にイオン交換水を加えて 1 L にした後、オートクレーブして用いた。テトラサイクリン添加時は終濃度 30  $\mu\text{g/ml}$  になるように加えた。

Schaeffer's Sporulation Medium (SSM, 1L): Nutrient Broth 8.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g および KCl 1.0 g にイオン交換水を加えて 1L にした後、オートクレーブした。その後、1 mM  $\text{FeSO}_4$  1 ml, 10 mM  $\text{MnCl}_2$  1 ml, 1 M  $\text{CaCl}_2$  1 ml を加えて使用した。テトラサイクリン添加時は終濃度 40  $\mu\text{g/ml}$  になるように加えた。

## 2. 2 粗クリスタル溶液の調製

*Bti* HD522 前培養液 5 ml (LB 培地、30°C、16 時間モノード振盪培養) を SSM 75 ml に植菌し、完全溶菌するまで 30°C で振盪培養した (~4 days)。この培養液を遠心分離 (9,000 rpm, 4°C, 10 min, JLA-16.250 ローター (BECKMAN)) し、上清を除いた。ペレットを crystal wash I 液 (0.5 M NaCl, 2% triton X-10) に懸濁した後、遠心分離によりペレット回収した。この洗浄操作を 3 回行った。同様の操作を crystal wash II 液 (0.5 M NaCl) を用いて 3 回、純水で 2 回を行い、ペレットを純水 3 ml に懸濁したものを粗クリスタルとした。このクリスタルには、Cry4A (134 kDa), Cry4B (128 kDa), Cry11A (72 kDa), Cyt1A (27 kDa) が含まれる。

*Bti* 4Q7/pIS431 前培養液 5 ml を SSM (tetracycline を含む) 75 ml に植菌し、30°C で振盪培養した。顕微鏡観察により封入体の形成が確認できたら、遠心分離 (9,000 rpm, 4°C, 10 min, JLA-16.250 ローター) により集菌し、0.4 mM Pefabloc SC 38 ml に懸濁した。超音波破碎処理 (Duty 75%, Pulse 12 s, 出力レベル 3~3.5, 20 min, SONIFER 450D (BRANSON)) を行った後、遠心分離 (9,000 rpm, 4°C, 10 min, JLA-16.250 ローター) によりペレットを回収し、4 mM Pefabloc SC 3 ml に懸濁したものを粗 Cry4 タンパク質結晶とした。この結晶は Cry4A からなる。

## 2. 3 臭化ナトリウム連続密度勾配遠心法

50 ml 容遠心チューブ (25×89 mm, BECKMAN) に 42% NaBr 3 ml を入れた。その上に 40% - 30% NaBr 28 ml をグラディエントゲル作製装置 (ATTO) により重層し、さらに 20% NaBr 3 ml を重層した。この上に粗クリスタルまたは粗 Cry4 タンパク質結晶 3 ml を重層し、遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 4 hrs, no brake, SW-28 rotor (BECKMAN)) を行った。分離したクリスタルおよび Cry タンパク質結晶は純水により洗浄後、純水に懸濁して 4°C で保存した。

## 2. 4 分離クリスタルおよび Cry タンパク質の確認

精製クリスタルまたは Cry タンパク質顆粒の結晶は、SEM (S-2250N 走査型電子顕微鏡 (日立製作所)) により観察した。また、クリスタルの可溶化は、クリスタル懸濁液 50  $\mu\text{l}$  に 10 mM DTT を含む 50 mM Carbonate buffer (pH 10) 溶液 150  $\mu\text{l}$  を加え、37°C で 2 時間反応させた後、遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, RT) した上清を可溶化タンパク質試料として用いた。クリスタルに含まれるタンパク質の分子量の検討は SDS-PAGE により、定量は Coomassie Protein Assay Reagent (PIERCE) により行った。

## 2. 5 ボウフラを用いた殺虫活性検定<sup>(16)</sup>

適当な希釈系列で作製した精製クリスタル懸濁液各 2 ml を 24 穴マイクロプレート入れ、各 well にネッタイシマカ 2 齢虫を 6 匹ずつ入れて 28°C に保温し、24 時間後の死虫数を数えた。タンパク質濃度と死虫数とに統計学的な信頼度が得られるまで検定を数回繰り返して、Probit 法により  $\text{LC}_{50}$  を算出した。

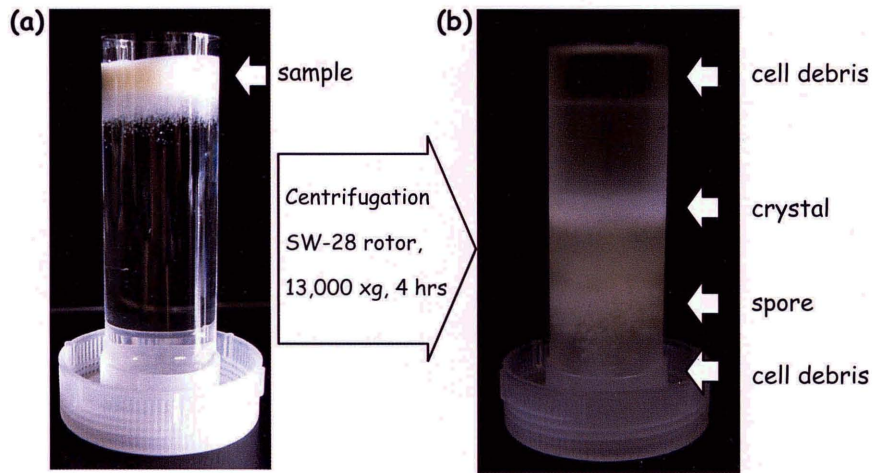


図1 NaBr 密度勾配遠心法によるクリスタルの精製  
遠心分離前(a)の試料液は遠心後(b)4つの層に分かれた

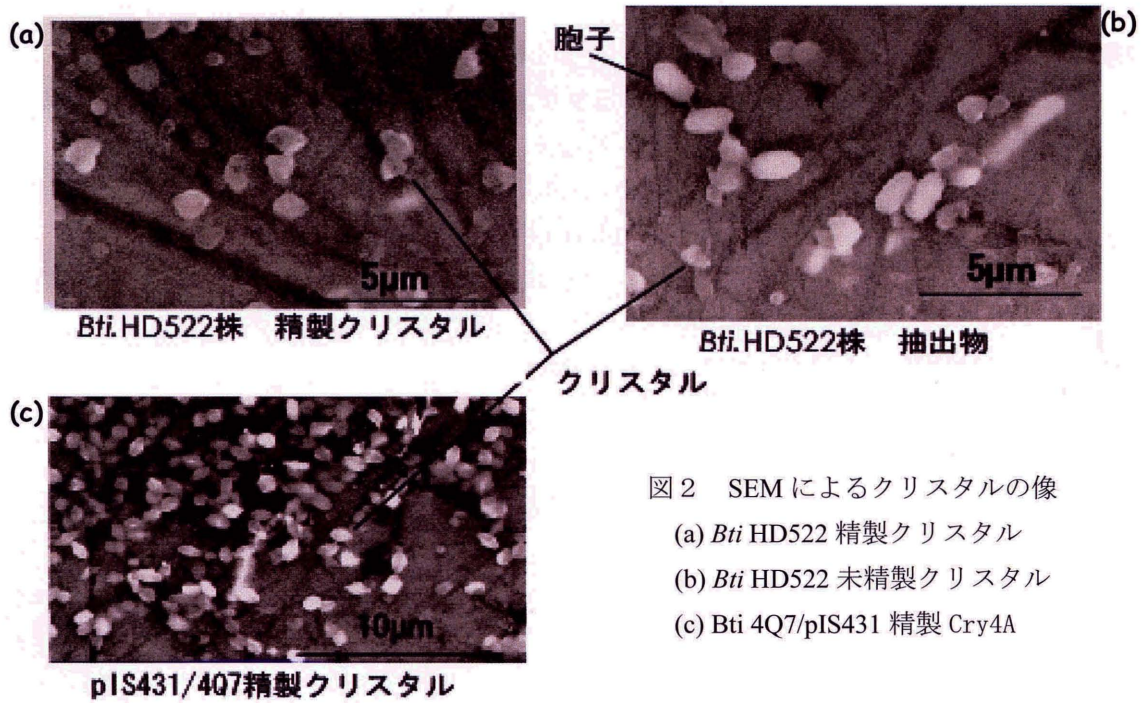


図2 SEMによるクリスタルの像  
(a) *Bti* HD522 精製クリスタル  
(b) *Bti* HD522 未精製クリスタル  
(c) *Bti* 4Q7/pIS431 精製 Cry4A

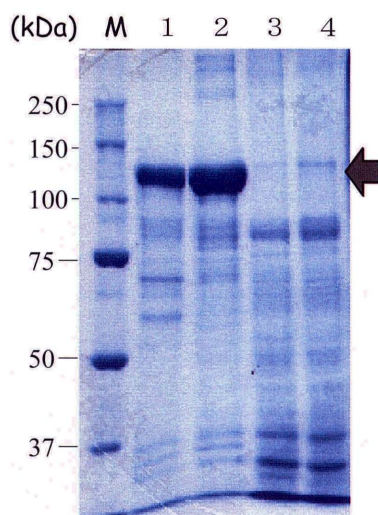


図3 精製前後のクリスタルタンパク質の SDS-PAGE 泳動パターン  
 タンパク質結晶を可溶化し、各レーン 3  $\mu\text{g}$  を泳動した。染色は GelCode Blue Stain Reagent (PIERCE)。M, サイズマーカー; 1, 4Q7/pIS431 未精製タンパク質; 2, 4Q7/pIS431 精製タンパク質; 3, HD522 未精製クリスタル; 3, HD522 精製クリスタル。矢印は Cry4 タンパク質の位置を示す。

### 3. 結果および考察

#### 3. 1 臭化ナトリウム連続密度勾配遠心法によるクリスタルの分離

30% - 40% NaBr 連続密度勾配遠心分離法では、遠心後、20%NaBr 付近、32%NaBr 付近、35%NaBr 付近および遠心管の底の計 4 つの層が生じた(図 1)。このうち、32%NaBr 付近の層は SEM 観察によりクリスタル層と確認できた(図 2)。また、35%NaBr 付近の層は孢子であり、20%NaBr 付近と底の層は菌体残渣であった(data not shown)。SEM の像からクリスタル層には孢子の混入がほとんど認められず、精製前後で形状の変化も見られなかったことから、本法は優れたクリスタル精製法であることがわかる。また、単離発現させた Cry タンパク質結晶(Cry4, 図 2 パネル(c))でも同程度の分離精製が行えた。NaBr 溶液の密度の理論値は、33% NaBr で  $1.318 \text{ g/cm}^3$ 、35% NaBr で  $1.344 \text{ g/cm}^3$  であり、それぞれクリスタル  $1.32 \text{ g/cm}^3$ 、孢子  $1.34 - 1.38 \text{ g/cm}^3$  の報告値と矛盾しない。

次に、精製前後のクリスタルのタンパク質組成を SDS-PAGE を用いて検討した(図 3)。精製前後において泳動パターンに大きな変化は見られなかったが、*Bti*.HD522 では精製クリスタルで Cry4 のバンドが強く現れた。この傾向は *Bti*. 4Q7/pIS431 でさらに顕著に見られ、精製後では Cry4Aa の 134 kDa のバンドが明らかに強くなっているのがわかる。単離発現させた Cry タンパク質の結晶は菌体内プロテアーゼによる分解を受け易かったが、精製後はプロテアーゼも除去されるらしく<sup>(14)</sup>、純水に懸濁して保存しても Cry タンパク質の損失はほとんど見られなかった。

#### 3. 2 精製クリスタルの *Ae. aegypti* を用いた殺虫活性検定

NaBr 連続密度勾配遠心法を用いて精製したクリスタルおよび Cry タンパク質の殺虫活性を *Ae. aegypti* 2 齢虫幼生を用いて検討した(表 1)。*Bti*. HD522 株から精製したクリスタルは精製前の 1.4 倍の活性を示すようになった。*Bti*.4Q7/pIS431 株から精製した Cry4 タンパク質の結晶は、HD522 精製クリスタルの 1/3 程度の活性しかないが、文献値<sup>(17)</sup>と比較すると 100 倍の活性を示した。これは孢子などの不純物が除去され、

殺虫活性を有するクリスタルの占有率が上昇したためと考えられる。以上のことから、NaBr 密度勾配遠心法による精製は Cry タンパク質の純度を上げ、その生物学的性質を保持させていることがわかる。

表 1 精製クリスタルの *Ae.aegypti* 2 齢虫に対する殺虫検定

Toxin	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (ng/ml)
<i>Bti</i> HD522 精製クリスタル	2.412 (1.857-3.131)
<i>Bti</i> HD522 未精製クリスタル	1.682 (1.129-2.738)
4Q7/pIS431 精製クリスタル	5.287 (3.686-7.515)
Cry4A (文献値) <sup>b</sup>	563 (496-639)

a, The 95% confidence limit is indicated in parentheses

b, ref. No. 17

#### 4. 終わりに

NaBr 連続密度勾配遠心法による精製法を、複数の Cry タンパク質から構成されたクリスタルを産生する *Bti*. HD522 株と、単一の Cry タンパク質結晶を産生する *Bti*. 4Q7/pIS431 株を用いて検討した。今回の方法では平均して約 10 mg クリスタル抽出物から約 1 mg の精製クリスタルが得られた。また、*Bt*. TK-E6 株や *Bt. dakota* 株など他の菌株でも NaBr の濃度を変えることでクリスタル精製が可能であった。本精製法はクリスタルの形状の変化やタンパク質の分解、機能の欠失が見られないので、他の不溶性タンパク質精製にも使える汎用性の高い方法と考えられる。

#### 5. 参考文献

- (1) Ang, B.J., and Nickerson, K.W. (1978) Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. Env. Microbiol.*, **36**, 625-626.
- (2) 飯塚敏彦 (1997) *Bacillus thuringiensis* の産生する殺虫性タンパク質とその病原機作、日本蚕糸学雑誌 66, 311-322.
- (3) Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J.V., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., and Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775-806.
- (4) van Frankenhuyzen, K. and Nystrom, C. The *Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity Database (2002) Canadian Forest Service, see [http://www.glf.cfs.nrcan.go.ca/science/research/netintro99\\_e.html](http://www.glf.cfs.nrcan.go.ca/science/research/netintro99_e.html)
- (5) Hara, H., Atumi, S., Yaoi, K., Nakanishi, K., Higurashi, S., Miura, N., Tabunoki, H., and Sato, R. 2003. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* *FEBS Lett.*, **538**, 29-34.
- (6) Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., and Soberon, M. (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta*, **1667**, 38-46.
- (7) Tomimoto, K., Hayakawa, T., and Hori, H. (2006) Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa molecule penetrates into the membrane. *Comp. Biochem. Physiol., Part B* **144**, 413-422.
- (8) Jenkins, J.L., and Dean, D.H. (2001) Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors. *BMC Biochemistry*, **2**, 1-8.

- (9) Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.J., and de Maagd, R.A. (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. BMC Genomics, **6**, 1-10.
- (10) Dean, D.H. and Douthit, H.A. (1974) Buoyant density heterogeneity in spores of *Bacillus subtilis*: Biochemical and physiological basis. J. Bacteriol., **117**, 601-610.
- (11) Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal  $\delta$ -endotoxin: effect on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. J. Cell Sci., **60**, 181-197.
- (12) Fast, P.G. (1972) The  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III. A rapid method for separating parasporal bodies from spores. J. Invertebr. Pathol., **20**, 139-140.
- (13) Sharpe, E.S., Nickerson, K. W., Bulla Jr., L. A., Aronson, J. N. (1975) Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. Appl. Microbiol., **30**, 1062-1063.
- (14) Nickerson, K.W., and Swanson, J.D. (1981) Removal of contaminating proteases from *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals by density gradient centrifugation in NaBr. European J. Appl. Microbiol. Biotech., **13**, 213-215.
- (15) 武部 聡、横尾尚哉、水橋 輝、松村 剛、駒野 徹 (2005) *B. thuringiensis* 細胞用発現ベクターpPcyt1A の構築. 近畿大先技総研紀要 No.10, 29-36.
- (16) Abdullah, M.A.F., Alzate, O., Mohammad, M., McNall, R.J., Adang, M.J., and Dean, D.H. (2003) Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. Appl. Environ. Microbiol., **69**, 5343-5353.
- (17) Poncet, S., Delecluse, A., Klier, A., and Rapoport, G. (1995) Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. J. Invertebr. Pathol., **66**, 131-135.

## 英文抄録

### Improved Technique for Refining *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystals by NaBr Gradient Centrifugation

Shinya Mukai<sup>1</sup>, Jun Iwayama<sup>1</sup>, Shinji Morinaga<sup>1</sup>, So Takebe<sup>1,2</sup>

A method for the purification of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystals by NaBr gradient centrifugation was improved. This method is simple, inexpensive, and useful for the separation of *cry* gene products from spores. A *Bt* strain was cultured with mid-scale (50-300 ml) Shaeffer's sporulation medium until autolysis phase. Crystals with spores and cell debris were layered on a top of a 30 ml linear NaBr gradient, comprising 30%-40% NaBr solutions. Centrifugation was carried out with a Beckman ultracentrifuge in SW-28 rotor operating at 10,000 rpm, 4 C for 4 hrs. Crystals formed a single band in about 33% NaBr of the positions. Scanning-transmission electron microscopy indicated that crystals purified by NaBr gradient centrifugation were free of contaminating spores and were morphologically pure. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis indicated that proteins composing crystals were stable and negligible proteolysis occurred during purification. The purified crystals retained biological activities as insecticidal toxins.

1. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan