

## 屋久島土壌より分離された *Bacillus thuringiensis* の結晶タンパク質における形態とサイズの比較

菊 田 治 典<sup>1)</sup>・黒 岩 学<sup>1)</sup>・水 野 正 紀<sup>1)</sup>・高 木 龍一郎<sup>2)</sup>・飯 塚 敏 彦<sup>3)</sup>

Crystal Protein in *Bacillus thuringiensis* Isolated from Yakushima Island Examined by Morphology and Size.

Harunori KIKUTA<sup>1)</sup>, Manabu KUROIWA<sup>1)</sup>, Masaki MIZUNO<sup>1)</sup>,  
Ryuichiro TAKAGI<sup>2)</sup> and Toshihiko IIZUKA<sup>3)</sup>  
(June 1999)

### 結 論

*B. thuringiensis* は、栄養型対数増殖末期に芽胞と共に殺虫性の結晶タンパク質を産生することで知られている。この結晶タンパク質は、芽胞囊期を経て、芽胞と共に菌体外に遊離されるが、その時期は各 serovar によって異なり、早いもので 24 時間、遅いもので約 10 日間である<sup>5,7,8)</sup>。Angus<sup>1)</sup> は、この結晶タンパク質が *B. thuringiensis* の殺虫活性に直接関与していることを報告した。

*B. thuringiensis* の結晶タンパク質は電子顕微鏡によって観察され、その形態は、分離株ごとに異なる可能性が示唆された<sup>6,14)</sup>。*B. thuringiensis* が産生する結晶タンパク質の形態は、はじめダイヤモンド型 (diamond-shape)、重ピラミッド形 (bipyramidal)、あるいは 偏菱形立方体 (rhombohedral) として報告され<sup>2,3,6)</sup>、続いて不定形立方体 (irregular) あるいは、サイコロ状 (cuboidal) 結晶を産生する serovar が次々と見出された<sup>4,8,9,16)</sup>。また菱形結晶にはめ込むように方形・粒状結晶が付着した embedded body や偏平方形結晶 (square, flat) を産生する serovar も報告されている<sup>13,16)</sup>。これら異なる結晶形態ならびにそのサイズは、同一培養条件下で比較することにより、ある程度の殺虫性の特徴を示すものである。

本実験では、屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* の結晶タンパク質形態を走査電子顕微鏡で観察し、屋久島から分離された *B. thuringiensis*

野生株における結晶タンパク質形態の特異性ならびにサイズ分布について検討を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1) 供試菌株

屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* 株 53 株を用いた。これらの H-serotype による分類ならびに 53 株の保有する cry 遺伝子とその殺虫活性については菊田ら<sup>10,11)</sup> においてすでに報告した。

#### 2) 電子顕微鏡用の試料の作製と観察

走査電子顕微鏡観察のための試料作製は菊田<sup>9)</sup>の方法に従った。即ち、肉エキスペプトン培地で、4 日間培養した菌株を 1 白金耳採り、1 cm のガラス円盤上で滅菌蒸留水に浮遊混和させた。浮遊混和液は自然乾燥の後、ガラス円盤を電子顕微鏡サンプル台にドータイトで固定し、イオンスパッター(日電, JFC-1100 型)で 1,200 V、5~10 mA で金蒸着し走査電子顕微鏡試料とした。走査電子顕微鏡は、日本電子技術サービス株式会社製 JSM-T 200 を用いて観察した。

走査電子顕微鏡によって観察された *B. thuringiensis* 結晶タンパク質を 4,400 倍で撮影を行い、芽胞および結晶タンパク質の長径を計測し、ミクロンバーを基に実寸を算出した。

### 結 果

*B. thuringiensis* が産生する結晶タンパク質形態

<sup>1)</sup> 酪農学園大学酪農学科、微生物利用学

Department of Diry Science Utilization of Micoroorganism Rakuno Gakuen University, Ebetsu 069-8501, Japan

<sup>2)</sup> 穂別町ヘルシーフード農業センター

Hobetu Town Healthy Food and Agricultural Center, Hobetu 054-0211, Japan;

<sup>3)</sup> 北海道大学農学部

Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

は特異的な殺虫性を知る上で重要な指標となる。屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* の走査電子顕微鏡観察による結晶タンパク質形態は 4 タイプに大別された。即ち、菱形結晶および方形結晶双方を有するタイプが 39 株、粒状または不定形結晶を有するタイプが 8 株、菱形結晶のみを有するタイプが 5 株、菱形結晶の崩れたタイプが 1 株となった (Table 1)。

菱形結晶の長径の長さ

培養条件が同じ場合、それぞれの菌株において産生される結晶タンパク質のサイズは *B. thuringiensis* が保有する *cry* 遺伝子ならびに培養条件によって制御されていると考えられる。本実験は分離菌株における殺虫性の特徴を知ることが目的とし、走査電子顕微鏡写真により、各菌株の結晶タンパク質菱形結晶（以下菱形結晶）長径の平均値を算出した。

その結果は Table 2 に示した。即ち、屋久島土壌の *B. thuringiensis* 分離株の菱形結晶長径平均値は  $1.165\ \mu\text{m}$  で、それぞれ大きいものは  $1.682\ \mu\text{m}$  から小さいものは  $0.739\ \mu\text{m}$  まで連続的に分布し、その標準偏差は  $0.038\ \mu\text{m}$  で小さな値となった。各分離株 serovar ごとの菱形結晶の長径平均値ならびに標準偏差を大別し、Fig. 1 に示した。即ち、屋久島分離 *B. thuringiensis* の serovar ごとの菱形結晶長径は、*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* が最も大きく、続いて *galleriae*, *thuringiensis* それから *kenyae* の順に小さくなった。分離 serovar が 1 株であった serovar *indiana* と栄養細胞の運動性が無く、serovar を決定できなかった株については、明らかな結果を出すことができなかった。

芽胞と菱形結晶の大きさ

計測した屋久島分離 *B. thuringiensis* の芽胞およ

Table 1 The morphology of crystal protein produced on each serovar by *B. thuringiensis* isolates in Yakushima Island.

Crystal shape	Strain	H-serotype (subsp.)	Crystal shape	Strain	H-serotype (subsp.)
bipyramidal	Jano 2-1	1 (thuringiensis)	bipyramidal and cuboidal	Seib 2-2-1	5a,5b (galleriae)
	Koma 3k-1	1 (thuringiensis)		Seib 4-4-1	5a,5b (galleriae)
	Onos 4-1	1 (thuringiensis)		Aiko 1-3-2	5a,5b (galleriae)
	Aiko 1-2-1	16 (indiana)		Aiko 1-4-1	5a,5b (galleriae)
	Onos 2-3	4a,5c (kenyae)		Aiko 1-4-3	5a,5b (galleriae)
bipyramidal and cuboidal	Aiko 1-4-2	4a,4c (kenyae)		Aiko 1-4-4	5a,5b (galleriae)
	Hana 3-1	3a,3b,3c (kurstaki)		Aiko 1-5-1	5a,5b (galleriae)
	Jano 1-1	3a,3b,3c (kurstaki)		Aiko 1-6-1	5a,5b (galleriae)
	Jano 5-1-1	3a,3b,3c (kurstaki)		Aiko 1-6-2	5a,5b (galleriae)
	Jano 5-1-2	3a,3b,3c (kurstaki)		Kose 5-3	5a,5b (galleriae)
	Jano 5-2	3a,3b,3c (kurstaki)		Kose 5-6	5a,5b (galleriae)
	Jano 5-3	3a,3b,3c (kurstaki)		Kose 5-7	5a,5b (galleriae)
	Jano 5-4	3a,3b,3c (kurstaki)		Onos 2-2	5a,5b (galleriae)
	Jano 5-4	3a,3b,3c (kurstaki)		Onos.4-2	5a,5b (galleriae)
	Jano 9-1	3a,3b,3c (kurstaki)			
	Jano 9-2-1	3a,3b,3c (kurstaki)	spherical or irregular	Jano 3-1	3a,3d (sumiyoshiensis)
	Jano 9-2-2	3a,3b,3c (kurstaki)		Jano 3-2	3a,3d (sumiyoshiensis)
	Jano 9-3-3	3a,3b,3c (kurstaki)		Jano 3-3	3a,3d (sumiyoshiensis)
	Jano 9-3-4	3a,3b,3c (kurstaki)		Jano 4-1	3a,3d (sumiyoshiensis)
	Jano 9-4-4	3a,3b,3c (kurstaki)		Jano 4-2	3a,3d (sumiyoshiensis)
	Jano 9-4-5	3a,3b,3c (kurstaki)		Miya 10-1	3a,3d (sumiyoshiensis)
	Jano 9-4-6	3a,3b,3c (kurstaki)		Aiko 2-1-1	14 (israelensis)
	Jano 10-1	3a,3b,3c (kurstaki)		Seib 4-3-1	Untypable
	Jano 10-2	3a,3b,3c (kurstaki)			
	Onos 2-1-1	3a,3b,3c (kurstaki)	collapsed bipyramidal	Aiko 1-3-1	Nonmotility
	Onos 2-1-2	3a,3b,3c (kurstaki)			
	Koma 1k-1	3a,3b,3c (kurstaki)			
	Koma 1k-2	3a,3b,3c (kurstaki)			
	Koma 1k-3-1	3a,3b,3c (kurstaki)			
	Koma 1k-3-3	3a,3b,3c (kurstaki)			
	Koma 1k-3-5	3a,3b,3c (kurstaki)			

**Table 2** The length of a bipyramidal crystal protein and spore of *B. thuringiensis* isolates in Yakushima Island.

<i>B.t.</i> strains	Bipyramidal crystal proteins		Spores	
	Means of length( $\mu\text{m}$ )	Standard deviation( $\mu\text{m}$ )	Means of length( $\mu\text{m}$ )	Standard deviation( $\mu\text{m}$ )
Aiko 1-2-1	1.048	0.295	1.591	0.105
Aiko 1-3-1	1.418	0.241	1.477	0.095
Aiko 1-3-2	1.136	0.257	1.667	0.101
Aiko 1-4-1	1.007	0.166	1.608	0.121
Aiko 1-4-2	0.739	0.150	1.315	0.168
Aiko 1-4-3	1.136	0.320	1.619	0.082
Aiko 1-4-4	1.136	0.186	1.851	0.093
Aiko 1-5-1	1.102	0.234	1.860	0.075
Aiko 1-6-1	1.086	0.180	1.545	0.036
Aiko 1-6-2	0.941	0.145	1.619	0.139
Hana 3-1	1.023	0.341	1.629	0.032
Jano 10-1	1.364	0.186	1.780	0.107
Jano 10-2	1.109	0.384	1.545	0.036
Jano 1-1	1.080	0.189	1.629	0.107
Jano 2-1	0.866	0.270	1.171	0.065
Jano 5-1-1	1.364	0.202	1.667	0.051
Jano 5-1-2	1.682	0.232	1.678	0.229
Jano 5-2	1.111	0.377	1.715	0.139
Jano 5-3	1.261	0.291	1.818	0.227
Jano 5-4	1.323	0.273	1.500	0.145
Jano 9-1	1.500	0.232	1.477	0.148
Jano 9-2-1	1.211	0.252	1.629	0.107
Jano 9-2-2	1.250	0.268	1.364	0.152
Jano 9-3-3	1.332	0.225	1.681	0.236
Jano 9-3-4	1.443	0.243	1.568	0.066
Jano 9-4-4	1.211	0.186	1.515	0.126
Jano 9-4-5	1.061	0.284	1.641	0.140
Jano 9-4-6	1.364	0.286	1.705	0.057
Koma 1k-1	1.118	0.195	1.500	0.145
Koma 1k-2	1.325	0.345	1.526	0.046
Koma 1k-3-1	1.364	0.200	1.477	0.057
Koma 1k-3-3	1.091	0.170	1.452	0.130
Koma 1k-3-5	1.061	0.170	1.568	0.111
Koma 3k-1	1.218	0.164	1.364	0.091
Kose 5-3	1.011	0.225	1.477	0.114
Kose 5-6	0.991	0.236	1.449	0.167
Kose 5-7	1.136	0.245	1.676	0.053
Onos 2-1-1	1.345	0.352	1.384	0.101
Onos 2-1-2	1.289	0.284	1.570	0.184
Onos 2-2	1.364	0.161	1.818	0.000
Onos 2-3	0.743	0.184	1.427	0.121
Onos 4-1	0.955	0.159	1.218	0.052
Onos 4-2	1.073	0.370	1.477	0.057
Seib 2-2-1	0.834	0.284	1.545	0.218
Seib 4-4-1	1.182	0.170	1.705	0.208

び菱形結晶の長径平均値をもとに、大きさの相関を Fig. 2 に示した。これらは F 検定を行った所、95% 信頼限界で有意差が認められた。また、個体数の多かった *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* および serovar *galleriae* について検討を行った結果 (Fig. 3

および Fig. 4)、芽胞と菱形結晶の大きさの相関は serovar ごとに異なることが示唆された。即ち、*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* の芽胞と菱形結晶は  $y=0.0619x+1.1638$  (相関係数  $r=0.0446$ ) で有意差は認められなかった。*B. thuringiensis* serovar



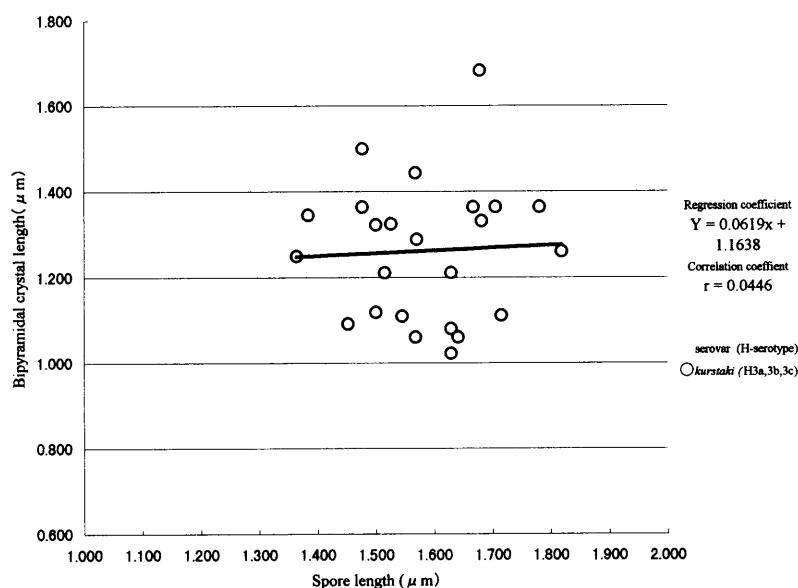


Fig. 3 Correlation of the distance between the spore and bipyramidal crystal in *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*.

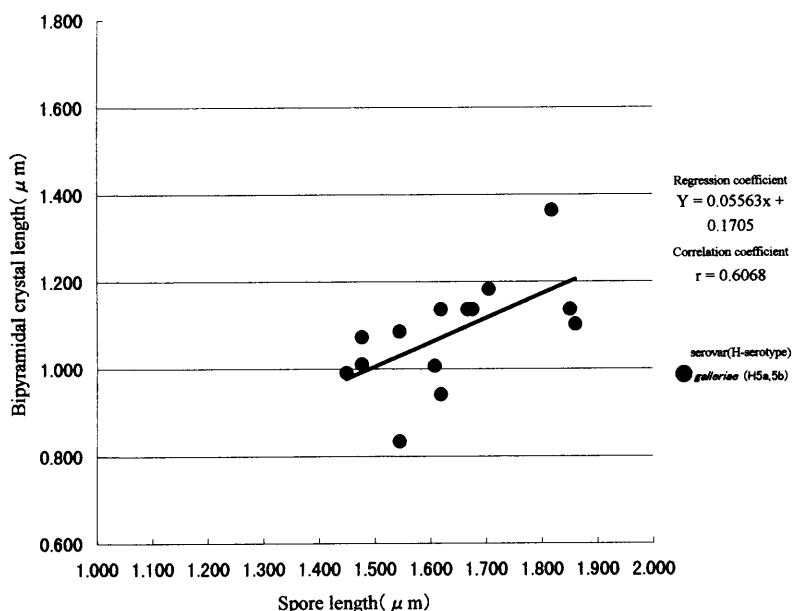


Fig. 4 The correlation of the length between the spore and bipyramidal crystal of *B. thuringiensis* serovar *galleriae*.

様に菱形結晶および方形結晶を有するタイプが優占し、菱形結晶のみを有するタイプおよび不定形結晶を有するタイプはわずかであった。

*B. thuringiensis* の serovar ごとの結晶タンパク質形態および大きさについて、FAUST *et al*<sup>4)</sup> は同一 serovar 内で、結晶の大きさが異なることを報告している。本試験では、それぞれ分離株の菱形結晶長径の計測を行った。*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* の菱形結晶長径は、1.023  $\mu\text{m}$  から 1.682  $\mu\text{m}$  の間で変動し、*B. thuringiensis* serovar *galleriae* で

は、0.834  $\mu\text{m}$  から 1.364  $\mu\text{m}$  の間で変動した。このことは Faust *et al*<sup>4)</sup> の結果を裏づけるものであった。

本試験において、それぞれ分離株の芽胞長径の計測を行ったところ、serovar *kurstaki* の芽胞長径は、1.364  $\mu\text{m}$  から 1.818  $\mu\text{m}$  の間で変動し、serovar *galleriae* は、1.449  $\mu\text{m}$  から 1.860  $\mu\text{m}$  の間で変動していた。このことから、芽胞と菱形結晶の大きさの関連性について検討した。その結果、serovar *galleriae* において芽胞が大きくなるに連れて菱形結晶も

大きくなる傾向が認められた。逆に, serovar *kurstaki* においては, 芽胞と菱形結晶の長径の間に有意な相関を認めることができなかった。Krieg<sup>12)</sup> は *B. thuringiensis* は通常 1 芽胞当たり 1 個の結晶タンパク質を産生するが, 1 芽胞当たり 2 個ないし 3 個産生する菌株を発見したことを報告している。このことから serovar *galleriae* は芽胞と結晶タンパク質を各々対応して産生している可能性を示し, serovar *kurstaki* は同一細胞から複数の結晶タンパク質を産生し, その結果, 結晶タンパク質の大きさに変異が生じた可能性が示唆された。これについては, 更に詳細な検討が必要と考えられた。

結晶タンパク質の大きさでは serovar *kurstaki* が最も大きく, 芽胞の大きさでは *B. thuringiensis* serovar *galleriae* が最も大きかった。このことは, *B. thuringiensis* の芽胞および菱形結晶の長径は, serovar ごとに異なり, また serovar ごとに芽胞と菱形結晶の相関も異なることを示唆している。

*B. thuringiensis* の結晶タンパク質の大きさにおいては, 飯塚ら<sup>8)</sup> は培養条件等環境要因によって変化するとしている。従って, 芽胞と菱形結晶の大きさの相関は培養条件によって変化する可能性が考えられた。従って, 本実験では同一培養条件下での比較検討を行った。

屋久島から分離された *B. thuringiensis* の同一 serovar 内の菌株とそれぞれの菌株における結晶タンパク質形態とを比較すると, 結晶タンパク質の大きさに個体間差異が認められるが, 結晶タンパク質形態は H-serotype を反映していた。しかし, H 4 a, 4 c (serovar *kenyae*) 株は, 同一 serovar 内において, 菱形結晶および方形結晶を産生する Aiko 1-4-2 株と, 菱形結晶のみを産生する Onos 2-3 株に分かれた。このことによって, 同一 serovar に属する菌株でも, これらの菌株は異なる *cry* 遺伝子を保有することが明らかとなった。

## 要 約

本実験は *B. thuringiensis* が産生する特異的な殺虫性を知る上で重要な結晶タンパク質形態について, 屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* 53 株を検討した。

1) 屋久島土壌より分離された *B. thuringiensis* を走査電子顕微鏡によって観察した結果, 結晶タンパク質形態は菱形結晶および方形結晶双方を有するタイプが 39 株, 粒状または不定形結晶を有するタイプが 8 株, 菱形結晶のみを有するタイプが 5 株, 菱形結晶の崩れたタイプが 1 株となった

2) 各分離株の菱形結晶長径と芽胞長径を検討した結果, 菱形結晶長径においては *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* は serovar *galleriae* より結晶が大きく, 屋久島土壌分離野生株においても *B. thuringiensis* は H-serotype によって, 結晶タンパク質の大きさが異なることを明らかにした。

3) 各分離株の菱形結晶長径と芽胞長径の相関を検討した結果, serovar *kurstaki* においては特に有意差は認められなかったが, serovar *galleriae* においては芽胞と結晶タンパク質との間に有意な相関関係が認められた。

4) 屋久島から分離された *B. thuringiensis* の同一 serovar 内の結晶タンパク質形態は H-serotype を反映して特徴を示していた。しかし, H 4 a, 4 c (serovar *kenyae*) 株は, 菱形結晶および方形結晶を産生する Aiko 1-4-2 株と, 菱形結晶のみを産生する Onos 2-3 株に分かれた。このことによって, serovar *kenyae* の中には殺虫活性を異にする菌株, 異なる *cry* 遺伝子を保有する菌株が分離されることを明らかにした。

## 文 献

- 1) ANGUS, T.A., 1956. Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. *Can. J. Microbiol.*, 2: 122-131.
- 2) BONNEFOI, A. and DE BARJAC, H., 1963. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. *Entomophaga.*, 7: 221-229.
- 3) DE BARJAC, H., 1978. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* pour les larves d'*Aedes aegypti* et d'*Anopheles stephansi*. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, 286: 1175-1178.
- 4) FAUST, R.M., ADAMS, J.R., ABE, K., IZUKA, T. and BULLA, L.A. Jr., 1982. Comparative morphology and size distribution of the parasporal crystals from various strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 51: 316-324.
- 5) HANNAY, C.L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature*, 172: 318-340.
- 6) HANNAY, C.L. and FITZ-JAMES P.C., 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Can. J. Microbiol.*, 1: 694-710.

- 7) HEIMPEL, A. M., 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Entomology, 12: 287-322.
- 8) 飯塚敏彦・石野正穂・中島敏夫, 1981. 昆虫病原菌 *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.
- 9) 菊田治典, 1990. 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. 酪農大紀要, 15: 1-69.
- 10) 菊田治典, 黒岩学, 高木龍一郎, 飯塚敏彦, 1999. 屋久島土壌から分離された *B. thuringiensis* I. H-serotype のフローラ. 日蚕雑., 68: 217-223.
- 11) 菊田治典, 黒岩学, 高木龍一郎, 飯塚敏彦, 1999. 屋久島土壌から分離された *B. thuringiensis* II. 殺虫活性と *cry* 遺伝子. 日蚕雑., 68: 225-235.
- 12) KRIEG, A., 1968. Über das Vorkommen verschiedener Varietäten von *Bacillus thuringiensis* in Deutschland. Zenbl. f. Bakt., Parasitenk., Infektionskrank. u. Hyg., Abt. I, Orig., 207: 83-90.
- 13) LOPEZ, J.E. and IBARRA, J. E., 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 62: 1306-1310.
- 14) NORRIS, J.R., 1971. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*; In Biosynthesis and Physical Structure (H.D. BURGESS and N.W. HASSEY, ed) Academic Press Inc., London, pp. 229-246.
- 15) PADUA, L.E., OHBA, M. and AIZAWA, K., 1980. The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 36: 180-186.
- 16) REEVES E.L. and GARCIA JR. C., 1970. Pathogenicity of bicrystalliferous *Bacillus* isolate for *Aedes aegypti* and other aedine mosquito larvae. Proc. IV International Colloquium on Insect Pathol. College Park, Maryland USA., 219-228.
- 17) SHARPE, E.S. and BAKER, F.L., 1979. Ultrastructure of the unusual crystal of the HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol., 34: 320-322.

### Summary

*Bacillus thuringiensis*, a bacterium used in genetically altered form in the biological control of certain insect pests, was isolated from Yakushima Island. In 53 isolates we examined the protein crystal for its morphology and size. The shape and size of the protein crystal are important indicators of insecticidal activity.

mesengers

1. Scanning electron microscopy disclosed (a) bipyramidal and cuboidal crystals in 39 isolates, (b) granular or irregular crystals in 8 isolates, (c) solely bipyramidal crystals in 5 isolates, and (d) crystals with a collapsed shape in 1 isolate.
2. Because of the long distance between the bipyramidal crystals and the spore, the crystals from serovar *kurstaki* isolates were larger than those of serovar *galleriae* isolates.
3. Among the serovar types, a significant correlation was noted in the length between the crystals and the spore in serovar *galleriae*.
4. In two of the serovar *galleriae* isolates, different shapes seemed to indicate different insecticidal activity, involving a different protein crystal gene or genes.