

Bacillus thuringiensisの産生する殺虫性毒素タンパク質の腹水ガン細胞ならびにカイコ中腸細胞におよぼす作用

関, 武純
九州大学農学部蚕糸化学教室

永松, 幹晴
九州大学農学部蚕糸化学教室

永松, 康德
九州大学農学部蚕糸化学教室

筒井, 亮毅
九州大学農学部蚕糸化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/23264>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 33 (1), pp.19-24, 1978-09. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

Bacillus thuringiensis の産生する殺虫性毒素 タンパク質の腹水ガン細胞ならびに カイコ中腸細胞におよぼす作用

関 武純*¹・永松幹晴*²・永松康徳
筒井亮毅*³・市丸哲造*⁴・渡辺忠雄*⁵

古賀克己・林 勝哉

九州大学農学部蚕糸化学教室

(1978年6月15日 受理)

Injuring Reaction of δ -Endotoxin upon Sarcoma 180 Ascites Cells and Silkworm Midgut Cells *in vitro*

TAKEYOSHI SEKI, MIKIHARU NAGAMATSU,
YASUNORI NAGAMATSU, RYOKI TSUTSUI,
TETSUZO ICHIMARU, TADAO WATANABE,
KATSUMI KOGA and KATSUYA HAYASHI

Laboratory of Sericultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-02, Fukuoka 812

緒 言

Bacillus thuringiensis (B.t.) は芽胞とともに菱形をした結晶物を形成する。このタンパク性の物質は、昆虫に対して毒性を示すことから δ -内毒素と呼ばれる。結晶体は、毒素の前駆体であると言う。つまり昆虫の体液にこの物質を注射しても毒性の発現はみられず、食下によつてはじめてあらわれる。この毒性発現には、感受性昆虫の消化液における高いpHとプロテアーゼの作用によつて、結晶体が可溶化することが必要である(鮎沢ら, 1976)。しかしながら、この結晶タンパク質の構成と毒素の本体については、よくわかっていない。結晶物の示す困難な性質——たとえば *in vitro* で可溶化したのち再会合により沈澱しやすいなど——のために基礎的研究がおこなわれているのである。最近、結晶タンパク質のサブユニットの一部が糖鎖を

もつこと、また、内因性プロテアーゼ活性を示すことが報告された (Bulla *et al.*, 1977)。さらに、この結晶の構成タンパク質成分を、会合を防ぎつつ、再現性よく分画する方法が開発された (Nagamatsu *et al.*, 1978)。これらを手がかりに、結晶の構造と活性の研究は今後急速に進展するものと思われる。

一方、この物質の生体内での作用機作についての知見は、他の毒素、たとえばジフテリアトキシンやリシンなどに比べて著しくおくれている。昆虫における結晶毒素の作用点は、食下された毒素がはじめに接する消化管(とくに中腸)であると考えられている。カイコに結晶タンパク質を投与すると、25分ほどで中腸の崩壊がはじまる。しかし、この組織での第一義的な作用点は不明である。この問題の追求のために、毒性を定量的に測定する方法を見出すことは、有用であると思われる。

Hatano は、ある種の毒素の検定に、CIR (cell injuring reaction) という反応系を開発した (cf. Tanaka *et al.*, 1971)。これは、培養細胞が毒素の存在下で紫外吸収物質を培地に放出することを利用して、毒作用を定量化しようという方法である。本研究

*¹ 現在 南西女学院短大, 北九州市

*² 現在 三菱樹脂(株)長浜工場研究部, 長浜市

*³ 現在 香蘭女子短大, 福岡市

*⁴ 現在 精華女子短大, 福岡市

*⁵ 九州大学農学部食品衛生化学教室

において、われわれは、この CIR が *B.t.* の δ -内毒素に適用できるかどうかを検討した。

九州大学農学部鮎沢啓夫教授と土井良宏博士にはそれぞれ *B.t.* 菌株とカイコを提供していただいた。ここに深く感謝の意を表する。

材料と方法

毒素の調製

B.t. の一菌株 var. *dendrolimus* T 84 A1 を用いた。菌の培養、結晶体の採取と分画は既報の通りにおこなった (Nagamatsu *et al.*, 1978)。得られた結晶物質 5 mg を 3.8 ml の 0.2 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 10.2) に懸濁し、カイコ消化液からセファデックス G-75 ゲル濾過とイオン交換セファデックス A-50 クロマトグラフィーにより約 80 倍に精製したプロテアーゼ (関武純, 未発表) 0.1 mg を加え、総量 4 ml で 37°C 60 分間インキュベートしたのち、12,000 rpm で 30 分遠心分離、上清を可溶性毒素として用いた。この溶液は約 1 A_{260} /ml のタンパク質濃度をもっていた。

消化液プロテアーゼの代りに還元剤メルカプトエタノール (ME) で可溶性される結晶成分をも用いた。結晶 1 mg を 10 ml の 0.1 M ME を含む 0.2 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 10.2) に懸濁し、4°C に一晚放置したのち遠心分離、上清を 0.01 M の上記緩衝液 (ME なし) に透析して用いた。時にはモノヨード酢酸でカルボキシメチル化したものも準備したが、これは下記のようにして調べた CIR において、無処理の毒素と変わらないことがわかった。

これらの毒素は、カイコに対する殺虫性があることを確かめた (Nagamatsu *et al.*, 1978) のちに使用した。必要に応じて、可溶性後 100°C で 15 分間熱失活した溶液を、対照として実験に供した。

マウス腹水ガン細胞

マウス肉腫 (ザルコーマ) 180 腹水ガン細胞 (S-180 細胞と略記する) は、既報のように調製した (Aviv *et al.*, 1971)。マウス ddN (雄, 5 週目) に S-180 を接種して 1 週間後に腹水を採取し、1000 rpm 60 分間の遠心分離により細胞を回収したのち DBA 溶液 (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g を 1 リットルの水に溶かしたもの) でくりかえし洗滌した。

CIR のための標準反応系

CIR 検定の標準液は、DBA 溶液に懸濁した S-180 細胞 2×10^6 個に対して、毒素 0.2 A_{260} 単位、

または $HgCl_2$ 25 μg を添加して作成した (総量 0.4 ml)。これを 37°C で振とうしつつ反応させ、60 分後または経時的に、冷却した DBA 溶液で 10 倍に希釈することにより反応を停止した。2500 rpm 15 分 (4°C) で遠心分離のち上清を 260 nm で測定した。 $HgCl_2$ による A_{260} 値 (非特異的な漏出にもとづく) に対して、毒素による A_{260} 値の割合を算出し、これを CIR の指数 (%) とした (Tanaka *et al.*, 1971)。このとき、DBA のみによる A_{260} の漏出はごくわずかで (Fig. 2 参照)、これは計算により差引いた。毒素の溶液に由来するグリシン-NaOH 緩衝液も同様であつた。

リン脂質の定量 上記の反応液の上清から、クロロホルム-メタノール (2:1) によつて粗脂肪を抽出し、食塩溶液で非脂肪質を除いた (Folch and Stanley, 1957) のち、硫酸灰化・発色によりリンを定量した (Fiske and Subbarow, 1925; Bartlett, 1959)。これに係数 (25) を乗じて総リン脂質量とした。

S-180 細胞への放射性アミノ酸の取り込み

上記の標準反応液 (0.4 ml) に、さらに ^{14}C -アミノ酸混合物 (10 mCi/mmol) を 0.2 μCi を加え、37°C で 60 分間振とうした。遠心分離により細胞をあつめ、洗滌を数回くりかえして上清の混入を除き、沈殿を濾紙に移して乾燥のちトルエン-PPO 中で液体シンチレーションカウンターにより計数した。

中腸組織と毒素とのインキュベーション

5 令 3 ~ 4 日目のカイコから中腸をとり、切開して DBA で 3 回洗滌した。中腸を一個ずつ試験管内にひもでつり下げ、10 ml の DBA に浸せきした。これに 5 A_{260} 位の毒素、または 625 μg の $HgCl_2$ を加え、37°C で 60 分振とうしたのち、260 nm (紫外吸収物質の漏出) と 500 nm (濁度) で培地 DBA の吸光度を測定した。

中腸由来の遊離細胞と毒素とのインキュベーション

遊離細胞の調製には、カイコ (4 令後期または 5 令 1 ~ 4 日目) 約 100 頭から採取した中腸を用いた。組織を 5 mm 四方ほどに細切し、一重のガーゼで包み、トリプシン (シグマ社製、カゼインを基質として 40 ユニット) を含む 10 ml の DBA 中で 28°C で 60 分静置した。つぎに中腸をガーゼごと新しいトリプシンを含む 10 ml の DBA に移し、20°C で 10 分間振とうしながら細胞を分散させた。トリプシン液を数回とりかえて同様のことをくりかえし、分散した細胞を含む外液を集めた。最後に集めた外液を 3 重ガーゼで濾過し、濾液から 600 rpm で 5 分間 (4°C) の遠心分

離により細胞を回収した。DBA で数回洗滌し、最後の懸濁液を中腸遊離細胞として用いた。こうして得られた細胞（測定時に適当な A_{260} 値が得られる量）に毒素 $0 \sim 0.3 A_{260}$ 単位または $HgCl_2$ $0 \sim 37.5 \mu g$ を加え、総量 $0.6 ml$ (DBA をベースとする) の混合液を作製し、これを $37^\circ C$ でかく拌しつつ反応させた。15分後に冷却した DBA で10倍に希釈することにより反応を停止させ遠心上清の A_{260} を測定した。タイムコースをとるためには、上記の最高量の毒素を含む反応液をスケールアップし、 $0.6 ml$ ずつを各時間ごとに採取して同様の処理をおこなった。

結 果

B.t. 内毒素の S-180 細胞に対する CIR

S-180 細胞の懸濁液に B.t. 結晶毒素を加えた。あらかじめカイロ消化液プロテアーゼで可溶化した結晶は、S-180 からの紫外吸収 (A_{260}) 物質の漏出を著しく促進することがわかった。Hatano に従って、この反応を CIR と呼ぶことにし、その指数の算出を試みた (cf. Tanaka *et al.*, 1971)。一例を Fig. 1 に示す。ここに用いた条件下で、CIR は100分のインキュベーションののち100%に達した。100%とは、 $HgCl_2$ による非特異的な紫外吸収物質の放出と同じレベルということである。活性化する前の結晶の懸濁液（溶解しない）、あるいは活性化したのちでも熱失活させた毒素溶液とのインキュベーションでは、 A_{260} の漏出はほとんどないか、あつてもごくわずかであった (60分の時点で CIR はそれぞれ0%, 5%)。結晶物をメルカプトエタノールで可溶化したものでは、30%ほどの CIR がみられた (60分)。T 84 A 1 株の結晶物の可溶化には、還元剤としてメルカプトエタノールよりもジチオスレイトルの方がよいことが、のちにわかった (Nagamatsu *et al.*, 1978) ので、後者による追試が必要である。

ここで、CIR 活性と殺虫性とは正しく平行関係にあるかどうかという疑問が生ずるであろう。可溶化の方法の違い、あるいは熱失活などによつて、この2つの活性はほぼ同じように変化したことから、これらは互いに深い関係にあるものと思われる。しかし、詳細についてはさらに研究が望まれる。

S-180 細胞から放出される物質は、培地のスペクトル (Fig. 2) と、糖による発色 (オルシノール反応に陽性、ジフェニルアミン反応に陰性) とから、RNA 様のものであることが示された。Fig. 2 から明らかなように、活性化毒素の添加によつて、培地のスペク

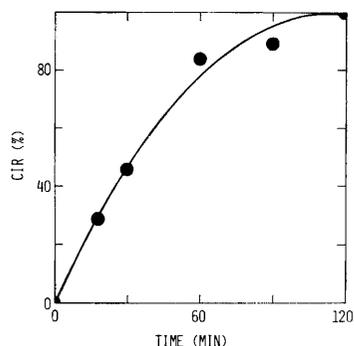


Fig. 1. Cell injuring reaction (CIR) of *B.t.* toxin upon sarcoma 180 cells. The reaction mixture ($0.4 ml$) contained buffered saline (DBA), 2×10^6 cells, and either $200 A_{260}$ units of toxin (solubilized by gut-juice protease) or $25 \mu g$ $HgCl_2$. Reaction was performed at $37^\circ C$ with shaking. At intervals the mixture was diluted 10-fold with DBA and centrifuged. The supernatant was measured for absorbancy at $260 nm$. Results were expressed relative to non-specific release of A_{260} due to $HgCl_2$.

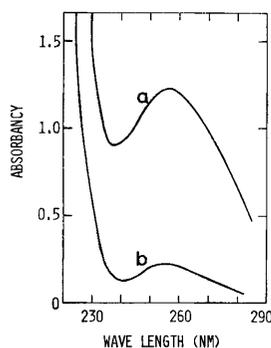


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of medium in which sarcoma 180 cells were incubated with or without solubilized *B.t.* toxin. For reaction conditions see Fig. 1. After incubating for 1 hr the supernatant of the medium was measured for absorbancy. (a) with solubilized toxin; (b) with DBA alone.

トルのレベルが著しく上昇する。漏出される RNA 様物質は、予備的な実験結果からみて、必ずしも低分子のみではないようである。(永松幹晴, 未発表)。このことは、細胞膜の透過性が毒素により著しく影響を受けていることを示唆する。そこで、膜の主成分の一つであるリン脂質の培地への放出の有無を上記と同じ反応系を用いてしらべてみた。また放射性アミノ酸の

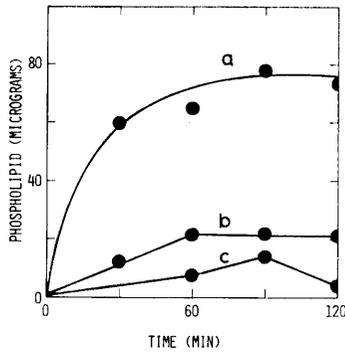


Fig. 3. Release of phospholipids from sarcoma 180 cells due to the presence of *B.t.* toxin or $HgCl_2$. Reaction was performed as described in Fig. 1. The supernatant of the medium was measured for phospholipid. The values due to DBA alone were subtracted. (a) with solubilized toxin; (b) with $HgCl_2$; (c) with heat-denatured toxin.

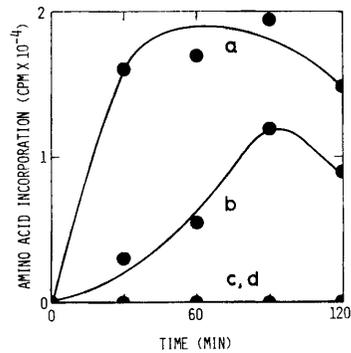


Fig. 4. Incorporation of labelled amino acids into sarcoma 180 cells. The reaction mixture used was the same as Fig. 1, but contained ^{14}C -amino acid mixture. Precipitated cells were counted for radioactivity. (a) with DBA alone; (b) with heat-denatured toxin; (c) with solubilized toxin; (d) with $HgCl_2$.

S-180 細胞への取込み能に対する毒素の影響についても検討した。

Fig. 3 に示すように、毒素の添加により培地へのリン脂質の放出が著しく促進された。リン脂質の場合には、RNA の場合と異なり、 $HgCl_2$ ではほとんど影響を受けなかった。つぎに、S-180 の培地に ^{14}C -アミノ酸を入れ、細胞内への全取り込みをカウントした (Fig. 4)。この反応は可溶性毒素の添加により完全に阻害されることがわかった。なお、アミノ酸取り込みは熱失活した毒素によってもかなり阻害されるように見える (Fig. 4)。この原因は、熱変性によつて生じた成分 (低分子?) が放射性アミノ酸と競合したためか、あるいはアミノ酸取り込み阻害は CIR をもたらず毒性とは異なる成分によるためなのか、いずれかであろう。

以上のことから、*B.t.* 内毒素は、S-180 細胞に対し、おそらく膜の変化を通じて細胞内の物質 (リボゾームなど) の崩壊と漏出をもたらすものと推察される。このことが、*B.t.* 毒素の本来の標的器官であるとされる昆虫中腸の細胞にもあてはまるかどうかを調べるために、以下の実験を試みた。

B.t. 内毒素の中腸組織に対する *in vitro* での作用 (吸光物質の漏出)

カイコに *B.t.* 内毒素を与えると中腸組織の剝離がおこる。このようなことが *in vitro* でもみられるかどうかをしらべた。Table 1 に示すように、試験管内で DBA に浸せきした中腸からの吸光物質の漏出は、可

Table 1. Release of UV-absorbing substances from intact gut tissues¹⁾.

Addition	A ₂₆₀	A ₅₀₀
Toxin, 5 A ₂₈₀ ²⁾	11.7	0.52
	11.2	0.46
$HgCl_2$, 625 μ g	10.7	0.54
	7.8	0.26
Protease, 0.125 mg ³⁾	7.5	0.29
	9.4	0.33
DBA alone	6.1	0.24
	5.5	0.18

¹⁾ A gut tissue taken from a silkworm was cut open, washed, and suspended in 10 ml DBA (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g dissolved in 1 l water) containing toxin or others as indicated, and gently shaken at 37°C for 1 hr. Then, the medium was measured for A₂₆₀ and A₅₀₀ after proper dilution if necessary. Experiments were made twice.

²⁾ Solubilized by gut juice protease.

³⁾ Gut-juice protease alone at the same amount used for solubilization of toxin.

溶化した毒素の培地への添加により有意に促進された。このようにして、中腸は、活性化した毒素であれば、個体全体の系がなくても反応しうることが示された。これは、中腸が *B.t.* 内毒素の標的器官であるというこれまでの説を支持するものである。しかし、このような全器官を用いる系は定量的かつくに不適当である。そこで、さらにつぎの実験をおこなつた。

中腸の組織をトリプシンでこわして浮遊細胞にし、

毒素とインキュベートした。毒素としてはメルカプトエタノールで可溶化したものを用いた。Fig. 5 に結果を示す。コントロール (DBA のみ, あるいはトリプシンを適量含むもの) に比べて, 可溶化した毒素を添加した反応系では紫外吸収物質の放出が著しかった。漏出物質は S-180 の場合と類似する RNA 様のスペクトルを示した (図略)。くり返し行なった同様の実験においてコントロールと毒素を添加した系との間にほとんど差が生じない結果に終ることがあった。おそらく中腸の遊離細胞を作るときにトリプシンでくりかえし処理したため, 細胞の損傷が著しくなり, 毒素による反応が検出されにくくなったためであろう。よりおだやかな条件下で細胞を分散させること, そしてジチオスレイトルで可溶化しさらに分画をおこなった毒素 (Nagamatsu *et al.*, 1978) を用いることが必要である。

考 察

細胞が毒素の作用を受けたのちどのようにして紫外吸収物質を放出するにいたるかはわかっていない。B.t. の可溶性結晶物質の場合, S-180 細胞への結合は急速におこっているようである。なぜならば, 放射性アミノ酸でラベルした結晶毒素をとり, 上記の条件下で可溶化して S-180 細胞とインキュベートすると, 細胞へのラベルの移行はインキュベート直後に開始し, 15分で飽和に達するからである。以後の時間, 結晶物は培地と細胞との間で平衡関係にあるように思われる (関武純, 未発表)。(もつとも, この実験では, ラベルが結晶タンパク質の bulk の成分に入るのであるから, 全体の一部を占めているであろう毒素成分の動きを必ずしも, 反映しないかもしれない。) 一方, 紫外吸収物質の放出は 100 分のインキュベーションのちにプラトーに達する (Fig. 1) ので, この反応は, 一連の毒作用のうち, 比較的遅い方のできごとであると思われる。リン脂質の遊離は, もつと早く, 30分ではほぼ最高値に達する (Fig. 3)。リン脂質は膜の主成分であるから, 膜への作用が比較的早くおけると想像できる。アミノ酸取り込み能も, 毒素を添加した直後から全く抑制されている (Fig. 4)。

これらのことから, 活性化した毒素が S-180 に接すると, まず細胞の膜が崩壊し, 物質の取り込み阻害, そして, 細胞内のリボゾームの崩壊と RNA 分解物の放出などの一連の反応がおこるものと推察される。詳細については今後の証明を待たなければならない。いずれにしても, 紫外吸収物質とリン脂質の放出は, 毒

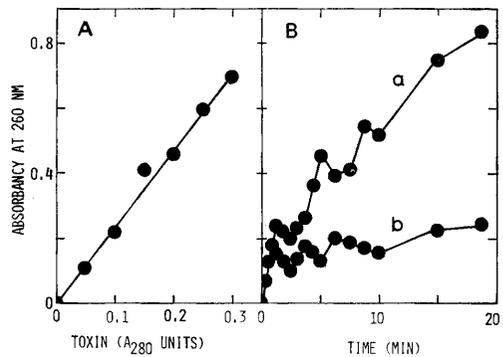


Fig. 5. Release of UV-absorbing substances from free cells prepared from midgut. A. Reaction was performed at 37°C with shaking in 0.6 ml DBA solution containing gut cells (liberated with trypsin) and various amounts of toxin (solubilized with mercaptoethanol). After 1 hr the mixture was diluted, centrifuged, and the supernatant measured for A₂₆₀ as described in Fig. 1. B. Similar reaction to A was performed but using 20 ml reaction mixture containing 3.3 A₂₈₀ units of toxin (solubilized with mercaptoethanol). At intervals aliquots were withdrawn and treated as above. (a) with toxin; (b) with DBA alone.

作用の定量化に役立つことが示された。

CIR は, 元来, ガン細胞に特異的な作用物のスクリーニングに用いられた (Tanaka *et al.*, 1971)。今回用いた S-180 細胞もガン細胞の一つであり, マウスに投与すると腹水ガンをおこす。こうしてできた腫瘍マウスに B.t. 毒素を注射すると, ガンが治癒するのであろうか。Parasad and Shethna (1974) によると, 吉田肉腫の種接を受けたラットは, 可溶化した B.t. 結晶物 (または分画した成分) によつて延命効果を示すという。彼らはこの知見をもとに B.t. の結晶には抗腫瘍性があると主張している。しかし, 活性化した B.t. 毒素が, 正常細胞に比べてガン細胞の方により選択的に作用するかどうかという疑問が残る。正常な肝細胞などとの CIR の比較が待たれる。

なお, Fig. 5B に示すように, 細胞からの紫外吸収物質の放出過程は, 詳しいタイムコースを観察すると, 振動しているようにみえる。これは, 実験誤差によるものであると思われるが, 実際の振動の反映であるかもしれない。生体反応系の振動はよく知られている。細胞内外における物質の平衡により, 細胞物質の放出量の周期的変化を生ずる可能性は, 十分考えられることである。

要 約

Bacillus thuringiensis T84 A1 株の産生する δ -内毒素は、カイコ消化液プロテアーゼなどによりあらかじめ可溶化しておく、マウスザルコーマ180腹水ガン細胞に *in vitro* で作用して、培地への紫外吸収物質の漏出を著しく促進することがわかった。

漏出された物質は、260 nm に極大吸収をもつ RNA 様のものであった。また、可溶性毒素はザルコーマ細胞からのリン脂質の遊離をも促進した。

この毒素の実際の標的器官であるといわれる中腸組織(カイコ)を、可溶化した毒素を含む培地中に浸しておく、培地に紫外吸収物質の放出が観察された。カイコ中腸組織からトリプシン処理により遊離の細胞をとって毒素で処理しても同様の結果が得られた。ただしカイコの遊離細胞の実験では、毒素に対して特異的な反応を示すような無傷の細胞を得ることが必要であった。

文 献

- 鮎沢啓夫・岩花秀典・勝木元也 1976 殺虫性蛋白質を産生する *Bacillus thuringiensis* とその利用。化学と生物, 14: 214-221
- Aviv, H., I. Boime and P. Leder 1971 Protein synthesis directed by encephalomyocarditis virus RNA: Properties of a transfer RNA-dependent system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68: 2303-2307
- Bartlett, G. R. 1959 Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 234: 466-468
- Bulla, L. A., Jr., K. J. Kramer and L. I. Davidson 1977 Characterization of the entomocidal paraperal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 130: 375-383
- Fiske, C. H. and Y. Subbarow 1925 The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375-400
- Folch, J. M. Lees and G. H. Sloane Stanley 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509
- Nagamatsu, Y., R. Tsutsui, T. Ichimaru, M. Nagamatsu, K. Koga and K. Hayashi 1978 Subunit structure and toxic component of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 32, in press
- Parasad, S. S. S. V. and Y. I. Shethna 1974 Purification and partial characterization of the antitumour and insecticidal protein subunit from the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 363: 558-566
- Tanaka, J., R. Shimizu and M. Hatano 1971 Characteristics of CIR (cell injuring reaction) active substance in culture fluid of *Bacillus cereus*, "MS-1063 Strain." *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 24: 77-81

Summary

The insecticidal δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* strain T84 A1 was found to attack mouse sarcoma 180 ascites cells *in vitro*, stimulating the release of UV-absorbing substances from the cells into the medium. For this effect it was required that the proteinaceous endotoxin was previously solubilized by gut-juice protease from the silkworm or by a reducing agent. The substances released had a UV-spectrum like that of RNA. Phospholipid was also liberated significantly from sarcoma cells in the presence of solubilized endotoxin. After the midgut of the silkworm, which may be the primary target organ of the toxin, was suspended in a medium containing solubilized toxin, it released significant amounts of UV-absorbing substances into the medium. Similar effects were observed for free cells prepared from the silkworm midgut treated with trypsin. In the latter experiments, however, nonspecific liberation of UV-absorbancy was often observed even in the absence of toxin, suggesting that the intactness of free cells after trypsin-treatment may be critical.