

УДК 632.937:595.142.39:591.23

Вегетативные инсектицидные белки

А.Г. ВИКТОРОВ,
старший научный сотрудник
Института проблем
экологии и эволюции
имени А.Н. Северцова РАН
e-mail: aleviktorov@yandex.ru

Возделывание генетически модифицированных сельскохозяйственных культур, несущих *Cry*-гены грамм-положительной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis*, выявило разную чувствительность вредных насекомых к *Bt*-токсинам (*Cry*-белкам, или дельта-эндотоксинам). В ряде случаев понадобилось дополнительное применение таких инсектицидов, как пиретроиды, карбаматы и даже фосфорорганические соединения, особенно на полях трансгенного хлопчатника. Именно с целью поиска инсектицида следующего поколения молекулярные биологи приступили к детальному изучению всего спектра белков, производимых бактерией *B. thuringiensis*.

Наибольший интерес в качестве такового вызвали *Vip*-белки – vegetative insecticidal protein (вегетативные инсектицидные белки). Первым был обнаружен ген *vip3A(a)* у бактерий *B. thuringiensis* из штамма AB88. Гомологичные гены были выявлены также примерно у 15 % штаммов этого вида. Кодированный геном *vip3A(a)* белок состоит из 791 аминокислоты и весит порядка 88,5 kDa*. Белок *Vip3A* не имеет структурной гомологии с дельта-эндотоксинами, в частности у него нет длинной амфипатической спирали в N-концевой части белка (домен 1), которая у *Cry*-белков ответственна за

проникновение сквозь клеточную мембрану. Из этого можно сделать вывод об ином механизме действия *Vip*-белков. В отличие от дельта-эндотоксинов, экспрессия которых проходит во время споруляции, синтез *Vip*-белков начинается на стадии вегетативного роста (с середины логарифмической фазы) и продолжается во время споруляции. В отличие от дельта-эндотоксинов секрета *Vip*-белков происходит без процессинга N-концевой части. *Vip*-белки непохожи на другие известные протеины и представляют собой новый класс токсинов, поражающих личинки чешуекрылых в течение 24–72 ч после попадания в желудочно-кишечный тракт. Спектр инсектицидной активности белков *Vip3A* довольно впечатляющ: хлопковые совки (*Spodoptera frugiperda*, *S. exigua*, *Helioverpa zea*), совка ипсилон *Agrotis ipsilon*, табачная огневка *Heliothis virescens*. Таким образом, список видов чешуекрылых, гусеницы которых погибают от *Vip3A* значительно шире соответствующего показателя у *Cry*-белков [2].

Токсичность *Vip3A* на два-три порядка превышает таковую дельта-эндотоксинов. Так, если LD_{50} белков *CryIA(b)* и *CryIA(c)* для гусениц *A. ipsilon* составляет около 80 и 18 мкг на мл корма соответственно, то 100 % смертность особей того же вида достигается при добавлении всего 62 нг *Vip3A* на 1 мл искусственного корма [2]. Гистологические исследования показали, что нанесение *Vip3A* на искусственный корм в концентрации 4 нг/см² вызывало паралич кишечника у гусениц 1-го возраста *A. ipsilon* и *S. frugiperda*. При-

менение более высокой дозы – 40 нг/см² – вызывало полный лизис клеток эпителия кишечника и гибель гусениц, в то же время гусеницы кукурузного мотылька (*Ostrinia nubilalis*), не чувствительные к этому токсину, питались кормом, содержащим *Vip3A* белки, без всяких отрицательных для себя последствий [7].

При попадании в кишечник гусениц белок *Vip3A*, весящий 88,5 kDa, протеолитически активируется до белка, весящего 62 kDa. В лабораторных экспериментах протоксин *Vip3A-F* [Full-length] протеолитически активировался и при воздействии трипсина – *Vip3A-T* [Trypsin], и экстракта кишечного сока – *Vip3A-G* [Gut]. Крайне интересным представляется и то обстоятельство, что токсин *Vip3A* активируется кишечным соком как чувствительной к нему табачной рогатой гусеницы – бражник сфинкс *Manduca sexta*, так и не чувствительной гусеницы кукурузного мотылька [3]. Из данного обстоятельства можно сделать вывод, что устойчивость насекомых к этому токсину обусловлена более тонкими молекулярными механизмами.

Изучение поведения меченого белка *Vip3A-G* в кишечнике гусениц *M. sexta* показало, что происходит его конкурентное связывание с мембранными пузырьками клеток щеточной каймы эпителия средней кишки. В то время как протеолитическая обработка *Vip3A* белка в кишечниках как чувствительных, так и не чувствительных насекомых происходит одинаково, *in vivo* иммулокализация показывает, что молекулы *Vip3A* прикрепляются к клеткам эпителия кишечника гусениц, чувствительных к нему, в значительно больших масштабах, нежели к таковым у гусениц, не чувствительных к *Vip3A*. Исследования *in vitro* клеток средней кишки гу-

* kDa – единица атомарной массы.

сениц *M. sexta* показали, что если молекулы активированного токсина Cry1Ab связывались с 120 kDa аминокептидазы-N и 250 kDa молекул кадгерина, то молекулы токсина Vip3A-G прикреплялись к 80 kDa и 100 kDa молекул, отличавшихся от всех известных Cry1Ab рецепторов. Исследования *in vitro* средней кишки гусениц *M. sexta* методом фиксации напряжения показали, что белок Vip3A-G действительно образует поры, в то время как белок Vip3A-F на это не способен. В то же самое время при проведении аналогичных опытов с не чувствительными к Vip-белкам гусеницами *Danaus plexippus* Vip3A-G поры не образовывал. В плоских липидных бислоях Vip3A-G и Vip3A-T образовывали ионные каналы в отсутствии любых рецепторов, подтверждая имманентное свойство белка Vip3A к образованию пор [3].

Вместе с тем, некоторыми авторами не исключалась возможность белка Vip3A вызывать апоптоз клеток после прикрепления к соответствующим рецепторам чувствительных насекомых [3]. Термин «апоптоз» обозначает программу гибели клеток, которая включает в себя «слипание» хромосом, фрагментацию клеточного ядра, конденсацию цитоплазмы, пузырьковидные вздутия клеточной мембраны и, наконец, разрушение всей клетки. Апоптоз, как механизм токсического воздействия, не взаимоисключаем с механизмом образования пор. Так, было показано, что бактериальные токсины аэролизин, производимый *Aeromonas hydrophila*, и альфа-токсин – *Staphylococcus aureus*, в зависимости от дозы и типа клеток могут индуцировать и порообразование и апоптический синдром [5, 6]. Кроме того, токсические агенты, полученные из спор *B. thuringiensis*, могут индуциро-

вать *in vitro* апоптоз клеток средней кишки *H. virescens* [4].

Таки или иначе, к настоящему времени фирмой Syngenta Crop Protection уже разработано несколько линий хлопчатника, содержащих гены Vip3A: COT102, COT202 и COT203. Кроме того, проходит испытания принципиально новая трансгенная технология VipCot. Растения этого сорта генетически модифицированного хлопчатника содержат сразу два гена *B. thuringiensis*: Vip3A и Cry 1Ab. Результаты, полученные на экспериментальных посевах VipCot хлопчатника в 2005–2007 гг., показали его высокую эффектив-

ность как против хлопковой совки, так и против табачной огневки. В ближайшее время следует ожидать появления и других генетически модифицированных сельскохозяйственных культур, содержащих Vip-гены. Однако до сих пор никто еще не ответил на вопрос известного канадского генетика Joe Cummins [1]: все ли меры безопасности предприняты для того, чтобы содержащиеся в трансгенном хлопчатнике Vip-белки, вызывающие апоптоз клеток млекопитающих, не причинили непоправимого вреда, попадая в сырье для производства одежды, пищу человека и корм для скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cummins J. Death Domains in New Bio-pesticides. 2005 // <http://www.i-sis.org.uk/DeathDomains.php>
2. Estruch J.J., Warren G.W., Mullins M.A., Nye G.J., Craig J.A. & Koziel M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. // PNAS, 1996, v. 93, p. 5389–5394.
3. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N. and Chen J. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab d-endotoxin / Appl. Environ. Microbiol, 2003, v. 69, p. 4648–4657.
4. Loeb M.J., Hakim R.S., Martin P., Narang N., Goto S. and Takeda M. Apoptosis in cultured midgut cells from *Heliothis virescens* larvae exposed to various conditions. // Arch. Insect Biochem. Physiol, 2000, v. 45, p. 12–23.
5. Menzies B.E., Kourteva I. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. // FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, v. 29, p. 39–45.
6. Nelson K.L., Brodsky R.A. and Buckley J.T. Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T-lymphomas. // Cell Microbiol, 1999, v. 1, p. 69–74.
7. Yu C.-G., Mullins M.A., Warren G.W., Koziel M.G. and Estruch J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. // Appl. Environ. Microbiol, 1997, v. 63, p. 532–536.

Аннотация. Рассмотрен механизм действия вегетативных инсектицидных белков (Vip3A), вырабатываемых бактерией *Bacillus thuringiensis*. Оценены перспективы использования Vip3A(a) генов в создании трансгенных растений второго поколения.

Ключевые слова. *Bacillus thuringiensis*, вегетативные инсектицидные белки, трансгенные растения, апоптоз.

Abstract. The paper discusses the toxic effect of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal proteins (Vip3A). It considers the prospects of using Vip3A(a) genes in the construction of the second generation transgenic plants.

Keywords. *Bacillus thuringiensis*, vegetative insecticidal proteins, transgenic plants, apoptosis.