

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07780

研究課題名(和文) 培養細胞に損傷活性を示す微生物由来新規生物活性タンパク質の発見と機能解析

研究課題名(英文) Discovery and functional analysis of the novel protein derived from microorganism that shows damaging activity on cultured cancer cells

研究代表者

浴野 圭輔 (EKINO, Keisuke)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：30310030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Bacillus thuringiensis (BT)の培養液中に細胞損傷活性を示すタンパク質が存在することがわかった。タンパク質精製を行い、A297株ゲノム上に存在する297_1_00946遺伝子が目的タンパク質候補と考えられた。また、培養条件により、活性を示さない条件がわかったため、両培養条件における遺伝子発現量の比較解析を行った。その結果、2種の二次代謝産物および1種のエンテロトキシンの生産に関連する遺伝子の発現量に差があることがわかり、解析をすすめている。また、蛍光プローブを用いた細胞損傷活性の解析により、培養細胞の細胞膜に作用することが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bacillus thuringiensis (BT)は殺虫タンパク質を生成することから、これまで微生物殺虫剤や遺伝子組換え作物に利用されてきた。21世紀に入り、BTが作る結晶性タンパク質の中に培養細胞に対して損傷活性を示すタンパク質が発見され、パラスポリンとよばれている。現在6種類に分類されているこれらのタンパク質は既知タンパク質との配列相同性が低く、新規な生物活性タンパク質である。本研究課題の成果は、これらBTの生物活性タンパク質の新たな知見を提供する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It was found that a protein having a cell-damaging activity exists in the culture medium of Bacillus thuringiensis (BT). After protein purification, the 297_1_00946 gene present on the A297 strain genome was considered to be a target protein candidate. Moreover, since the condition showing no activity was found depending on the culture conditions, a comparative analysis of gene expression levels under both culture conditions was performed. As a result, it was found that there are differences in the expression levels of genes related to the production of two secondary metabolites and one type of enterotoxin, and further analysis is being conducted. In addition, analysis of cell-damaging activity using a fluorescent probe strongly suggested that it acts on the cell membrane of cultured cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Bacillus thuringiensis parasporin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Bacillus thuringiensis(BT)は菌体内にタンパク質のかたまりを形成し、そのタンパク質はさまざまな昆虫に対して殺虫活性を示す。これら殺虫タンパク質は現在までに 800 種類以上が発見され、アミノ酸配列の相同性により 78 種類のグループ (Cry1 ~ Cry78) に分類されている。BT 研究の多くはこの殺虫タンパク質に関するものであるが、近年新たな生物活性分子として、培養がん細胞損傷タンパク質パラスポリンが発見されている。本タンパク質は興味深いことに、例えば、ヒト白血病細胞 molt-4 には強い損傷活性を示すが、ヒト正常肝細胞 HC やヒト組織球性リンパ腫細胞 U937 には作用しないなど、細胞特異的(選択的)な損傷活性を示す。現在発見されているパラスポリンは、わずか 6 種類であるが、細胞の選択性がそれぞれ異なることに加え、その細胞損傷メカニズムも、アポトーシスを誘発するもの、あるいは細胞膜に孔を形成するものなど、それぞれのパラスポリンによって異なることが明らかになってきている。このような背景のもと本研究課題において、独自に培養がん細胞損傷活性を BT から探索した結果、パラスポリンとは明らかに異なる細胞損傷タンパク質を新たに見出した。

2. 研究の目的

BT A297 株の培養液が示す白血病細胞 molt-4 の形態変化は、申請者がこれまで解析を行ってきたパラスポリンのそれとは明らかにことなることから、パラスポリンとは異なる損傷機構によって培養細胞を死に至らしめていることが予想された。本研究では、この培養細胞損傷タンパク質の詳細を明らかにすることを目的にまずは、活性本体の精製および分子の特定を行った。また、培養細胞に対して損傷活性を示す機構について解析を行った。

3. 研究の方法

まずは、活性本体を特定するため、A297 株の培養液をサンプルとして、精製を行った。次に、A297 株のゲノム配列を次世代シーケンズ解析により明らかにした。精製サンプルからトリプシンによる in gel digestion によって得られたサンプルの nanoLC-MS/MS 解析を行い、そのデータから目的タンパク質の同定を行った。PCR により目的遺伝子のクローニングを行い、pET 発現システムを用いた大腸菌による異種遺伝子発現系を構築し、活性の確認を行った。

本細胞損傷活性は、培養条件によりその活性を示さなくなることが明らかとなったことから、培養条件の違いによる遺伝子発現量について、それぞれの培養条件における RNA-seq 解析を行った。

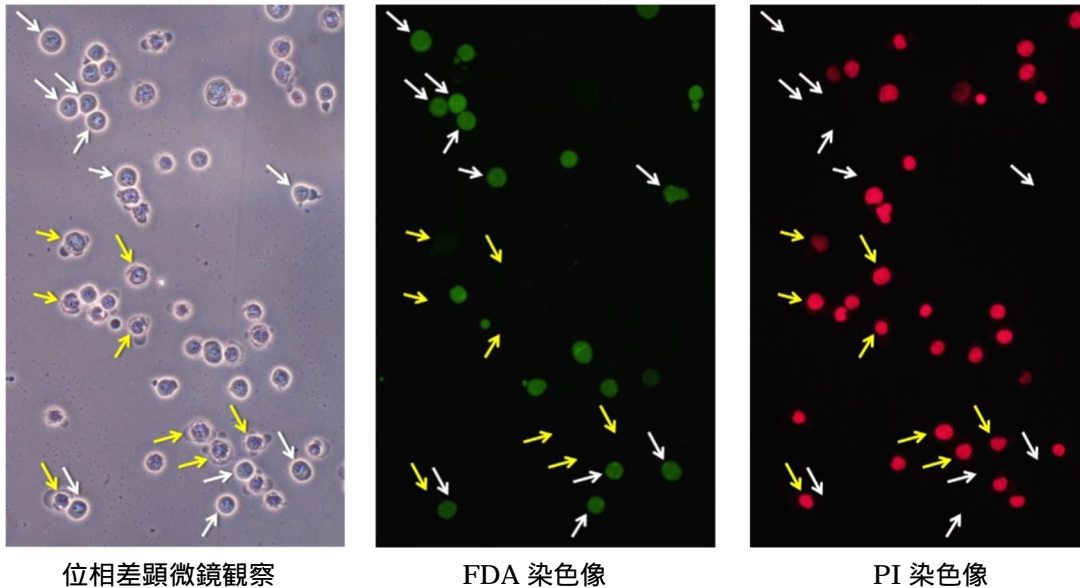
培養細胞の損傷活性機構を解析するため、molt-4 細胞に対してサンプルを添加し、蛍光プローブによる解析を行った。生細胞蛍光染色色素である Fluorescein diacetate (FDA) と、細胞膜に損傷がある場合に細胞内に取り込まれる核染色色素ヨウ化プロピジウム (PI) とともに二重染色し、蛍光顕微鏡下での形態観察を行った。

4. 研究成果

A297 株の培養液をサンプルとして、各種クロマトグラフィーによる精製を行った。SDS-PAGE の結果、約 60 kDa に単一のバンドを得ることができた。精製と並行して、次世代シーケンズ解析によって A297 株のゲノム配列解析を行った。A297 株は約 5.2 Mb の染色体に加えて、6 つのプラスミドを保持していることが明らかとなった。精製サンプルが微量であったため、まず、精製サンプルを電気泳動した後、タンパク質試料をゲル内酵素消化し、nanoLC-MS/MS 解析を行った。得られたペプチドの MS/MS データをもとに、次世代シーケンズ解析によって得られたゲノム配列情報を参照して目的タンパク質の同定を行った (MS/MS Ion Search)。その結果、目的タンパク質が染色体上の 297_1_00946 遺伝子であることが予想された。

そこでまず、pET32b を用いた発現系を構築し、大腸菌による異種遺伝子発現を行った。しかしながら、本タンパク質がシグナル配列を持ち、成熟タンパク質の N 末端配列が正確にわからないことなどから、全長タンパク質、シグナル配列を除いたものなど数種類の発現系を構築したものの、活性を確認することができなかった。次に、BT の近縁種である *Brevibacillus* による発現系を構築したが、大腸菌による発現系同様活性を確認することができなかった。

A297 株の細胞損傷活性について蛍光プローブを用いてその機構を解析した。molt-4 細胞に培養サンプルを添加し、FDA (細胞内に取り込まれると、細胞内の各種酵素により加水分解され蛍光性の Fluorescein となることから生細胞が蛍光染色される) と PI (生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞にのみ入り込み核内の DNA に intercalate し赤色蛍光を発する) による二重蛍光染色を行った。その結果、生細胞は緑色の蛍光を示す一方、そうでない細胞は PI により赤色の蛍光を示すことが確認された。従って、A297 株の培養サンプルによって、培養細胞の細胞膜が損傷を受けていることが明らかとなった(下図、白矢印は生細胞を、黄色矢印は死細胞を示した)。



位相差顕微鏡観察

FDA 染色像

PI 染色像

図. 蛍光プローブによる細胞損傷活性の観察

その後、A297 株の培養サンプルは、培養条件の違いによって、細胞損傷活性を示す条件とそうでない条件があることがわかった。A297 株は 25 °C で 14 時間の振とう培養では活性を示すが、37 °C での振とう培養では活性を示さないことが明らかとなった。そこで、両培養条件における遺伝子発現量の解析を行った。一方、次世代シーケンス解析の飛躍的な発展によって多くの微生物のゲノム配列が明らかにされた結果、Bacillus 属細菌には様々な二次代謝産物の生産に關与する遺伝子クラスターが存在することが明らかになってきた。それらの中には、Bacillibactin や Bacillomycin の誘導体のように細胞損傷活性を示すものも存在する。そこで、A297 株のゲノム配列に対して、ゲノムマイニングツールである antiSMASH によるこれらの遺伝子クラスター解析を行った。本解析では、リボソームペプチドおよび非リボソームペプチドを含む様々な二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを検出することができる。その結果、A297 株にはこのような遺伝子クラスターが 18 種類存在することがわかった。それらのうち、明らかに既知物質と判定できたものは、非リボソームペプチドである petrobactin のみであり、ほとんどが未同定分子の生産に關与するものであることが明らかとなった。これまでの解析により、297_1_00946 遺伝子産物が目的タンパク質候補ではあるものの、確証を得るまでに至らなかったため、これらの分子についても候補対象として遺伝子発現量の比較を行った。その結果、297_1_00946 遺伝子は約 4 倍の発現上昇が確認され、18 の遺伝子クラスターのうち、クラスター内の遺伝子間で発現上昇の程度に差はあるものの、2 種類の遺伝子クラスターに関して発現上昇が確認された。一方で、本菌株のゲノム上に確認されたエンテロトキシン遺伝子のうち Hbl の発現が 5~8 倍上昇していることから、細胞損傷活性に關与している可能性も考えられた。

現在、これら候補分子について解析を進めている。具体的には、発現変動解析によって抽出された候補遺伝子の遺伝子破壊株を構築し、培養細胞に対する損傷活性を確認している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hassan Naim, Easmin Farhana, Sasano Yu, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Systematic approach for assessing whether undeletable chromosomal regions in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> are required for cell viability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-020-01001-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hassan Naim, Sasano Yu, Kimura Shunta, Easmin Farhana, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 CRISPR-PCDup: a novel approach for simultaneous segmental chromosomal duplication in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-020-0957-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 3.Easmin F, Sasano Y, Kimura S, Hassan N, Ekino K, Taguchi H, Harashima S.	4. 巻 129
2. 論文標題 CRISPR-PCD and CRISPR-PCRep: Two novel technologies for simultaneous multiple segmental chromosomal deletion/replacement in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 129-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Easmin Farhana, Hassan Naim, Sasano Yu, Ekino Keisuke, Taguchi Hisataka, Harashima Satoshi	4. 巻 128
2. 論文標題 gRNA-transient expression system for simplified gRNA delivery in CRISPR/Cas9 genome editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 373 ~ 378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 浴野圭輔	4. 巻 97
2. 論文標題 微生物結晶性タンパク質の機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onoue Takuya, Tanaka Yutaka, Hagiwara Daisuke, Ekino Keisuke, Watanabe Akira, Ohta Kazuyoshi, Kamei Katsuhiko, Shibata Nobuyuki, Goto Masatoshi, Oka Takuji	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of Two Mannosyltransferases Contributing to Biosynthesis of the Fungal-type Galactomannan -Core-Mannan Structure in <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35059-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Shuichi, Atsuyama Kenji, Ekino Keisuke, Shin Takashi	4. 巻 66
2. 論文標題 Estimating the Diffusion Coefficients of Sugars Using Diffusion Experiments in Agar-Gel and Computer Simulations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 632 ~ 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ekino Keisuke, Yonei Shinichi, Oyama Hiroshi, Oka Takuji, Nomura Yoshiyuki, Shin Takashi	4. 巻 184
2. 論文標題 Cloning, Purification, and Characterization of Tripeptidyl Peptidase from <i>Streptomyces herbaricolor</i> TY-21	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 239 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-017-2547-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katafuchi Yukako, Li Qiushi, Tanaka Yutaka, Shinozuka Saki, Kawamitsu Yohei, Izumi Minoru, Ekino Keisuke, Mizuki Keiji, Takegawa Kaoru, Shibata Nobuyuki, Goto Masatoshi, Nomura Yoshiyuki, Ohta Kazuyoshi, Oka Takuji	4. 巻 27
2. 論文標題 GfsA is a 1,5-galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 568 ~ 581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwx028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Farhana Easmin, Naim Hassan, Yu Sasano, Keisuke Ekino, Hisataka Taguchi, and Satoshi Harashima
2. 発表標題 PCR-based simplified gRNA delivering system for CRISPR/Cas9, gRNA-TES, in yeast.
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Farhana Easmin, Naim Hassan, Yu Sasano, Keisuke Ekino, Hisataka Taguchi, and Satoshi Harashima
2. 発表標題 PCR-based quick method to deliver gRNA for CRISPR/Cas9 in yeast.
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋大志, 浴野圭輔, 尾山 廣
2. 発表標題 Pimelobacter由来metzincinメタルプロテアーゼの構造と機能
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前山 諒, 岡 拓二, 原島 俊, 浴野圭輔
2. 発表標題 Bacillus subtilis NBRC13719由来抗菌ペプチドの解析
3. 学会等名 日本生物工学会支部沖縄大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷 龍典, 門畑凌太, 村上亮輔, 藤本昌希, 平川万里, 浴野圭輔, 原島 俊
2. 発表標題 バガス由来阻害物耐性出芽酵母変異株の分離と遺伝解析
3. 学会等名 日本生物工学会支部沖縄大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 糸数帆高, 松本拓己, 浴野圭輔, 西澤正文, 原島 俊
2. 発表標題 出芽酵母における“超”高次倍数体育種技術の開発
3. 学会等名 日本生物工学会支部沖縄大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考