

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：87104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580111

研究課題名（和文）微生物由来がん細胞特異的毒素の生体に対する毒性と消化器がん抑制効果

研究課題名（英文）Toxicity and antitumor effects of parasporin-4 from *Bacillus thuringiensis* strain A1470

研究代表者

奥村 史朗（OKUMURA SHIRO）

福岡県工業技術センター・生物食品研究所・専門研究員

研究者番号：40399671

研究成果の概要（和文）：

パラスポリン 4 はヒト大腸がん由来の CACO-2 細胞をはじめとするヒト培養がん細胞に対して高い細胞傷害活性を示す一方で、正常細胞に対しては細胞傷害活性を示さないが、このことは正常な哺乳動物に対して毒性を示さないことを保証するものではない。そこで、マウスに対する急性毒性および長期投与における健康への影響を検討した。また、パラスポリン 4 前駆体封入体の経口投与によるがん抑制効果の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

Parasporin-4 (PS4) is a cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. It exhibits specific cytotoxicity against human cancer cell lines especially CACO-2, Sawano, and MOLT-4 cells. And it does not exhibit the activity against 4 normal tissue cells such as human primary hepatocyte cells, UtSMC, MRC-5, and normal T cells. However, these results do not provide assurance that the protein exhibits no toxicity to mammals. In this study, we determined acute toxicity and effects of long-term administration of PS4 on mouse. In addition, we tested the inhibitory effects of oral administration of pre-PS4 against colon cancer on mutant mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学、応用微生物、培養細胞

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：生物工学、パラスポリン、変異マウス、大腸がん、*Bacillus thuringiensis*

## 1. 研究開始当初の背景

*Bacillus thuringiensis* (BT)はグラム陽性の桿菌で孢子形成時に封入体のタンパク質を形成するという特徴をもっている。この封入体タンパク質は昆虫の消化液を模した

アルカリ溶液で可溶化し、アルカリプロテアーゼでプロセッシングすることで特定の昆虫に対する殺虫活性を示すことで知られ、クライトキシン (Cry)と呼ばれている。この殺虫活性を利用し、多くの害虫抵抗性遺伝子組

換え作物に Cry 遺伝子が導入されているが、ほとんどの Cry は酸性溶液中では凝集して失活することが知られており、Cry が胃酸で失活することが、人体に対する安全性の根拠のひとつとなっている。

我々は約 5000 株の BT ライブラリから新規殺虫活性タンパク質の探索を行ってきたが、殺虫活性を示す BT 株はごく一部であり、多くの株が産生する封入体タンパク質には殺虫活性が認められない。しかし、これら殺虫活性のない株の中からヒト培養がん細胞に対して細胞傷害活性を示す株を発見しパラスポリンと命名した。本研究開始時には全部で 14 種類のパラスポリンが発見され、そのアミノ酸配列の相同性から大きく 4 つに分類されていた。このうち A1470 株により産生されるパラスポリン 4 は、ヒト大腸がん由来の CACO-2 細胞に特に強い細胞傷害活性を示す一方で、正常細胞には作用せずがん細胞特異的な毒素と考えられている。その前駆体は分子量 30kDa で、この前駆体を含む封入体をアルカリ溶液で可溶化し、プロテアーゼ K によるプロセッシングを行うと、C 末側が切断されて 27kDa の活性体となり、はじめて細胞傷害活性を示す。パラスポリン 4 前駆体の遺伝子を導入した組み換え体大腸菌は、A1470 株と同様に封入体としてパラスポリン 4 前駆体を生産し、この封入体を可溶化およびプロセッシングすることにより A1470 株の封入体と同様の細胞傷害活性を示す。パラスポリン 4 は pH 2 という強酸性条件でも安定で、アルカリ溶液の約 2.5 倍という大きな溶解度を示し、そのままペプシンによるプロセッシングにより、アルカリ条件と同等の比活性を示す活性体を得られる。パラスポリン 4 はアルカリ性から酸性までの広い pH 領域で安定であるという点において、酸性溶液中で失活する他のパラスポリンや Cry と大きく異なっている。同時に、このことは、パラスポリン 4 前駆体を哺乳動物に経口投与したときに、その消化器官内で可溶化され、消化酵素によりプロセッシングを受けることを意味し、その際のパラスポリン 4 の生体に対する安全性やがん抑制効果について大きな興味を引くこととなった。さらに、パラスポリン 4 は大腸がん細胞由来ヒト培養細胞である CACO-2 細胞に対して最も高い細胞傷害活性を示すが、大腸がんをはじめとする消化器がんは、パラスポリン 4 が消化管内でプロセッシングされたときに高濃度で暴露されるがん組織であることから、パラスポリン 4 の消化器がん抑制効果に大きな期待が持てる。

## 2. 研究の目的

パラスポリン 4 はヒト大腸がん由来の CACO-2 細胞をはじめとするヒト培養がん細胞に対して高い細胞傷害活性を示す一方で、

正常細胞に対しては細胞傷害活性を示さないが、このことは正常な哺乳動物に対して毒性を示さないことを保証するものではない。そこで、最初に実験動物へ投与可能な量を検討するために、哺乳動物に対する急性毒性および長期投与における影響を検討する。また、パラスポリン 4 の生体内における動態を検討するために、ELISA 法を用いたパラスポリン 4 の血中濃度の測定法を確立する。最終的には、パラスポリン 4 前駆体の経口投与によるがん抑制効果の検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) パラスポリン 4 のマウスへの急性毒性

6 週齢の雄の ICR マウスに 200  $\mu$ L の PBS に溶解した 0.5~50  $\mu$ g のパラスポリン 4 を腹腔内投与し、48 時間後の死亡率からその急性毒性を計算した。LD<sub>50</sub> はプロビット法により計算を行った。

### (2) パラスポリン 4 の長期経口投与における体重変化

C57BL/6J マウスに生後 60 日目から週 3 回乾燥重量にして 10 mg のパラスポリン 4 の前駆体封入体を 100  $\mu$ L の蒸留水とともにゾンデにより経口投与し、その体重変化及び目視可能な健康被害について検討を行った。

### (3) 血清中の微量パラスポリン 4 の ELISA による定量方法および血中動態

①パラスポリン 4 に対するウサギ及びマウス抗血清を作製し、これを精製して、サンドイッチ ELISA 法によるマウス血清中の微量パラスポリン 4 定量法の検討を行った。プレートは Maxsorp (Nunc 社製) を使用し、まずプレートにウサギ抗血清を PBS で希釈して 10  $\mu$ g/mL の濃度で 50  $\mu$ L 投入し、4°C で一晩インキュベートした。ウサギ抗血清を廃棄後、0.05% の Tween20 を含む PBS (tPBS) で洗浄し、200  $\mu$ L blocking buffer (5% スキムミルク in tPBS) を投入して 37°C で 1h インキュベートしてブロッキングを行った。blocking buffer を廃棄して tPBS で洗浄し、コントロールのウサギ血清を用いてパラスポリン 4 を希釈して 0.5 ng/mL~1  $\mu$ g/mL の濃度に調製し、各ウエルに 50  $\mu$ L 投入して 4°C で一晩インキュベートした。サンプルを廃棄後、tPBS で洗浄し、1%BSA を含む PBS で 300 倍希釈したマウス抗血清を 50  $\mu$ L 投入し、37°C で 1h インキュベートした。マウス抗血清を廃棄後、tPBS で洗浄し、50  $\mu$ L の希釈 2 次抗体 (anti-Mouse IgG HRP :  $\times$ 5000 in PBS, BSA1%) を加えて、室温で 1h インキュベートし、tPBS で洗浄後 ABTS 溶液を 100  $\mu$ L 加えて 405nm の吸光度変化を測定した。

②6 週齢の雄の ICR マウスに 100  $\mu$ L の PBS に溶解した 4  $\mu$ g のパラスポリン 4 活性

体を、腹腔内注射、皮下注射、静脈注射により投与し、その後 24 時間の血中濃度の変化を測定した。

#### (4) 大腸がん誘発変異マウスへのパラスポリン 4 の経口投与による延命試験

生後約 120 日で大腸がんを発症し死亡する C57BL/6J-APC<sup>Min</sup>/J 変異マウスおよびコントロールとしての正常 C57BL/6J マウスに、生後 60 日目から週 3 回乾燥重量にして 10 mg のパラスポリン 4 前駆体封入体を 100  $\mu$ L の蒸留水とともにゾンデにより経口投与し、その生存日数を検討した。コントロールとして同量の蒸留水を経口投与する群を用意した。

### 4. 研究成果

#### (1) パラスポリン 4 のマウスへの急性毒性

パラスポリン 4 活性体を ICR マウスの腹腔内へ投与し、48 時間以内での死亡による LD<sub>50</sub> を計算したところ、310  $\mu$ g/kg (95%信頼限界 190~580  $\mu$ g/kg) であった。パラスポリン 4 は膜孔形成型のトキシンであることがわかっているが、これは微生物が産生する膜孔形成型のトキシンとしてはきわめて弱い LD<sub>50</sub> 値である。図 1 にこの投与試験の際のプロビット法による濃度-反応割合解析結果を示した。

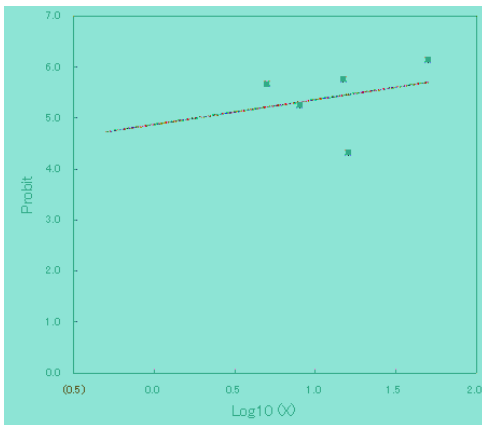


図 1 パラスポリン 4 を投与したマウスのプロビット法による解析

#### (2) パラスポリン 4 の長期経口投与における体重変化

図 2 に雄の C57BL/6J マウスへパラスポリン 4 前駆体封入体を経口投与した際の体重変化を、図 3 に雌の体重変化を示した。雄雌ともパラスポリン 4 前駆体封入体の投与と蒸留水の投与との間に体重変化の有意差が見られなかった。またパラスポリン 4 前駆体の経口投与による目視可能な健康被害も観察されなかった。

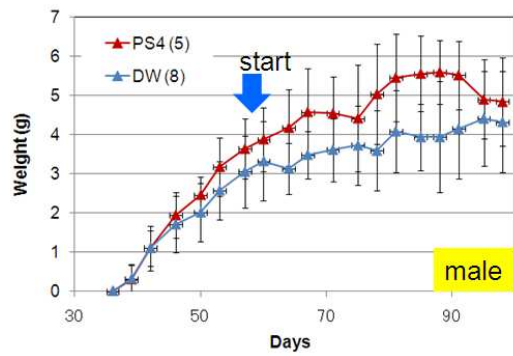


図 2 雄の C57BL/6J マウスへパラスポリン 4 前駆体封入体を経口投与した際の体重変化：エラーバーは標準偏差を示す。凡例のカッコ内の数字は検体数を示す。

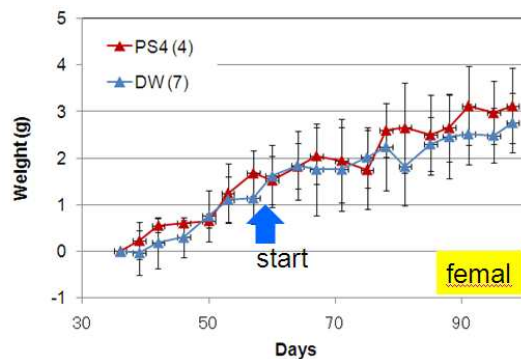


図 3 雌の C57BL/6J マウスへパラスポリン 4 前駆体封入体を経口投与した際の体重変化：エラーバーは標準偏差を示す。凡例のカッコ内の数字は検体数を示す。

#### (3) 血清中の微量パラスポリン 4 の ELISA による定量方法および血中動態

サンドイッチ ELISA 法により微量パラスポリン 4 の定量を行うために新規に抗パラスポリン 4 マウス抗血清を作製し、IgG 精製およびアフィニティ精製を行った。従来作製、精製していた抗パラスポリン 4 ウサギ抗体をマイクロプレートに固定化し、新規に調製したマウス抗体を検出用に用いて、血清に含まれるナノグラムオーダーのパラスポリン 4 活性体の定量を行った。結果を図 4 に示す。検量線はパラスポリン 4 が 1  $\mu$ g/mL の時に 405nm の吸光度値として約 0.047 と比較的大きな標準偏差を示したが、それ以下のパラスポリン 4 濃度では標準偏差が 0.012~0.025 と安定な測定結果が得られた。

次に、6 週齢の雄の ICR マウスに 4  $\mu$ g のパラスポリン 4 活性体を投与し、その後 24 時間の血中のパラスポリン 4 濃度の変化をこのサンドイッチ ELISA 法で測定した。静脈内投与では投与直後に 90 ng/mL 以上、皮下投

与では 80 ng/mL 以上の血中濃度を示し、その後急速に濃度が低下し 20 時間後には両投与方法ともに 10 ng/mL 以下となった。一方腹腔内投与においては、投与直後は血中内に parasporin 4 はほとんど存在しなかったが、投与後 2h で約 20 ng/mL の最高濃度となり、その後徐々に低下して 12h 後には測定限界以下となった。腹腔内投与においては最高血中濃度が静脈内投与や皮下投与と比較して 1/4 ~ 1/5 と大幅に低いことが認められた。

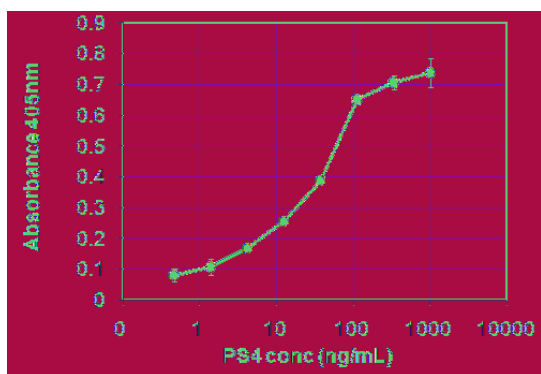


図 4 血清中の微量 parasporin 4 のサンドイッチ ELISA 法による定量：エラーバーは標準偏差を示す。

#### (4) 大腸がん誘発変異マウスへの parasporin 4 の経口投与による延命試験

哺乳動物に parasporin 4 前駆体を経口投与すると、parasporin 4 前駆体が胃酸で可溶化され、消化酵素であるペプシンで活性化されると予想される。実際にマウスに餌に混ぜた parasporin 4 前駆体封入体を一晩自由摂取させ、翌朝消化器官内の内容物を回収し、ウェスタンブロットにより解析を行うと、parasporin 4 が消化器官内で活性化されていることが確認された。この回収物をろ過滅菌し、CACO-2 細胞を用いてその細胞傷害活性を調べると、胃や小腸からの回収物は細胞傷害活性を保っていることが確認された。

C57BL/6J-APC<sup>Min</sup>/J 変異マウスに高カロリーの給餌を行うと大腸にポリープを生じ、体重が減少して生後 120 日前後で死亡する。この変異マウスに parasporin 4 前駆体を強制的に経口投与し、蒸留水を与えた群と比較して生存日数を調べ、生存率の経時変化を図 5 に示した。コントロールとして、正常 C57BL/6J マウスに、同様に parasporin 4 および蒸留水を与えた群を用意した。変異マウスは生後 100 日前後から死亡例が確認されるようになり、蒸留水投与群では 180 日で全数が死亡したが、parasporin 4 投与群では 200 日後も 10% が生存していた。途中経過では parasporin 4 投与群の死亡率が上回っていた

が、大腸がんを発症しない正常 57BL/6J マウスの parasporin 4 投与群においても検体の死亡が多数認められ、実験系に何らかの問題があったと考えられた。原因究明の上、再試験を行う必要があると考えられた。

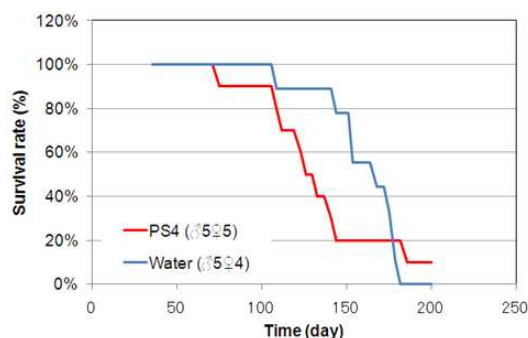


図 5 大腸がん誘発変異マウスへの parasporin 4 の経口投与による延命試験：凡例のカッコ内の数字は検体数を示す。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Shiro Okumura, Hiroyuki Saitoh, Tomoyuki Ishikawa, Kuniyo Inouye, Eiichi Mizuki, 2011 年, Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808 : 1476-1482, doi: 10.1016/j.bbame.2010.11.003 査読有

② Shiro Okumura, Tomoyuki Ishikawa, Hiroyuki Saitoh, Tetsuyuki Akao, Eiichi Mizuki, Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. *Biotechnology Letters*, 投稿中 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① *Bacillus thuringiensis* が産生するがん細胞傷害性タンパク質の担癌マウスに対する抗腫瘍効果、○奥村史朗、古賀浩徳、井上國世、水城英一、2013 年度日本農芸化学会、東北大学 (仙台市) 2013. 3. 26

② Parasporin-4 のマウスに対する毒性と担癌マウスに対する抗腫瘍効果、○奥村史朗、古賀浩徳、水城英一、第 5 回 parasporin 研究会、崇城大学 (熊本市) 2012. 12. 8

③ 微生物由来のがん細胞傷害性タンパク質

parasporin-4 のマウスに対する毒性、○奥村史朗、古賀慎太郎、黒田理恵子、古賀浩徳、井上國世、水城英一、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都女子大学(京都市) 2012. 3. 25

④ *Bacillus thuringiensis* A1470 株が産生する parasporin-4 はコレステロール非依存型の  $\beta$ -pore-forming toxin としてヒト培養がん細胞を破壊する、○奥村史朗、井上國世、第 84 回日本生化学会大会日本生化学会、国立京都国際会議場(京都市) 2011. 9. 22

⑤ *Bacillus thuringiensis* が産生するがん細胞破壊性タンパク質 Parasporin-4 のマウスに対する急性毒性、○奥村史朗、古賀慎太郎、黒田理恵子、古賀浩徳、井上國世、水城英一、日本農芸化学会 2011 年度大会京都女子大学(京都市) 2011. 3. 26

⑥ Parasporin-4 の作用機構について、○奥村史朗、齋藤浩之、石川智之、水城英一、第 4 回パラスポリン研究会、岡山大学津島キャンパス(岡山市) 2010. 11. 27

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：バチルス・チューリンゲンシス A 1470 株由来の細胞認識および細胞障害活性を有する新規タンパク質およびそれをコードする遺伝子

発明者：奥村史朗、齋藤浩之、水城英一、赤尾哲之、中村修、樋口和彦、石川智之、大庭道夫

権利者：福岡県

種類：特許

番号：特許第 4565891 号

取得年月日：2010 年 8 月 13 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

パラスポリン命名委員会

<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥村 史朗 (OKUMURA SHIRO)

福岡県工業技術センター・生物食品研究所・専門研究員

研究者番号：40399671

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

齋藤 浩之 (SAITOH HIROYUKI)

福岡県工業技術センター・生物食品研究所・専門研究員

研究者番号：60416493