

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：87104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07403

研究課題名(和文) がん細胞特異的に作用する微生物毒素の受容体解明と受容体に対する抗体の細胞への作用

研究課題名(英文) Elucidation of the parasporin-1 receptor and effect of the anti-parasporin-1 receptor antibody to human cell lines

研究代表者

奥村 史朗 (Okumura, Shiro)

福岡県工業技術センター・その他部局等・専門研究員

研究者番号：40399671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、パラスポリン1 (PS1) の受容体を解明することと有力な受容体候補であるベクリン1に対する抗体がPS1と同様にがん細胞をアポトーシスに誘導する現象について詳細に検討を行うことにある。これまで、PS1を固定化した光架橋プローブによりPS1の受容体の探索を行い、ウエスタンブロットにより解析を進めてきたが、解析結果の再現性が低く、それが探索の際の溶液中のカルシウム濃度と相関があることを発見した。また、ベクリン1を組換え体大腸菌により生産し、モノクローナル抗体を作成し、アフィニティ精製し、その細胞傷害活性およびPS1活性阻害能を測定したが、ともに活性は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the receptor of parasporin-1 (PS1) and investigate in detail the phenomenon that antibody against beclin-1 which is a potent receptor candidate induces apoptosis of cancer cells like PS1. For the search of receptors for PS1, we have searched with a photocrosslinking probe immobilized with PS1 and carried out analysis by western blotting, however, the reproducibility of the analysis result was not good. But we found that there is a correlation with the calcium concentration and the result of analysis. In addition, we produced recombinant beclin-1 by E. coli, and the monoclonal antibody was prepared from the protein. The cytotoxic activity against PS1-susceptible cell lines and the inhibitory ability against PS1 of the affinity purified antibody were measured, but neither activity was observed.

研究分野：応用微生物

キーワード：パラスポリン 受容体 細胞傷害活性 がん

1. 研究開始当初の背景

Bacillus thuringiensis (BT) は土壌に普遍的なグラム陽性の桿菌である。当研究所は5,000株のBTライブラリーを保有しているが、このすべてのBTは孢子形成時にクリスタルと呼ばれる巨大な封入体タンパク質を形成する(写真1)。BTはそれぞれ相同性があるが異なったクリスタルタンパク質を産生し、このクリスタルから殺虫性のタンパク質が多く発見されGMO作物の殺虫タンパク質遺伝子として利用されている。また2000年に当研究所でBTのクリスタルタンパク質からがん細胞傷害性のタンパク質を発見し、パラスポリンと命名している。現在では全部で19種類、大きく分けて6種類のパラスポリンが発見されている。ただし、大多数のBT株のクリスタルタンパク質からは殺虫タンパク質もパラスポリンも見つかっていない。

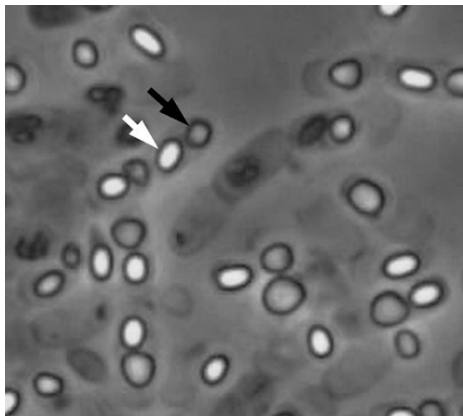


写真1 孢子形成時のBT(白矢印が孢子、黒矢印がクリスタル)

パラスポリンは申請者の所属する研究室で最初に発見されたタンパク質であり、国内のいくつかの研究グループがパラスポリン研究を実施している。近年、国外の研究者により多くの新規パラスポリンが報告され、イギリスや韓国、サウジアラビア、ブラジルなどから共同研究の申し入れがあるなど、その研究は世界的な広がりを見せている。パラスポリン1(PS1)は最初に同定されたパラスポリンであり、いろいろながん細胞に細胞毒性を示すが、ヒト正常細胞由来の培養細胞に対しては毒性を示さない。さらに、摘出ガン組織を利用した実験から、PS1はがん組織に対して毒性を示すものの正常組織に対する影響は著しく低いことがわかった。これらの実験結果から、PS1は細胞に存在する受容体依存の作用機構を有し、その受容体は正常細胞よりもむしろガン細胞に多く存在するものと推定された。また、PS1の細胞に対する作用機構解析の結果、PS1はCa²⁺流入により細胞内Ca²⁺濃度上昇を誘発し、標的細胞にアポトーシスを誘導すること、アポトーシスはカスパーゼ8の活性化を介して起こることが判明した。その後、申請者らは光反応性

化学架橋剤を用いることによりベクリン1(BECN1)をPS1受容体タンパク質として同定した。また、抗BECN1抗体を用いたフローサイトメトリー分析により、BECN1が細胞膜表面に存在すること、BECN1の細胞膜表面存在量と細胞のPS1感受性に高い相関性があることがわかった。しかしBECN1の細胞膜表面への局在を示す報告は現在のところなく、細胞膜表面への局在の生理的意義や機構などについては不明な点が多い。BECN1についてはポリクローナル抗体が市販されており、これを用いてPS1とBECN1の結合に対する抗BECN1抗体の効果を検討したところ、抗BECN1抗体はPS1の細胞への結合を阻害するが、PS1のがん細胞への毒性は阻害しなかった。そして、これは抗BECN1抗体自体がPS1と同じ細胞特異性で細胞毒性を示すためであることが判明した。さらに、抗BECN1抗体もまたPS1同様カスパーゼ8依存のアポトーシスを誘導することも判明した。これらの結果は、BECN1が特定のがん細胞では細胞膜に発現し、アポトーシス誘導と関連があること、PS1や抗BECN1抗体は細胞膜のBECN1と結合しアポトーシスの引き金となることを示唆している。

2. 研究の目的

我々はBECN1をPS1の受容体として同定しているが、一般的にはBECN1は細胞内においてオートファジーに重要な役割を果たすタンパク質として知られている。したがって、まずBECN1がPS1の受容体であることを多方面にわたって検討を行い、確定していく作業が必要である。

次に抗BECN1抗体について、予備試験では市販ポリクローナル抗体を用いてその細胞死誘導活性を検討してきたが、詳細な検討を進めていくうえで量やコストの問題があり、細胞死誘導活性のあるポリクローナル抗体を自製する必要がある。抗BECN1抗体がBECN1と似たドメインを持つ膜タンパク質と結合して細胞死誘導活性を発揮している可能性もあり、自製の抗BECN1ポリクローナル抗体を用いてその作用機構の検討を進めていく。また細胞死誘導活性を発揮する抗体画分を得て、最終的には医療品として投与可能な抗BECN1ヒト型モノクローナル抗体取得を目指す。本研究期間内ではそのための基礎データの取得までを目標とする。そのために、まず、PS1の受容体の解明についてBECN1によるPS1の活性抑制やBECN1ノックアウト細胞とPS1活性との相関などの検討を、次に細胞死誘導活性を保持する抗BECN1抗体の取得、そしてそれを用いて光反応性化学架橋剤によるPS1結合タンパク質と抗BECN1抗体の応答の検討などについて進めていく。

3. 研究の方法

(1) PS1の受容体の解明

すでに BECN1 が PS1 の受容体候補として同定されているが、一般的には BECN1 は細胞内においてオートファジーに重要な役割を果たすタンパク質として知られている。したがって、まず BECN1 が PS1 の受容体であることを多方面にわたって検討を行い、確定していく作業が必要である。そこで、BECN1 非発現培養細胞への BECN1 の導入と PS1 に対する感受性の検討、組換え体 BECN1 の作製とその PS1 活性の抑制効果、BECN1 の細胞膜画分への存在証明について検討を行った。

(2) 細胞死誘導活性を保持する抗 BECN1 抗体の取得

次に抗 BECN1 抗体について、予備試験では市販ポリクローナル抗体を用いてその細胞死誘導活性を検討してきたが、詳細な検討を進めていくうえで量やコストの問題があり、細胞死誘導活性のあるポリクローナル抗体を自製する必要がある。そこで、大腸菌および培養細胞を用いて BECN1 組換え体を作製し、マウス等を用いてポリクローナル抗体を作製してその細胞傷害活性を検討した。

(3) 光反応性化学架橋剤による PS1 結合タンパク質の探索

また、BECN1 以外にも PS1 の細胞傷害作用において重要な働きを担うたんぱく質が存在する可能性もあり、光応答性化学架橋剤を用いて PS1 に感受性のある培養細胞から PS1 と相互作用するたんぱく質の探索を行った。

4. 研究成果

(1) PS1 の受容体の解明

BECN1 非発現培養細胞へ BECN1 遺伝子を導入し、PS1 に対する感受性の変化を検討しようとしたが、導入により細胞が増殖しなくなり、検討できなかった。また、組換え体 BECN1 による PS1 の細胞傷害活性の抑制を検討しようとしたが、BECN1 は封入体として生産されたため、リフォールディングを試みたが適切な条件を見つけることができなかった。

(2) 細胞死誘導活性を保持する抗 BECN1 抗体の取得と活性の検討

次に抗 BECN1 抗体について、予備試験では市販ポリクローナル抗体を用いてその細胞死誘導活性を検討してきたが、詳細な検討を進めていくうえで量やコストの問題があり、細胞死誘導活性のあるポリクローナル抗体を自製する必要がある。そこで、大腸菌および培養細胞を用いて BECN1 組換え体を作製し、マウス等を用いてポリクローナル抗体を作製してその細胞傷害活性を検討した。免疫中の抗体価の一部を図 1 に示した。

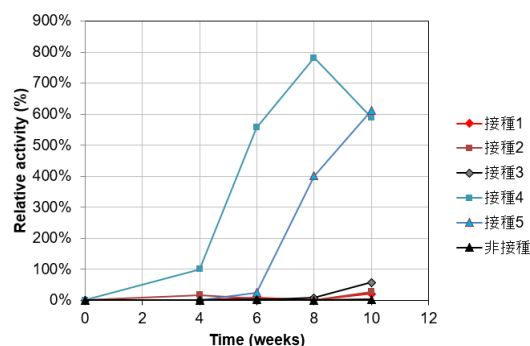


図 1 マウス血清中の BECN1 抗体価

次に、十分に抗体価の上昇したマウスから血清を採取し、BECN1 を固定化したカラムでアフィニティ精製を行い、精製前に比較し、抗体価が絶対値で 4 倍、比活性で 10 倍高い BECN1 抗体を得ることができた。精製の概要を図 2 に示した。

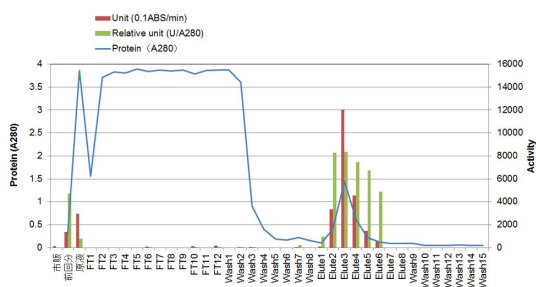


図 2 BECN1 抗体のアフィニティ精製

こうして得た BECN1 抗体について、PS1 に感受性のある HeLa 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。抗血清、アフィニティ精製時のフロースルー (FT)、精製抗体を 2 種類、加熱処理した精製抗体、について細胞傷害活性を検討したが、活性は見られなかった (図 3)。

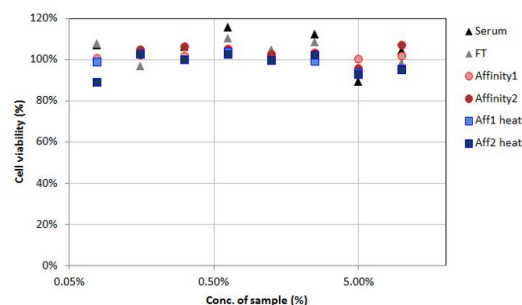


図 3 BECN1 抗体の細胞傷害活性

また精製抗体の PS1 の細胞傷害活性に対する阻害作用を検討したところ、阻害効果は見られなかった (図 4)。

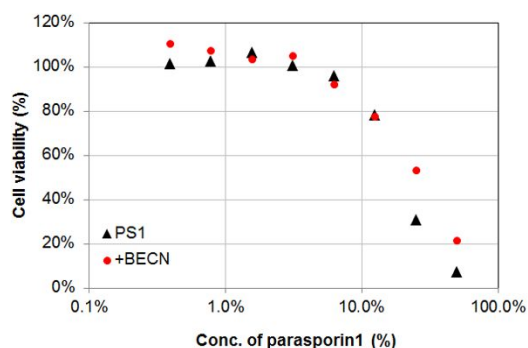


図4 BECN1 抗体の PS1 活性への阻害

(3) 光反応性化学架橋剤による PS1 結合タンパク質の探索

PS1 を修飾した光応答性化学架橋剤 (図5) を用いて PS1 に感受性のある培養細胞から PS1 と相互作用するタンパク質の探索を行った。同架橋剤を PS1 感受性細胞に作用させ、紫外線を照射し、紫外線架橋部位を受容体と共有結合させて、受容体にビオチン標識させ、ウェスタンブロットによる探索を試みた。

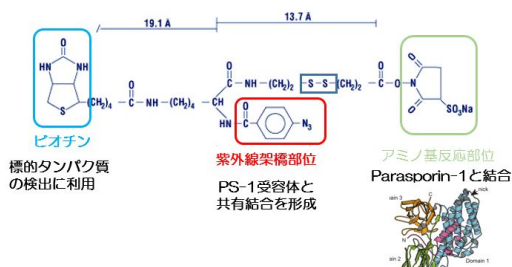


図5 光架橋剤によるプローブ

しかし、解析結果の再現性が低く、検討の結果、それが探索の際の溶液中のカルシウム濃度と相関があることを発見した。今後架橋剤の作用条件を詳細に検討し、継続的に受容体探索を進めていく。

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1件)

(1) Toshihiko Akiba, Shiro Okumura, Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. J Invertebr Pathol. (2017) 142, 44-49. 査読あり
doi: 10.1016/j.jip.2016.10.005

〔学会発表〕(計4件)

片山秀樹、日下芳友、奥村史朗、水城英一、細胞毒素 Parasporin-1 受容体の探索、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日 (京都市)

片山秀樹、日下芳友、奥村史朗、水城英一、

Parasporin-1 の細胞死誘導機構と受容体の探索、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日 (横浜市)

奥村史朗、片山秀樹、井上國世、*Bacillus thuringiensis* が産生するがん傷害性タンパク質の生化学的性質とほ乳動物に対する毒性、食品酵素化学研究会第 16 回学術講演会、2016 年 9 月 1 日 (大阪市)

Shiro Okumura, Hironori Koga, Kuniyo Inouye, Eiichi Mizuki, Biochemical characterization of parasporin-4 and effects of the pro-parasporin-4 diet on the health of mice. International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and the 48th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2015 年 8 月 9 日 (Vancouver, Canada)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<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

片山 秀樹 (KATAYAMA HIDEKI)

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：90416496

(4) 研究協力者

なし