

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580117
 研究課題名（和文） 微生物由来の細胞傷害性タンパク質パラスポリン4の作用機構解明
 研究課題名（英文） Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*.
 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CACO-2細胞をはじめとする哺乳動物ガン細胞由来の培養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ことから、その作用機構を解明することでガン治療薬・ガン診断薬としての利用化が期待できる。本研究においては、パラスポリン4をヒト培養ガン細胞に投与した際のパラスポリン4や細胞内外の物質の挙動をいろいろと検討し、パラスポリン4が細胞膜に対する穴空けトキシンであることを解明した。

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. In this study, we subjected PS4 to the human cell lines and analyzed the PS4 and internal and external molecules of the cells. These results suggest that PS4 is a unique β -pore-forming toxin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：酵素化学、応用微生物、培養細胞

科研費の分科・細目：農学・農芸化学・応用生物化学（6103）

キーワード：Bacillus thuringiensis、がん細胞、Parasporin

1. 研究開始当初の背景

Bacillus thuringiensis 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アルカリ溶液で可溶化することができ、その後プロテアーゼでプロセッ

シングすると、特定の昆虫に対する殺虫活性を示すことで知られている。最近の研究において、殺虫活性を示す封入体タンパク質を生産する *B. thuringiensis* 株はごく一部であり、ほとんど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ことが判明

してきた。その後、これら殺虫活性のない株の中に哺乳動物培養細胞に対して細胞傷害活性を示す株が発見されパラスポリンと命名されている。研究開始時点までに9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つに分類されている。本研究の対象であるパラスポリン4は *B. thuringiensis* A1470 株 (図1) により前駆たいとして産生され、分子量が30kDaで275個のアミノ酸残基からなる。

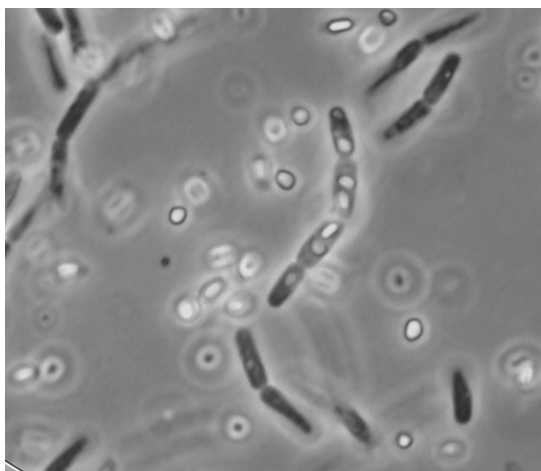


図1 *Bacillus thuringiensis* A1470 株

この前駆体がプロテアーゼKによるプロセッシングを受けてC末側247番目以降のアミノ酸が切断されて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し、プロセッシングすると活性のあるパラスポリン4活性体が得られるが、興味深いことにこの際にrefolding操作が必要ない。こうして得られたパラスポリン4活性体は陽イオン交換クロマトグラフィとゲルクロマトグラフィで精製され、各種物性値が計測されている。またパラスポリン4活性体についても大腸菌組み換え体で作成され、前駆体と同様に封入体として生産されるが、大腸菌組み換え体のパラスポリン4活性体は細胞傷害活性を持たず、またプロテアーゼ耐性も持たないことから、本来の活性体と立体構造が異なると考えられる。

2. 研究の目的

パラスポリン4はCACO-2、Sawano、MOLT-4細胞などのヒトガン細胞由来の培養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(表1)。このことから、パラスポリン4の作用機構を解明することでガン治療薬・ガン診断薬としての利用が期待できる。そこで本研究

においてはパラスポリン4作用時の動態や感受性細胞の細胞生理学的検討を行いパラスポリン4の作用機構について解明することを目的とした。

細胞株名	由来	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
CACO-2	腺ガン細胞	0.12
Sawano	ガン細胞	0.25
MOLT-4	白血病T細胞	0.64
TCS	ガン細胞	0.72
HL60	前骨髄性白血病細胞	0.73
U-937 DE-4	リンパ腫	0.98
PC12	ガン細胞	1.8
Hep G2	ガン細胞	1.9
Normal T cell	正常細胞	>2
HC	正常細胞	>2
UtSMC	正常細胞	>2
MRC-5	正常胎児繊維芽細胞	>2

表1 パラスポリン4の細胞傷害活性

3. 研究の方法

(1) パラスポリン4の精製

パラスポリン4遺伝子を導入した組み換え体大腸菌をカナマイシン20 $\mu\text{g/mL}$ を含むLB培地200mLで120rpmで振とうしながら37°Cで一晩培養した。次に培養液を8000 $\times\text{g}$ 、15minで遠心して集菌し、菌体を-20°Cで2時間以上凍結しておいた。これを解凍し、10mLの溶解液(50mM Tris-HCl(pH8)、25% Sucrose、1mM EDTA)を加えて分散させ、10mg/mLリゾチームを0.5mL入れて、室温で30minインキュベートした。その後、超音波破砕機

(Branson model 450D)を用いて強度3、50% dutyで3min超音波処理を行った。次に10mLの界面活性剤液(0.2M NaCl、1%デオキシコール酸ナトリウム、1% Nonidet P-40)を加えて、室温で30minインキュベートし、30000 $\times\text{g}$ 、30minで遠心して封入体を回収した。これを洗浄液(1% TritonX-100、1mM EDTA)で洗浄し、続いて蒸留水で洗浄した。洗浄は各2回行った。次に湿重量にして40mgの組み換え体大腸菌によるパラスポリン4封入体に10mLの10mM塩酸を加え、よく攪拌して37°Cで60minインキュベートし可溶化し4500 $\times\text{g}$ で15min遠心して上清を回収し、これを可溶化液とした。10mLの可溶化液に10mg/mLペプシンを200 μL 加え37°Cで90minインキュベートして活性化し、1mg/mLペプスタチンを200 μL 加えて氷冷し反応を停止した。そ

の後 4500×g で 15min 遠心して上清を回収し、これを活性化液とした。この活性化液を 20mM Glycine、pH3.0 で平衡化した 1mL の Resouse S カラム (GE ヘルスケア) に通し、活性化した パラスポリン 4 をカラムに結合した後、20mM Glycine、pH3.0、3M NaCl で数回洗浄し、不要なタンパク質をカラムから取り除いた。次に running buffer を 20mM Glycine、pH10.0 に変更し、溶出してくる パラスポリン 4 を回収した。一連の操作は流速 0.5 μ L/min、4°C で行った。続いて SuperdexG-75 担体 (GE ヘルスケア) を 0.1M 炭酸ナトリウム、pH10.0、150mM NaCl で平衡化し、XK16/70 カラム (GE ヘルスケア) に充填し、Resouse S カラムによる精製により回収したサンプル 1mL を投入して、1mL/min で平衡化に用いたものと同じ緩衝液を流してサンプルを分子量により分画した。280nm の吸光度により溶出してくるタンパク質濃度をモニターし、溶出画分を回収して CACO-2 細胞による細胞傷害活性を測定して最も活性の高い画分を パラスポリン 4 精製物として回収し、-80°C で保存した。

(2) パラスポリン 4 の多量体形成

パラスポリン 4 を培養細胞に作用させ、その細胞膜上での多量体の形成を観察した。HeLa および CACO-2 細胞を MEM 培地に 10%FBS (CACO-2 細胞においては 20%) を加えた培地を用いて 37°C で 5% 二酸化炭素存在下で培養し、 2.2×10^5 細胞/mL の濃度で 96 ウェルマルチウェルプレートに 90 μ L ずつ分注した。この 96 ウェルマルチウェルプレート中で細胞をさらに 24 時間培養して試験に用いた。各ウェルに 10 μ L の パラスポリン 4 を添加し 3 ~ 6 0 分室温で放置した後に培地および パラスポリン 4 溶液を取り除き、PBS で 3 回洗浄した。そこに 50 μ L の SDS sample buffer を添加し室温で 30 秒振とうしてからマイクロチューブに SDS sample buffer を回収し、95 °C で 5 min 加熱した。このサンプル 10 μ L を 3-10% の gradient gel で電気泳動し、さらにウエスタンブロット法で PVDF 膜に転写し、抗パラスポリン 4 ウサギ抗血清を用いて ECL で発光させて、SDS sample buffer 中の パラスポリン 4 を解析した。

(3) パラスポリン 4 による細胞内ラクトースデヒドロゲナーゼの漏れだし

パラスポリン 4 の作用による HeLa 細胞と CACO-2 細胞における細胞内ラクトースデヒドロゲナーゼ (LDH) の漏れだしの測定を行った。HeLa および CACO-2 細胞を MEM 培地に 10% FBS (CACO-2 細胞においては 20%) を加えた培地を用いて 37°C で 5% 二酸化炭素存在下で培養し、 2.2×10^5 細胞/mL の濃度で 96 ウェルマルチウェルプレートに 90 μ L ずつ分注した。この 96 ウェルマルチウェルプレート中で細胞

をさらに 24 時間培養して試験に用いた。各ウェルに 10 μ L の パラスポリン 4 を添加し、終濃度で 0.1 - 3.0 μ g/ml となるようにした。この状態で 0-24 時間 37°C で培養後、培地を回収し、遠心して浮遊している細胞を取り除いた。培養液中に漏れだしている LDH 活性は CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (プロメガ製) を用いて 492 nm の吸光度で測定した。LDH 漏れだし量は、終濃度で 0.9% の Triton X-100 により完全に細胞を破壊した時の LDH 活性と比較して計算した。

(4) パラスポリン 4 による細胞外からの分子の流入

血球細胞である MOLT-4 と K562 細胞を培養し、培地中に 3000~7000Da と分子量の異なる FITC 修飾デキストラン (ライフテクノロジ社製) を添加し、そこに パラスポリン 4 を作用させて、FITC 修飾デキストランの細胞内への流入を測定した。培地に終濃度で FITC として 50 μ M の FITC 修飾デキストランを入れ、これに終濃度で 3 μ g/mL の パラスポリン 4 を添加した。37°C で 90min インキュベートしてから、10%ホルムアルデヒド PBS を等量添加し、10min インキュベートし、PBS で洗浄した。これらの細胞を Epics XL フローサイトメーター (ベックマンコールター製) で解析し、パラスポリン 4 を添加しなかったサンプルと比較して細胞内への FITC 修飾デキストランの流入を計測した。

(5) パラスポリン 4 によるアポトーシスの誘導

MOLT-4 細胞に パラスポリン 4 を作用させ、最終的にアポトーシスを誘導するエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3 もしくは 7 の活性化量を測定し、パラスポリン 4 によるアポトーシスの誘導について検討を行った。MOLT-4 細胞を培養し 4×10^5 細胞/mL の濃度で 96 ウェルマルチウェルプレートに 90 μ L ずつ分注した。これに パラスポリン 4 を終濃度で 0.6 もしくは 3 μ g/ml、actinomycin D を終濃度で 1 μ M、camptothecin を終濃度で 1 μ M、TritonX-100 を終濃度で 0.1% 加え、37°C で 2 ~ 24 時間 インキュベートした。インキュベート終了時にカスパーゼ 3 もしくは 7 により化学発光する基質 (CaspaseGLO kit、プロメガ製) を加え、室温で 30min インキュベートしたあとで化学発光量を計測した。カスパーゼの活性化量は パラスポリン 4 などを添加しなかった細胞における発光量との比として計算した。Actinomycin D と camptothecin はアポトーシスのポジティブコントロールとして、Triton X-100 はネガティブコントロールとして用いた。

4. 研究成果

(1) パラスポリン4の多量体形成

パラスポリン4を培養細胞に作用させ、その細胞膜上での多量体の形成をウェスタンブロットにより観察したところ、パラスポリン4に対して抵抗性のあるHeLa細胞においては単量体のみが観察された。また、パラスポリン4に対して感受性であるCACO-2細胞においては、約27kDaの単量体のバンドの他に80~200kDaの範囲に多量体のバンドが観察された。CACO-2細胞における多量体のバンドは時間を追って濃くなっており、だんだんとパラスポリン4の多量体が形成されている様子が推察された。抵抗性のHeLa細胞においても単量体のバンドが観察されたことから、パラスポリン4は抵抗性の細胞においても細胞膜に結合すると思われる、その後細胞傷害活性の発揮のためには多量体化される必要があると考えられた。

(2) パラスポリン4による細胞内ラクトースデヒドロゲナーゼの漏れだし

パラスポリン4の作用によるHeLa細胞とCACO-2細胞における細胞内ラクトースデヒドロゲナーゼ(LDH)の漏れだしの測定を行ったところ、CACO-2細胞においては0.1 μ g/mLにおいても24h後に約40%の細胞内LDHが細胞外に漏れだしていた。LDHの漏れだし量はパラスポリン4濃度が上がるにつれて増加し、3 μ g/mLの濃度においては投与後2hですべてのLDHの漏れだしが見られた。

これに対してパラスポリン4に対して抵抗性のHeLa細胞においては、検討したすべての濃度においてLDHの顕著な漏れ出しは観察されなかった。

(3) パラスポリン4による細胞外からの分子の流入

MOLT-4とK562細胞にパラスポリン4を作用させ細胞外のFITC修飾デキストランの流入を観察したところ、パラスポリン4に対して感受性であるMOLT-4細胞においては用いたすべての分子量のデキストランにおいて細胞内への流入が観察された。一方でパラスポリン4に対して抵抗性であるK562細胞においてはすべての分子量のデキストランにおいて細胞内への流入が認められなかった。

(4) パラスポリン4によるアポトーシスの誘導

MOLT-4細胞にパラスポリン4を作用させ、最終的にアポトーシスを誘導するエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ3もしくは7の活性化量を測定したところ、0.6 μ g/mLのパラスポリン4を投与した場合はまったくカスパーゼの活性化量が上昇しなかつ

た。また3 μ g/mLのパラスポリン4の投与においては6hまではカスパーゼの活性化量が上昇しなかったが、24hにおいてはコントロールの2.8倍の活性化量を示した。ただし、この時点ですべてのMOLT-4細胞は死滅しており、カスパーゼ活性の上昇によりアポトーシスを誘導して細胞が死滅したのではなく、細胞が死滅した結果、何らかの副次的な効果でカスパーゼ活性が上昇して見えたと考えられた。なおポジティブコントロールであるactinomycin Dやcamptothecinでは時間に応じてカスパーゼ活性が上昇し、24h後にはコントロールの7~12倍の活性化量が観察された。ネガティブコントロールであるTritonX-100においては24hを通じて全く活性化量の上昇は見られなかった。

(5) まとめ

以上の結果からパラスポリン4が細胞膜に対する穴空け毒素であることが確認された。穴空け毒素については、機能を実現する立体構造が重要であり、パラスポリン4についても、結晶化およびX線解析による立体構造の解明が今後の課題となる。また、パラスポリン4においてははっきりとした細胞選択性を示すことから、細胞膜における膜孔形成の際にレセプターが関与していると推察される。今後パラスポリン4のガン治療薬・診断薬としての応用を検討するためにも、レセプターの探索が必要であると考えられる。

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4件)

① Inoye K、Okumura S、Mizuki E、Parasporin-4、A Novel Cancer Cell-killing Protein Produced by *Bacillus thuringiensis*、Food Sci Biotechnol、査読有、Vol. 17、2008、219-227

② Okumura S、Saitoh H、Ishikawa T、Mizuki E、Inoye K、Identification and characterization of a novel cytotoxic protein、parasporin-4、produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain、Biotechnol Annu Rev、査読有、Vol. 14、2008、225-252

③ 奥村史朗、斎藤浩之、片山秀樹、日下芳友、井上國世、水城英一、微生物由来の細胞傷害性タンパク質パラスポリン4の作用機構解明、福岡県工業技術センター研究報告、査読有、No. 18、2008、24-26

④ 奥村史朗、井上國世、*Bacillus thuringiensis*がつくる「クリスタル」タンパク質の不思議、化学と生物、査読無、2009年10月号、2009、671-673

〔学会発表〕（計6件）

①奥村史朗、斎藤浩之、石川智之、片山秀樹、日下芳友、水城英一、Parasporin-4 の MOLT-4 細胞に対する受容体結合部の探索、2009 年度日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 27 日、名城大学天白キャンパス

②奥村史朗、斎藤浩之、井上國世、水城英一、Bacillus thuringiensisA1470 株が作るガン細胞傷害性タンパク質パラスポリン4の作用機構解明、第8回昆虫病理研究会シンポジウム第14回BT研究会合同大会、2008年9月13日、財団法人人材開発センター富士研修所

③奥村史朗、斎藤浩之、石川智之、水城英一、ヒト培養ガン細胞に対するParasporin-4の受容体結合部の探索、第3回パラスポリン研究会、2008年10月24日、九州大学箱崎キャンパス

④奥村史朗、斎藤浩之、石川智之、井上國世、水城英一、ガン細胞傷害性タンパク質Parasporin-4の作用機構、2009年度日本農芸化学会大会、2009年3月28日、マリメッセ福岡

⑤奥村史朗、斎藤浩之、石川智之、井上國世、水城英一、ガン細胞傷害性タンパク質Parasporin-4の作用機構、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸国際展示場

⑥奥村史朗、水城英一、ガン細胞傷害性タンパク質パラスポリン4の作用機構解明、久留米大学産学地域共同機構 マンスリー・セミナー、2010年1月26日、久留米大学医学部

〔図書〕（計1件）

井上國世監修、奥村史朗、水城英一、赤尾哲之、シーエムシー出版、食品酵素化学の最新技術と応用 2009年、総ページ数 243

〔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

Committee of Parasporin Classification and Nomenclature

<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

斎藤 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