

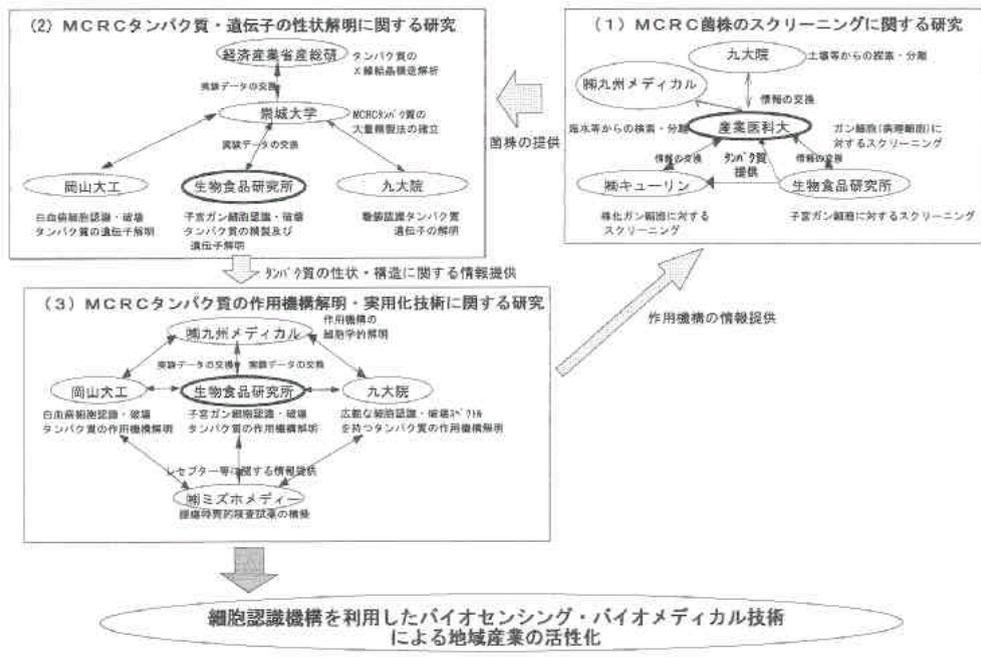
# 微生物由来細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明と応用に関する研究

「微生物由来細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明と応用に関する研究」(H12年度～H14年度)

研究代表者：水城英一(福岡県工業技術センター) 他9機関

研究の概要・目標	諸外国の現状等	研究進展・成果がもたらす利点
<p><b>1. 何を目標しているのか</b> 従来、殺虫細菌と考えられていた<i>Bacillus thuringiensis</i>(以下BT)のうち、殺虫活性を持たない菌株が生産する結晶性タンパク質の働きは長い間謎であった。1996年、これらの中に、哺乳類細胞を選択的に認識・破壊するタンパク質(MCRCタンパク質)が存在することを世界で初めて明らかにした。本研究では、これらのMCRCタンパク質の性状、作用機構を解明し、その応用技術の開発を目指す。</p> <p><b>3年後の目標</b> ●MCRCタンパク質ライブラリー100件の作成 ●MCRCタンパク質遺伝子の単離、遺伝子解明 ●MCRCタンパク質を用いた体外診断薬開発</p> <p><b>2. 何を研究しているのか</b> ●MCRCタンパク質の単離・精製 ●MCRCタンパク質の性状の解明 ●MCRCタンパク質遺伝子の単離 ●MCRCタンパク質作用機構の解明 ●MCRCタンパク質を用いた疾病体外診断薬の開発 ●新規MCRCタンパク質の探索</p> <p><b>3. 何が新しいのか</b> MCRCタンパク質は本研究グループが世界で初めて発見したものであり、細胞の識別・破壊活性の他、レクチン(凝集認識)活性を持つ。本タンパク質及びその遺伝子の性状、タンパク質の作用機構等は未だ謎に包まれている。本研究はこれらの点を明らかにし、その応用技術を開発する点が新しい。</p> <p><i>Bacillus thuringiensis</i>: 人間に有害な結晶性殺虫タンパク質を作る細菌、殺虫剤生産に利用 MCRCタンパク質: 多発性BTが作る哺乳類細胞を選択的に認識・破壊する結晶性タンパク質。</p>	<p><b>1. 現状</b> MCRCタンパク質は本プロジェクトを企画した福岡県工業技術センター及び九州大学によって世界で初めて発見され、1999年3月に最初の論文が掲載されたばかりである。本タンパク質に関する研究に関しては、本グループが世界のトップを走っている。従来の殺虫性BTを研究している世界の他のグループは、MCRCタンパク質の存在について未だ認識していないところも多い。</p> <p><b>2. 我が国の水準</b> 福岡県工業技術センター及び九州大学を中心とする本研究グループは、既にMCRCタンパク質を生産するBT菌株4菌株を発見しており、このうち1株のMCRCタンパク質に関してはその遺伝子の単離、構造解明に成功している。MCRCタンパク質に関する研究分野は本研究グループによってわが国で開拓され、わが国が世界をリードしている。</p>	<p><b>1. 世界との水準の関係</b> 世界の他のBT研究グループの関心は未だに殺虫性BTに集中しており、1999年3月に本研究グループが最初の論文を発表した後も、未だMCRCタンパク質の存在を認識していないグループも多い。本研究グループは、既にMCRCタンパク質を生産するBT菌株4菌株を発見しており、このうち1株のMCRCタンパク質に関してはその遺伝子の単離、構造解明に成功している。また、MCRCタンパク質に関する基本特許を既に1998年に出願している。このように、MCRCタンパク質に関する研究分野は、現在、本研究グループが世界を大きくリードしている。</p> <p><b>2. 波及効果</b> ●本タンパク質は、細胞の識別能力、ガン細胞破壊活性、凝集認識(レクチン)活性を有しており、体外診断薬、医薬、研究試薬等の研究に活用でき、これらの分野の発展に大きく寄与すると考えられる。</p>

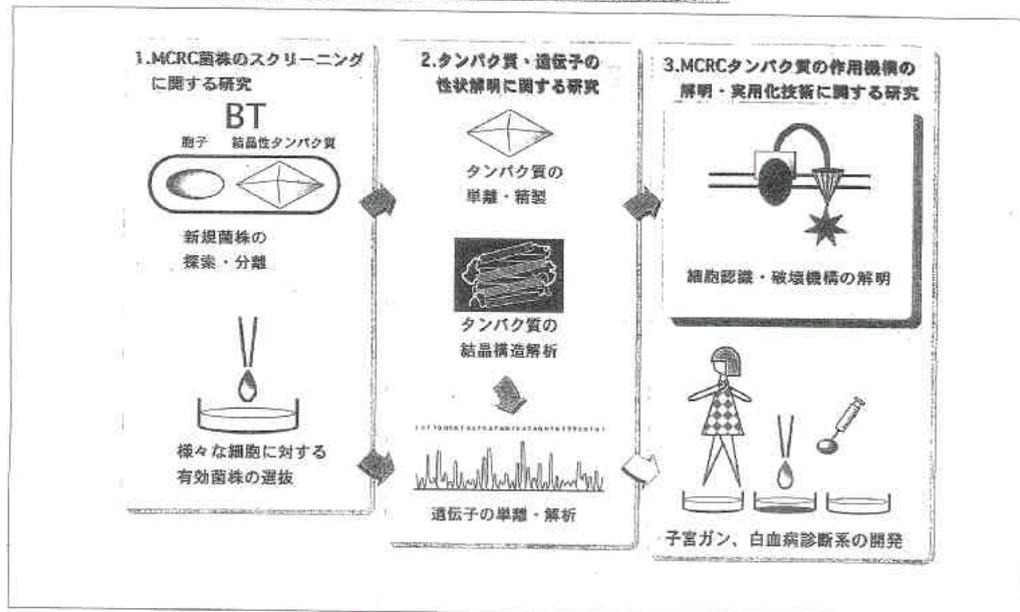
## 「微生物由来細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明と応用に関する研究」の研究体制



# 微生物由来細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明と応用に関する研究

研究内容、手法の概要

研究テーマ名：微生物由来細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明と応用に関する研究（総論版）



# 所要経費

(単位：千円)

研究項目	担当機関等	研究 担当者	H12 年度	H13 年度	H14 年度	所用 経費
1. MCRC 菌株のスクリーニングに関する研究						
(1)土壌からの MCRC 菌株の探索・分離	九州大学大学院農学研究院	大庭道夫	4,783	3,722	2,248	10,753
(2)植物・海水からの MCRC 菌株の探索・分離	(株)九州メディカル	前田 稔	1,751	1,525	1,502	4,778
(3)株化ガン細胞に対するスクリーニング	(株)キューリン	村田義隆	10,484	5,838	4,499	20,821
(4)ガン細胞(病理細胞)に対するスクリーニング	産業医科大学医学部第2病理学教室	笹栗靖之	7,403	5,859	4,509	17,771
(5)スクリーニング用タンパク質の調製、ならびに子宮ガン細胞に対するスクリーニング	福岡県工業技術センター生物食品研究所	水城英一	1,406	1,576	1,408	4,390
2. MCRC タンパク質・遺伝子の性状解明に関する研究						
(1)MCRC タンパク質の大量精製法の確立	崇城大学工学部応用微生物工学科	新 隆志	8,215	8,569	9,101	25,885
(2)MCRC タンパク質のX線結晶構造解析	(独)産業技術総合研究所生物情報解析研究センター	原田一明	8,135	8,236	7,498	23,869
(3)子宮ガン細胞認識・破壊タンパク質の精製及び遺伝子解明	福岡県工業技術センター生物食品研究所	水城英一	14,447	5,855	2,349	22,651
(4)白血病細胞認識・破壊タンパク質の遺伝子解明	岡山大学工学部生物機能工学科	酒井 裕	2,059	4,056	1,726	7,841
(5)糖鎖認識タンパク質の遺伝子解明	九州大学大学院農学研究院	大庭道夫	4,613	3,751	3,718	12,082
(6)新規 MCRC タンパク質の遺伝子解明	産業医科大学医学部第2病理学教室	笹栗靖之	1,540	1,363	0	2,903
3. MCRC タンパク質の作用機構の解明・実用化技術に関する研究						
(1)子宮ガン細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明	福岡県工業技術センター生物食品研究所	赤尾哲之	1,550	4,640	11,497	17,687
(2)作用機構の細胞学的解明	(株)九州メディカル	前田 稔	3,608	3,101	3,392	10,101
(3)白血病細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明	岡山大学工学部生物機能工学科	酒井 裕	5,890	3,852	6,037	15,779
(4)広範な細胞認識・破壊スペクトルを持つタンパク質の作用機構解明	九州大学大学院理学研究院	伊藤明夫	8,254	8,679	7,619	24,552
(5)腫瘍の特異的検査試薬の構築	(株)ミズホメディター	榎原謙次	1,023	8,749	8,470	18,242
4. 本研究課題の推進管理	(財)福岡県産業・科学技術振興財団		3,025	4,441	4,268	11,734
合 計			88,186	83,812	79,841	251,839

## 研究成果の概要

### 総括

微生物由来細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明と応用に関する研究プロジェクトでは、福岡県工業技術センター及び九州大学が世界に先駆けて発見した微生物由来哺乳類細胞認識・破壊タンパク質 (MCRC タンパク質) について、新規タンパクの探索、性状解明、遺伝子のクローニング、作用機構の解明等を行い、その応用技術として子宮ガン細胞等の体外診断薬の開発を目指す。

世界初の例となった A1190 株 MCRC タンパク質に続き、本プロジェクトでは世界で 2 例目 ~ 10 例目となる 9 つの MCRC タンパク質遺伝子のクローニングに成功した。すなわち、白血病細胞に認識・破壊活性を持つ A1470 株の MCRC タンパク質遺伝子 (3 種) 及び子宮ガン細胞に認識・破壊活性を持つ A1462 株の MCRC タンパク質遺伝子 (3 種)、広範なガン細胞に破壊活性を有する A1547 株の MCRC タンパク質遺伝子 (1 種)、その他の株から 2 種の遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子に関しては国際特許を含む遺伝子特許 4 件を出願中である。

一方、MCRC タンパク質によるガン細胞破壊のメカニズムの解明も進展しており、新規の細胞破壊機構の存在が予想されている。また、体外診断薬開発の重要なステップとなるガン細胞 (子宮ガン、白血病) の検出原理を確立することができた。さらに、摘出ガン組織を用いた研究では、MCRC タンパク質が非ガン部の組織に影響を与えず、ガン組織を強力に破壊することが明らかになっている。

### サブテーマ毎、個別課題毎の概要

#### 1. MCRC 菌株のスクリーニングに関する研究

##### 1.1. 土壌からの MCRC 菌株の探索・分離

土壌および動物の糞からの *B. thuringiensis* MCRC 菌株の分離と収集を、3 年間 (平成 12 ~ 14 年度) 試みた結果、総計 1093 株の *B. thuringiensis* が得られた。

##### 1.2. 植物・海水からの MCRC 菌株の探索・分離

MCRC 産生能を有する *Bacillus thuringiensis* の探索を、植物・海水・土壌を中心に平成 12 年度においては小笠原諸島 (父島、母島) より、平成 13 年度は北海道 (道東、道北)、西表島マングローブ林および北九州市洞海湾より、平成 14 年度は種子島、奄美大島及び有明海沿岸の干潟よりサンプリングを行い、計 85 菌株の *B. thuringiensis* を分離できた。

##### 1.3. 株化ガン細胞に対するスクリーニング

各種 BT 菌株由来の MCRC タンパク質を含むと思われる粗精製画分を各種細胞を用いて、細胞破壊活性を測定し、活性の高い MCRC タンパク質の産生菌株候補をスクリーニング、特定した。

##### 1.4. ガン細胞 (病理細胞) に対するスクリーニング

A1190, A2316, B207 等の MCRC タンパク質は、食道扁平上皮癌の cell line である TE9, TE10 において、細胞膜表面にフォスファチジルセリンを露出し、核が断片化し、細胞死に至るアポトーシスによる細胞死の形態をとることが、各種実験で確認できた。癌組織を使用した実験すくなくとも一部において、核にアポトーシス小体や断片化した像を認めることより同様の機序により癌細胞の殺傷効果が引き起こされている可能性が示唆された。

##### 1.5. スクリーニング用タンパク質の調整、ならびに子宮ガン細胞に対するスクリーニング

九州大学農学部及び生物食品研究所が保有する *Bacillus thuringiensis* のうち 2,780 株から、性状の異なるヒト子宮ガン細胞、HeLa (子宮頸部上皮ガン細胞)、Sawano (子宮内膜腺ガン細胞) および TCS (子宮角化型扁平上皮ガン細胞) を用いて、これらのガン細胞に対して破壊活性を有する MCRC 菌株のスクリーニングを行い、MCRC 菌株 55 株を得た。さらに、本プロジェクトの中で遺伝子がクローニングされ、活性型分子が精製された。また、これら 55 株の新規 MCRC 菌株の類型

化を行い、これまでに発見されている MCRC タンパク質とは異なる、新型の MCRC タンパク質を産生する MCRC 菌株 42 株 (76.4%) を得ることができた。

## 2. MCRC タンパク質・遺伝子の性状解明に関する研究

### 2.1. MCRC タンパク質の大量精製法の確立

既取得の MCRC 菌株のうち T34、A1470、A1190 の 3 株について、その MCRC タンパク質の大量精製法の検討を行った。

### 2.2. MCRC タンパク質の X 線結晶構造解析

MCRC タンパク質の有する癌細胞認識・破壊のメカニズムを解明することを目的として、結晶の作成と X 線解析による構造決定を行った。

### 2.3. 子宮ガン細胞認識・破壊タンパク質の精製及び遺伝子解明

*B. thuringiensis* 由来のガン細胞破壊タンパク質 (MCRC タンパク質) 遺伝子の世界初の報告例となった子宮ガン破壊性の A1190 株由来タンパク質 (parasporin と命名、前駆体 81kDa、活性型 56kDa)、第 2 列目となる子宮ガン破壊性の A1462 株の B タンパク質 (前駆体 88kDa、活性型 64kDa)、第 3 列目となる白血病破壊性の A1470 株 B タンパク質 (前駆体 32kDa、活性型 28kDa)、世界で 5 列目となる A1462 株 A タンパク質 (前駆体 88kDa、活性型 64kDa)、6 列目となる A1470 株 D タンパク質 (前駆体 34kDa、活性型 31 kDa) のクローニング、発現に成功した。

### 2.4. 白血病細胞認識・破壊タンパク質の遺伝子解明

*Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis* A1519 株のクリスタルを精製し、ウサギを用いて抗 A1519 株クリスタル抗体を作成した。次に A1519 株のプラスミド DNA を精製し、A1519 株 プラスミド DNA ライブラリを作成した。A1519 株 プラスミド DNA ライブラリより抗 A1519 株クリスタル抗体に陽性の 16 クローンを選抜し、その全塩基配列を決定した。この過程で、A1519 株が保持するプラスミドの一つである pBTC1519-1 (7288 bp) の全塩基配列を決定することが出来た。

### 2.5. 糖鎖認識タンパク質の遺伝子解明

九大保存菌株の中から、ヒツジ赤血球に凝集活性を有するタンパク質を産生する菌株が 23 株得られた。その中で特にレクチン活性の強かった A1800 株の産生するタンパク質について性状調査を行った。

## 3. MCRC タンパク質の作用機構解明・実用化技術に関する研究

### 3.1. 子宮ガン細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明

子宮ガン及び白血病細胞診断薬開発に関する基礎的知見を得ることを目的として、子宮ガン及び白血病細胞に対して認識・破壊活性を有する MCRC タンパク質 (A1190 株、A1470 株) の細胞死誘導機構の解析を行った。

### 3.2. 作用機構の細胞学的解明

走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) および光学顕微鏡を用いて MCRC タンパク質のガン細胞に対する細胞破壊活性を形態学的な解明を試みた。

### 3.3. 白血病細胞認識・破壊タンパク質の作用機構解明

*Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis* A1519 株クリスタルに由来する MCRC タンパク質の活性分子が 29kDa ポリペプチドであることを明らかにした。これを精製して内部領域 2ヶ所および N 末端のアミノ酸配列を決定し、それらに基づいて遺伝子解析のための DNA プライマーを設計した。また、T 細胞白血病ガン細胞 MOLT-4 及び Jurkat に対する 29kDa 活性分子の作用を詳細に解析した。さらに細胞死誘導過程も詳細に解析した。

### 3.4. 広範な細胞認識・破壊スペクトルを持つタンパク質の作用機構解明

*B.thuringiensis* 1547 株が産出し、ほ乳動物細胞に毒性を示すタンパク質の特性と哺乳動物細胞への作用機作を解析した。

### 3.5. 腫瘍の特異的検査試薬の構築

MCRC が癌細胞上のレセプターを特異的に識別し、その特異結合反応を診断薬に応用可能かを検討した。

#### 波及効果、発展方向、改善点等

医療の分野では将来、遺伝情報をもとに、各人の疾病罹患の予測、各人の体質に合わせたオーダーメイド医薬の開発等が可能になると言われている。一方、わが国は今後、急速に迎える高齢化社会では、ガンを始めとする生活習慣病が重要な疾病となると言われており、これらの疾病の早期発見・診断法、新規治療法の開発が極めて重要な課題となると考えられ、診断薬、医薬等を含む保健・医療分野は巨大市場へと急速に成長すると考えられる。

MCRC タンパク質は、細胞の識別・破壊能力を有していることがこれまでに明らかにされている。MCRC タンパク質のガン細胞識別・破壊活性の分子機構が解明されれば、未知の膜抗原分子の発見、新規ガン細胞破壊機構の発見等、ガンの早期発見、診断、新規治療法の開発に役立つ多くの知見がもたらされるものと考えられる。また、本研究では体外診断薬開発の鍵となる検出原理を確立することができたが、今後は、様々なガン細胞や実際の検体等を用いて体外診断薬開発を進めると共に、レセプター分子等、細胞破壊のメカニズムに関する情報を活用して、検出精度を向上させる必要がある。

既に海外を含め、他の研究グループがMCRC タンパク質に関する研究を展開してきており既に遺伝子特許を出願したグループもある。今後はMCRC タンパク質遺伝子の特許だけでなく、診断薬及び医薬の開発に於いて極めて重要な意味を持つレセプター遺伝子等についても特許を取得し、今後の研究開発競争に勝ち抜く必要がある。

研究成果の発表状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	6件	2件	57件	65件
国際	22件	4件	10件	36件
合計	28件	6件	67件	101件

(2) 特許等出願件数

4件 (うち国内3件、国外1件)

(3) 受賞等

第 期 1件 (うち国内1件、国外0件)

1. 福岡県知事表彰 (職域表彰): Bt 発見 100周年記念国際シンポジウムの企画運営

(4) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor	サブテーマ1	サブテーマ2	サブテーマ3	合計
Biochim. Biophys. Acta.	3.000	0	1	1	2
Biochem. Biophys. Res. Commun.	2.946	0	0	1	1
System. Appl. Microbiol.	2.054	0	1	0	1
FEMS Microbiol. Lett.	1.806	1	0	0	1
Clin. Diagn. Lab. Immunol.	1.483	0	1	0	1
J. Appl. Microbiol.	1.479	1	0	1	2
J. Biochem. Biophys. Meth.	1.218	0	0	1	1
Can. J. Microbiol.	1.071	0	1	0	1
Curr. Microbiol.	1.095	3	2	0	5
Parasitol. Res.	1.025	1	0	0	1
J. Invertebr. Pathol.	0.898	2	0	0	2
Appl. Entomol. Zool.	0.613	3	0	0	3
Microbiol. Res.	0.531	2	0	0	2
J. Gen. Appl. Microbiol.	0.512	1	0	0	1
J. Basic Microbiol.	0.421	1	0	1	2
Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.	0.300	1	0	0	1
ITE Lett. Batt. New Tech. Med.	-	1	0	0	1
Total		17	6	5	28