

細胞損傷タンパク質パラスポリンを通して見るCryタンパク質の可能性

誌名	蚕糸・昆虫バイオテック = Sanshi-konchu biotec
ISSN	18810551
著者名	早川, 徹 酒井, 裕
発行元	日本蚕糸学会
巻/号	77巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 205-210
発行年月	2008年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



特集 1: 「BT 研究の最前線」

細胞損傷タンパク質パラスポリンを通して見る Cry タンパク質の可能性

早川 徹*・酒井 裕
岡山大学大学院自然科学研究科

はじめに

Bacillus thuringiensis は芽胞形成期にタンパク質結晶(クリスタル)を産生する(図 1)、クリスタルの主成分である Cry タンパク質の中には様々な細胞損傷活性を示すものがある。パラスポリン(Parasporin)は *B. thuringiensis* 及び近縁の細菌が産生する Cry タンパク質のうち、溶血活性を待たないが、ガン細胞に選択的な細胞損傷活性を示すものと定義され、Cry タンパク質の中でも特に新しいタイプのものとして注目されている。

Cry タンパク質の命名と分類はトキシン命名委員会(http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)が担っており、リストには現時点でも 400 以上もの Cry トキシンが 55 種のグループ(Cry1 ~ 55)に分類されている。また、非特異的な活性を示す 30 近い Cyt トキシンも加わっており、これからもその数は増えていくと考えられる。リストに記載されている Cry タンパク質の半分近くは鱗翅目昆虫(蝶や蛾など)に活性を示す殺虫毒素である。これは農薬の標的となる重要な畑作害虫の多くが鱗翅目昆虫に属するため、それを対象とする毒素の研究が精力的になされたことによると考えられる。実際、受容体の同定などを含む作用機構に関する研究は鱗翅目昆虫特異的な殺虫毒素 Cry1 等を中心に強力に推し進められている。一方、Cry タンパク質の活性は多岐に渡り、中には鱗翅目昆虫以外にも蚊、ハエなどの衛生害虫が属する双翅目やコガネムシ、ハムシなどの鞘翅目昆虫、さらには線虫に活性を示すものなど様々な標的を持つこと

が明らかになっている。特に興味深いのは、最近、殺虫スペクトルの明らかでない Cry タンパク質の中から人のガン細胞に対して特異的な細胞損傷活性を示すパラスポリンが見つかったことである。様々な活性を示す Cry タンパク質が存在することは、*B. thuringiensis* が、そして Cry タンパク質がどのように進化してきたのか? という難解な疑問をさらに複雑化するものであるが、同時に Cry タンパク質が持つ潜在的な可能性を示唆するものでもある。

本稿では Cry タンパク質の中でも新しいタイプであるパラスポリンについて紹介するとともに、Cry タンパク質が潜在的に持つ可能性について考察する。なお、Cry タンパク質の構造や機能に関しては、詳しい解説を部分的に省略するが、それらについては他の解説書『*Bacillus thuringiensis* 殺虫蛋白質の科学』(大庭道夫, 堀秀隆, 酒井裕編, アイピーシー)を参照されたい。

1. ガン細胞損傷活性を持つ Cry タンパク質, パラスポリン

一般的に Cry タンパク質は生物学的・生化学的な性質の違いから大きく 2 種に分類でき、それぞれ Cry トキシン及び Cyt トキシンと呼ばれている。Cry トキシンは高い殺虫特異性を示す毒素であり、プロトキシンの大きさが 70 kDa 型と 130 kDa 型に細分されるが、活性化されると何れも大きさが約 60 kDa の、プロテアーゼ耐性を示す活性化ペプチドとなる(図 2)。この活性ペプチドは分子内切断によってセグメントに分かれている場合もある。一方、Cyt トキシンは大きさ 25-30 kDa 程度の毒素であり、Cry トキシンとは全く異なる構造を持っている。Cyt トキシンの標的は Cry トキシンと異なり、哺乳類を

* 〒700-0082 岡山市津島中3-1-1
連絡先: hayakawa@biotech.okayama-u.ac.jp

含む脊椎動物や昆虫などの無脊椎動物を問わず非特異的な活性を示す (Crickmore et al., 1998)。

パラスポリンは、*B. thuringiensis* 及び近縁の細菌が産生する Cry タンパク質の中で溶血活性を持たないが、ガン細胞に選択的な細胞損傷活性を示すものと定義される。Cry タンパク質の中では Cyt トキシンも哺乳類由来の培養細胞に毒性を示すが、ガン細胞に対する特異性という点でパラスポリンとは異なるため同じグループとは考えられていない (Mizuki et al., 2000)。パラスポリンとしての活性を示す Cry タンパク質はこれまでに 4 種類が報告され (<http://parasporin.fitec.pref.fukuoka.jp/intro.html>)、パラスポリン 1 ~ 4 と命名されているが、同時にパラスポリン 1 : Cry31, パラスポリン 2 : Cry46, パラスポリン 3 : Cry41, パラスポリン 4 : Cry45 として Cry タンパク質としての命名もされている。

2. パラスポリン—構造の多様性と類似点—

4 種類のパラスポリンは、ガン細胞損傷活性というある意味で類似した活性を共有するにも関わらず、パラス

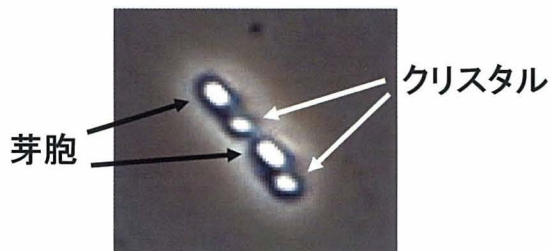


図 1. *B. thuringiensis* subsp. *sotto* T84AI が産生する芽胞とクリスタル

ポリン一般に共通する構造的な特徴は見つかっていない。むしろアミノ酸配列上では他の Cry トキシンや Cyt トキシンどころか、異なるグループのパラスポリンとも低い相同性しか示さず、活性化のパターンにも類似性がない (図 2)。例えばパラスポリン 1 (Cry31Aa1) のプロトキシンは 81 kDa であり、プロテアーゼによるプロセッシングを受けて部分分解され、さらに分子内切断を受けて 15 kDa (S⁹⁴-R²³¹) と 56 kDa (M²³²-S⁷²³) のサブユニットが形成される。15 kDa と 56 kDa のペプチドは活性分子の精製過程で挙動を共にすることからヘテロダイマーを形成すると考えられている (Katayama et al., 2005)。一方、パラスポリン 2 (Cry46Aa1) は 37 kDa のプロトキシンを持ち、プロテアーゼによるプロセッシングを受けると N 末端と C 末端両方のペプチドが除かれて 30 kDa の活性化ペプチドになる (Kitada et al., 2006)。パラスポリン 3 (Cry41A) の場合、プロトキシンはパラスポリン 1 と類似の 88 kDa で、活性化されると N 末端側のペプチドが除かれて 64 kDa の活性化ペプチドになる (Yamashita et al., 2005)。パラスポリン 4 (Cry45Aa) のプロトキシンはパラスポリン 2 と類似の 30 kDa であるが、活性化されると C 末端側のペプチドが除かれて 27 kDa の活性化ペプチドになる (Okumura et al., 2005)。

プロトキシン及び活性化ペプチドの大きさから考えるとパラスポリン 1 及び 3 は Cry トキシン型となる。アミノ酸配列上の相同性自体は低いものの、Cry トキシン間で高度に保存されているブロック配列 (Block 1-5) に類似する配列がパラスポリンの 1 及び 3 でも見つかるため (図 2), Cry トキシンと同様な 3 つのドメイン (I ~ III)

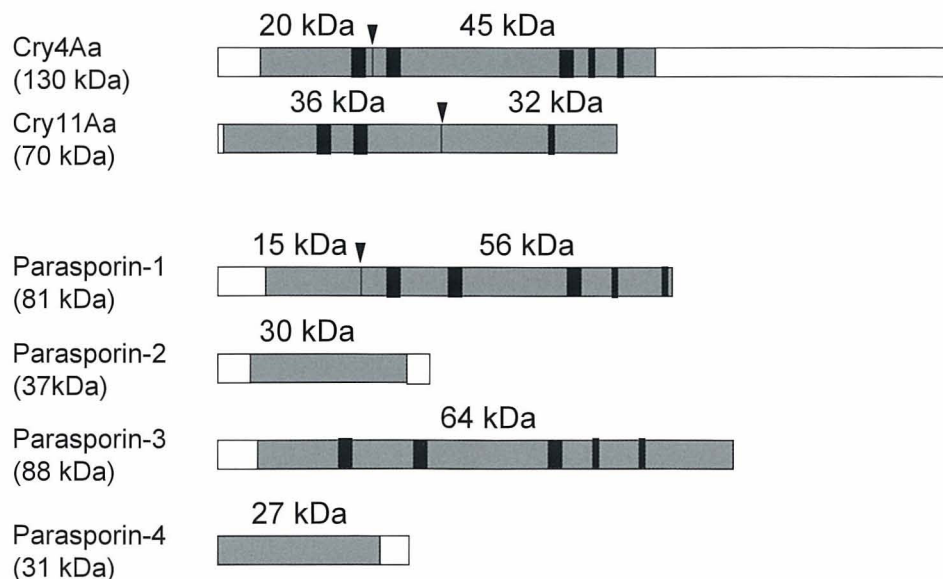


図 2. パラスポリンの活性化ペプチド

■: 活性化ペプチド □: プロセッシングによって除かれる領域 ▼: 分子内切断が起こるサイト ▮: ブロック配列

で構成される高次構造を持つと考えられる (Mizuki et al., 2000; Yamashita et al., 2005)。ちなみに Cry トキシンはドメイン I の α ヘリックス領域が貫入して標的細胞膜上に小孔を形成すると考えられているため、小孔形成毒素 (Pore-forming toxin, PFT) の分類において α -PFT (図 3) に分類される (Parker & Feil, 2005)。

一方、パラスポリン 2 及び 4 のプロトキシン及び活性化ペプチドの大きさは Cry トキシンよりも Cyt トキシンに類似している。Cyt トキシンは β バレルに基づいた小孔形成を行うと考えられており、Cry トキシンの α -PFT に対して β -PFT (図 3) と呼ばれている (Parker & Feil, 2005)。実際パラスポリン 2 及び 4 は Cyt トキシンと低い相同性しか示さないものの、他の β -PFT との類似性が報告されている。例えばパラスポリン 2Ab はグリーンヒドラ (*Chlorohydra viridissima*) 由来の β -PFT である hydralysin と約 40% という比較的高い相同性を示す (Hayakawa et al., 2007)。また X 線結晶構造解析の結果、パラスポリン 4 と 38% の相同性を示す 26 kDa タンパク質 (図 3) がウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 由来の β -PFT、 ϵ トキシンと極めて類似した構造を持つことが示されている (Akiba et al., 2006)。

3. パラスポリンの作用機構

パラスポリン 1 と 3 は殺虫性の α -PFT である Cry トキシンと類似する構造を持ち、パラスポリン 2 と 4 は β -PFT に類似性を示す。よって構造に違いがあるが、パラスポリンはすべて小孔形成という同様な作用機構を示すと考えられる。しかし実際の作用機構についてはパラスポリン 1 と 2 でまったく異なる結果が得られている。

構造の類似性からパラスポリン 1 は Cry トキシンのようにドメイン I の α ヘリックスに依存する小孔形成を行なうと予想される。しかし、パラスポリン 1 を感受性の

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸ガン細胞) に投与しても細胞膜上に小孔が形成されたことを示す細胞内 lactate dehydrogenase (LDH) の漏出や propidium iodide (PI) の流入は観察されず、代わりに細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入や続く caspase-3 の活性化、PARP の断片化などアポトーシスに特徴的な現象が観察される。これはパラスポリン 1 が小孔形成ではなく、 Ca^{2+} の細胞内流入を引き金とするアポトーシスによって標的細胞を殺すことを示している (Katayama et al., 2007)。パラスポリン 1 に小孔形成能がない、もしくは小孔形成能があっても HeLa 細胞上の特異的受容体との結合ではそれが発揮されない可能性も考えられるが、詳細は不明である。

パラスポリン 1 が標的細胞にアポトーシスを誘導することは Cry タンパク質の中では珍しい現象であるが、常識的に考えればそれほど不思議なものでもない。つまり、一般的に細胞表面には情報伝達に関わる様々な膜タンパク質が存在しており、Cry タンパク質の結合が何らかのシグナルを細胞内に発信する契機になることは十分に想定される。実際に Cry トキシンの結合が細胞死に向かうシグナルトランスダクションの引き金になる例も最近になって報告されている。例えば、イラクサキンウワバ由来の培養細胞、High five 細胞において、鱗翅目特異的殺虫毒素 Cry1Ab の受容体と考えられるカドヘリン様タンパク質 (Bt-R_I) を発現させた場合、Cry1Ab が細胞表面に提示された Bt-R_I に結合すると細胞の G タンパク質が活性化され、続いて adenylyl cyclase/protein kinase A 経路を介した細胞死が誘発されると報告されている (Zhang et al., 2006)。Cry トキシンと昆虫種の組み合わせによってはパラスポリン 1 と同様の作用を引き起こしているものがあるかも知れない。

一方、パラスポリン 2 は小孔を形成する毒素と考えられる。パラスポリン 2 (Parasporin-2Ab) を投与した

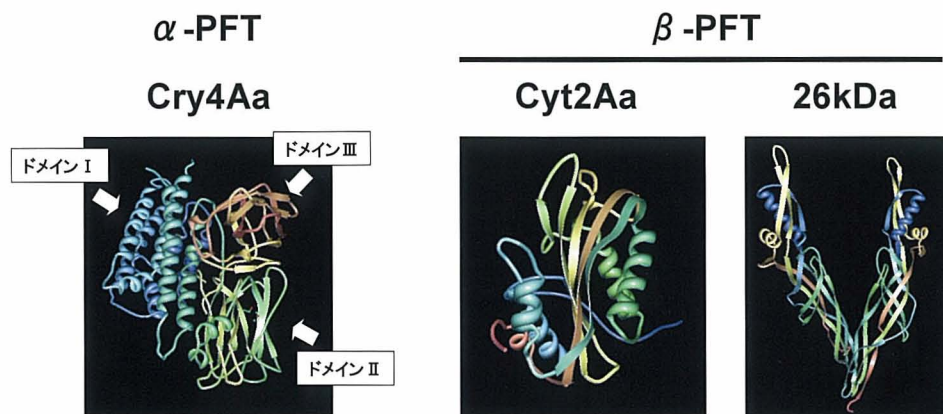


図 3. Cry 蛋白質に属する α -PFT 及び β -PFT の構造
Cry4Aa, Boonserm et al. (2006); Cyt2Aa, Li et al. (1996); 26 kDa, Akiba et al. (2006) より引用改変

MOLT-4 細胞（ヒト白血病ガン細胞）では、投与後 1 時間で細胞の膨張や核の凝縮が観察される（図 4）。またパラスポリン 2（Parasporin-2Aa）を HepG2 細胞（ヒト肝臓ガン細胞）に投与すると細胞膜上に小孔が形成されたことを示す細胞内 LDH の漏出や PI の流入が観察される（Kitada et al., 2006）。HepG2 細胞ではそれ以外にもパラスポリン 2 を低濃度で投与した場合でのみ caspase-3 や -7 の活性化が観察される（Ito et al., 2004）。またパラスポリン 2 と類似の 29 kDa タンパク質が Jurkat 細胞（ヒト白血病ガン細胞）にアポトーシスを誘導することも報告されている（Amano et al., 2005）。これらはパラスポリン 2 が小孔形成とアポトーシス誘導という二つの細胞損傷メカニズムを有する可能性を示唆している。恐らくはこの場合も標的となる細胞種によって若干異なる作用を持っているかも知れない。

4. パラスポリンは何処から来たのか？

パラスポリンと殺虫性 Cry トキシンは各々異なる細胞種を標的とし、構造的にも低い類似性しか示さない。しかしすべてのパラスポリンが Cry トキシンとしての名前も持っていることから判るように、パラスポリンと Cry トキシンには共通する特徴がある。

例えば、パラスポリンも Cry トキシンも *B. thuringiensis* が芽胞形成する際にクリスタルの形で産生され、昆虫幼虫の消化液と同様のアルカリ性の条件下で可溶化する。クリスタル中でトキシンはプロトキシンの状態で存在しており、活性化にはプロテアーゼによる部分消化が必要である。また双方とも高い特異性を示すことから標的細胞膜上の特異的な受容体が活性発現に関与すると考えられる。これらの共通する特徴の存在は、両者が同じグループのタンパク質であることを明確にしており、違いは標的認識に関わる部分だけである可能性を示唆して

いる。

もともと Cry トキシンは標的認識に関して多様性が観察される毒素である。例えば Cry トキシンでは、受容体の結合にドメイン II のループ領域が関与すると考えられているが、結合部位としてはループ 1 やループ 2、ループ 3、 $\alpha 8$ ループなど分子表面に露出すると考えられる様々な領域が候補になっている。また、それ以外にドメイン III を介して N-アセチルガラクトサミンを含むタンパク質糖鎖と結合するトキシンも存在する。結合先となる受容体についてもカドヘリン様タンパク質やアミノペプチダーゼ N、アルカリフォスファターゼ、P252 など膜タンパク質や脂質など、昆虫幼虫中腸上皮組織の刷毛縁膜上に局在する様々な分子が候補となっている。

興味深いことに、Cry トキシンについて報告された受容体結合部位と標的細胞膜上で見つかる受容体候補の組み合わせが Cry トキシンの種類と昆虫種との組み合わせによって異なる場合がある。また、感受性を示さない昆虫幼虫の中腸刷毛縁膜からも Cry トキシンと親和性を示す膜タンパク質が見つかることが多い。これらのことは、Cry トキシンの様々な領域が受容体結合部位として機能する可能性を示しており、それと結合親和性を示す標的細胞膜上の膜タンパク質や脂質は受容体として機能しうることを示唆する。乱暴な言い方をすれば、Cry トキシンは、適切な条件下で結合できるものが細胞膜表面に存在しさえすれば細胞損傷活性を発揮できるのかも知れない。そう考えればパラスポリンと Cry トキシンの違いは Cry トキシンのグループ内で見られる多様性の極端な例と言えるのかも知れない。

以前は、*B. thuringiensis* の産生する Cry タンパク質はすべて殺虫活性を示し、*B. thuringiensis* や Cry タンパク質も昆虫と共に進化・選抜されてきたと考えられた。しかし、*B. thuringiensis* の産生する Cry タンパク質の中に

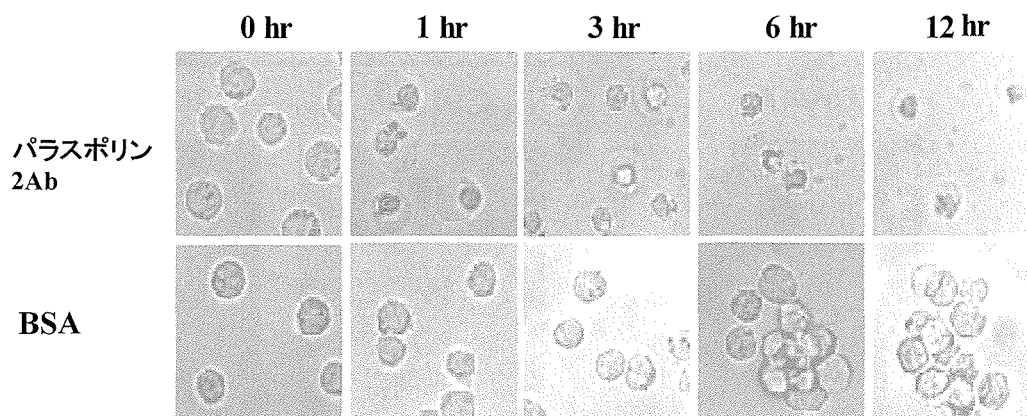


図 4. パラスポリン 2Ab を投与した MOLT-4 細胞の経時的変化 Hayakawa et al. (2007) より引用改変

は殺虫活性などが明らかでないものが多く (Ohba and Aizawa, 1986), また, パラスポリンのような新規な活性を示す Cry タンパク質が見つかるにつれて, *B. thuringiensis* が昆虫とは無関係に独自の進化を遂げてきた可能性も考えられるようになっていく。

パラスポリンは如何にして生まれたか? この問題の答えは現時点で得ようがなく, 様々な考え方ができると思う。パラスポリンのように昆虫と無関係な活性を示す Cry タンパク質が自然環境中に広く散在していることはたしかに *B. thuringiensis* が昆虫とは関係なく, 独自の戦略と方向性を持って進化してきたことを示唆するものである。しかし, パラスポリンが持つ「アルカリ条件下で可溶化」, 「プロテアーゼによる活性化が必要」などの特徴は, 昆虫との関連性があってもガン細胞とは無関係と思われ, パラスポリンと昆虫との深い関係を示唆するものである。*B. thuringiensis* は生き残り戦略として多様な Cry タンパク質を産生するシステムを持ち, その中からたまたまガン細胞に特異的な毒素が見つかっただけということも考えられる。

5. パラスポリンを通して見る Cry タンパク質の可能性

近年, 殺虫スペクトルが明らかでない Cry タンパク質の中から昆虫以外の生物に対する新規の活性を発見しようとする試みが活発に行なわれている。本稿で紹介したパラスポリン以外にも病原性原生動物であるトリコモナスに活性を示す *B. thuringiensis* が見つかった (Kondo et al., 2002)。*B. thuringiensis* の産生する Cry タンパク質が上述のような戦略を持つのであれば, スクリーニングの戦略や方法次第で, 今後も様々な活性を持つ新規 Cry タンパク質が見つかると思われる。

また, 今後, パラスポリンの分野でも遺伝子組換え技術を用いたトキシン分子の改変が試みられるようになると思われる。特に本稿でも紹介したパラスポリン 1 や 3 は, 3 つのドメインで構成される典型的な殺虫性 Cry トキシンと比較的似た構造を持ち, 遺伝子の改変も比較的容易と考えられる。つまり, 特異性や機能などが異なるパラスポリンもしくは Cry トキシンは受容体への結合部位などの機能構造もそれぞれ異なっているはずである。しかし, お互いに基本骨格が類似しているのであれば, 全体の構造を損なわずにその機能構造自体を交換もしくは改変できる可能性がある。似たようなことは Cry トキシンにおいて一般的に行なわれており, ある Cry トキシンの受容体結合に関与すると考えられるドメイン II のループ構造を異なる特異性を持つ Cry トキシンに導入

することで殺虫特異性が改変・拡張できることが報告されている (Abdullah et al., 2003)。

パラスポリンに関する研究はそれ自体大きな意義と可能性を持つものである。この分野の研究が進めばガン細胞のターゲティングが可能となり, 実際のガン治療や診断などに利用することも可能になるかも知れない。さらに Cry トキシンとの構造の類似性を残しながら全く異なる特異性や作用を示すパラスポリンの存在は, Cry タンパク質全般の機能構造を理解する上で格好の比較対象になると考えられる。

引用文献

- 石渡繁胤, (1901), 劇烈なる一種の軟化病 (卒倒病) に就て, 大日本蚕糸会報, **114**, 1-5.
- Abdullah, M. A. F., Alzate O., Mohammad M., McNall R. J., Adang M. J. and Dean D. H. (2003) Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5343-5353.
- Akiba T., Higuchi K., Mizuki E., Ekino K., Shin T., Ohba M., Kanai R. and Harata K. (2006) Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to beta-pore-forming toxins. *Proteins*, **63**, 243-248.
- Amano H., Yamagiwa M., Akao T., Mizuki E., Ohba M. and Sakai H. (2005) A novel 29-kDa crystal protein from *Bacillus thuringiensis* induce caspase activation and cell death of Jurkat T cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 2063-2072.
- Boonserm, P., Mo M., Angsuthanasombat C. and Lescar J. (2006) Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry-4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**, 3391-3401.
- Crickmore N Zeigler D. R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J. and Dean D. H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 807-813
- Katayama H., Yokota H., Akao T., Nakamura O., Ohba M., Mekada E. and Mizuki E. (2005) Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biochem.* **137**, 17-25
- Katayama H., Kusaka Y., Yokota H., Akao T., Kojima M., Nakamura O., Mekada E. and Mizuki E. (2007) Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induce Ca^{2+} influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration in toxin-sensitive cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 7742-7752
- Kitada S., Abe Y., Shimada H., Kusaka Y., Matsuo Y., Katayama H., Okumura S., Akao T., Mizuki E., Kuge O., Sasaguri Y., Ohba M. and Ito A., (2006) Cytocidal actions of Parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26350-26360
- Hayakawa T., Kanagawa R., Kotani Y., Kimura M., Yamagiwa M., Yamane Y., Takebe S. and Sakai H., (2007) Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* **55**, 278-283.
- Kondo S., Mizuki E., Akao T. and Ohba M., (2002) Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitol. Res.* **88**, 1090-

- 1092.
- Li J, Pandelakis AK, Ellar DJ (1996) Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**, 129-152.
- Mizuki E., Park Y. S., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K. and Ohba M. (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**, 625-634
- Ohba M. and Aizawa K. (1986) Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **47**, 12-20.
- Okumura S., Saitoh H., Ishikawa T., Wasano N., Yamashita S., Kusumoto K., Akao T., Mizuki E., Ohba M. And Inouye K., (2005) Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6313-6318
- Parker M. W. and Feil S. C., (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **88**, 91-142.
- Yamashita S., Katayama H., Saitoh H., Akao T., Park Y. S., Mizuki E., Ohba M. and Ito A., (2005) Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **138**, 663-672
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla Jr. LA (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9897-9902.