

氏 名	おく 村 史 朗
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2605 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, produced by <i>Bacillus thuringiensis</i> A1470 strain (<i>Bacillus thuringiensis</i> A1470 株が産生する新規な細胞傷害性タンパク質 Cry45Aa の同定とその性質の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 國 世 教 授 吉 川 正 明 教 授 安 達 修 二

論 文 内 容 の 要 旨

Bacillus thuringiensis (以下 BT と略す) は、孢子形成時に 1 種類もしくは複数のタンパク質により構成される封入体を産生する。ある種の BT 株では、この封入体に昆虫に対する殺虫活性を示すタンパク質が含まれている。BT は哺乳類、鳥類、爬虫類などには病原性を示さないため、微生物農薬として注目されてきた。また、これから得られる殺虫タンパク質はしばしば遺伝子組み換え作物に応用されている。他方、最近になり、ヒト培養細胞に対して細胞傷害活性を示すタンパク質を産生する BT 株が報告されている。

本論文では、*B. thuringiensis* A1470 株が産生する 2 種類の細胞傷害性タンパク質について、その同定と遺伝子クローニングをおこない、そのうちの一つである Cry45Aa について、その諸性質を解析したものである。その主な内容は以下のとおりである。

1. 害虫として知られるコナガの中腸上皮細胞の刷子縁膜を抽出し、これに中性の合成リン脂質を加え、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーのチップ上に疎水性相互作用により固定化し、疑似細胞膜を構築した。これにコナガに対して殺虫活性を示す BT タンパク質 Cry1Ac の溶液を流して、疑似細胞膜との相互作用を測定した。Cry1Ac は疑似細胞膜に対して濃度依存的に結合し、Cry1Ac 結合量と Cry1Ac 濃度の関係はラングミュアの吸着等温式に従った。また、加熱変性した Cry1Ac は結合性を示さなかった。このように、Cry1Ac と疑似細胞膜との特異的な結合が SPR センサーにより解析できることを示した。
2. アビジンを固定化した SPR センサーに、ビオチン化タンパク質を含む HeLa 細胞のホモジネートを流し、ついで洗浄液を流して非特異的結合物を除いた。残存タンパク質の結合量からホモジネート中のビオチン化タンパク質の定量できることを示した。この際に、試料液を流す順序を考慮した補正の導入により、検量線の相関係数を大きく改善した。さらに、HeLa 細胞の細胞膜画分を遠心分画法により精製し、ビオチン化タンパク質濃度と、膜酵素 Amino peptidase N 比活性とを比較したところ、この両者が互いに同様の傾向を示すことを確認した。このことから、SPR センサーによるビオチン化タンパク質の定量値が膜画分の精製指標として有効であることが示された。
3. *B. thuringiensis* A1470 株が産生する封入体を可溶化後にプロテアーゼ処理により活性化すると、ヒト白血病細胞である MOLT-4 細胞に対して細胞傷害活性を示す。28 kDa のタンパク質を含む画分が MOLT-4 細胞に対して強い細胞傷害活性を示すことが知られていたが、そのタンパク質は同定されていなかった。本論文では、A1470 株から 2 種類の細胞傷害性タンパク質を同定し、その遺伝子をクローニングした。アミノ酸配列の相同性検索により、一方は別の BT 株が産生する細胞傷害性タンパク質 Cry46Aa と高い相同性をもつタンパク質であることが判明した。また、他方のタンパク質は、新規な細胞傷害性タンパク質であることが確認され、*B. thuringiensis* タンパク質命名委員会により Cry45Aa と命名された。
4. クローニングで得た Cry45Aa 遺伝子を pET30a (+) ベクターに連結し、大腸菌の BL21 株に導入して培養し、Cry45Aa を封入体として産生する大腸菌を得た。この封入体は、巻き戻し操作を行うことなく細胞傷害活性を示した。

また、10 mM 塩酸に対して特に高い溶解度を示した。そこで、塩酸で可溶化したのちに、ペプシンで活性化し、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製する新規な調製法を確立した。本調製法により、アルカリ可溶化を用いる従来法に比べて27倍の収率でCry45Aaを精製することが可能となった。

5. 活性化したCry45Aaを20種類の哺乳動物培養細胞系に投与し、その細胞傷害活性を検討した。その結果、Cry45Aaはヒト結腸ガン由来のCaco-2細胞、ヒト子宮ガン由来のSawano細胞、ヒト白血病細胞由来のMOLT-4細胞などに対して強い傷害活性を示した。一方、ヒト正常T細胞、ヒト正常肝細胞、ヒト子宮正常平滑筋細胞、ヒト正常胎児繊維芽細胞の4種類の正常細胞に対しては傷害活性を示さなかった。このように、Cry45Aaはヒトガン細胞に対し、特異的な傷害性をもつことが示された。また、Cry45Aaの熱安定性、pH安定性、等電点、分子吸光係数などのタンパク質化学的諸性質を解析し、他のCryタンパク質のそれらと比較検討した。

論文審査の結果の要旨

Bacillus thuringiensis（以下BTと略す）が産生する殺虫タンパク質は遺伝子組み換え作物に応用されている。最近になって、殺虫性はないが、ヒト培養ガン細胞に対して細胞傷害活性を示すタンパク質を産生するBT株が報告されている。これらは細胞特異性を示すことから、ガンの診断や治療への応用が期待されている。本論文は、BTが産生する新規の細胞傷害性タンパク質を同定し、その遺伝子をクローニングし、さらにその細胞特異性を検討したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. BTの殺虫タンパク質に感受性のある昆虫の中腸上皮細胞膜を抽出して表面プラズモン共鳴（SPR）センサーのチップ上に固定化し、その疑似細胞膜と殺虫タンパク質との相互作用を検出する *in vitro* スクリーニング法を開発した。本スクリーニング法は、飼育不可能な昆虫に対するBT株のスクリーニングのみならず、BTの産生する細胞傷害性タンパク質のスクリーニングにも有用であることを示した。
2. 培養細胞の膜タンパク質をビオチン修飾し、このビオチン化タンパク質をSPRセンサーによる定量する方法を示した。また、ビオチンで修飾した培養細胞からの細胞膜画分の精製において、ビオチン化タンパク質が精製指標として有効に利用できることを示した。
3. *B. thuringiensis* A1470株から2種類の細胞傷害性タンパク質を同定し、その遺伝子をクローニングした。このうちの一方は、新規な細胞傷害性タンパク質であることが確認され、*Bacillus thuringiensis* タンパク質命名委員会によりCry45Aaと命名された。
4. 大腸菌によるCry45Aa組み換え体の封入体が10 mM 塩酸に対して高濃度に溶解することを見いだした。BTに関する研究は殺虫活性の解明から始まっており、BTの封入体の溶解は昆虫の消化液と同じアルカリ性の溶液で行うのが定法であったが、本論文では酸性溶液での封入体溶解を含むCry45Aaタンパク質の新規かつ効率的な調製法を確立した。
5. Cry45Aaを20種類の哺乳動物培養細胞系に投与し、その細胞傷害活性の細胞特異性を検討している。Cry45Aaは8種類のヒトガン細胞に対して強い傷害活性を示した。一方、4種類の正常細胞に対しては活性を示さなかった。このことから、Cry45Aaがガンの診断と治療へ応用できる可能性が示唆された。

以上のように本論文は、*Bacillus thuringiensis*が産生する新規の細胞傷害性タンパク質Cry45Aaを同定し、その遺伝子をクローニングし、さらにCry45Aaがガン細胞に対し高い細胞傷害性をもつことを示したものであり、酵素化学、農産製造学および食品生理機能学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年2月16日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。