

## *Bacillus thuringiensis* 92-10 株が産生する Parasporin-1Aa について

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野  
上森 翔太

*Bacillus thuringiensis* (Bt) が産生する Cry タンパク質の中には、農業上や衛生上重要な害虫に対し特異的殺虫活性を有するものがあることから、Bt は微生物防除資材として広く利用されている。一方、がん細胞に対し選択的な細胞損傷活性を示す Parasporin が発見され (Mizuki *et al.*, 2000)、現在 6 つのサブグループ (Parasporin-1~6) に分類されている。そのうち Parasporin-1Aa1 は殺虫性 Cry トキシンと同様の 3 ドメイン構造をとりながら、それとは全く異なる作用機作を示すため、Cry トキシンの作用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ている (Katayama *et al.*, 2007)。本研究では、Parasporin-1Aa と殺虫性 Cry トキシンの作用機構の比較を通して、Parasporin-1Aa のがん細胞損傷活性機構を明らかにすることを目的とした。ベトナムで分離された *B. thuringiensis* 92-10 株 (Yasutake *et al.*, 2005) 由来の Parasporin-1Aa を供試した。

現在知られている Parasporin-1Aa の作用機構は次の通りである。81 kDa の Parasporin-1Aa がアルカリ可溶化、プロテアーゼ処理により 56 kDa と 15 kDa からなる活性型ヘテロダイマーを形成する。このヘテロダイマーが標的細胞の細胞膜上に存在する受容体 (Beclin-1) に結合することで、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入が起こり、カスパーゼカスケードが活性化し、アポトーシスが誘導され、細胞が死に至る (Katayama *et al.*, 2007)。

本研究では、まず Parasporin-1Aa がトリプシン処理により 2 断片化され、ヘテロダイマーを形成することで細胞損傷活性を持つ点に注目した。分子内切断を受けない変異体 (Parasporin-1Aa[R231A/M232A]) を作製し、トリプシン処理により活性化した後、ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa14 細胞) に対する細胞損傷活性を示すか調査したが、損傷活性は認められなかった。活性化した Parasporin-1Aa[R231A/M232A] は HeLa14 細胞の細胞表面に結合することが、免疫染色による結合実験により確かめられた。しかしながら、カスパーゼカスケードの活性化は確かめられなかった。以上のことから Parasporin-1Aa が分子内切断され、ヘテロダイマーを形成することは細胞損傷活性には必要であり、細胞に結合した後のカスパーゼカスケードの活性化、アポトーシス誘導に関与していると考えられた。

次に殺虫性 Cry トキシンと構造が大きく異なるドメイン II が Parasporin-1Aa ではどのような働きをするのか調査した。Parasporin-1Aa に Cry1Aa のドメイン II を導入した変異体 (Parasporin-1Aa[D2Cry1Aa]) を作製し、トリプシン処理したところ Parasporin-1Aa と同じ断片長の 2 断片が生成された。2 断片を HeLa14 細胞に投与したところ、損傷活性は認められなかったが、ゲル濾過クロマトグラフィーにより 2 断片を分離精製することができなかったことから、ヘテロダイマーを形成していると考えられた。免疫染色による結合実験を行ったところ活性型 Parasporin-1Aa[D2Cry1Aa] は HeLa14 細胞に結合しないことから、Parasporin-1Aa のドメイン II は標的細胞との結合に関与していると考えられた。