

<L-4> *Bacillus thuringiensis* から発見された新しい結晶性毒素タンパク質

(パラスポリン2)の細胞破壊機構

○北田栄<sup>1</sup>、阿部雄一<sup>1</sup>、片山秀樹<sup>2</sup>、赤尾哲之<sup>2</sup>、水城英一<sup>2</sup>、大庭道夫<sup>3</sup>、久下理<sup>1</sup>、伊藤明夫<sup>1</sup>

(1;九大院・理、2;福岡県工業技術センター・生物食品研、3;九大院・農)

**【目的】***Bacillus thuringiensis* (BT) は、わが国で初めて蚕の病原微生物として発見され、これまでに各種BT菌体内に結晶状に貯蔵されているタンパク質 (Cryタンパク質) が毒素本体であり、これらは特定の昆虫のみに殺虫活性を示し、人畜や環境に影響を与えないことが明らかとなっている。このため現在では数種のCryタンパク質が、有害昆虫を駆除するための生物農薬素材として遺伝子組み替え作物などに利用されている。しかしながら、生息する多くのBT菌は結晶タンパク質を細胞内に貯蔵しているにもかかわらず、殺虫活性を示さないものも存在する。このような中、近年、殺虫活性および溶血活性を示さず、哺乳動物培養細胞に対して毒性を発揮するBT菌株が多数発見された。これらのうち、我々はBT(A1547)株が産生する結晶性毒素タンパク質 (パラスポリン2) の同定および遺伝子クローニングを行い、この毒素の細胞特異性とヒト各種がん病理組織に対する有効な細胞破壊性を報告した(1)。今回、パラスポリン2による細胞破壊機構の解明を目的とし、ヒト肝ガン由来培養細胞HepG2に対する毒性作用を調べた。

**【方法・結果】**パラスポリン2を細胞に作用させると、細胞表面に風船状の形態が観察され、急速な細胞内タンパク質の流出およびPropidium iodideの細胞内への取り込みが起きた。このことから、パラスポリン2は細胞膜に傷害を与えていると考えられる。蛍光抗体法により標的細胞でのパラスポリン2の局在を観察したところ、その作用時間に関わらずほとんどが細胞膜に存在していた。細胞に作用させたパラスポリン2を免疫ブロッティング法により検出すると、膜画分にのみ30 kDaのモノマーと約200kDaのSDS耐性のオリゴマーが検出された。このオリゴマーは毒素感受性細胞において特異的に検出されるため、毒素オリゴマー化が細胞破壊作用と強く相関していると考えられる。さらにパラスポリン2の細胞における局在を細胞分画法により詳細に解析したところ、モノマー、オリゴマーとも主に細胞膜画分に回収され、さらにコレステロールなどに富む脂質マイクロドメインDetergent Resistant Membrane (DRM) に存在していた。そこでパラスポリン2の細胞膜での存在状態を調べるために、パラスポリン2を作用させた細胞に対してアルカリ処理を行なったところ、モノマーは膜表面に結合し、オリゴマーは膜に挿入されていた。

**【結論】**パラスポリン2は、細胞膜の脂質ラフトに存在する推定上の受容体に結合した後、細胞膜での孔形成と密接に関わっているであろう分子オリゴマー化を介して、細胞傷害を引き起こしているのではないかと考えられる。

(1) Ito, A. et al. A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 21282-21286. (2004).