

# 細胞傷害性タンパク質の作用研究 によるヒト癌細胞標的分子の探索

広島大学 大学院生物圏科学研究科  
生物機能開発学専攻  
教授 永松 康德

# 研究目的: 副作用の少ない抗癌剤はできないか

*Bacillus thuringiensis* (BT菌)の  
2タイプ 3種の Cryタンパク質



人為的な活性化

毒素タンパク質



作用に選択性有り

細胞表在タンパク質

マーカータンパク質になりうるか？

ヒト肝臓癌細胞 HepG2

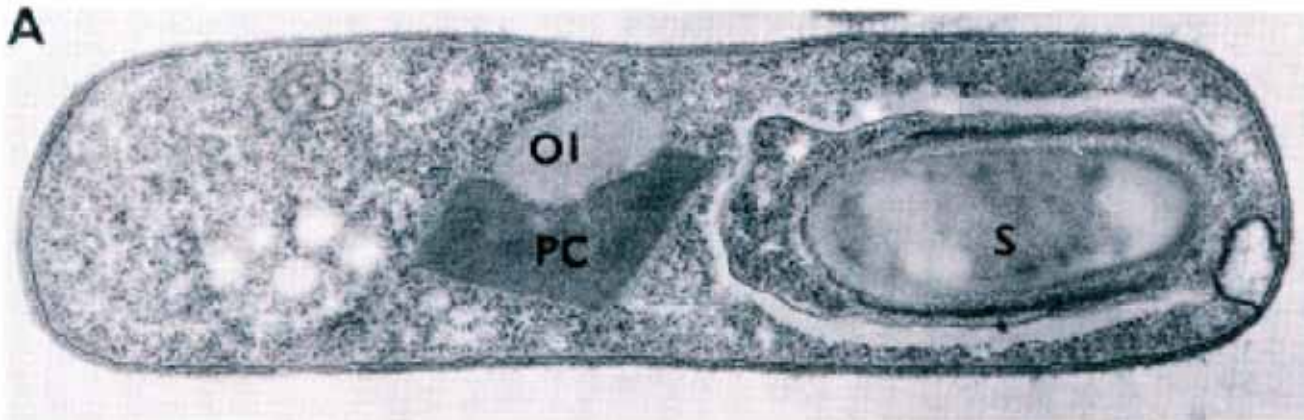
ヒト子宮頸部癌細胞 HeLa



細胞膨潤・破壊

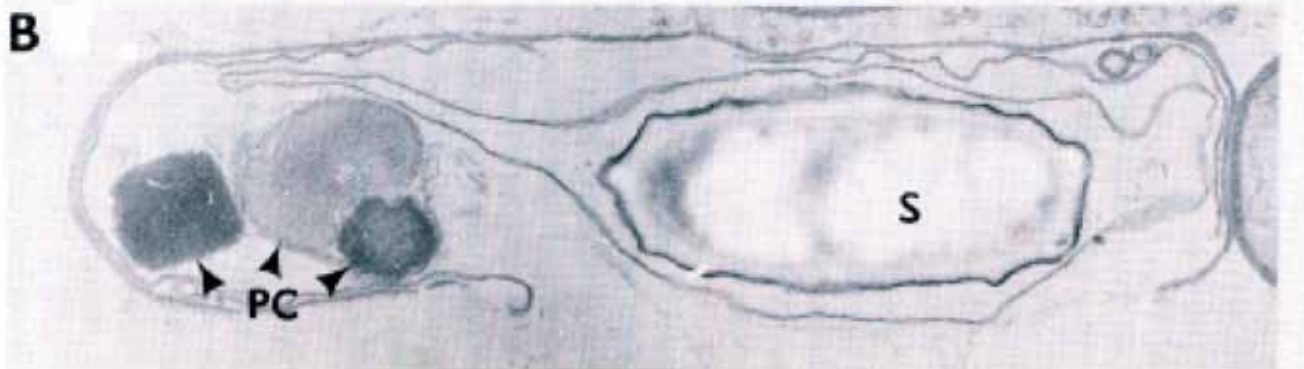
細胞膜孔形成？

# 背景1-1：BT菌の殺虫性 Cryタンパク質



チョウやガ  
(鱗翅目)  
の幼虫へ病原性  
Cry1蛋白質  
Cry2蛋白質

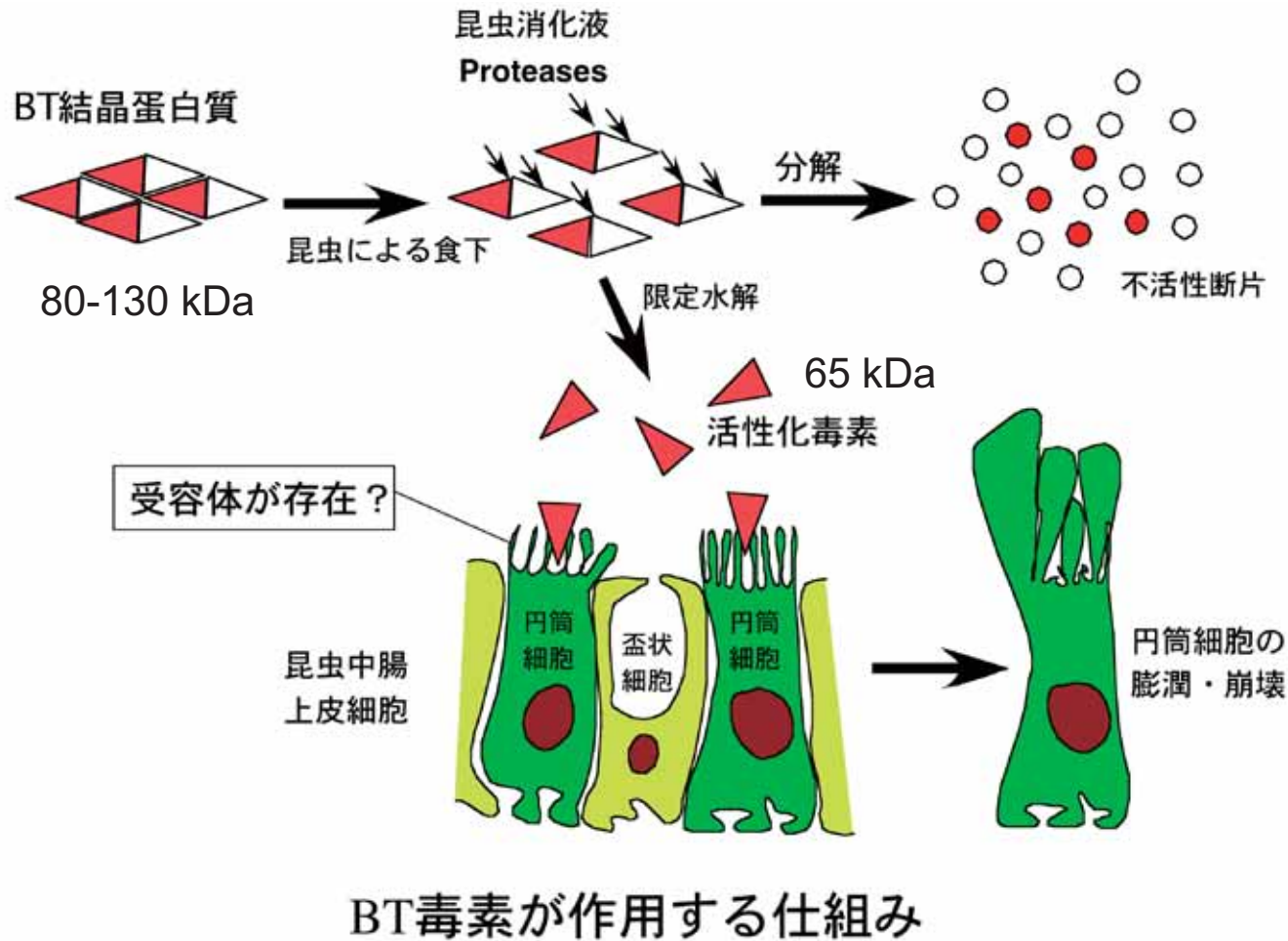
S, spore 胞子; PC, parasporal crystal 胞子と並行してできる結晶



カやハエ(双翅目)  
の幼虫へ病原性  
Cry4 x 2種  
Cry11 x 2種  
Cyt 蛋白質

このほか、甲虫目昆虫 (Cry3) や線虫へ作用するCry 蛋白質が同定されている

# 背景1-2: 殺虫性 Cryタンパク質の作用

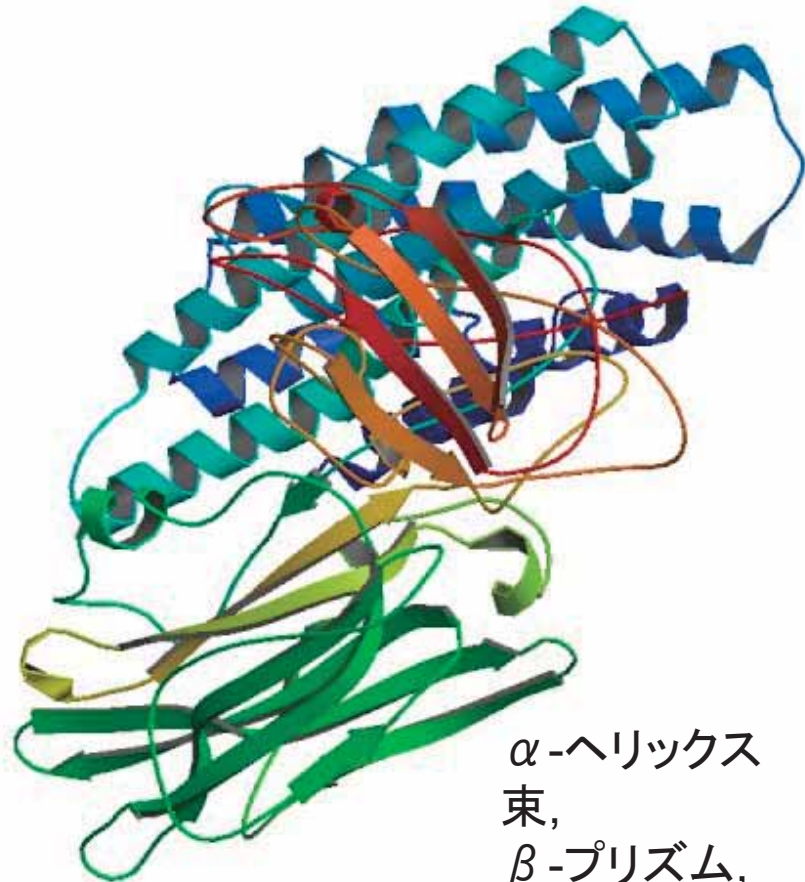


活性化毒素は  
選択性を保持

標的細胞の  
細胞膜上の  
カドヘリン様  
蛋白質が  
受容体

活性化毒素は  
細胞膜孔を  
形成

# 活性化殺虫性蛋白質の立体構造



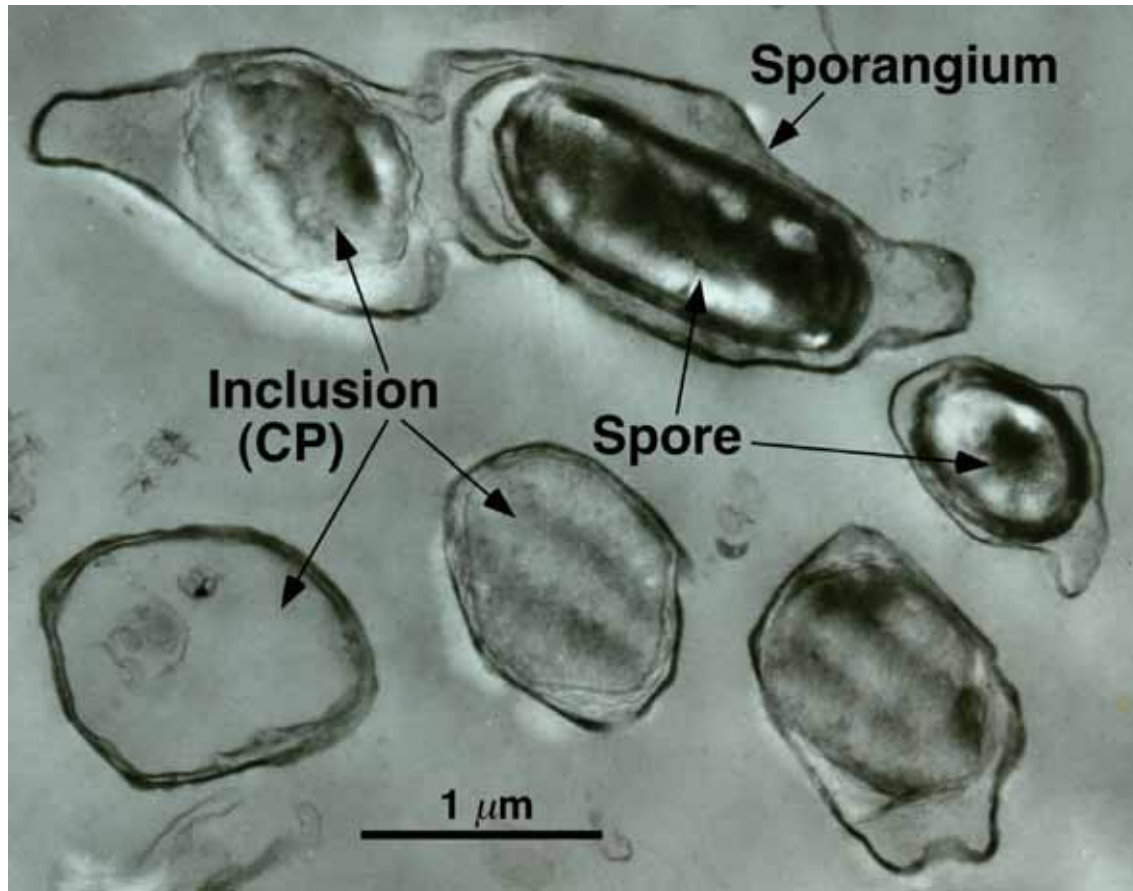
$\alpha$ -ヘリックス  
束,  
 $\beta$ -プリズム,  
 $\beta$ -サンドイッチ  
ドメイン構造

アミノ酸配列の相同性が低くても、基本的には左の3ドメイン構造

2番目のドメインのアミノ酸配列の差異が選択性に大きく関与

BT殺虫性蛋白質と標的細胞との間の「蛋白質-蛋白質」相互作用で作用選択性を決定—**高いレベルの選択性**

# ヒト子宮癌細胞を殺すBT Cry 毒素



BT菌 M019株の電子顕微鏡写真

3種の鱗翅目昆虫と  
2種の双翅目昆虫に  
病原性が無い40株  
の Cry蛋白質



殺虫性Cry蛋白質用の  
条件で人為的に溶解と  
活性化

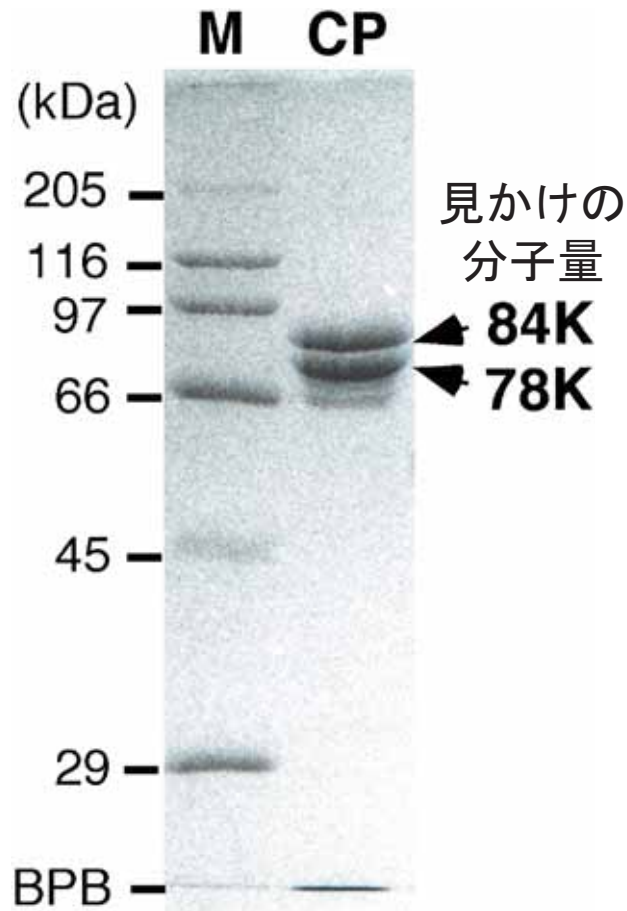


ヒト子宮癌細胞HeLa  
に対する障害作用を  
アッセイ



M019株を取得

# BT菌M019株のCry蛋白質

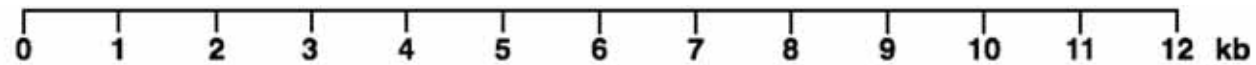


蛋白質の構造解析と  
遺伝子クローニングの結果、  
3種のCry蛋白質が同定  
された。

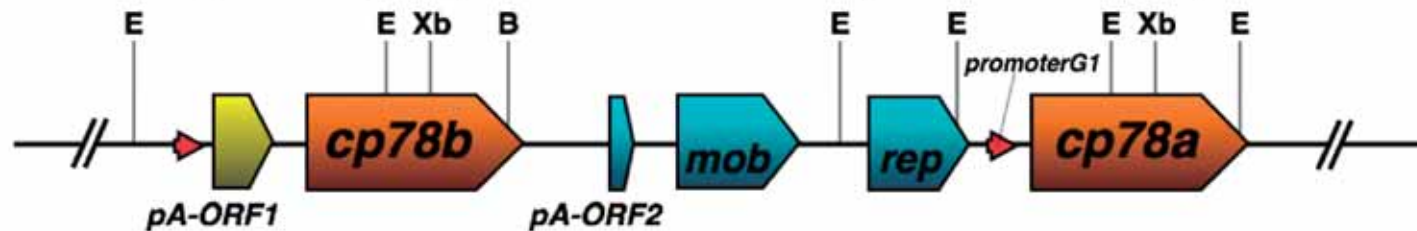
**CP78A, CP78B, & CP84**

Cry蛋白質としての分子量は  
いずれも84,000

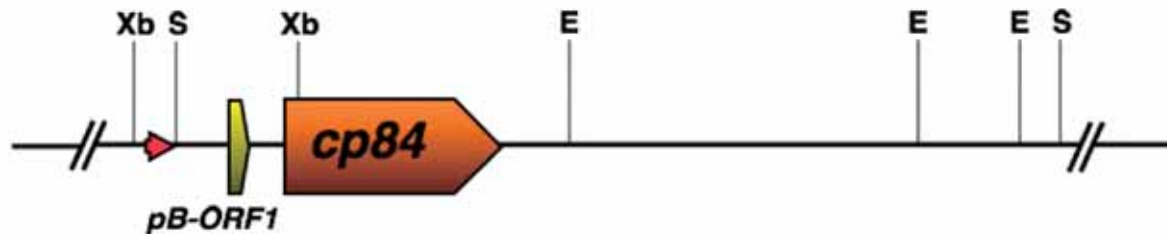
# 3種のCry蛋白質の遺伝子は独立して 2つのプラスミドDNA上に存在した



## A. a major large plasmid DNA (pBTm019A)



## B. a minor 20 kb-plasmid DNA (pBTm019B)



Restriction enzymes: B, *Bam*H I; E, *Eco*R I; S, *Sal* I; Xb, *Xba* I



# 3遺伝子の翻訳開始領域150塩基 は同じパーツが使われている

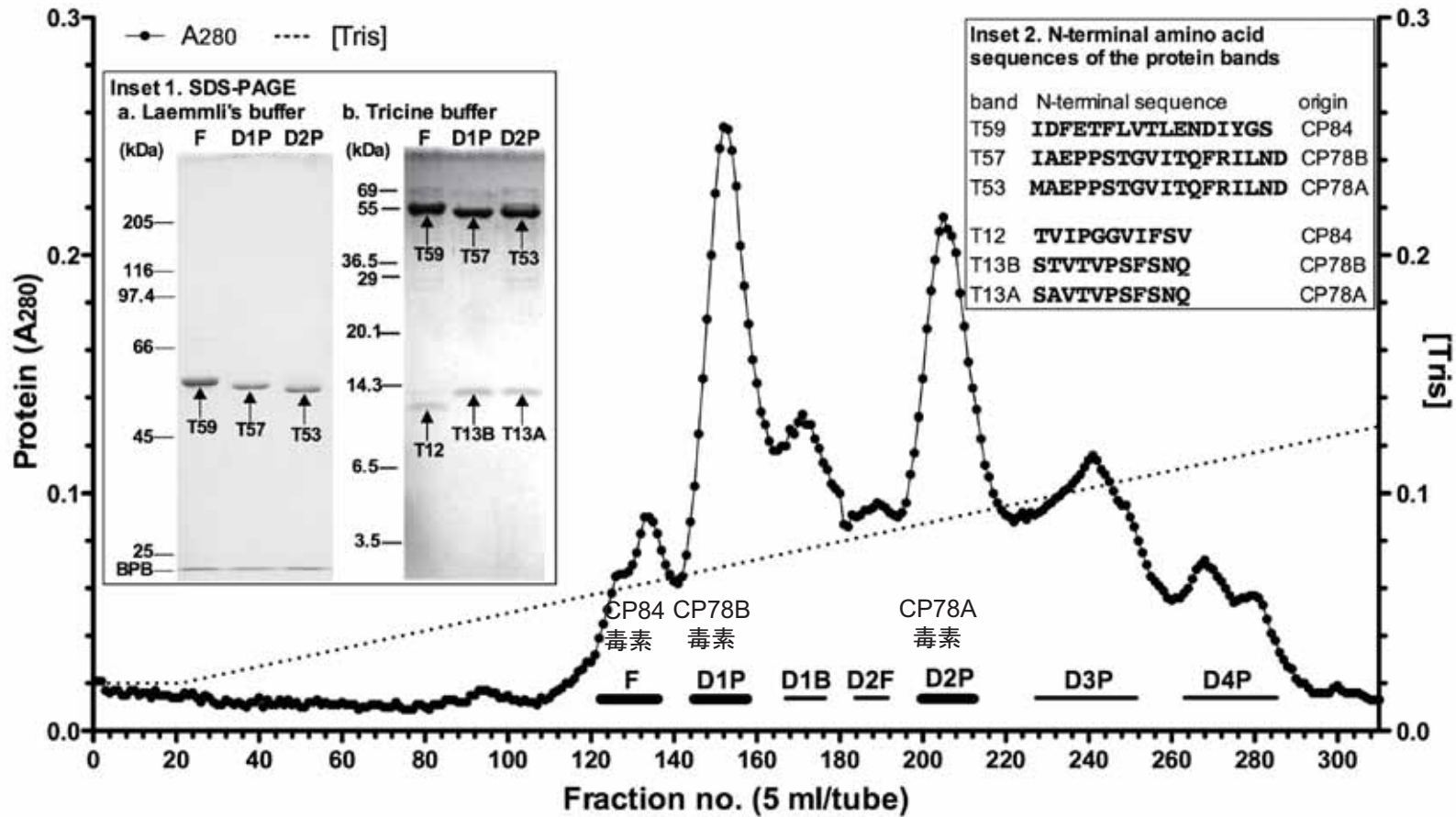
78a TTTATTTGATCAATTTTAAAATAAAAAAGATCTCACC  
 78b TTTGTTTGTAAATTTTCAGGAAAAAAGATCTCAAC  
 84 AAATATAGGTATTACCGTTTCTGTTCGGTTACTACA

	*翻訳開始点	STAB-SD配列
78a	GACTTTTGTATGTCGGTTGTTTACCATGTGAAAGGTGGAGATATTGTGGACCCGTTTTCT	
78b	GACTTTTGTATGTCGGTTGTTTAC	TATGTGAAAGGTGGAGATATTGTGGACCCGTTTTCT
84	CAAACCCCATGTCGGTTGTTTAC	TATGTGAAAGGTGGAGATATTATGGACCCGTTTTCT

78a	AATTATTCTGCACAAAATACCCAGATTCAAATAATAACCAAGAACTAACTACAAAATCC	
78b	AATTATTCTGACAAAATACCCAGATTCAAATAATAACCAAGAACTAA	TTACAGAATCC
84	AATTGTTCTGAAAAAATAC	TCAGATTCAAATAATAACCAAGAACTAACTGTAGAATCC

78a	TCTTTATTTTATTTCGGATACTACTAATGGAAATGTAAAAA	ATTACCACCCGATTGAACAA		
78b	TCTTCATTTTATTTCGGATACTACTAATGAAAAT	ATGAAAACTTACCATCC	AATTGAACAA	
84	TCTTCATTTTATTTCGAATACTACTAATGAAAAT	ATGAAAAAAA	AAATTATCC	TCCAATAAT

# 溶解・活性化した毒素蛋白質の イオン交換クロマトによる分離





CP84は新奇なCry蛋白質だが、予想される  
立体構造は殺虫性蛋白質に似ているだろう

```

CP84      1 MSVYYVYKGG DIMDPFSNCS EKKYSDSNNN QELTVSSSSF YSNTTNNMK  50
                                         Tryptic cleavage site ↓
CP84      51 KNYPPINKNF SRNSNDTVLD ILNISQNNNI DIFAPYNNLH SIKDELQIRT 100
                                         F65
CP84     101 VIPGGVIFSV TGNKFDVDSKF TAITYAAITK LTSSLITAAA TAILGPIGTT 150
          T12 N-terminal
CP84     151 IGGAISGPIA NALFGLIPGM KPLTPQEIID IAVEQSKLYT DEQITNLVIT 200
                                         Tryptic cleavage site ↓
CP84     201 NATSELASIK AKIEDFNSQL NFALNSKNDN LMNRIDFETF LVTLENDIYG 250
          F61                                     T59 N-terminal
CP84     251 SIIKLMNFGY SKQLLPITV CCTLNLSFLR DAIFNSQTFN ISTQGKRVLT 300
          F44B
CP84     301 DTFERRTIEY SDKIINEYTL LFNEIKLKEN AKTTLDFRTF MSLQVLDQVD 350
CP84     351 LWSVFKFSQF NIRNTRRLYT IPYQYSENDV SKLDPTQING DWKFINQILY 400
          F44A
CP84     401 GLPGNRISGF AGTVELYQPN KIRRINKLKA LYSNNETTGY VGKDANAMDS 450
          F47A
CP84     451 FDTHPIISQK PAIINYASHV IVNLPPSSVQ NLTLTDTIGP IFPGKYVINQ 500
CP84     501 QLYPGLNSLL EYEKFAIPDH KGVNVAGLPN IDSSYTSSTI DNLRQNFITS 550
          59kfrA
CP84     551 KPILGSVTAF QKDIPNYEQV NNKEQIVHLC PTDTDQKLLG FNIPALEYSK 600
          59kfrB
CP84     601 DRIANFGFEE TWMIIPSYSS SGDNLQFKGT TAGIKYYLKS AQNAYANYKI 650
CP84     651 FIKIAYKPNN SGNKVQLNIN MKDLTSSSII SATLNIQNTS LLKGTSEDNV 700
CP84     701 KFITFEVPTN FPISNNTYEL QLIFTNLQQN DDLRLNELIL HPINNDFINI 750
CP84     751 LNA 753

```

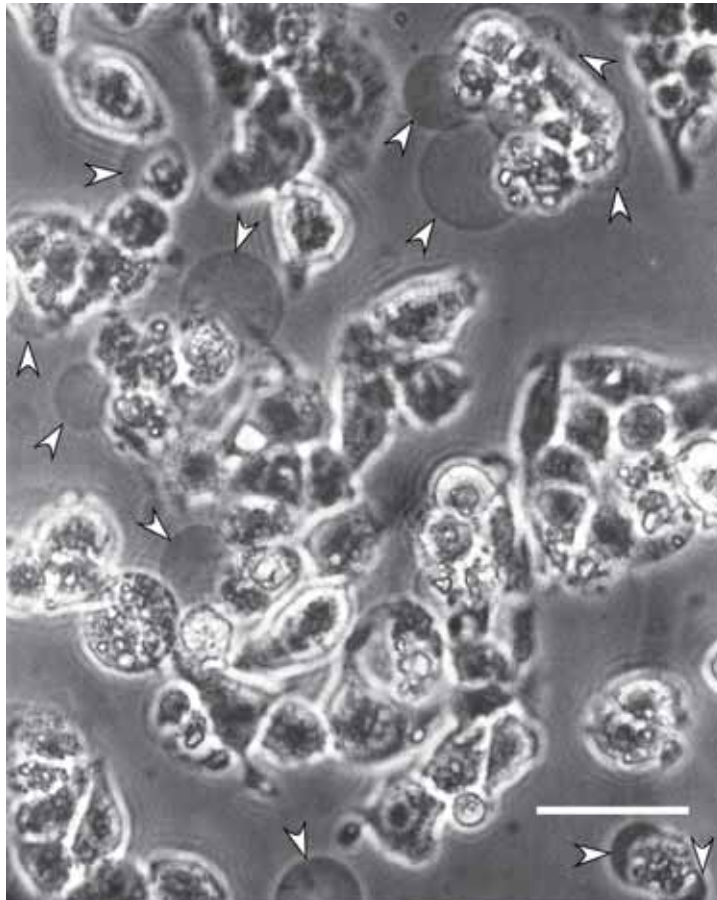
## M019株 Cry蛋白質の細胞毒性 (LC50, $\mu\text{g/ml}$ )

細胞	起源	CP78B毒素	CP78A毒素
ヒト			
HeLa	子宮頸部癌細胞	1.2	9.6
MOLT-4	白血病T細胞	23.6	>100
Jurkat	白血病T細胞	>100	>100
CACO-2	結腸癌細胞	>100	>100
HepG2	肝臓癌細胞	0.93	8.8
HC	胎児正常肝細胞	>100	>100
UtSMC	正常子宮平滑筋細胞	>100	>100
A549	肺癌細胞	>100	>100
サル			
Vero	腎臓細胞	>100	>100
COS-7	腎臓細胞	>100	>100
マウス			
NIH3T3-3	胚細胞	>100	>100

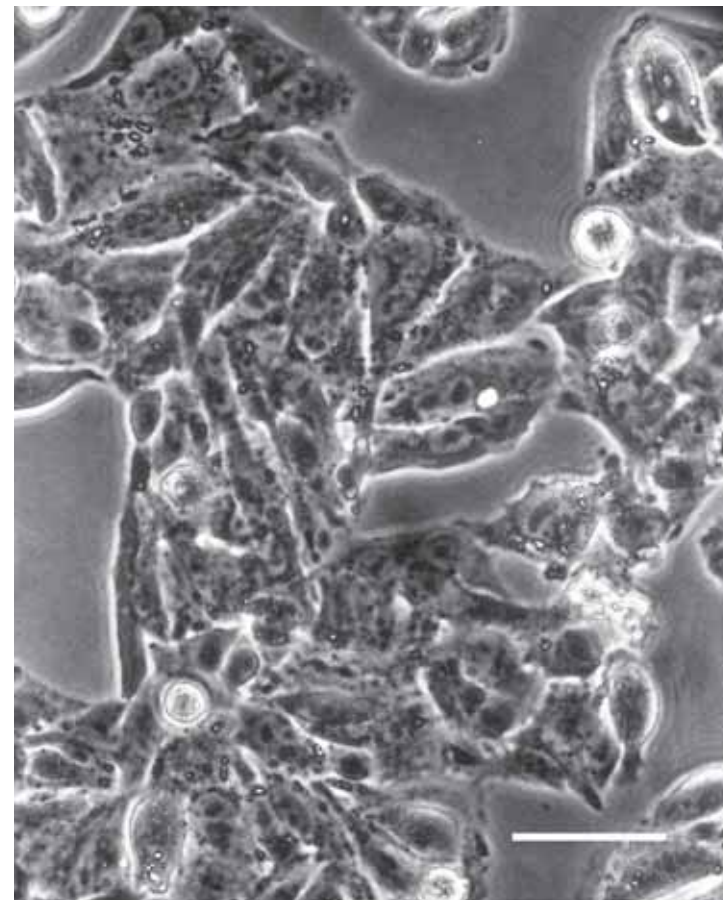
# 毒素は細胞間接着をゆるめ、膨潤させる

ヒト肝臓癌細胞 HepG2

—細胞膜孔形成か？



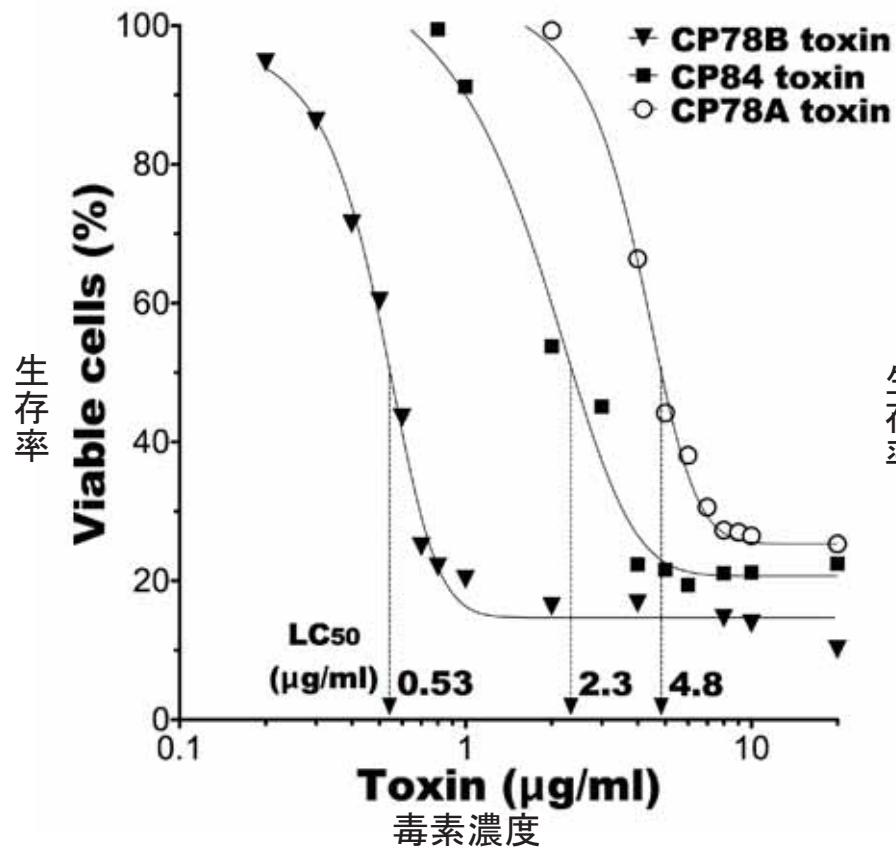
CP84 毒素, 4  $\mu\text{g/ml}$ , 6 時間



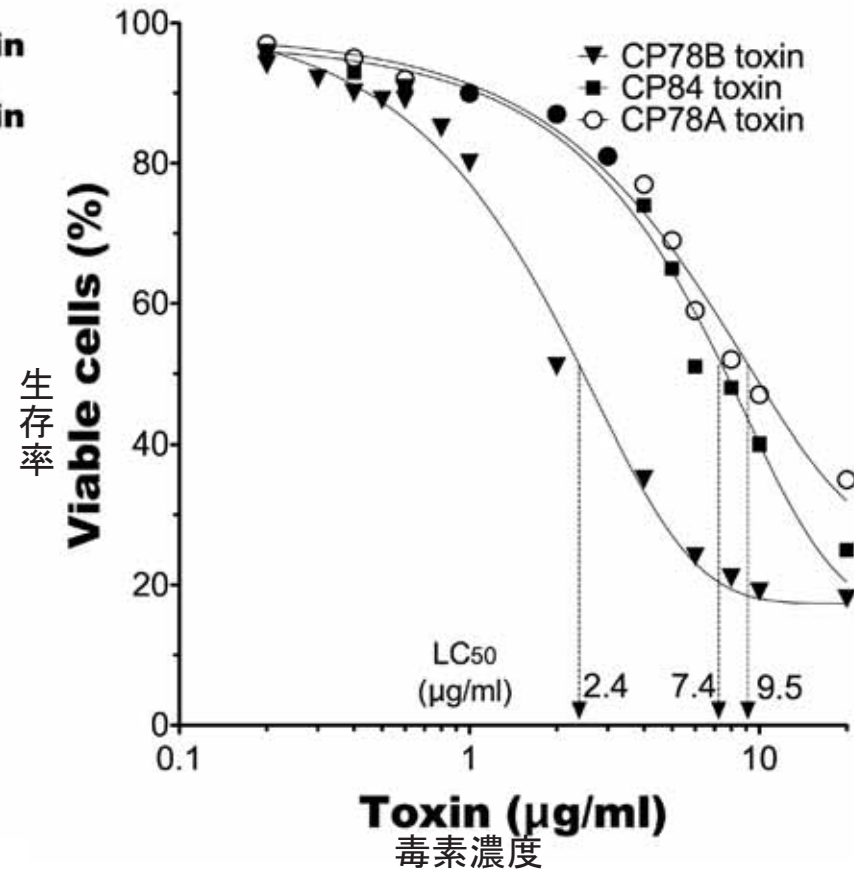
コントロール, 24 時間

# 相同のCP78AとBで活性が大きく異なる CP84は中間の活性

ヒト肝癌細胞 HepG2

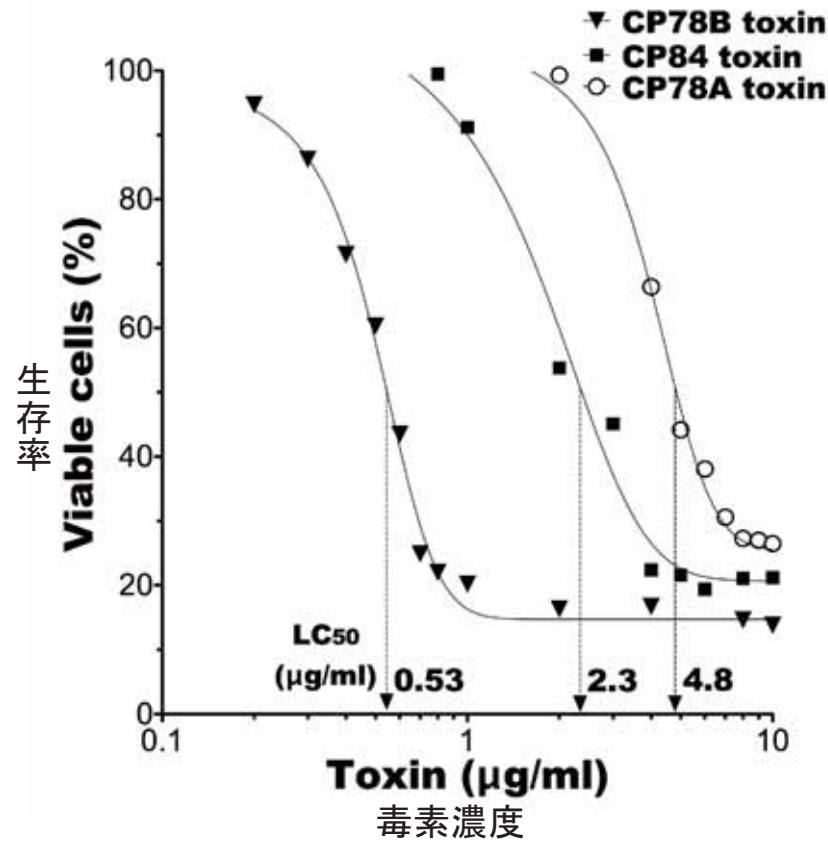


ヒト子宮頸部癌細胞 HeLa

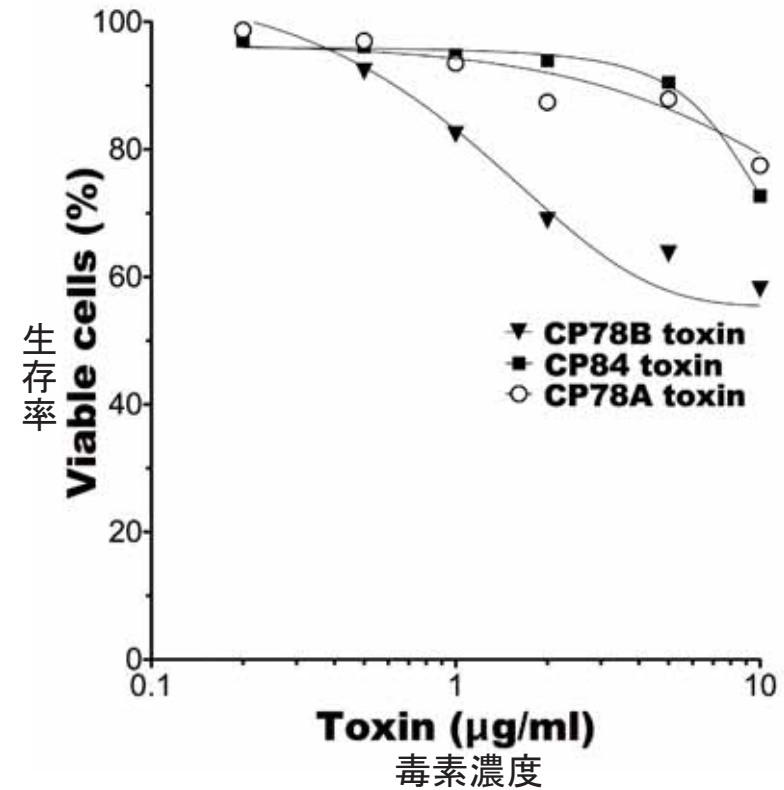


# ヒト胎児由来の正常肝細胞が、弱いながらも毒素に対して感受性を示した

肝癌細胞 HepG2



胎児正常肝細胞 HC





想定される用途と業界

肝臓癌の治療—医薬業界  
局所化学療法に  
用いる抗がん剤

---

癌の生物学における新知  
見の提供

## 従来技術との比較

ほぼ肝臓癌と子宮頸部癌のみに  
明確な障害活性を示し、  
他の細胞や正常な肝細胞への  
傷害は少ないと思われる。

免疫力の低下などの副作用を回  
避できることが期待される。

# 実用化に向けた課題

この蛋白質の癌細胞傷害活性は、限られた種類の株化癌細胞に対して得られたものである。

どのタイプの肝臓癌細胞へ効果があるのか、周囲の正常な肝細胞への影響は問題ないかなど医学的検証が必要

アレルギーの検証

# 知的財産権

- 出願番号 特願2007-294601
- 出願人 国立大学法人 広島大学
- 発明者 永松 康德

# お問い合わせ

- 広島大学産学連携センター  
産学連携部門 コーディネータ  
榎木 高男(かやき たかお)  
東広島市鏡山 3-10-31  
電話; 082-421-3704  
e-mail; [kayaki@hiroshima-u.ac.jp](mailto:kayaki@hiroshima-u.ac.jp)