

9. 海綿由来蛋白質毒を用いた新規核内デリバリー素子

酒井 隆一

北海道大学 大学院水産科学研究院 応用生命科学部門 生物有機化学研究室

Key words : AB 毒素, 海綿, ドラッグデリバリー, 逆行輸送, 核移行

緒 言

海洋生物は、生理活性物質の宝庫と呼ばれ、低分子化合物を中心に多様な化合物が報告されている。これらの多くは脂溶性の化合物で、細胞膜を透過し、細胞内の生体分子を標的として作用を発揮している。一方で、水溶性の成分は脂質二重膜を透過することができないため、細胞表面の受容体やイオンチャンネルに作用して生理作用を発揮するものが多い。本研究では、水溶性でありながら強い細胞毒性を持つ西表島産の *Spongosorites* 属海綿に含まれるタンパク質毒のソリテシジン (SOR) に着目して研究を行った。ソリテシジンは筆者が海綿等の底生生物に含まれる生理活性物質の探索研究で発見した化合物であるが、動物細胞に対して強力な細胞毒性を示すと同時に、マウスに対し遅効性ではあるが強力な致死作用を示した [1]。これらの毒性はパリトキシンやマイトトキシンを凌ぐジフテリア毒素に匹敵するものであった。しかしソリテシジンは微量タンパク質であり単離が非常に困難であったことからその詳細な構造や活性機序に関しては未解明であった [1]。一方これまでの研究でソリテシジンの配列解析から分子量 4 万の核酸分解酵素 (DNase-I) と分子量 7 万の C-末端残基から構成されることが示唆されている。DNase-I はエンドヌクレアーゼの一種で染色体遺伝子から一本鎖 DNA まであらゆる形態の DNA を分解することが知られている。もし DNA 分解がソリテシジンの強力な細胞毒性の機序であるならば、ソリテシジンは何らかの機構で細胞に侵入し、さらに核内に侵入、そこで DNA を切断することで細胞毒性を示すことが考えられた。巧妙な機構で細胞に侵入し、そのマシナリーを利用することで攻略する素子としてウイルスや細菌毒素、そして植物毒素のリシンが知られている。これらはすべて細胞内に侵入後、細胞内の物質輸送経路を巧みに利用して作用点まで到達し、毒性を発揮している。これまでに核内に到達する毒素として Cytolethal Distending Toxin (CDT) が見いだされている [2, 3]。CDT は A-C の 3 つのサブユニットから構成されるいわゆる AB 型毒素に分類される細菌毒素で大腸菌やカンピロバクター、ピロリ菌などの毒素として複数知られ、CDT ファミリーを形成している。B サブユニットはソリテシジン同様 DNase-I であり、その作用機序は細胞膜のコレステロールに富んだマイクロドメインに A ユニットが結合し、それに誘起されたエンドサイトーシスにより BC ユニットの複合体が細胞内に侵入、エンドゾームを脱出した B サブユニットが何らかの機構で核内に侵入することで DNA の切断が起こり細胞毒性を発揮するとされているが、B サブユニットが核内に移行するメカニズムは未解明である [2, 3]。ソリテシジンは DNase-I を活性ドメインに持つタンパク質毒としては CDT に次ぐものであるが、サブユニットを構成しておらず一本鎖のポリペプチドである点が CDT と大きく異なる。これらの背景から筆者はソリテシジンを細胞外部から核内に物質を送達するデリバリーシステムと捉え、ソリテシジンに倣うことで新規のドラッグデリバリーシステムが構築できるのではないかと考え、その構造、作用機序、最小活性構造等の基礎的知見を得ることを目的に研究を行った。

材料と方法

海綿試料は沖縄県西表島、恩納村、辺戸岬で採集した *Spongosorites* sp を用いた。それぞれの試料を水抽出し、タンパク質画分を得た。タンパク質の分離には SDS-PAGE を用い、大量分取は分取用 SDS-PAGE 装置を用いた。分取電

気泳動で得た変性ソリテシジンを抗原としてウサギに接種、抗血清をプロテイン A カラムにより精製し、抗ソリテシジンウサギ IgG を調製した。細胞内での挙動は FITC ラベル化ソリテシジンを用い、共焦点レーザー顕微鏡観察により光学的切片を作製し観察した。ソリテシジンの部分アミノ酸配列は、エドマン分解で得られた N-末端およびトリプシン消化後に分離したペプチド断片より得たアミノ酸配列を用いて c-DNA を鋳型に RACE により決定した。N-末端側の非翻訳領域の配列は c-DNA およびゲノム DNA を鋳型にインバース PCR 法により得た。全アミノ残基はゲノム DNA を鋳型として PCR により確認した。成熟タンパク質の配列解析は、分取電気泳動で得た変性ソリテシジンの *de novo* LC-MS/MS 分析を行うことで解析した。ソリテシジンの発現実験は推定アミノ酸配列をもとに大腸菌に最適化した DNA を合成し、それを用いて大腸菌発現系で行った。

結 果

1. 海綿の採集とソリテシジンの分布

ソリテシジンを含む海綿を探索するため西表島、沖縄本島においてダイビング調査を行い、*Spongosorites* 属海綿が西表以外にも恩納村および辺戸岬に生息することを確認した（図 1a～c）。それぞれの海綿の水抽出物について毒性試験を行ったところ西表産と恩納産海綿にのみ活性が確認されたが、辺戸岬産の海綿には活性がみられなかった。また抗ソリテシジン抗体を用いた Western blot においても西表と恩納のサンプルにはソリテシジンが確認できたが、辺戸岬産の海綿および別種海綿（ネガティブコントロール）には確認できなかった（図 1d）。

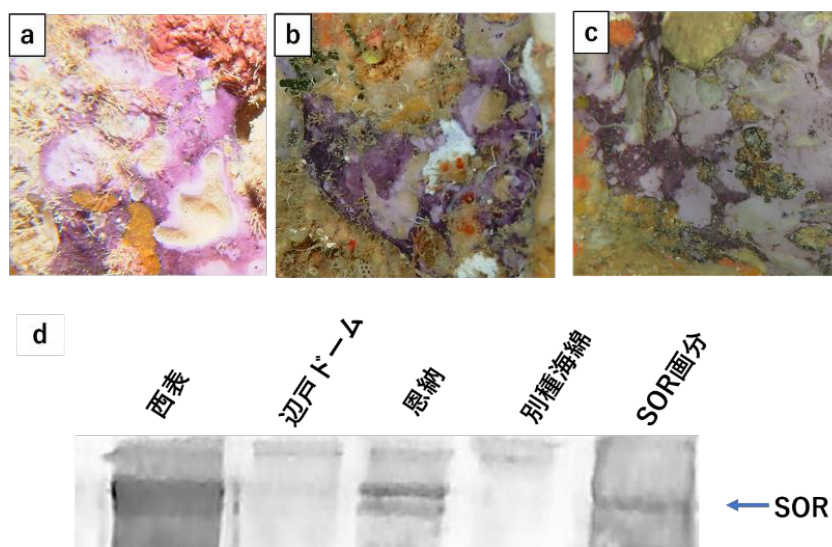


図1. Soritesidine (SOR) の分布

- a) 西表、b) 恩納、c) 辺戸岬（辺戸ドーム）で採集した試料の水中写真。
d) それぞれの試料水抽出物の抗SOR抗体によるウエスタンブロッティング。

2. ソリテシジンの全アミノ酸配列と修飾

これまでの研究で、3'RACE 法により得られた N-末端からポリ A 鎖までの遺伝子配列を解析し、ソリテシジンは成熟ペプチドで全 947 残基からなるタンパク質であることを推定しているが、N-末端側のシグナルペプチド領域・非翻訳領域の構造は不明であった。そこでこれを調べるためまず 5'RACE 法を試みたが遺伝子の増幅は認められなかった。そこで次に cDNA を鋳型にインバース PCR を試みたところ、非翻訳領域を含む 5' 側の遺伝子配列を得ることができた。そこで次に得られた 5' 側の非翻訳領域の遺伝子配列からプライマーを設計し cDNA およびゲノム DNA を鋳型に全長 PCR を行ったところ、両者から同一の遺伝子 (3,309bp) を取得することができた。この遺伝子に含まれるソリテ

シジンの配列は 3' RACE 法で推定されたものと完全に一致したことから、推定アミノ酸配列は確度の高いものと判断した。ソリテシジン遺伝子は劣 5' 側にヒスチジンから開始される 41 残基のペプチドに相当する翻訳領域を持っていたが、開始コドンとしてメチオニン (AUG) は確認できなかった。このことから前駆タンパク質として N-末端側に 41 アミノ酸からなるペプチドが付加した前駆体ソリテシジンがプロセッシングされて成熟ソリテシジンとなっている可能性が高い (図 2)。

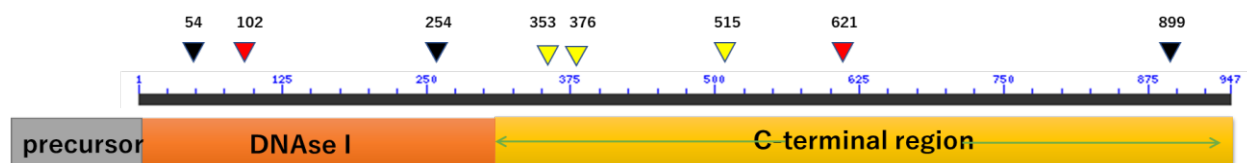


図 2. ソリテシジンのドメイン情報

DNA 配列から推定したソリテシジンの構造模式図。前駆体ペプチドには N-末端に 41 アミノ酸残基が付加 (灰色)。

成熟ペプチドの N-末端約 300 残基は DNase-I と相同性を示す (オレンジ)、C-末端側約 650 残基 (黄色) は機能既知のタンパク質に有意な相同性はない。Bar の数値は成熟ペプチドのアミノ酸残基番号。▽は N-型糖鎖のコンセンサス配列の位置。LC-MS による *de novo* 解析とコンセンサス配列が完全に一致: 赤、アスパラギン残基が一致: 黄、一致せず: 黒。

ソリテシジンは N-末端側約 310 残基に全生物に普遍的に存在する核酸分解酵素 DNase-I に相当するモチーフを、C-末端側に機能不明な 637 残基からなるモチーフを持つ単鎖ポリペプチドであった。BLAST 検索でソリテシジンの N-末端側配列にヒットした 38 種の既知タンパク質は、古細菌由来が 20 種と最も多く、バクテリア 9 種、硬骨魚類 8 種と続き、いずれも DNase-I にアノテーションされるタンパク質であった。一方、哺乳類、CDT の B ユニット、ウイルス等の DNase-I とは低い (13~15%) 相同性であった。ソリテシジンの C-末端側のアミノ酸配列に相同するタンパク質として α プロテオバクテリアのゲノム中に見いだされたタンパク質が 30% 程度の相同性を示したがその機能は不明である。

ソリテシジンは、N-末端側に 3 つ、C-末端側に 5 つの N 型糖鎖コンセンサス配列が存在していることから最大 8 か所の糖鎖修飾が存在すること、システイン残基が 10 個存在することからジスルフィド結合が最大 5 か所存在する可能性が示唆された。この配列から計算される成熟タンパク質の分子量は 103,911 であるが、MALDI-TOFMS で測定した実測分子量は 108,766 で 4,855 大きいことから、複数の糖鎖の存在が示唆された。そこで、ソリテシジンの配列確認と糖鎖修飾位置の推定を行う目的で LC-MS を用いたトリプシン消化物の *de novo* アミノ酸配列解析を行った。得られた配列断片を推定配列と比較解析した結果、約 78% の一致が確認された。N-型糖鎖のコンセンサス配列に着目すると、8 個のうち 102 および 621 残基目のコンセンサス配列が予測配列と完全に一致した。また、353、376、515 残基がアスパラギン残基のみ、もしくはそれを含む複数の残基が一致したが、54、254、899 残基は一致しなかった。MS/MS 解析において検出されたアスパラギン残基は無修飾であったと考えるのが妥当なので、糖鎖が結合しているとすれば後者の 3 残基と考えられる。

3. ソリテシジンの作用機序解析

配列解析の結果からソリテシジンは DNase-I タイプの酵素を活性ドメインに持つ AB 毒素であると推測された。AB 型毒素は酵素からなる活性ドメイン (A ドメイン) や細胞表面への結合ドメイン (B ドメイン) からなるタンパク質の総称であり、多くの細菌毒素 (CDT、コレラ毒素、ジフテリア毒素) や植物毒素リシン等広く知られている。これらの毒素が細胞に侵入するためにはまず細胞表面の受容体に B ドメインが結合する必要があるため、ソリテシジンの受容体が何であるかを調べることにした。まずソリテシジンと同様に、核を標的オルガネラとしている CDT は、カベオラ等のコレステロールに富む細胞膜のマイクロドメインに結合することが知られているので、細胞膜のコレステロールをメチルシクロデキストリンで除去しソリテシジンの毒性への影響を調べたが、毒性の低下は見られなかった。次に、抗菌性ペプチドや溶血性のタンパク質毒素が標的としている生体膜、リシンの受容体である糖鎖への結合の可能性を

考慮し、細胞膜構成脂質、各種単糖、レクチンによるソリテシジンの活性への影響を調べたが、いずれも阻害作用を示さなかった。これらの結果からソリテシジンの受容体は細胞表面の何らかのタンパク質である可能性が高いと考え、細胞をトリプシン処理後にソリテシジンを作用させたが、ソリテシジンの細胞毒性に変化はなかった。

次に、ソリテシジンの細胞内における局在性を検討した。まずソリテシジンを FITC ラベル化し、得られたラベル化タンパク質 (FITC-SOR) を HeLa 細胞に添加、4 時間インキュベート後、30 分、1 時間、12 時間、16 時間後に細胞を固定し、それぞれ共焦点レーザー顕微鏡観察を行った (図 3a~d)。その結果ソリテシジンは投与直後に細胞表面に局在し、4 時間程度で細胞内に移行し始め、さらに 12 時間で核内に移行、16 時間後には完全に核内に局在していることが観察された。この結果はソリテシジンがエンドサイトーシスのように比較的早いプロセスで細胞内に移行し、ゆっくりとしたプロセスで核に移行することを示すものである。そこで、細胞をエンドサイトーシスが停止する低温下 (12°C) で処理後 FITC-SOR を添加、その挙動を観察した。その結果、ソリテシジンの細胞内移行は認められなかったことからソリテシジンはエンドサイトーシスで細胞内に移行していることが明らかとなった。エンドサイトーシスはエネルギー依存的に起こる細胞の物質取り込み機構である [4]。その機構はさまざまであるが、代表的なものにクラスリン依存的エンドサイトーシスがある [4]。そこでその阻害剤である PitStop を用いてソリテシジンの毒性を調べたところ阻害がみられなかった。また、クラスリン依存的経路やそれ以外の経路でエンドサイトーシスにかかわる重要なタンパク質にダイナミンがある。ダイナミンはエンドサイトーシスの細胞内に陥入した膜を切断する。ダイナミンの阻害剤である MitMAB および OctMAB を添加し FITC-SOR の挙動を調べたところ阻害剤存在下では細胞内への蛍光移行が認められなかった (図 3e、f)。この結果はソリテシジンの細胞移行がダイナミン依存性であることを支持した。

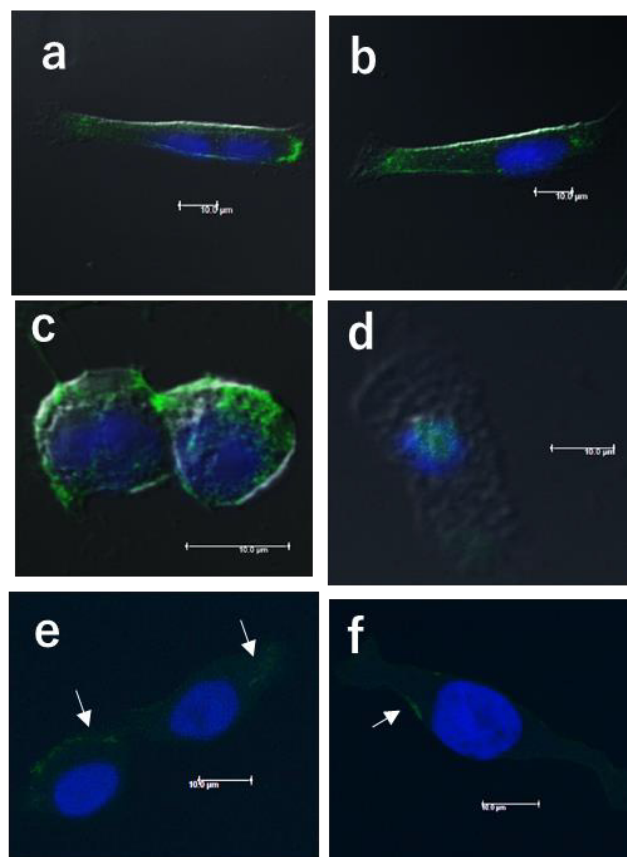


図 3. HeLa 細胞における FITC ラベル化ソリテシジンの経時的細胞内移行

投与後 30 (a)、60 分 (b)、12 (c)、16 時間 (d) 経過後共焦点レーザー顕微鏡で観察結果。
ソリテシジン (緑色蛍光) および核 (青色蛍光)。ダイナミン阻害剤 MitMAB (e) および OctMAB
(f) 投与後 15 分での観察。矢印は細胞表面にとどまった FITC 蛍光。Bars は 10 μ m。

ソリテシジンの細胞内逆行輸送経路についてさらに詳しく調べるため、各種阻害剤を用いて阻害剤がソリテシジンの毒性を阻害するかを調べた。クラスリン非依存性でかつダイナミン依存性のエンドサイトーシスにはマクロピノサイトーシスと ARF6 依存性エンドサイトーシスが知られている [4]。そこでそれぞれの阻害剤である wortmannin および NAV2729 を添加後ソリテシジンの活性を調べたところ NAV2729 はソリテシジンの毒性を有意に阻害したが wortmannin には阻害がみられなかった。またエンドゾーム成熟を阻害する EGA、ゴルジ体から小胞への物質輸送を阻害する BFA に有意な阻害が確認されたが、核内輸送を仲介するインポーチンの阻害剤 importazole、エンドゾームからゴルジ体への直接的な輸送を阻害する Retro2 に活性は見られなかった (図 4)。

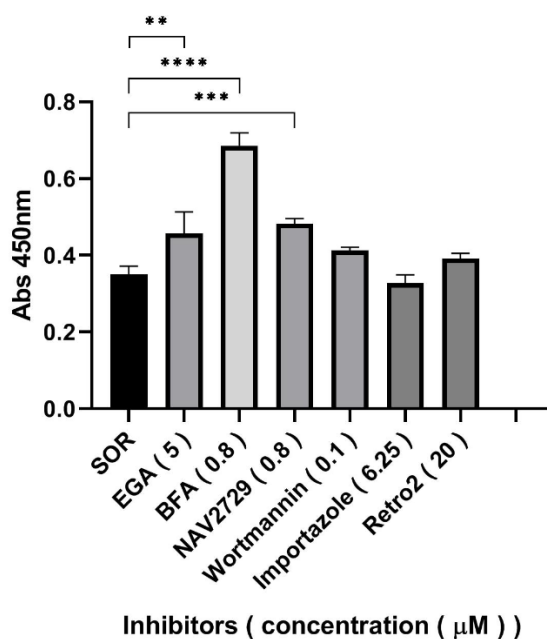


図 4. 各種阻害剤によるソリテシジンの毒性阻害

Dunnett's test, **P<0.01, ***P<0.005, ****P<0.001。

4. ソリテシジン全配列および変異体のポリペプチドの発現

まず、ソリテシジンの推定アミノ酸配列をコードする DNA を大腸菌発現系において発現させ全長ソリテシジンを得た。リコンビナント体は不溶性の封入体として得られたので、リフォールディングを行い可溶化した。得られた発現タンパク質 (r-SOR) の毒性をブラインシュリンプ、培養細胞両方で調べたがいずれも活性を示さなかった。次に、N-末端残基が単独で DNA 切断活性を持つか調べるため、大腸菌を用いて 1~310 アミノ酸残基の発現を行った。

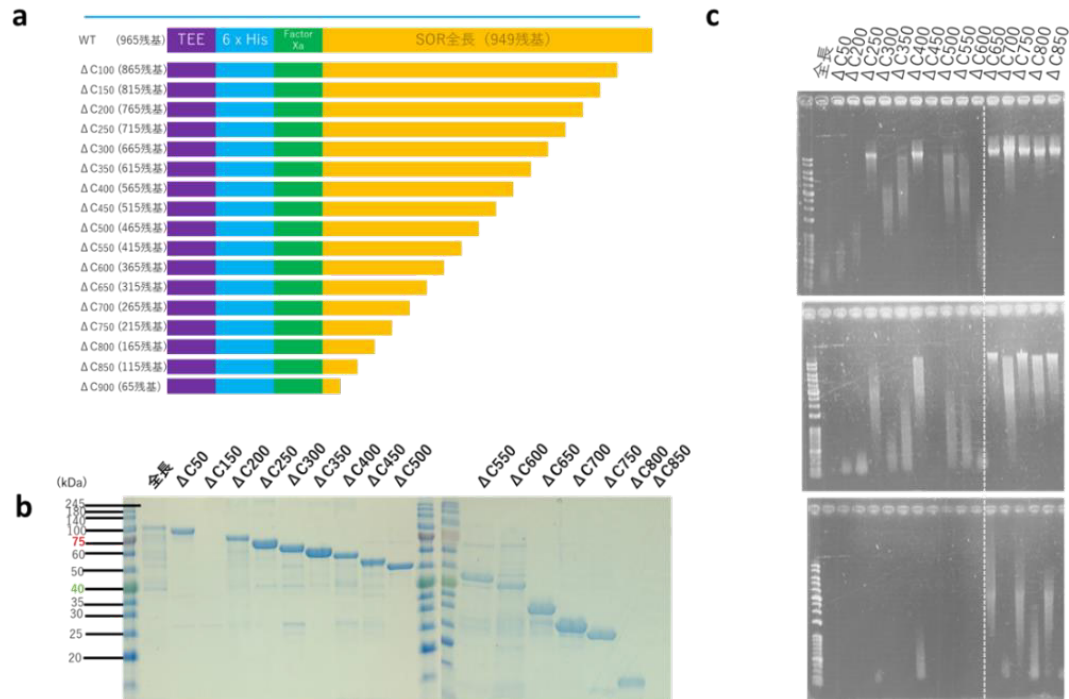


図 5. 発現トランケートソリテシジン

- SOR およびそのトランケート体発現遺伝子デザイン。N-末端側に発現促進配列 (TEE)、HisTag、Factor X 切断部位を導入した。
- 発現体のリフォールディング後可溶化画分の SDS-PAGE (12%グラジエントゲル)。
- それぞれのトランケート体による DNA 切断。上からインキュベート後 30 分、2、18 時間。

得られたタンパク質 (rN-SOR) は単独でも DNase 活性を示した。しかし、rN-SOR は高濃度においても細胞毒性を示さなかったことから、単独では細胞内もしくは核内に移行することができず活性を示さなかったものと考えられる。そこで、ソリテシジンの細胞内移行は C-末端側に依存していると仮定し、ソリテシジンを構成するアミノ酸 947 残基の C-末端側を 50 残基ずつ欠損させた遺伝子セットを作製し、それぞれを大腸菌で発現した (図 5a)。すべての発現タンパク質は封入体として得られたので、それぞれリフォールディングし、可溶化タンパク質を回収し (図 5b)、*in vitro* での DNase 活性を調べた。その結果、Δ150 を除く 15 種のタンパク質が得られ、Δ600 (N-末端 365 残基) 以上のタンパク質には 18 時間以内に DNA をほぼ完全に消化する活性が認められたが、それよりも短い変異体は (Δ650～850) 活性が失われていた (図 5c)。これらのタンパク質はいずれも細胞毒性を示さなかった。

考 察

海綿より見出された毒素ソリテシジンは、947 残基からなる単一ポリペプチドであり、その遺伝子はイントロンを持たず、ポリ A 鎖を持つ、また開始コドンを持たないという非常にユニークな特徴を持っていた。前駆体ソリテシジンは N-末端側にヒスチジンから始まる 41 残基のペプチドを有していたがその配列から特定のシグナルペプチドとしての機能は予測できなかった。ソリテシジンの N-末端側約 310 残基は DNase-I との相同性を示したが、C-末端側の 637 残基については機能を示唆する相同タンパク質はなく、既存の情報から機能や構造を予測することは困難であった。天然から得られたソリテシジンと今回推定したアミノ酸配列から予測されるタンパク質には約 4,800 程度の分子量差がみられた。ソリテシジンには N-型糖鎖コンセンサス配列が複数存在するため、糖修飾を受けている可能性が示唆されたが、糖鎖分解酵素に処理、レクチン結合性実験から糖鎖の存在を明確にすることはできなかった。今回実施した LC-

MS/MS による配列解析で 47% 程度の推定配列がペプチド断片の配列と一致したが、一致しない配列も多く、使用する酵素や LC-MS/MS の条件をさらに検討し構造解析を行うことで、糖鎖を含む翻訳後修飾やジスルフィド結合に関する構造情報を得る必要がある。

ソリテシジンはバクテリアの毒素 CDT に次ぐ核内移行毒素であり、その強力な毒性から効率的に細胞内に侵入、さらには核内に到達する機能を持つと考えられる。ソリテシジンは CDT と異なりサブユニットを持たない単一ポリペプチドであり、DNase を活性ドメインとする点を除けば、構造的に CDT と大きく異なる。ソリテシジンはその配列から示唆されたように DNA 分解活性を持つことから、何らかの機構で細胞内に侵入し、核まで到達する必要がある。今回、ソリテシジンの細胞侵入はクラスリン非依存的・ダイナミン依存的であることが示唆された。このような経路としてマクロピノサイトーシスと ARF6 依存的エンドサイトーシスが知られているが、前者を阻害する wortmannin にソリテシジンの毒性阻害がみられなかったこと、ARF6 依存経路を阻害する NAV2729 に有意な阻害がみられたことからソリテシジンは ARF6 依存的エンドサイトーシスを経て細胞に侵入していることが示唆された。しかし今回の研究でその前段階の細胞表面の受容物質の同定には至らなかった。またエンドゾーム成熟を阻害する EGA、ゴルジ体から小胞への物質輸送を阻害する BFA に有意な阻害が確認されたことから、ソリテシジンは細胞内にエンドサイトーシスで侵入後、エンドゾームの成熟を経て、エンドゾーム脱離し、ゴルジ体に侵入、逆行輸送されたのち COPI 複合体を経て小胞に移行することが示唆された [5]。通常タンパク質が核内に移行する際には核膜孔透過を補助するタンパク質であるインポーチンが核移行シグナル配列と結合する。ソリテシジンには核移行シグナル配列がないこと、さらにインポーチン阻害剤の影響を受けなかったことから [6]、これまでになく機構で核内に侵入している可能性が示唆された。

このような特異な核移行能を持つソリテシジンはドラッグデリバリーシステムとして大変興味深い。今回、発現実験によりソリテシジンの DNase 活性の最小構造は N-末端側 300 残基程度であることが分かった。しかし、全長を含む各リコンビナントタンパク質すべてが DNase 活性の有無にかかわらず細胞毒性を示さなかったことから、発現タンパク質には細胞内もしくは核内に移行する能力が弱い、もしくはないものと考えられる。天然ソリテシジンは配列情報と分子量の隔たりがあることから糖鎖を含む何らかの翻訳後修飾が考えられるが、現時点でその詳細は不明で、今後さらに詳細な天然ソリテシジンの構造解析を進めてゆく予定である。

ソリテシジンは海洋生物から見出された最初の AB 型毒素で、その生合成や起源に興味を持たれる。海綿は細胞内にバクテリアを共生させていることが知られており、多くの海綿由来の生理活性物質がバクテリアの産物であることが知られている。今回、採集地の異なる *Spongosorites* 海綿の分析から、同種の海綿でもソリテシジン産生型と非産生型が存在することが示されたことから、ソリテシジンは海綿の産物ではなく海綿中に存在する微生物により生産されている可能性が示唆された。しかし、ポリ A 鎖を持つソリテシジンの遺伝子構造から、バクテリアの産物である可能性は低い。今後、ソリテシジンの真の産生生物を調べるためにソリテシジン産生型と非産生型海綿の詳細な比較を行う。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命科学研究科構造生物学研究室の田中良和教授である。

文 献

- 1) Sakai R, Tanano K, Ono T, Kitano M, Iida Y, Nakano K, Jimbo M. Soritesidine, a Novel Proteinous Toxin from the Okinawan Marine Sponge *Spongosorites* sp. Mar Drugs. 2019 Apr 8;17(4):216. doi: 10.3390/md17040216. PMID: 30965587; PMCID: PMC6520796.
- 2) Pons BJ, Vignard J, Mirey G. Cytolethal Distending Toxin Subunit B: A Review of Structure-Function Relationship. Toxins (Basel). 2019 Oct 12;11(10):595. doi: 10.3390/toxins11100595. PMID: 31614800; PMCID: PMC6832162.

- 3) Thelestam M, Frisan T. Cytolethal distending toxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:111-33. doi: 10.1007/s10254-004-0030-8. Epub 2004 Aug 27. PMID: 15338430.
- 4) Harper CB, Popoff MR, McCluskey A, Robinson PJ, Meunier FA. Targeting membrane trafficking in infection prophylaxis: dynamin inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2013 Feb;23(2):90-101. doi: 10.1016/j.tcb.2012.10.007. Epub 2012 Nov 17. PMID: 23164733.
- 5) Orci L, Perrelet A, Ravazzola M, Wieland FT, Schekman R, Rothman JE. "BFA bodies": a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):11089-93. doi: 10.1073/pnas.90.23.11089. PMID: 8248213; PMCID: PMC47927.
- 6) Soderholm JF, Bird SL, Kalab P, Sampathkumar Y, Hasegawa K, Uehara-Bingen M, Weis K, Heald R. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β . *ACS Chem Biol.* 2011 Jul 15;6(7):700-8. doi: 10.1021/cb2000296. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21469738; PMCID: PMC3137676.