

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

【目的】 西表島に生息する *Spongosorites* 属海綿はジフテリア毒素といった細菌毒素に匹敵する強力なタンパク毒ソリテシジン (SOR) を含んでいる。ソリテシジンは細胞内に侵入し、核に移行することで DNA を分解し毒性を示すことが示唆されていたが詳細は不明であった。ソリテシジンの核内移行メカニズムを知ることができれば、ソリテシジンもしくはその最小機能構造 (mSOR) をドラッグデリバリーシステムとして利用することができる。そこで本研究では、まずソリテシジンを海綿より抽出しその構造、作用機構を解明するとともに、発現タンパク質を調製し、核内に移行する単位構造を見出すことを目指した。

【方法】 海綿は沖縄県にて採集した。ソリテシジンは硫酸沈殿、イオン交換カラム、ゲルろ過カラム、分取電気泳動で分離するとともに、変性 SOR をウサギに接種し抗体を作製した。ソリテシジンのアミノ酸配列はエドマン分解および LC-MS/MS による *de novo* ペプチドマッピングにより解析した。海綿から抽出した mRNA およびゲノム DNA を用い遺伝子を取得した。ソリテシジンの細胞内での挙動はソリテシジンを FITC ラベル化し共焦点レーザー顕微鏡で調べた。作用機構の解明にはエンドサイトーシスおよび逆行輸送阻害剤を用いて、ソリテシジンの毒性を軽減するかどうかを指標に調べた。ソリテシジンの縮小変異体 (mSOR) は前 947 アミノ酸残基の C-末端側から 50 残基ずつ削除し、大腸菌で発現し用いた。

【結果】 ソリテシジンは N-末端側に 310 残基程度の DNase-I および C-末端側に 650 残基程度の機能未知配列、計 947 残基からなる新規の一本鎖ペプチドで、細胞に侵入し核内に移行する能力を持つ毒素であることを立証した。各種阻害剤を用いて細胞内移行経路を検討したところ、ソリテシジンはエンドサイトーシスにより細胞に侵入、エンドゾーム成熟後に脱出、ゴルジ体を逆行して小胞に移動すること、また独自の機構で核内に侵入していることが示唆された。次に、細胞侵入から核内移行までの過程に必要な最小構造単位 (mSOR) を探索するために C-末端側からアミノ酸 50 残基ずつ削除したソリテシジン変異体計 15 種を作製し、DNA 分解活性と細胞毒性を調べたところ、C-末端側 650 残基以上を削除した tN-SOR の DNA 分解活性が大きく損なわれたことから、配列解析で予想したように N-末端側 300 残基程度が DNase 活性を持つことが立証された。しかし、全長発現体を含むどの変異体にも細胞毒性は見られず、発現タンパク質では膜透過能が失われたと考えられる。この結果から、ソリテシジンにおいて：1. N-末端側約 300 残基は DNase として機能する最小単位であるが、2. N-末端の DNase 単独では細胞 (核内) 侵入できないことがわかった。これらの結果より、天然のソリテシジンの活性を再現するためには糖鎖を含む翻訳後修飾、ジスルフィド結合などタンパク質の構造の精密な再構築が送達体の開発には必須である可能性が高い。今後は天然ソリテシジンの物性と機能を再現するためにさらに詳細な構造解析を進めてゆく。

SOR と発現変異体

