217. 超活性天然物「マイトトキシン」の作用標的分子探索

此木　敬一

*東北大学 大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻
天然物生物機能科学講座 天然物生命化学分野

Key words：マイトトキシン，CRISPR スクリーニング，細胞毒性，作用機序

緒　言

マイトトキシン（Maitotoxin：MTX）（図 1）は渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の培養抽出物から単離され［1］、1996 年、絶対立体配置を含めた全立体構造が決定された。1982 年に電位依存性 Ca^{2+}チャネルの活性化作用が公表されてから［2］、リポソームを除く各種細胞や組織に対して顕著な Ca^{2+}流入をもたらし、これを契機に細胞生理を破綻させることが明らかにされた［3］。MTX は破傷風毒素やボツリヌス毒素と並び、天然毒として最高級の急性致死毒性（マウス）を示すが、Ca^{2+}流入の経路は同定されていない。現在までに 240 報（Web of Science、タイトル検索）が公表されているが、近年、作用機序の本質に迫る報告はなく、未解決生命現象となっている。

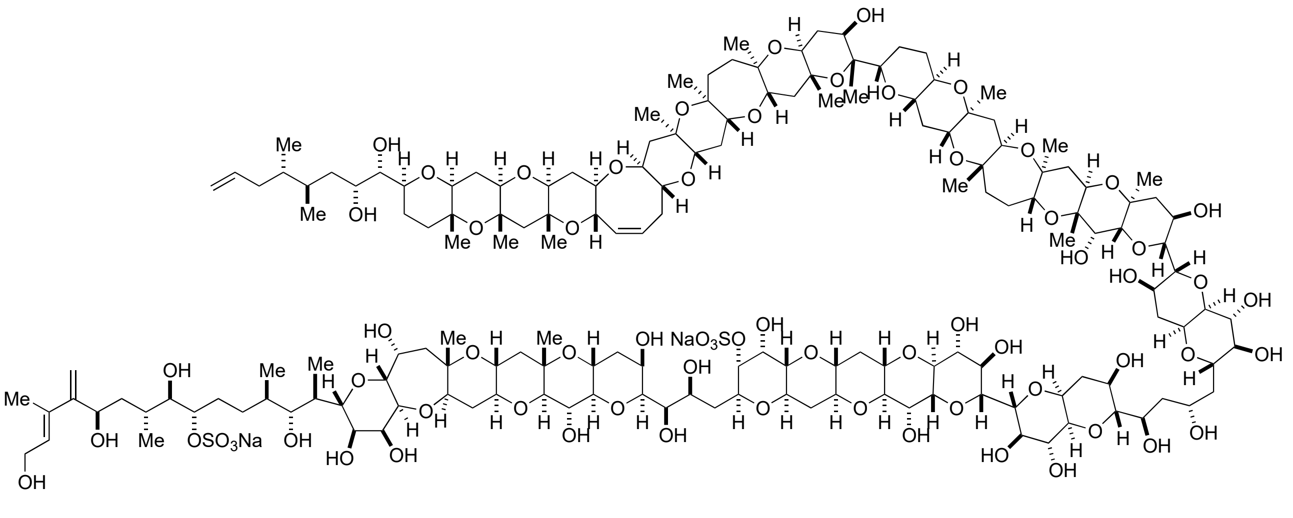

図 1. マイトトキシン（Maitotoxin：MTX）

研究代表者は大阪大学大学院理学研究科の村田道雄教授と共に、培養細胞に対する MTX の $^{45}Ca^{2+}$流入作用を観測し、リン脂質やガングリオシド等の脂質が阻害剤となること、赤血球ゴーストに対して MTX が $^{45}Ca^{2+}$を流入させることを明らかにした［4］。MTX をケミカルプローブへ誘導して行った光親和性標識実験では、特定の分子標的を同定するに至らなかったことから、分子標的が複数存在するか、または脂質であると推察した［5］。我々は一細胞中の全遺伝子を対象とする網羅的な戦略を模索し、2018 年、CRISPR スクリーニングを行った。本研究は、CRISPR スクリーニングの結果検証を行うことを目的とした。

*現在の所属：東北大学 大学院農学研究科 農芸化学専攻 食品天然物化学講座 天然物生命化学分野

方　法

1. CBB法によるMTXの膜透過性亢進作用の観察

各種脂質のクロロホルム溶液を減圧濃縮した後、真空ポンプで十分に乾燥した。適切な緩衝液で水和、ボルテクシングにより剥離させ、脂質懸濁液を得た。ガラスキャピラリーに収めた脂質懸濁液をヘキサデカン中に押し出すことにより脂質単層膜（Bubble）を形成させた。別々に作製した2つのBubbleを左右から接触させ、中央に脂質二重膜（Contact Bubble Bilayer：CBB）を形成させた。2つのガラスキャピラリーの各々に予め挿入しておいた電極間の電圧を制御し、CBBを透過する電流を計測した。

2. ライブセルイメージング

細胞膜（PlasMem Bright Red、同仁）、微小管（Tubulin Tracker Deep Red、Thermo Fischer Scientific）、アクチン（Actin Tracker Deep Red、Thermo Fischer Scientific）、核（Hoechst 33342、Thermo Fischer Scientific）を染色する蛍光試薬、Ca^{2+}濃度をモニターする蛍光試薬（Fluo3-AM、同仁）を予め添加した培養細胞CHO-K1に対してMTXを投与し、10分毎に合計1時間撮影した。また、Ca^{2+}存在下、Ca^{2+}非存在下の各条件を適用した他、MTXの代わりに抗生物質であるAmphotericin B、界面活性剤であるTriton X-100を同細胞に添加し、比較した。撮影には共焦点レーザー顕微鏡FV1000（オリンパス）、または東北大学学加齢医学研究所共通機器室に設置されているCelldiscoverer 7（Zeiss）、共焦点レーザー顕微鏡TSC SP8（Leica）を用いた。

3. 単一遺伝子ノックダウン株、単一遺伝子欠損株に対するMTXの細胞毒性

Hela細胞に対して16種類のsiRNA（旧Dharmacon、現Horizon Discovery）をトランスフェクションした。インキュベート後、野生株とともに収穫し、96穴マイクプレートに播種した。MTXを添加してインキュベート後、WST8を添加し、細胞生存率を調べた。

CRISPRスクリーニングの結果から、MTXの細胞毒性を減弱することが推測された1つの遺伝子について単一遺伝子欠損株を作製し、MTXの細胞毒性を増強または減弱することが推測された6つの遺伝子について単一遺伝子欠損株を購入した（Horizon Discovery）。100,000細胞／mLの野生株ならびに単一遺伝子欠損株を96穴マイクロプレートに播種し（100 μL）、翌日、MTXを添加した。インキュベート後、WST8を添加し、細胞生存率を調べた。

結果と考察

1. CBB法によるMTXの膜透過性亢進作用の観察

脂質懸濁液中にGramicidin Aを添加しCBBを形成させたところ、シングルイオンチャネルが観測されたため、観測系の確立を確認した。次に脂質懸濁液中にMTXを添加しCBBを形成させたが、MTXによる膜透過性亢進作用は観測されなかった。MTXはOH（ヒドロキシ）基を余り含まない疎水性領域（図1に示した構造で上部領域）とヒドロキシ基を豊富に含む親水性領域（図1に示した構造で下部領域）を持ち合わせる両親媒性分子であるため、生体膜、保管や実験に用いるガラスや樹脂製の器具に対して高吸着性を示す。また、脂質単層膜を貫く大きさを有するMTXの安定性が懸念されたこともあり、手法の改変が求められた。そこでCBB形成後、DMSOに溶解した微量のMTXを添加する手法を適用したが、実施は極めて困難であった。

MTXの膜透過性亢進作用を観察するため、直径10～30 μmのGigantic Unilamellar Vesicles（GUV：リポソーム）、または直径200 nmのLarge Unilamellar Vesicles（LUV：リポソーム）を調製した。$^{45}Ca^{2+}$や内封したCa^{2+}感受性蛍光色素Fluo 3（同仁）を用いてCa^{2+}流入作用を調べたが、MTXによるCa^{2+}流入は観測されなかった。

2. ライブセルイメージング

マウスに対する急性毒性が発現される時間軸で細胞毒性が発現していることを予想し、ライブセルイメージングを行った。その結果、MTXが細胞外Ca^{2+}濃度に依存して、細胞膜の一部を水疱状に膨らませること（Blebbing）を明らかにしたが、既に他研究者により報告済みであることも判明した。BlebbingがMTXに特異的であるかどうか調べるため、脂質膜に結合する薬剤を用いて調べた結果、Amphotericin BやTriton X-100もBlebbingもBlebbingをもた

らすこと、但し、Blebbing を誘引する濃度は MTX において極めて低いこと、さらに、Blebbing は細胞質内の Ca^{2+}濃度の増加、微小管の崩壊に続いて生じる形態変化であることを明らかにした（図 2)。これらの結果から、MTX は細胞膜中の局所構造を認識すると推測された。細胞質内の Ca^{2+}濃度の上昇が微小管の脱重合をもたらすことは必然であるが、微小管同様、細胞骨格形成に必須であるアクチン繊維の動態に興味が持たれた。しかし、Actin Tracker Deep Red は生細胞内でアクチンを染色できなかった。同試薬はグルタールアルデヒドで固定した細胞内でアクチンを染色できたため、同試薬が膜透過性に乏しく、ライブセルイメージングに不適切であると考えられた。そこで、アクチンに結合性蛍光タンパク質（CoralHue™ beta-Actin-targeted monomeric Azami-Green 1、理化学研究所バイオリソースセンター）の遺伝子をトランスフェクションしたが、アクチン繊維特有の形態が観察されなかった。現在、ライブセルイメージングに適した試薬を模索している。

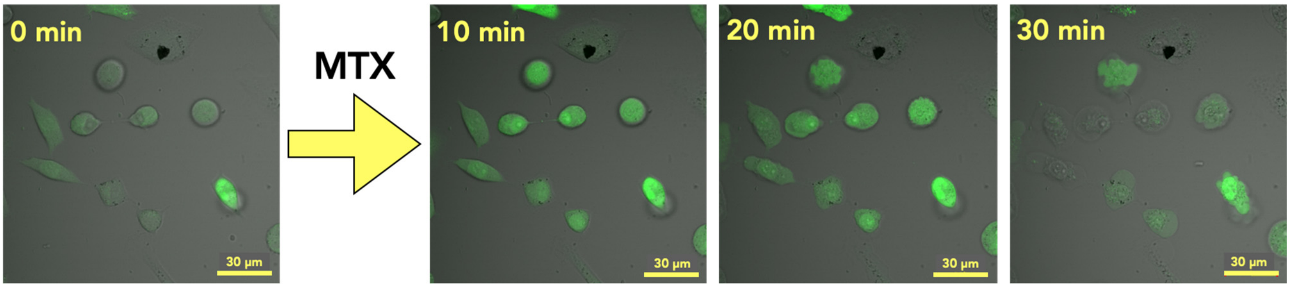

図 2. MTX（0.5 nM）を添加した CHO-K1 細胞（10,000 細胞／100 μ L）
添加前（0 min）、添加後（10、20、30 min）、明視野と暗視野（励起：508 nm／蛍光：527 nm）で撮影した画像を重ね合わせた。暗視野では細胞内 Ca^{2+}濃度変化をモニターするために添加した Fluo 3 に由来する蛍光を撮影した。

3. 単一遺伝子ノックダウン株、単一遺伝子欠損株に対する MTX の細胞毒性

siRNA をトランスフェクションした Hela 細胞と野生株に対する MTX の細胞毒性に顕著な差異は観測されなかった。いくつかの遺伝子についてはリアルタイム PCR を行い、ノックダウンを確認した。siRNA によるノックダウンを行ってもわずかに残る遺伝子の存在が MTX の細胞毒性に及ぼす影響を考慮し、7 つの遺伝子に絞りノックアウト株を調達した。その結果、2 つの単一遺伝子欠損株が CRISPR スクリーニングの結果を担保した。内訳は MTX の細胞毒性を増強した遺伝子および減弱した遺伝子、それぞれ 1 つずつであった。

単一遺伝子ノックダウン株、5 つの単一遺伝子欠損株に対して想定した結果が得られなかった根拠は不明である。今後、2 つの単一遺伝子欠損株に対して想定した結果が得られた根拠を追求し、MTX の細胞毒性、ひいては MTX による Ca^{2+}流入の分子機構を明らかにしたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院理学研究院生体分析化学研究室の松森信明教授、理化学研究所環境資源科学研究センターケミカルゲノミクス研究グループの松本健博士でした。松森信明教授には各種脂質を構成成分とするリポソーム（Gigantic Unilamellar Vesicles）のイメージングを行って頂き、松本博士には siRNA を用いたノックダウン解析、単一遺伝子欠損細胞株の作製および毒性試験を行って頂きました。この場を借りて深謝致します。

理化学研究所バイオリソースセンターより、CoralHue™ beta-Actin-targeted monomeric Azami-Green 1 を発現させるプラスミドを譲渡して頂きました。また、ライブセルイメージングには東北大学加齢医学研究所共通機器室に設置されている Celldiscoverer 7（Zeiss）、共焦点レーザー顕微鏡 TSC SP8（Leica）を利用させて頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

本研究に先立って行われた CRISPR スクリーニングを行って頂きましたトロント大学ドネリーセンターCharles Boone 博士（理化学研究所環境資源科学研究センター分子リガンド標的研究チームリーダーを兼任）、Jason Moffat 博士、酵母に対する毒性試験を行って頂きました理化学研究所環境資源科学研究センターケミカルゲノミクス研究グループの八代田陽子博士に御礼申し上げます。また、本研究の推進にあたり貴重なご助言賜りました東北大学大学院農学研究科天然物生物化学分野の山下まり教授、長由扶子助教、工藤雄大特任助教、各種実験を行った山田智士氏、角替俊輔氏、後藤萌香氏、吉尾柊太郎氏、田端滉樹氏に御礼申し上げます。

文　献

1) Yokoyama A, Murata M, Oshima Y, Iwashita T, Yasumoto T. Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate. J. Biochem. 1988 Aug;104(2):184-7. PMID: 3182760 DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122438.

2) Takahashi M, Ohizumi Y, Yasumoto T. Maitotoxin, a Ca^{2+} channel activator candidate. J. Biol. Chem. 1982 Jul 10;257(13):7287-89. PMID: 6282837

3) Gusovsky, F. and Daly, J. W. Maitotoxin: a unique pharmacological tool for research on calcium-dependent mechanisms. Biochem Pharmacol. 1990 Jun 1;39(11):1633-9. PMID: 1971510 DOI: 10.1016/0006-2952(90)90105-t.

4) Konoki K, Hashimoto M., Murata M, Tachibana K. Maitotoxin-induced calcium influx in erythrocyte ghosts and rat glioma C6 cells, and blockade by gangliosides and other membrane lipids. Chem. Res. Toxicol. 1999 Oct;12(10):993-1001. PMID: 10525277 DOI: 10.1021/tx990014m

5) Konoki K, Hashimoto M, Honda K, Tachibana K, Tamate R, Hasegawa F, Oishi T, Murata M. Maitotoxin-photoactive probe binds to membrane proteins in blood cells. Heterocycles. 2008 Dec 12;79(1): 1007 – 1017 DOI: 10.3987/COM-08-S(D)78