

**【目的】**マイトトキシン (Maitotoxin : MTX) (下図) は渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の培養抽出物から単離され、1996 年、絶対立体化学を含めた全立体構造が決定された梯子状ポリエテルである。1982 年、薬理に関する初めての研究成果が公表されて以来 40 年が経過したが、極低濃度で各種培養細胞に対して  $\text{Ca}^{2+}$  流入をもたらし、天然毒として最高級の急性致死毒性 (マウス) を示す作用機序は不明のままである。2018 年、我々は一細胞中の全遺伝子を標的とする CRISPR スクリーニングを行い、MTX の細胞毒性を増強、または減弱させる遺伝子を同定した。本研究では CRISPR スクリーニングの結果検証を目的とした。

**【方法】**1. 電気生理学的手法の一つである (Contact Bubble Bilayer : CBB) 法を適用し、特定の脂質に対する MTX の作用を調べた。2. 細胞膜、微小管、アクチン、核を染色する各種蛍光試薬、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度をモニターする蛍光試薬を予め添加した培養細胞 CHO-K1 に対して MTX を添加し、ライブセルイメージングを行った。3. siRNA を用いて単一遺伝子のノックダウンを試み、MTX に対する感受性を野生株と比較した。4. HAP1 細胞 (野生株)、ならびにその単一遺伝子欠損細胞株に対する MTX の細胞毒性を調べ、欠損遺伝子の影響を調べた。

**【結果】**1. 福井大学の老木成稔先生、岩本真幸先生にご指導賜り CBB 法を習得した。CBB を構成する脂質に予め MTX を混合した場合、膜透過性亢進は観測されなかった。CBB 形成後、MTX を添加する戦略を試みたが、極めて困難であり実現できなかった。戦略を切り替え、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素である Fluo 3 を用いたが、MTX はリボソームに対して  $\text{Ca}^{2+}$  流入を起こさなかった。2. MTX は CHO-K1 細胞膜の Blebbing を伴う急性細胞毒性を示すこと、Blebbing が  $\text{Ca}^{2+}$  流入、微小管崩壊の後に生じることがわかった。細胞膜の Blebbing はカルシウムイオノフォアである A23187、抗生物質である Amphotericin B、界面活性剤である Triton X-100 を添加した場合にも観測されたが、MTX は 10,000 分の 1 程度の濃度で Blebbing を生じることがわかった。3. MTX の細胞毒性を増強、または減弱させることが推測された 16 個の遺伝子に対して siRNA を設計しトランスフェクションしたが、MTX の細胞毒性に与える影響は観測されなかった。4. そのため、7 つの遺伝子に絞り単一遺伝子欠損株を調製または購入し、MTX の細胞毒性に与える影響を調べたところ、野生株と比較して MTX の細胞毒性を増強、または減弱させる単一遺伝子欠損株が一株ずつ見出された。

マイトトキシン (Maitotoxin : MTX)

