

## 課題番号 19

## 海洋生物毒マイトトキシンの抗腫瘍活性の機構解明

## [1] 組織

代表者：此木 敬一

(東北大学大学院農学研究科)

対応者：関根 弘樹

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

山下 まり (東北大学大学院農学研究科)

長 由扶子 (東北大学大学院農学研究科)

工藤 雄大 (東北大学大学院農学研究科・  
同学際科学フロンティア研究所)

吉尾 柊太郎 (東北大学大学院農学研究科)

小林 巧 (東北大学大学院農学研究科)

田端 滉樹 (東北大学大学院農学研究科)

研究費：物件費 13 万円

## [2] 研究経過

1982 年に関する薬理が初めて報告されて以来、マイトトキシン (Maitotoxin, MTX, **Figure 1A**) の作用機序は不明である。極低濃度で各種培養細胞に対してカルシウム (イオン) 流入をもたらすこと、本現象を契機として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) を示すことがわかっているものの、カルシウム流入の経路は同定されていない。そのため、MTX の作用機序は、未知の情報伝達経路に依存すると考えられている。我々は 2018 年、約 18,000 個の遺伝子各々をノックアウトした HAP1 細胞 (慢性骨髄性白血病細胞株 KBM-7 に由来する一倍体に近いヒト細胞株) に MTX を投与した。培養を継続した後に生存した細胞中の遺伝子解析を行い、MTX の細胞毒性に影響を及ぼす遺伝子群を決定した (CRISPR スクリーニング)。明らかにされた感受性遺伝子群および耐性遺伝子群より一つずつ選択し、各一遺伝子を欠損させた細胞株、KO-1 株および KO-2 株、を受託調製したところ、MTX による細胞毒性をそれぞれ増強および減弱することがわかった。

昨年度、ライブセルイメージングを実施し、MTX が培養細胞に対してもたらず Blebbing を調べた。令和 3 年 12 月 14 日、電子メールにて関根弘樹先生にご連絡し、当該共同研究において受入教員としてご協力頂

くことに御了承頂いた。その後、応募、採択に至った。

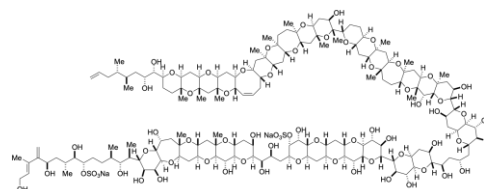
今年度、本共同研究では KO-1 株、KO-2 株の RNA-seq 解析を行うこと、これら二株に対して MTX がもたらす細胞毒性を蛍光顕微鏡で観察することを計画した (**Figure 1B**)。以下、詳細を記す。

## [3] 成果

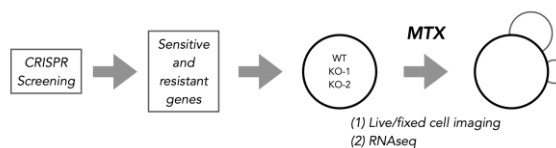
## (3-1) 研究成果 1

昨年度、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) を標識する各種蛍光試薬、カルシウム濃度変化を捉える蛍光試薬 (Fluo3-AM, Dojindo) を予め添加した培養細胞 CHO-K1 に対して MTX を投与し、ライブセルイメージングに用いた。その結果、懸念材料が二つ見出された。一点目は、僅か 1 時間程度 (観察時間) で生じる蛍光試薬の退色がその性質に依存するものか MTX の生物活性に依存するものか断定できなかったこと (懸念点 1)、二点目は Actin Tracker Deep Red が細胞内に侵入できなかったため、アクチンを観察できなかったこと (懸念点 2) である。そこで今年度、懸念点 1 に対して、ライブセルイメージングの際、コントロール条件を設けることで改善を試みた。懸念点 2 に対して、固定細胞を用いること、すなわち、MTX とインキュベートした後、固定処理、各種蛍光試薬の添加を経た細胞を観察することで改善を試みた。

(A)



(B)



**Figure 1.** (A) Structure of maitotoxin (MTX). (B) Schematic figure of the present research

また、ライブセルイメージングにはキーエンス製 BX-800、固定細胞の観察には加齢医学研究所共通機器室に設置されている Olympus 製 APX100 (蛍光顕微鏡)、Leica 製 TCS-SP8 (共焦点レーザー顕微鏡) を用いた。

まず、ライブセルイメージングの結果を述べる。MTX は野生株、KO-1 株、KO-2 株に対して、細胞外のカルシウム濃度に依存して顕著なカルシウム流入作用を示した。MTX によるカルシウム流入が抑制される試薬 A あるいは試薬 B を添加する条件で実施したところ、試薬 A を添加した条件で、KO-1 株に対するカルシウム流入作用が減弱されることがわかった。

前年度、試薬 X や試薬 Y が MTX 同様、細胞外のカルシウム濃度に依存して細胞膜の Blebbing を誘引するが、その濃度は MTX において極めて低いことを明らかにした。今年度、同様の結果が HAP1 野生株、KO-1 株、KO-2 株においても観測され、この細胞内カルシウム濃度上昇は試薬 A あるいは試薬 B 存在下で抑制されることがわかった。また、試薬 X については細胞外液からカルシウム (イオン) を除いた条件でも、小胞体からの遊離と推察される細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。これは MTX では観測されなかった性質であり、試薬 X と MTX の作用機序には違いがあることが明らかとなった。

続いて、固定細胞を用いて行ったアクチンの観察結果について述べる。MTX の添加により、細胞の形態は大きく変化するもののアクチンの動態に顕著な変化が見られていないように見受けられた。既に MTX の添加により微小管が縮退することはわかっており、細胞骨格を構成する二因子の MTX 感受性に興味を持たれる。しかし、アクチン繊維がいわゆるマニュアルに掲載されているように明瞭に観察されないため、染色試薬や固定条件を検討する必要がある。

### (3-2) 研究成果 2

研究成果 1 を受けて、野生株、KO-1 株、KO-2 株について RNA-seq 解析を行った。各株を継続培養し、NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) を用いて total RNA を抽出した。純度および濃度を加齢医学研究所共通機器室に設置されている 4150 TapeStation (Agilent Technologies Inc.) で測定し、受託先が求める純度および濃度を満たした 9 試料 (3 株の各々につき 3 試料) を用意し、受託先に送付した (株式会社マクロジェン・ジャパン)。受託先で再度、純度および濃度が分析され、9 試料のうち 1 試料が条件を満たしていないことが分かった。懸念されたのは DNA の混入であったため、受託先で DNase 処理を行ったが、純度は改善されなかった。そこで新たに 1 試料の total RNA を調製し、4150 TapeStation (Agilent Technologies Inc.) による事前分析後、受託

先へ再送した。最終的に条件を満たした 9 試料を RNA-seq 解析に提供した結果、KO-1 株、KO-2 株ともに野生株と比較して元々欠損させた遺伝子以外にも多数の遺伝子 (発現) に差異がみられた。そのため、現在、生データを基に加齢医学研究所共通機器室に導入されている StrandNGS を用いた再解析を進めている。

### (3-3) 波及効果と発展性など

MTX は細胞膜の局所構造を認識する稀有な海洋天然有機化合物である。細胞膜の局所構造を分子標的にする抗腫瘍薬剤は存在せず、創薬研究に新たな知見をもたらすと考える。また、本共同研究は、分担者である修士一年生、小林巧、田端晃樹 (東北大・院農) の育成に大きく貢献した。

### [4] 成果資料

(1) 〇今田皇緑<sup>1</sup>、木下祥尚<sup>1</sup>、此木敬一<sup>2</sup>、松森信明<sup>1</sup>(九州大学、<sup>2</sup>東北大学)「海産毒マイトトキシンの脂質膜に対する影響」、日本化学会第 103 回春季年会、東京理科大学野田キャンパス、野田市 (2023 年 3 月 22-25 日)