

## 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 柗太郎 (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、薬理に関する研究成果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複数遺伝子を選択し、各一遺伝子を欠損させた細胞株を受託調製した。そして、KO-1 株および KO-2 株が MTX による細胞毒性をそれぞれわずかに増強および減弱することがわかった (**Figure 1B**)。

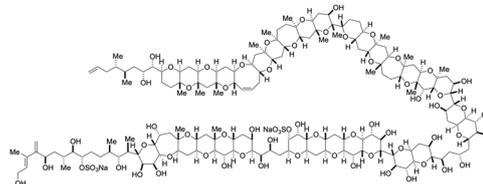
昨年度、野生株、KO-1 株、KO-2 株について RNA-seq 解析を行った。各株を継続培養し、NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH &

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。その結果、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。

令和 4 年 12 月 22 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。主として、RNA-seq の再解析を目的に、加齢医学研究所共通機器室に導入されている StrandNGS の利用を念頭に応募し、採択に至った。

令和 5 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長期間、MTX に暴露した際の細胞毒性を調べることを計画した (**Figure 1B**)。以下、詳細を記す。

(A)



(B)



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

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果 1

RNA-seq 解析を委託した Macrogen より、野生株、KO-1 株、KO-2 株 (各 3 セット、合計 9 セット) に付随する Fastq ファイルを入手した。Strand NGS にアップロードし、約 1 日かけてゲノムデータに照合し、アラインメントした。フィルタリング、グルーピングを経て定量規格化した。適宜、同一株間で顕著に発現量の差がみられる場合を想定して補正を行った上で、一元配置分散分析 (統計解析) を行い、必要に応じて

多重検定補正を済ませ、最終的に得られた結果を Macrogen より提供された結果と比較した。論文未公表のため、KO-1 株、KO-2 株がいずれの遺伝子をノックアウトしたのかを説明できないが、KO-1 株についてはいずれの処理方法を経ても欠損した遺伝子が上位に来なかった (Table 1)。

そこで、Strand NGS における各種設定を変更し、複数解析を行ってみたところ、いずれも異なる結果を与えた (Table 2)。

**Table 1.** RNA-seq: 受託解析と Strand NGS によるマニュアル解析の一例

Macrogen				StrandNGS_TPM_Filter20-100_NoBaseOneWayAnova_0.05-2			
Gene ID	Gene Symbol	KO1/WT <sub>FC</sub>	KO1/WT <sub>raw.pval</sub>	Gene ID	Gene Symbol	FC (KO1 vs WT)	p [(KO1 vs WT)]
5728	PTEN	-568.382651	1.1713E-196	81569	ACTL8	-27.03246	3.38E-04
5991	LIPE	-120.934208	5.70688E-05	63910	SLC17A9	-16.78696	2.27E-04
5308	PTX2	-65.267469	2.07076E-31	3225	HOCX9	-8.381769	2.27E-04
56047	CNTNAP2	-51.269151	4.44555E-04	56925	LXN	-7.774316	2.27E-04
55530	MYO5C	-45.977906	1.4207E-32	11148	HHLA2	-7.271728	2.38E-04
51569	ACTL8	-35.432879	2.58039E-29	349408	TLR8-AS1	-7.150187	2.28E-04
5854	ALDH1A2	-31.768499	1.59171E-50	2047	EPHB1	-6.292736	2.27E-04
5050	PAIPSS2	-31.304437	5.1203E-75	23105	FSTL4	-6.057358	2.28E-04
100526836	BLOC1S5-TX	-30.411360	6.55075E-05	100505817	LINC02582	-5.4181585	2.35E-04
547549	CENPVL3	-28.000237	1.61796E-20	387914	SHISA2	-5.1850843	2.99E-04

可能であれば今後も同ソフトウェアの利用を継続し、真の解析結果を得たいと考えている。しかし、KO-2 株については最上位に来ないものの、欠損遺伝子が上位、もしくは極めて低い p 値を示した。

**Table 2.** RNA-seq: Strand NGS によるマニュアル解析 (各種条件の比較)

Normalization	TPM		TMM	
Filter	20-100			
Baseline	No			
Statistics	One way Anova			
Multiple Test Correction	Benjamini FRD		No	
	Gene	FC	Gene	FC
	ACTL8	-27.03246	SNX19	-372.9122
	SLC17A9	-16.78696	SLC17A9	-151.60806
	HOCX9	-8.381769	LXN	-136.40904
	LXN	-7.774316	ZNF676	-135.25247
	HHLA2	-7.271728	MEIOB	-127.61736
	TLR8-AS1	-7.150187	LINC00462	-80.19601
	EPHB1	-6.292736	HOCX9	-70.68859
	FSTL4	-6.057358	PRRX1	-66.23815
	LINC02582	-5.4181585	PWWP3B	-31.593418
	SHISA2	-5.1850843	VENTXP1	-30.46171

### (3-2) 研究成果 2

MTX が野生株、KO-1 株、KO-2 株に対して、いずれも顕著なカルシウム流入作用を示すこと、MTX に類似する作用を示す界面活性剤が異なる様式で同作用を示すことは昨年報告済みである。しかし、MTX に対する野生株、KO-1 株、KO-2 株の感受性に顕著な差が見られず、Crispr スクリーニングの結果を担保できているかどうか不明であった。この原因が観察期間の短さにあると考慮し、野生株、KO-1 株、KO-2 株を 4、8、14 日間継続培養し、4 日条件については初日、8 日条件については初日と 4 日目、14 日条件については初日、4、8、11 日目に培地交換 (初日を除く) に続けて 0 から 300 pM (最終濃度) の MTX の添加を行なった。そして、最終日に WST-8 を添加し、細胞生存率

を測定する実験を計画し実施した。その結果、MTX に対する感受性は 4 日、8 日条件ではあまり差異が見られなかったが、14 日条件で野生株と KO2 株の間に差異が見られ、KO2 株の MTX 耐性が明らかとなった。

### (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、分担者である修士二年生、小林巧、田端澁樹 (東北大・院農) の育成に大きく貢献した。

### [4] 成果資料

(1) ○此木敬一、中山 健、大岩弘隆、駒崎有紀、工藤雄大、長由扶子、山下まり (東北大院農) 「海洋生物毒マイトトキシンの作用機序解明に向けた ケミカルプローブ合成」、日本農芸化学会東北支部第 158 回大会、仙台市 (2023 年 12 月 2 日)