

令和元年6月28日現在

機関番号：33114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04550

研究課題名(和文) バイオイメージング法によるテトロドトキシンと輸送タンパク質の動態解析

研究課題名(英文) Bio-imaging of tetrodotoxin and analysis of tetrodotoxin transporting proteins in pufferfish

研究代表者

長島 裕二 (Nagashima, Yuji)

新潟食料農業大学・食料産業学科・教授

研究者番号：40180484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：フグの毒化機構解明のため、放射性TTXを用いたSPECT/PETバイオイメージング法によるTTXの可視化とTTX輸送タンパク質について検討した。TTXに標識する放射性元素と結合位置を決定し、放射性TTXを合成した。標識された放射性TTXは、非標識TTXと同等のNa⁺チャネル親和性を示した。放射性TTXを腹大動脈投与されたトラフグでは、投与1時間後にTTXが肝臓に集積した。TTXの吸収、取り込み、排出等に関するトランスポーターの候補遺伝子を解析した。ヒガンフグ卵巣からフグ毒結合タンパク質を単離し、ビテロジェニンが肝臓から卵巣へのTTX輸送に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、放射性TTXを用いてTTXの動態をバイオイメージング法で可視化した点であり、これによりフグ以外の一般魚だけでなくマウスなどTTX感受性の高いTTX非保有動物におけるTTXの動態を知ることができ、人体でのTTXの体内動態を推定してフグ毒中毒治療法の開発に道が拓ける。また、TTXの輸送タンパク質についても、輸送タンパク質はTTXを結合するため、TTXを特異的に検出する検査試薬への応用やTTXの毒性中和効果が期待できる。TTXトランスポーターはフグ毒化のキーポイントであり、これをロックアウトしたTTXを蓄積しない安全なフグの作出技術開発につながり、社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Pufferfish accumulate high levels of tetrodotoxin (TTX) in liver and ovary. However, the underlying toxification mechanism of pufferfish is poorly understood. In this study, we developed the new method to analyze TTX by spectroscopic SPECT imaging and investigated the genes and the proteins involved in toxification of pufferfish.

We synthesized radiolabeled TTX, based on the in silico examination of radioisotope element and its binding site of TTX. Spectroscopic SPECT imaging demonstrated that after TTX was administered into non-toxic pufferfish Takifugu rubripes, the toxin was detected in liver 60 min after administration. Candidates of the genes relating to transport TTX into liver of pufferfish were elucidated and the gene encoding OCT6 is promising. TTX-binding protein with a molecular mass of 10 k was isolated and identified as vitellogenin-1 like protein. Vitellogenin is suggested to be a carrier protein of TTX from liver to ovary in pufferfish.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：水産学 生体分子 テトロドトキシン バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

フグ類は猛毒のテトロドトキシン (TTX) をもつため、フグの生産や利用にあたってはフグ中毒の防止策を最優先に講じなければならない。フグ養殖において、TTX との接触を断つことで“無毒フグ”の産出は可能になったが、フグがどのようにして TTX を取り込み、分布、蓄積するかという毒化機構の根本的な部分はいまだ解明されていない。

我々は、フグの毒化過程を 1) 消化管吸収、2) 血液運搬、3) 組織への取り込み、4) 排出の 4 つのステップに分けて検討した結果、肝臓での取り込みがフグの毒化を担う主要要因であることを明らかにした。肝臓に蓄積した TTX は長期間保持されることが飼育実験で実証されているが、トラフグに TTX を筋肉投与した場合、肝臓から胆汁への TTX 排出を認め、TTX 投与 8 時間以降、胆汁中の TTX 濃度は平衡になり、体内の TTX 量は減少しないことから、TTX は消化管で再吸収されて再分布していることが示唆された。我々は、TTX の体内動態を可視化して調べたいと考え、TTX に特異的なプロトンケミカルシフトを用いて高磁場 MRI (Magnetic Resonance Imaging) による TTX の検出に挑んだ。トラフグに TTX を筋肉投与すると、投与 6 時間後に TTX は肝門脈付近に高濃度に検出され、3 日後には TTX が肝組織に点在している様子を非破壊的に観察することに世界で初めて成功した。しかしながら、肝臓以外の毒性の低い組織では TTX を検出することができず、イメージングで TTX 体内動態を明らかにするためには、検出感度と解像度の改善が必要である。

フグの毒化には様々なタンパク質が関与していることが示唆されており、例えば、フグ科魚類の血漿に存在する TTX 結合タンパク質 PSTBP (pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin binding protein) は TTX の運搬に、フグ肝臓における TTX 取り込みには特殊なトランスポーターが関与していると推測されている。上記高磁場 MRI において、TTX はトラフグ肝臓に様に分布するのではなく点在して検出されたことから、肝臓中で TTX はなんらかの生体成分と結合して存在することが窺える。また、未発表の結果ではあるが、卵巣の毒化メカニズムを調べる過程で、フグ毒の一部はタンパク質成分 (構造未解明) と結合していることを見出し、これが卵巣への TTX 運搬や蓄積に寄与している可能性も考えられる。TTX の体内動態を可視化して調べようとする試みは我々の研究以外にはなく、TTX の動態と TTX 輸送タンパク質を関連付けた研究はこれまで行われていない。

2. 研究の目的

フグは TTX を特異的に蓄積するが、詳しい毒化機構はいまだ不明な点が多い。我々は、薬物動態学的手法により、肝臓での TTX 取り込みがフグ毒化の支配要因であることを明らかにし、肝臓から胆汁へ TTX は排出されるが、再び消化管で吸収されること (腸肝循環) を見出した。我々は、こうした TTX の体内動態を可視化解析しようと試みており、高磁場 MRI による TTX の非破壊検出に成功したが、装置の性能上 TTX 動態観察には至らなかった。そこで本研究では、1) 高感度で高精度な検出が期待できる放射性 TTX を用いる SPEC/PET によるバイオイメージングで TTX の体内動態を解析し、2) 毒化の主要組織である肝臓への取り込みにかかわる TTX トランスポーターと、肝臓から卵巣への輸送関連タンパク質に焦点を絞り、フグの毒化を TTX の動態と輸送タンパク質の観点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 放射性 TTX を用いた SPECT/PET バイオイメージング法による TTX の可視化

放射性 TTX を有機合成するにあたり、TTX に放射性物質を合成標識することで Na⁺チャネルとの結合座位

が変化しないよう、*in silico*で合成標識設計を行い、解析結果に基づき放射性 TTX を合成した。放射性 TTX が非標識 TTX と同等の生化学・薬理物理化学的性状を示すことを、ヒト骨格筋細胞およびマウス心筋細胞由来の Na⁺チャネルに対する結合親和性を指標にしてパッチクランプ法で調べ、放射性 TTX の薬剤安定性、光分解、収着および吸着についても検討した。そして、テクネシウムを結合した放射性 TTX (50 μg TTX/kg) を無毒の養殖トラフグの腹大動脈に投与し、ガンマカメラを用いてガンマ線を測定して画像解析を行い、TTX の体内動態を調べた。

(2) TTX 輸送運搬タンパク質の特定と機能解析

TTX 取り込みトランスポーターについては、既知であるヒトの有機カチオントランスポーター (OCT)、有機カチオン/カルニチントランスポーター (OCTN) および薬物排泄トランスポーター (BCRP) のアミノ酸配列をプローブとして、トラフグゲノムデータベースからトランスポーターをコードすると予測される推定塩基配列を検索した。得られた推定塩基配列を特異的に増幅する PCR プライマーを設計し、トラフグの肝臓から調製した cDNA を鋳型として PCR を行い、トラフグのトランスポーター遺伝子を検出した。得られた PCR 産物を TA クローニング法で大腸菌 DH5 株に形質転換し、プラスミドを抽出してトランスポーター遺伝子の塩基配列を解析した。さらに、RACE 法で目的とするトランスポーター遺伝子の全長配列を取得した。また、トランスポーター遺伝子の組織発現分布を Real-time PCR または RT-PCR で調べた。

ヒガンフグ卵巣のフグ毒結合タンパク質については、まず、ヒガンフグ卵巣から TTX 関連化合物とタンパク質を指標にして、カラムクロマトグラフィーで目的タンパク質を精製単離した。精製品の部分アミノ酸配列を解析し、cDNA クローニングによりフグ毒結合タンパク質の一次構造を決定した。次に、卵黄タンパク質と TTX の結合性を調べるため、ヒガンフグ卵巣から市販の抗サケビテロジェニンポリクローナル抗体を用いて卵黄タンパク質を精製した。卵黄タンパク質と TTX の結合性は平衡透析法で測定した。対照として、TTX をもたないシロザケ卵巣についても同様の試験を行い、フグの毒化における卵黄タンパク質の役割について検討した。

4. 研究成果

(1) 放射性 TTX を用いた SPECT/PET バイオイメージング法による TTX の可視化

TTX に結合する放射性元素は、*in silico* 解析により、ヨウ素とテクネシウムが分子エネルギー的に最適だった。そこで、ヨウ素またはテクネシウムを標識した放射性 TTX を合成した。放射性 TTX はヒト骨格筋細胞およびマウス心筋細胞由来の Na⁺チャネルに対して、非標識 TTX と同等の結合親和性を示すことを確認した。また、ヨウ素を結合させた TTX を用いて薬剤安定性、光分解、収着および吸着試験を実施したところ、非標識 TTX と同様な性状を示した。

放射性 TTX をトラフグの腹大動脈に投与すると、投与 30 分後から TTX の肝臓への移行が観察され、1 時間後に TTX が肝臓に集積している様子が確認された。本結果は、これまでの給餌飼育実験や *in vivo* の TTX 単回投与と実験において、投与された TTX は主に肝臓に移行、蓄積することを可視化観察したもので、TTX の体内動態をリアルタイムで撮影することに成功した最初の研究成果である。

(2) TTX 輸送運搬タンパク質の特定と機能解析

TTX 取り込みトランスポーターについては、トラフグの肝臓に発現する 3 つのトランスポーター遺伝子について完全長 cDNA の塩基配列を解析した。ヒトで報告のある既知トランスポーター遺伝子でトラフグゲノムデータベースを検索した結果、有機カチオントランスポーター (OCT6)、有機カチオン/カルニチントランス

ポーター2(OCTN2)および薬物排泄トランスポーター(BCRP)をコードする推定塩基配列 ENSTRUT00000047242、ENSTRUT00000004198 および ENSTRUT00000032306 が得られた。cDNA をクローニングしたところ、OCT6 をコードする全長 1,971bp の slc22a16 遺伝子、OCTN2 をコードする全長 2,144bp の slc22a5 遺伝子および BCRP をコードする全長 1,977 bp の abcg2 遺伝子を解析することができた。トラフグの slc22a16 遺伝子は、フグゲノムデータベースの chromosome16 に 8 個のエクソンとして存在し、翻訳領域には 12 ヶ所の膜貫通ドメインを有する 582 アミノ酸からなる OCT6 がコードされていた。Real-time PCR により、トラフグの slc22a16 遺伝子は、肝臓で特異的に発現していることが明らかになった。slc22a5 遺伝子は、フグゲノムデータベースの chromosome 15 に 12 個のエクソンとして存在し、翻訳領域には 12 ヶ所の膜貫通ドメインを有する 554 アミノ酸からなる OCTN2 がコードされていた。RT-PCR により、トラフグの slc22a5 遺伝子は、脳および腸で高い発現が認められ、腎臓と肝臓で弱い発現が認められた。abcg2 遺伝子は、フグゲノムデータベースの Chromosome 17 に 15 個のエクソンとして存在し、翻訳領域には 6 ヶ所の膜貫通ドメインと ABC transporter G ファミリーに特徴的なモチーフを有する 612 アミノ酸からなる BCRP がコードされていた。RT-PCR において、トラフグの abcg2 遺伝子は腸での発現が顕著で、次いで肝臓が高かった。トランスポーターの機能と組織における発現特異性から、OCT6 は TTX の循環血液中から肝臓中への取り込みに、OCTN2 は TTX の腸管吸収に、abcg2 遺伝子は腸での異物排泄や肝臓での代謝産物の胆汁排泄に関与すると考えられる。

有毒のヒガンフグ卵巣からフグ毒結合タンパク質を単離し、cDNA クローニングで一次構造を決定した。単離したフグ毒結合タンパク質の分子量は、SDS-PAGE により 10kDa と見積もられ、cDNA クローニングにおいて 637 bp が解析され、212 アミノ酸が演繹された(推定分子量 25318.962 Da)。BLAST 検索の結果、本フグ毒結合タンパク質はトラフグ由来の vitellogenin-1 like protein の一部と 99%の相同性を示し、フグ毒結合タンパク質は a von Willebrand factor type D domain に相当することがわかった。RT-PCR において、フグ毒結合タンパク質はヒガンフグ雌の肝臓と卵巣で発現していた。卵黄タンパク質と TTX の結合を平衡透析試験で定量的に調べたところ、ヒガンフグ卵黄タンパク質の TTX 結合量は $6.79 \pm 0.26 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質であった。対照のシロザケ卵黄タンパク質の TTX 結合量も $6.00 \pm 0.48 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質であったことから、魚卵の卵黄タンパク質は TTX を結合することが明らかになり、フグでは肝臓から卵巣への TTX の輸送に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Y. Nagashima, A. Ohta, X. Yin, S. Ishizaki, T. Matsumoto, H. Doi, T. Ishibashi: Difference in uptake of tetrodotoxin and saxitoxins into liver tissue slices among pufferfish, boxfish and porcupinefish. *Marine Drugs* 2018; 17: doi:10.3390/md16010017. 査読有り

X. Yin, A. Kiriake, A. Ohta, Y. Kitani, I. Ishizaki, Y. Nagashima: A novel function of vitellogenin subdomain, vWF type D, as a toxin-binding protein in the pufferfish *Takifugu pardalis* ovary. *Toxicon* 2017; 136: 56-66. doi:10.1016/j.toxicon. 2017.06.006. 査読有り

M. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuki, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima. Urinary excretion of tetrodotoxin modeled in a porcine renal proximal tubule epithelial cell line, LLC-PK1. *Marine Drugs* 2017; 15: doi:10.3390/md15070225. 査読有り

A. Kiriake, A. Ohta, E. Suga, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Comparison of tetrodotoxin uptake and gene expression in the liver between juvenile and adult tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Toxicon* 2016; 111: 6-12. doi:10.1016/j.toxicon.2015.12.007 査読有り

C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Toxicity of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification. *Eur. Food Res. Technol.* 2016; doi:10.1007/s00217-016-272-1. 査読有り

T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 2015; 93: 98-102. doi:10.1016/j.toxicon.2014.11.227. 査読有り

長島裕二：フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質。日本水産学会誌 2015; 81: 736. 査読なし

長島裕二, 松本拓也：フグ毒テトロドキシンの体内動態。LABIO 21 2015; 62: 24-27. 査読なし

[学会発表] (計 32 件)

永井 慎, 長島裕二：ナトリウムチャンネルとテトロドキシンの結合シミュレーション。平成 31 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 31 年 3 月。

永井 慎, 長島裕二：放射性テトロドキシシン合成設計に関する研究。平成 31 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 31 年 3 月。

長島裕二, 江澤歩美, 大木理恵子, 横塚峻介, 石崎松一郎, 松本拓也：魚卵ピテロジェニンとはテトロドトキシシンを結合する。平成 31 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 31 年 3 月。

松下直樹, 高橋晶子, 山本千里, 松本拓也, 長島裕二：トラフグの有機カチオントランスポーター oct6 をコードする slc22a16 遺伝子のクローニング。平成 30 年度日本水産学会秋季大会，広島県東広島市，平成 30 年 9 月。

永井 慎：TTX と Na⁺ channel におけるインシリコ解析。第 32 回マリントキシシン研究会，東京都港区，平成 30 年 3 月。

永井 慎, 片淵哲朗：放射性標識をした核酸医薬品の設計モデリングと機能性評価。第 138 回日本薬学会大会，石川県金沢市，平成 30 年 3 月。

松本拓也, 高橋晶子, 青柳 充, 大竹才人, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二：トラフグのカルニチントランスポーター octn2 をコードする slc22a5 遺伝子のクローニング。平成 30 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 30 年 3 月。

長島裕二：魚貝類の毒 マリントキシシン。平成 29 年度第 1 回愛知県衛生研究所技術研修会。愛知県名古屋市，平成 29 年 11 月。

T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuku, M. Aoyagi, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Carrier-mediated transport of tetrodotoxin in porcine renal proximal tubule epithelial cell line LLC-PK1 monolayer. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム，東京都港区，平成 29 年 9 月。

松本拓也, 北島冴美, 青柳 充, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二：トラフグ薬物排泄トランスポーター Bcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング。平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月。

松本拓也, 石崎優衣, 望月桂花: フグ毒テトロドトキシンの尿中排泄機構に関する研究. 第 63 回毒素シンポジウム, 山形県天童市, 平成 28 年 7 月.

T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Pharmacokinetics and biliary excretion of tetrodotoxin in the marine pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea, May, 2016.

北島冴美, 門川峻徳, 松本拓也, 長島裕二: 次世代シーケンサーアーカイブを用いたトラフグ肝臓薬物排泄トランスポーターのクローニング. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 28 年 3 月.

門川峻徳, 北島冴美, 松本拓也, 長島裕二: 次世代シーケンサーデータベースを用いたトラフグ肝臓有機イオントランスポーターのクローニングの試み. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 28 年 3 月.

T. Matsumoto: Distribution and biliary excretion of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. World Congress on Pharmacology, オーストラリア プリスベン, 平成 27 年 7 月.

[図書] (計 1 件)

- 1) 長島裕二: 自然毒. 「魚介の科学」(阿部宏喜編), 2015. pp. 212 (185-196).

[その他]

ホームページ等

- 1) 県立広島大学研究者総覧

<https://hiris.pu-hiroshima.ac.jp/profile/ja.4s3XB301rQE9lFOGX0cbBw==.html#articles>

- 2) 岐阜医療科学大学 <http://www.u-gifu-ms.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長島 裕二 (NAGASHIMA YUJI)

新潟食料農業大学・食料産業学部・教授

研究者番号: 40180484

(2) 研究分担者

- 1) 永井 慎 (NAGAI MAKOTO)

岐阜医療科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号: 30460497

- 2) 松本 拓也 (MATSUMOTO TAKUYA)

県立広島大学・人間文化学部・准教授

研究者番号: 30533400