

令和元年6月21日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04551

研究課題名(和文) フグ毒テトロドトキシンの輸送・蓄積に関わる分子機構究明

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms involved in transportation and accumulation of the pufferfish toxin tetrodotoxin

研究代表者

荒川 修 (ARAKAWA, Osamu)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：40232037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：フグ体内におけるフグ毒テトロドトキシンの輸送・蓄積機構解明に資するため、種や成長・成熟段階が異なるフグを用いて、TTXの体内動態やTTX結合性タンパク質アイソフォーム(Tr)群(機能は同じで構造の一部が異なる一群のタンパク質)の発現状況を調べた。その結果、TTXは種や成熟段階に応じて特定の組織に選択的に移行・蓄積すること、有毒種のフグのみが多様なTr群を保有するが、それらは遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも、成長・成熟に依存せず特定の組織で構成的(恒常的)に発現していること、などを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TTXの輸送・蓄積機構の解明は、フグが何故、如何にして毒をもつようになったのかという水圏生命科学上の根源的な疑問の一つに迫るきわめて興味深いテーマである。さらに、食品衛生上世界的な問題となっている魚介類のTTX汚染リスクを根本的に回避するうえでも、重要な知見を提供するであろう。今回得られた成果は、当該機構の解明に大きく貢献するものであり、将来的にはTTX蓄積遺伝子群の特定や、毒の輸送・蓄積を阻害する生体システム制御に関する研究などに発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify transportation and accumulation mechanisms of tetrodotoxin (TTX) in pufferfish, we investigated TTX kinetics inside the body and expression profiles of TTX-binding protein isoforms (Trs) using different species and different growth/maturation stages of pufferfish. The results indicated that TTX was selectively transferred and accumulated in specific tissues depending on the species and maturation stage, and that only toxic species of pufferfish could possess a variety of Trs, which were constitutively expressed in specific tissues in both gene and protein levels independently of growth and maturation.

研究分野：水産食品衛生学、水産化学

キーワード：テトロドトキシン フグ毒結合性タンパク質 PSTBP トラフグ ヒガンフグ 次世代シーケンサ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フグの毒化機構に関する研究はここ数十年でめざましい進歩を遂げ、フグの毒化は細菌から始まる食物連鎖で説明することが可能となった。フグは肝臓や卵巣、皮など、特定の部位に高濃度のテトロドトキシン (TTX) を蓄積するため、フグ体内には TTX の特異な輸送・蓄積機構が存在するものと考えられる。近年、研究代表者らは、有毒餌生物を遮断して無毒の餌で飼育した無毒養殖フグを用いて種々の TTX 投与実験を行い、フグには消化管→肝臓→皮/卵巣といった TTX の特異な体内動態が存在し、当該動態は個体の成長や成熟に伴い変化することを見出した。一方、それらを担う候補分子として、Yotsu-Yamashita ら (2001) がヒガンフグ血漿から分離した TTX 結合性タンパク質 (PSTBP) に着目し、トラフグには PSTBP に相同な 4 種のアイソフォーム遺伝子が存在し、うち 2 種は肝臓や血液中で発現していることを示した。さらに、このような PSTBP 相同タンパク質アイソフォーム (Toxin-binding protein related; Tr) 群は、他のトラフグ属有毒種にもみられるが、無毒種や一般魚には認められないことから、「TTX の輸送・蓄積には Tr 群が関係しており、それらの血中での組成変化 (毒摂取や成長・成熟に伴う個々の Tr 遺伝子の発現変動) が毒の運搬先を決定づける」と予想した。

### 2. 研究の目的

以上のような状況の下、本研究では、フグ体内における TTX の輸送・蓄積に関わる分子機構の一端を解明するため、引き続きフグにおける TTX の体内動態やその成長/成熟依存性をより詳細に調べるとともに、TTX 蓄積能の異なる多様なフグ種を対象に、最新のゲノム解析やタンパク質化学的手法を用いて、Tr 群の組成、発現パターン、微細分布、ならびにそれらの成長/成熟依存的な変化 (Tr 群の発現プロファイル) を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) トラフグにおいて、皮と肝臓への毒移行・蓄積プロファイルの相違を明確にするため、無毒養殖個体に TTX を異なる用量 [30 (low dose; LD)、100 (medium dose; MD)、および 300 (high dose; HD)  $\mu\text{g}/\text{個体}$ ] で投与し、24 時間後に皮と肝臓に移行した TTX 量を LC/MS で測定した。

(2) 天然ヒガンフグ雌個体につき、性成熟と毒の動態の関係をより明確に示すため、卵巣組織の様態から厳密に成熟段階を評価するとともに、LC-MS で各部位の TTX 量を測定した。一方、無毒養殖ヒガンフグを用い、毒投与試験を行った。各試験魚に TTX またはデカルバモイルサキントキシン (dcSTX) を経口経管投与し、24 ないし 72 時間後に取り上げて、各部位の TTX 量を LC-MS/MS、dcSTX 量を蛍光 HPLC で測定した。他方、天然および養殖個体の卵巣につき、免疫組織化学的手法で TTX の微細分布を観察するとともに、血漿につき、抗 PSTBP ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットに供し、PSTBP の発現状況を調べた。

(3) 天然ではサキントキシン (STX) や dcSTX 主体の麻痺性貝毒 (PST) を保有する淡水フグ *Pao suvattii* につき、TTX と PST の蓄積能の相違を明らかにするため、毒投与試験を行った。無毒人工飼育個体に同量の TTX と STX を経口経管投与し、24 および 48 時間後に取り上げ、各部位の毒量を測定した。一方、*P. suvattii* 人工飼育個体から肝臓、皮、および消化管の組織切片を作成し、STX と TTX を含む培地で一定時間培養後、各切片の毒取り込み量を測定した。

(4) 各種フグにおける Tr 群の組成や発現状況を明らかにするため、まず有毒種と無毒種を用い、RT-PCR により肝臓における 2 ドメインタイプの Tr の発現状況を調べた。次いで、3'-RACE により各アイソフォームの部分配列を得た後、PSTBP とトラフグ Tr 群の配列を加えて、Clustal で多重配列アライメントを、MEGA6 でドメイン単位の系統樹を作成した。また、トラフグの成長/成熟に伴う Tr 群の発現変動を調べるため、成長・成熟段階の異なる養殖トラフグ (8 ヶ月齢魚、2 年魚、4 年魚) の血漿および各組織から酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム抽出法を用いてトータルタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離後、抗 Tr 抗体を用いたウエスタンブロット (WB) 法によりタンパク質レベルでの発現状況を調べた。さらに、12 ヶ月齢の養殖トラフグに TTX を経口経管投与し、毒の投与による Tr 群の発現変動を同 WB 法により調べた。SDS-PAGE 分離後の WB 法では、配列相同性がきわめて高い Tr アイソフォーム遺伝子産物の識別が困難である。多様な Tr 産物の発現状況とそれらの糖鎖修飾・プロセッシングを一斉分析するためには、二次元電気泳動による組織由来のトータルタンパク質分離後の WB 法、糖鎖染色、および質量分析によるスポットの解析が有効と考えられる。そこで、二次元電気泳動による分離条件を検討するため、4 年魚の血漿および肝臓より得られたトータルタンパク質について、二次元電気泳動を行い、蛍光染色によりタンパク質スポット分離を評価した。

(5) トラフグの成長・成熟に伴う Tr 遺伝子アイソフォーム群の発現変動を明らかにするために、ゲノム解析、発現解析 (RNA-seq 解析)、転写開始点解析を行った。ゲノム解析では、メスのトラフグ 1 個体 (個体 ID: Tr\_160118, 表 3-5-1 参照) の筋肉から抽出した DNA を対象として、HiSeq のペアエンドシーケンシングを行った (表

表 3-5-1 解析に用いたトラフグ個体リスト

個体 ID	性別	年齢	体長 (mm)	体重 (g)
Tr_160720	不明	<1	135	51
Tr_171109	メス	2	350	1,091
Tr_160118	メス	2-3	380	1,110
Tr_180419	メス	4	450	2,300

3-5-2)。アセンブリは *de novo* で行った。発現解析では、1歳未満から4歳までのメスのトラフグ計4個体 (Tr\_160720, Tr\_160118, Tr\_171109, Tr\_180419, 表 3-5-1 参照) を対象として、それぞれ肝臓、卵巣、筋肉、皮の組織毎に全 RNA を抽出し、Hiseq もしくは Novaseq のペアエンドシーケンシングを行った (表 3-5-2)。4 個体のうちの 1 個体 (Tr\_160118) については、全 RNA の抽出からの繰り返しを加えた。各発現解析の 4 組織分のリードをプールして *de novo* アセンブリを行った後で、Tr 遺伝子アイソフォーム群の発現量推定をした。転写開始点解析は CAGE 法を用いて、メスのトラフグ 1 個体 (Tr\_171109) を対象として行った (表 3-5-2)。

表3-5-2 解析リスト

解析内容 (解析名)	個体ID	組織*	シーケンシング	全リード数**
ゲノム解析	Tr_160118	M	Hiseq (PE100)	50,318,874
発現解析 (Tr_Tra1)	Tr_160720	L,O,M,S	Hiseq (PE100)	22,316,732
発現解析 (Tr_Tra2)	Tr_171109	L,O,M,S	Hiseq (PE150)	18,469,838
発現解析 (Tr_Tra3)	Tr_160118	L,O,M,S	Hiseq (PE100)	25,024,876
発現解析 (Tr_Tra4)	Tr_160118	L,O,M,S	Hiseq (PE100)	22,093,192
発現解析 (Tr_Tra5)	Tr_180419	L,O,M,S	Novaseq (PE100)	19,415,778
転写開始点解析	Tr_171109	L,O,M,S	Hiseq (SE75)	285,299,002

\* L: 肝臓, O: 卵巣, M: 筋肉, S: 皮; \*\* すべての組織分を合算した値

#### 4. 研究成果

(1) トラフグへの TTX 投与試験において、24 時間後の毒の移行様式は皮と肝臓で大きく異なっていた。すなわち、両組織の TTX 濃度はともに用量の増加に伴って増加したものの、皮の TTX 蓄積率 (用量に対する各組織の TTX 量の割合) は用量の増加に伴って有意に減少したのに対し、肝臓の蓄積率は、用量にかかわらずほぼ一定であった。このことは、両組織への TTX 移行・蓄積の分子メカニズムが異なる可能性を示唆するものである。

(2) 天然ヒガンフグ雌個体につき、HE 染色した卵巣切片の様態に基づき成熟段階を卵黄胞期、卵黄形成期ステージ (Stg) 1~3 の 4 段階に分けたところ、卵黄胞期から卵黄形成期 Stg 1 にかけては卵巣の TTX 濃度 (MU/g) が、卵黄形成期 Stg 1 から 3 にかけては卵巣の TTX 量 (MU/個体) が漸増していた (図 4-2-1)。また、卵黄胞期には皮が体内総 TTX 量の 86% を占めたのに対し、卵黄形成期 Stg 1~3 には卵巣が 53~76% を占めた。一方、毒投与試験では、TTX 投与区の場合、投与 24~72 時間後に雌個体 (卵黄胞期) で卵巣 TTX 濃度が上昇したが、雌雄ともに総 TTX 量の 80% 以上を皮が占めた。dcSTX 投与区では、総 dcSTX 量の 98% を消化管、次いで 1.7% を卵巣が占めた。他方、卵母細胞内の TTX は成熟に伴い卵黄胞から卵黄球へと移行し、産卵が近づくと卵膜に分布した。血漿中の PSTBP は、天然個体で発現量や分子量に個体差がみられたものの、

成熟段階や雌雄、毒性、毒投与の有無には依存しなかった。以上、本研究により、ヒガンフグは食物から TTX を特異的に吸収し、普段は主に皮に蓄積するが、成熟に伴い TTX は卵巣に輸送・蓄積されるようになること、その際、卵母細胞内の毒の微細分布も次第に変化すること、PSTBP は毒の有無に関わらず構成的に発現していること、などを示すことができた。

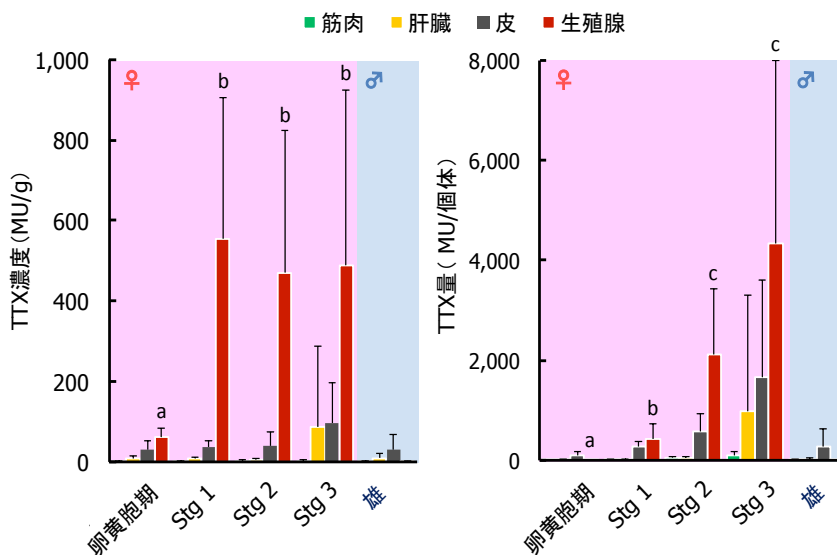


図 4-2-1 各成熟段階における組織別 TTX 濃度 (左) および TTX 量 (右)  
a < b < c, p < 0.05

(3) *P. suvattii* への毒投与試験では、STX と TTX の挙動は大きく異なった。すなわち、STX は雌では主に卵巣、雄では皮に移行・蓄積していたのに対し、TTX は消化管内容物に少量残存していたものの、いずれの組織からもほとんど検出されなかった。一方、組織切片培養実験では、いずれの組織も STX の取り込み量が TTX を上回った。特に消化管では TTX はほとんど取り込まれず、STX 取り込み量との差が最も顕著となった。従って、本種では消化管が関門となり、STX は選択的に取り込まれて卵巣や皮に蓄積するが、TTX はほとんど取り込まれず、そのまま排出されるものと推察された。

(4) 有毒の3種コモンフグ、マフグ、ナシフグの肝臓にのみ目的サイズのバンドが見られ、Trは有毒種に特異的に存在することが示唆された。2ドメインタイプのTrの多重配列アライメント(図4-4-1)では、N-グリカン糖鎖推定結合部位(NXS/T配列)は7ヶ所において種間で保存されており、トラフグ以外ではさらに1-2ヶ所のNXS/T配列を有していたことから、フグ種間におけるPSTBPアイソフォーム群の多様性は糖鎖修飾に由来する可能性がある。また、N末端ドメインに比べ、C末端ドメインでアミノ酸の置換が高頻度に起きていた。一方、ドメイン単位の系統樹(図4-4-2)では、N末端およびC末端ドメインでそれぞれクレードが構成され、N末端ドメインのクレードではトラフグのドメインのみ多種のフグから離れており、糖鎖推定結合部位の数も含め、トラフグのTr群は他とは若干異なる特徴を持つことが示唆された。

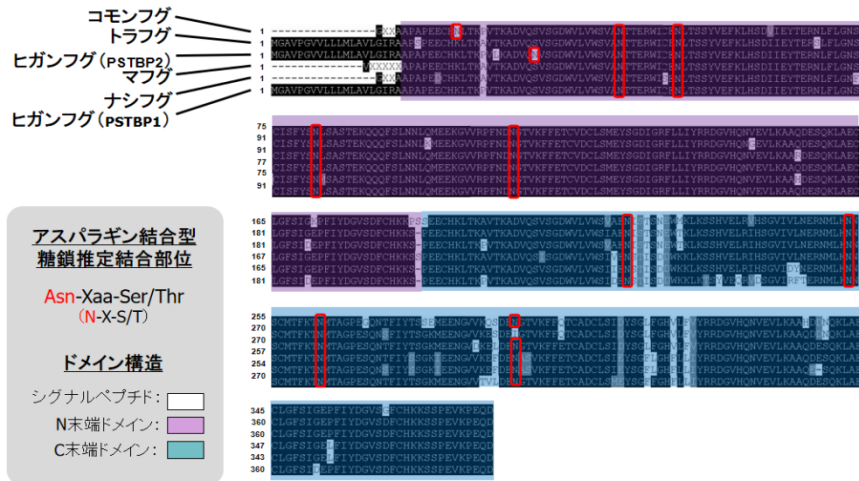


図4-4-1 各種フグ由来2ドメインタイプTrの多重配列アライメント

成長・成熟段階の異なるトラフグの各部位について、PCRによりTr群遺伝子のmRNAレベルでの発現を調べた結果、いずれの段階においても、肝臓にのみ安定な発現が確認された。また、WB法によりタンパク質レベルでの発現状況を調べたところ、一部のアイソフォームで構造(分子量)に個体差が見られるが、成長・成熟段階に依存しないことが示唆された。

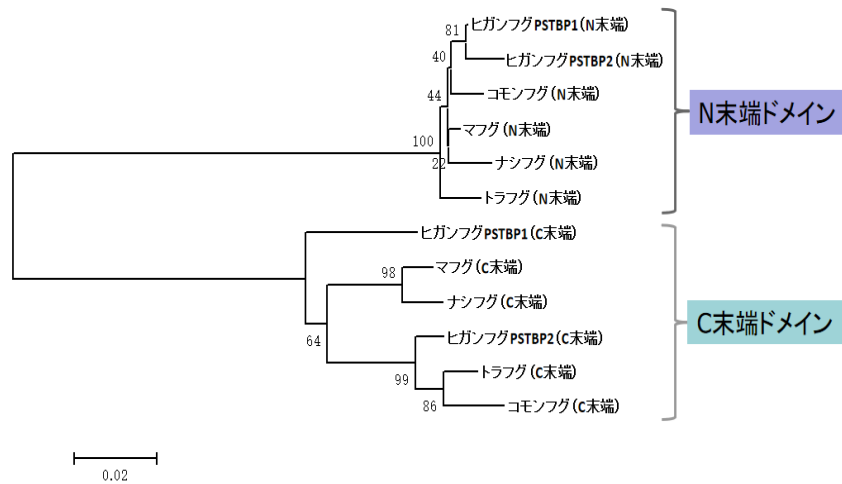


図4-4-2 2ドメインタイプTrのドメイン単位で作成した系統樹

一方、養殖トラフグにTTXを投与した後24時間と72時間では、血漿中に見られるTr群のうち、2ドメインタイプと思われるバンドが毒の投与により消失する現象が見出された。mRNAレベルでの変動がない一方で、毒の投与による血漿中のTrタンパク質の一過的な減少が見られる理由としては、フグが常に毒への対応ができるようにTr群を構成発現により体内に蓄え、毒の摂取により毒と結合したタンパク質の組織移行が起こっていると考えられる。今後、血漿および肝臓における、経時的なTrのタンパク質レベルの消長(個々のTrアイソフォームにおける量的変動や分子量・荷電等の質的变化)を詳細に調べることで、多様なTrアイソフォームの存在意義や糖鎖修飾の意義が明らかになる可能性がある。血漿中のTr群を二次元電気泳動で分離・検出するには、主要成分のアルブミンやグロブリンの除去法の開発が課題となるが、肝臓については、良好な二次元プロファイルが得られる抽出・分離条件を確立できた。これを基盤として、糖タンパク質解析系(ProQ Emerald検出およびMSn解析)を併用することにより、今後、個々のTrアイソフォームの量変動解析や構造解析が進むと期待できる。

(5) ゲノム解析では、n50が56,474塩基対の全長約340万塩基対のアセンブリーが得られた。この結果とFUGU5などを合わせて解析を行ったところ、トラフグのゲノム上にはTr遺伝子アイ

表4-5-1 Tr群アイソフォーム数(>200bp)とTr群全体の発現量\*

解析名	個体ID	アイソフォーム数	肝臓	卵巣	筋肉	皮
Tr_Tra1	Tr_160720	9	1,260	3	0	1
Tr_Tra2	Tr_171109	11	1,421	1	0	0
Tr_Tra3	Tr_160118	14	3,551	2	1	1
Tr_Tra4	Tr_160118	8	1,830	0	1	8
Tr_Tra5	Tr_180419	8	250	0	0	0

\* 各解析各組織における全遺伝子発現量に対する相対発現量

ソフォーム群が複数の染色体にまたがって点在しており、全コピー数が10程度は存在することが予想された。これは Tr 遺伝子アイソフォーム群の多様性がこれまで考えられていた以上に高いことを示唆するものである。発現解析では、各解析から8~14のアイソフォームが検出された(表4-5-1)。また、Tr 遺伝子アイソフォーム群全体の発現量は、成長・成熟の程度に関係なく肝臓のみで高くなっていることが明確に示された。各発現解析で得られた Tr 遺伝子アイソフォームのうち発現量が比較的多いものについてアミノ酸配列による系統樹を構築したところ(図4-5-1)、成長・成熟の異なる個体を用いたいずれの解析においても PSTBP1, 2, TBT-bp2a\_1, 2a\_2, 2b\_1 (Hashiguchi et al. 2015, doi:10.1111/jeb.12634)に相同なアイソフォームが共通して発現していることが示された。その一方で、ゲノム解析から予想されるように Tr 遺伝子アイソフォーム群は系統的にかなり多様であることが示唆された。これらの結果は、トラフグの成長・成熟に伴う Tr 遺伝子アイソフォーム群組成の大きな変動がないことを示すとともに、より詳細な系統レベルではなんらかの変動が起る可能性を否定できないことも示している。

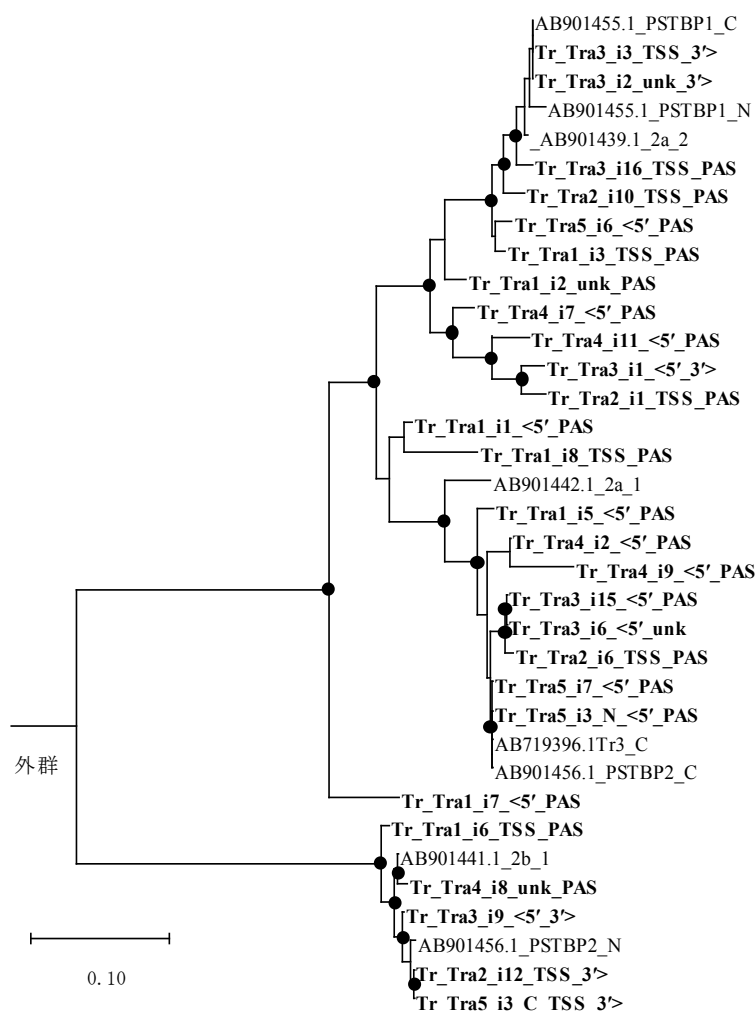


図4-5-1 Tr遺伝子群のアミノ酸配列系統樹  
TBT-bp2遺伝子のエクソン2~5に相同な配列を用いた。●はブートストラップ値が50以上のノードを示している。配列名は、解析名(Tr\_Tra)、アイソフォーム番号(i)、5'側の状態(TSS:転写開始点がある、<5': Tr遺伝子配列がタンデムに並んでいる、unk:不明)、3'側の状態(PAS:ポリアデニレーションシグナルがある、3': Tr遺伝子配列がタンデムに並んでいる、unk:不明)を意味している。外群には、*Lagocephalus*属のTBT-bp2遺伝子配列(AB901444.1, AB901445.1, AB901453.1, AB901454.1)を使用した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, G. N. Nishihara, C. Urata, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated changes in internal distribution and intra-ovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. *Fish. Sci.*, 84, 723-732 (2018)  
DOI: 10.1007/s12562-018-1209-2
- ② O. Arakawa, T. Takatani, S. Taniyama, R. Tatsuno: Toxins of pufferfish - distribution, accumulation mechanism, and physiologic functions. *Aqua-BioScience Monographs*, 10, 41-80 (2017)  
DOI: 10.5047/absm.2017.01003.0041
- ③ R. Tatsuno, W. Gao, K. Ibi, T. Mine, K. Okita, G. N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa: Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon*, 130, 73-78 (2017)  
DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.03.001

[学会発表] (計12件)

- ① 山田実紗子, 金原葉子, 高 威, 土井啓行, 吉川廣幸, 辰野竜平, 長島裕二, 高谷智裕, 荒川修: 海産フグと淡水フグの TTX/PST 蓄積能. 日本食品衛生学会第114回学術講演会, 2018年
- ② R. Tatsuno, W. Gao, H. Yoshikawa, H. Takahashi, T. Fukuda, M. Furushita, G. N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa: Tetrodotoxin dynamics in the pufferfish *Takifugu rubripes* changes

- depending of its liver development. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, 2017
- ③ W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, H. Yoshikawa, K. Soyano, T. Takatani, O. Arakawa: Tetrodotoxin-specific toxin uptake and maturation-associated toxin accumulation in the pufferfish *Takifugu pardalis*. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, 2017
  - ④ 高威, 辰野竜平, 山口健一, 高谷智裕, 荒川 修: 数種フグにおける PSTBP 相同タンパク質アイソフォーム群の探索. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年
  - ⑤ 金原葉子, 辰野竜平, 征矢野清, 高谷智裕, 荒川 修: ヒガンフグ体内 TTX 分布の性成熟に伴う変化. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年
  - ⑥ W. Gao, R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani, O. Arakawa: Expression of PSTBP homologues in several pufferfish species. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, 2015
  - ⑦ Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：高谷 智裕

ローマ字氏名：(TAKATANI, Tomohiro)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：水産・環境科学総合研究科（水産）

職名：教授

研究者番号（8 桁）：90304972

研究分担者氏名：山口 健一

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI, Kenichi)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：水産・環境科学総合研究科（水産）

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：90363473

研究分担者氏名：山田 明德

ローマ字氏名：(YAMADA, Akinori)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：水産・環境科学総合研究科（水産）

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：40378774

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：辰野 竜平

ローマ字氏名：(TATSUNO, Ryohei)

研究協力者氏名：高 威

ローマ字氏名：(GAO, Wei)

研究協力者氏名：金原 葉子

ローマ字氏名：(KANAHARA, Yoko)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。