

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07569

研究課題名(和文) 麻痺性貝毒を生産する渦鞭毛藻の毒生合成調節の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of toxin synthesis in paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates

研究代表者

長 由扶子(Cho, Yuko)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：60323086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：サキシトキシン類縁体である麻痺性貝毒の生産生物である渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の有毒株と無毒株を比較し、毒生合成調節の機構を追究することで毒性低減のために有用な情報を収集した。麻痺性貝毒は10以上のステップを経て生合成されるが、そのうちの初期の2段階目までの反応を司る酵素及び生成する生合成中間体を解析するための手法として免疫染色及びカラムスイッチングHILIC-MS法を開発した。無毒化の鍵反応が初発の反応であることを明らかにし、さらに生合成反応の場がステップごとに異なる可能性を示唆する結果を得た。予想外の知見から新たな生合成調節機構研究へと展開される成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Saxitoxin and its analogues are potent neurotoxins which are named as paralytic shellfish toxins, collectively. The mechanism of their biosynthesis were investigated by the comparison of the toxic and non-toxic subclones of the dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*. The analytical methods were developed for the expression analysis (the immunohistochemical method for the biosynthetic enzymes and the column switching HILIC-MS method for the biosynthetic intermediates). By these methods, the key steps toward the non-toxic mutation was suggested to be the first few steps in the complicated STX biosynthetic pathway. Moreover unexpectedly, the localization of the enzymes which catalyze the first and the second step were suggested to be different. It leads us to the new hypothesis that there could be some unknown regulation mechanism other than the regulation of the protein expression.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 麻痺性貝毒 サキシトキシン 免疫染色 LC-MS 発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

麻痺性貝毒は主に海産渦鞭毛藻が生産し、プランクトンフィーダーである二枚貝に蓄積され、それを喫食したヒトに口唇のしびれや、運動失調をひきおこし、重篤な場合には呼吸麻痺により死亡に至らしめる強力な毒として知られる。世界中で原因渦鞭毛藻の分布が拡大しつつあり、国際的な問題となっている。原因プランクトンを低減するあるいは毒性を低減することができれば、ダメージを減らすことができるが方策は未だにみつかっていない。渦鞭毛藻のサキシトキシン (STX) 生合成関連コア遺伝子のなかでも生合成初期の反応を触媒する酵素の推定遺伝子 *sxtA4* が渦鞭毛藻の有毒種 (*Alexandrium tamarense*, *A. catenella* など) で検出され、無毒種 (*A. affine*, *A. anderssoni* など) では検出されないことが報告された。さらに連携研究者 (山下) は推定生合成中間体を化学的に合成し、申請者の開発した LC-MS 検出法によって、渦鞭毛藻の同一細胞由来の有毒株 Axat-2 に存在する初期中間体が無毒株 UAT-014-009 にはいずれも存在しないことを明らかにした。生合成初期の変異が無毒化の原因と予想し、無毒化の機構を追求することで原因プランクトンの毒性低減に有用な情報が得られるものと考えた。

## 2. 研究の目的

*A. tamarense* 有毒株、無毒株の麻痺性貝毒初期中間体生合成遺伝子 *sxtA* の野生型及び変異型 mRNA 発現量を比較し、タンパク発現量との相関をみることを目的とした。さらに配列からの推定による機能を化学的に証明するために有毒株から *sxtA* の全長 cDNA を取得し、大腸菌で SxtA 発現タンパクを得、*in vitro* で中間体 A' が生成する反応を触媒するかどうかについても検討することとした。そのために必要な LC-MS 分析法も改良し、より特異性が高く精度のよい方法を開発する。さらに変異型の mRNA が *sxtA* の発現量調節に関わっていることを証明することを当初の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *A. tamarense* の有毒株と無毒株における STX 生合成遺伝子とタンパク発現量比較  
両株から収穫した mRNA を既報のプライマーを用いてリアルタイム PCR に供し、*sxtA4* 及び *sxtG* 遺伝子の発現量を調べた。さらにデータベースから取得した *A. fundyense* の *sxtA4* 及び *sxtG* 遺伝子の塩基配列をもとにしたペプチドを用いて抗 SxtA4 ペプチド抗体作製した。抗血清から IgG 画分に精製後さらにアフィニティ精製した抗体を用いて免疫染色法とウエスタンブロッティングによってタンパク発現量と局在を比較した。

(2) カラムスイッチング HILIC-MS による一斉分析法の開発

生合成中間体とサキシトキシン類縁体は極性やチャージが異なることから従来の HILIC-MS 分析法では一斉分析できなかったことから、原理の異なる 3 種のガードカラムを連結した濃縮部と ZIC-HILIC<sup>®</sup> を用いる分析部を組み合わせ、バルブにより流路を切り替えるカラムスイッチング HILIC-MS による一斉分析法を開発した。*A. tamarense* 有毒株と無毒株の差分解析から有毒株にのみ得られた未知ピークを MSMS や合成標品と比較、同定した。

(3) *A. tamarense* 以外の有毒種、無毒種の分析

本研究にて開発した免疫染色と LC-MS 分析法を *A. catenella* 有毒株、*Gymnodinium catenatum* 有毒株、無毒種の *A. insuetum*, *Prorocentrum triestinum* に応用した。

## 4. 研究成果

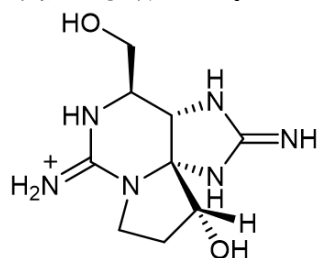
(1) *A. tamarense* 有毒株と無毒株の STX 生合成遺伝子及びタンパク質の発現解析

*A. tamarense* 有毒株と無毒株の STX 生合成遺伝子のうち *sxtA4* と *sxtG* の mRNA 発現レベルを調べたところ、*sxtG* の発現量は同等であるのに対し、*sxtA4* は有毒株で著しく高いことがわかった。さらに渦鞭毛藻の免疫染色法を確立し、タンパク質としての発現を比較した。有毒株細胞において抗 SxtA4 抗体で多くの強いシグナルが検出されること、そのシグナルは細胞内オルガネラに局在することが示唆された。生合成経路で SxtA の次の反応を触媒するアミジノトランスフェラーゼ (SxtG) に対する抗ペプチド抗体では、有毒、無毒にかかわらずシグナルが検出され、さらに SxtG は SxtA4 とは異なる局在を示すことを見出した。ウエスタンブロッティングでは抗 SxtG 抗体で有毒株、無毒株ともに理論長 (43 kDa) と一致するバンドを与え、SxtG は両株で同様に発現していることが示唆された。すなわち無毒株の細胞にも SxtG 酵素がタンパク質として発現していることを支持する結果を得た。

麻痺性貝毒生合成反応は 10 以上のステップを経る複雑な経路であることがわかったが、それぞれが異なるオルガネラで進行する可能性が示唆された。また SxtA の遺伝子及びタンパク質の発現が毒性と関連し、SxtG の遺伝子及びタンパク質は有毒、無毒に関わらず発現していることが明らかとなった。酵素の局在の違いは予想外の結果であり、これまで見出していた代謝阻害剤による STX 生合成阻害が単なる酵素活性の阻害だけでなく、トランスポーターなど反応酵素以外のタンパク質やオルガネラをターゲットにしているのではないかとの仮説へと展開した。

(2) 12 $\beta$ -deoxy-decarbonyl STX の同定  
カラムスイッチング HILIC-MS 分析によって *A. tamarense* 有毒株にのみ検出されたピ

ークの精密質量、組成式から dcSTX から酸素 1 個分失われた構造であることが推定された。dcSTX 標品を化学的に還元して得られた 12 $\alpha$ , $\beta$ -deoxy-decarbomoyl STX と溶出位置及び MSMS スペクトルを比較し、12 $\beta$ -deoxy 体であると同定した。本化合物は渦鞭毛藻から検出された例がなく、生合成あるいは代謝との関連が示唆された。



12 $\beta$ -deoxydecarbomoylsaxitoxin

図 1 渦鞭毛藻から初めて同定された STX 類縁体の構造

### (3) 有毒種、無毒種への応用

*A. tamarense* 有毒株と無毒株を用いて開発した分析方法を他の渦鞭毛藻に応用した。無毒種の *A. insuetum* 及び *P. triestinum* では免疫染色で抗 sxtA4 抗体でのシグナルがみられず、有毒種の *A. catenella* 及び *G. catenatum* では *A. tamarense* 有毒株と同様、細胞内オルガネラに局在するシグナルが検出された。またカラムスイッチング HILIC-MS によって無毒種でも *A. tamarense* 無毒株と同じくアルギニン以外の生合成中間体 (Int-A' 以降すべて) が検出されず STX 生合成系が初期の段階から進行していないことが明らかとなった。すなわち STX 生合成経路のアルギニンにプロピオニル CoA を縮合させる反応が渦鞭毛藻の毒性に寄与する鍵反応であることが示唆された。今後は抗体で検出されているタンパク質が遺伝子配列から予測されたものであるかどうか de novo シークエンスなどで確認したい。またトランスポーターの介在など新たに予想された機構も考慮して STX 生合成調節メカニズムについて研究する予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Mari Yotsu-Yamashita, Spiro Bicyclic Guanidino Compounds from Pufferfish, Possible Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin in Marine Environments, Chem. Eur. J., 24, 7250-7258 (2018). <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201801006>.
2. Yukari Maeno, Yuichi Kotaki,

Ryuta Terada, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita, Six domoic acid related compounds from the red alga, *Chondria armata*, and domoic acid biosynthesis by the diatom, *Pseudo-nitzschia multiseriata*, Sci. Rep., 8, 356 (2018). DOI: 10.1038/s41598-017-18651-w.

3. Tadaaki Tsukamoto, Yukie Chiba, Minoru Wakamori, Tomoshi Yamada, Shunsuke Tsunogae, Yuko Cho, Ryo Sakakibara, Takuya Imazu, Shouta Tokoro, Yoshiaki Satake, Masaatsu Adachi, Toshio Nishikawa, Mari Yotsu-Yamashita, and Keiichi Konoki, Differential binding of tetrodotoxin and its derivatives to voltage-sensitive sodium channel subtypes (Nav1.1 to Nav1.7), Br. J. Pharmacol., 174, 3811-3892 (2017). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13985/full>.

4. Yuta Kudo, Chikafumi Chiba, Keiichi Konoki, Yuko Cho and Mari Yotsu-Yamashita, Dietary administration of tetrodotoxin and its putative biosynthetic intermediates to the captive-reared non-toxic Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. Toxicol., 137, 78-82 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.07.016>.

5. Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Renpei Yoshioka, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, Synthesis and identification of key biosynthetic intermediates for the formation of the tricyclic skeleton of saxitoxin, Angew. Chem. Int. Ed., 56, 5327-5331 (2017). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201612461/full>.

6. Yuko Cho, Shigeki Tsuchiya, Renpei Yoshioka, Takuo Omura, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima, Mari Yotsu-Yamashita, Column switching combined with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of saxitoxin analogues, and their biosynthetic intermediates in dinoflagellates. Journal of Chromatography A, 2016, 1474, 109-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.065>.

7. Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, Biosynthetic route towards saxitoxin and shunt pathway. Scientific Reports, 2016, 6:20340, DOI: 10.1038/srep20340. <http://www.nature.com/articles/srep20340>.

8. Yuko Cho, Shigeki Tsuchiya, Renpei

Yoshioka, Takuo Omura, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, The presence of 12 - deoxydecarbomoyl saxitoxin in the Japanese toxic dinoflagellate *Alexandrium* determined by simultaneous analysis for paralytic shellfish toxins using HILIC-LC-MS/MS, *Harmful Algae*, 2015, 49, 58-67. doi:10.1016/j.hal.2015.09.003.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 2018、平成 30 年度公益社団法人日本水産学会春季大会、「<sup>15</sup>N 同位体標識培地による渦鞭毛藻の麻痺性貝毒及び生合成中間体への <sup>15</sup>N 取り込み挙動の解析」長由扶子、土屋 成輝、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり
2. 2018、日本農芸化学会 2018 年度大会、「クロイソカイメン共生菌が生産する新規有毒二次代謝産物の構造決定」菊池 颯、岡田 華弥、長由扶子、吉田 慎一朗、権 垠相、山下 まり、此木 敬一
3. 2018、日本農芸化学会 2018 年度大会、「記憶喪失性貝毒ドウモイ酸の生合成経路に関する研究」海老根 優香理、小瀧 裕一、長由扶子、此木 敬一、山下 まり
4. 2018、日本農芸化学会 2018 年度大会、「海洋生物における新規テトロドトキシン関連化合物の探索」上山 望、杉本 敬太、長由扶子、此木 敬一、山下 まり
5. 2017、科学研究費補助金 新学術領域研究(研究領域提案型)生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学、第 3 回公開シンポジウム、「巨大ゲノム生物の毒生合成マシナリー探索とゲノム解析の基盤技術開発」、長由扶子
6. 2017、日本農芸化学会東北支部第 152 回大会、「フグ由来のテトロドトキシン関連化合物の合成」杉本 敬太、上山 望、長由扶子、此木 敬一、西川 俊夫、山下 まり
7. 2017、The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations” Biosynthetic pathway of saxitoxin based on the structures of its intermediate, Mari Yotsu-Yamashita, Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and Yasukatsu Oshima.
8. 2017、第 59 回天然有機化合物討論会、「フグの新規スピロ環状グアニジノ化合物の単離、構造決定と海産テトロドトキシンの生合成経路の推定」上山望、杉本敬太、工藤雄大、長由扶子、此木敬一、西川俊夫、山下まり
9. 2017、Tohoku University's Chemistry Summer School, Screening of novel toxic secondary metabolites from symbiotic bacteria of the marine sponge *Halichondria okadai*, Sou Kikuchi, Kayo

Okada, Yuko Cho, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki

10. 2017、Tohoku University's Chemistry Summer School, Screening of biosynthetic intermediates of domoic acid, Yukari Ebine, Yuichi Kotaki, Ryuta Terada, Yuko Cho, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita
11. 2017、科学研究費補助金 新学術領域研究(研究領域提案型)生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学、第 2 回公開シンポジウム、「巨大ゲノム生物の毒生合成マシナリー探索とゲノム解析の基盤技術開発」、長由扶子
12. 2017、第 12 回化学生態学研究会 湯の川プリンスホテル渚亭、「電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルに対する Crambesin B 誘導体の阻害活性」、塚本 匡顕、千葉 雪絵、中崎 敦夫、石川 裕生、中根 嘉祈、長由扶子、西川 俊夫、山下 まり、此木 敬一
13. 2017、第 28 回万有仙台シンポジウム、「フグのテトロドトキシン関連化合物の構造と推定生合成経路」上山 望、杉本 敬太、西川 俊夫、長由扶子、此木 敬一、山下 まり、ポスター
14. 2017、Gordon Conference (Mycotoxins & Phycotoxins), Column switching HILIC-MS for the analysis of saxitoxin analogues and their biosynthetic intermediates in toxic and non-toxic dinoflagellates, Yuko Cho, Shigeki Tsuchiya, Takuo Omura, Kazuhiko Koike, Hiroshi Oikawa, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita.
15. 2017、日本農芸化学会 2017 年度大会、渦鞭毛藻の麻痺性貝毒及び生合成中間体のカラムスイッチング HILIC-HILIC-MS-MRM による分析、長由扶子、土屋 成輝、吉岡 廉平、大村 卓朗、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり
16. 2017、平成 29 年度公益社団法人日本水産学会春季大会、渦鞭毛藻有毒、無毒種の STX 生合成中間体定量と推定 STX 生合成酵素 SxtA4 の発現解析、長由扶子、土屋 成輝、日出間 志寿、大村 卓朗、小池 一彦、及川 寛、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり
17. 2016、Tohoku University's Chemistry Summer School、Screening of the biosynthetic intermediates of paralytic shellfish toxins using a stable isotope-labeled precursors, Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita
18. 2016、第 58 回天然有機化合物討論会、麻痺性貝毒生合成中間体の同定と生合成経路の解明、土屋 成輝、長由扶子、吉岡 廉平、美野輪 高之、此木 敬一、長澤 和夫、大島 泰克、山下 まり
19. 2016、日本農芸化学会東北支部第 151 回

大会、麻痺性貝毒の生合成経路解明に向けた  
予想生合成中間体の合成及び同定、土屋 成  
輝、吉岡 廉平、長 由扶子、此木 敬一、長  
澤 和夫、大島 泰克、山下 まり

20. 2016、平成 28 年度日本水産学会春季大会、  
渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* 有毒株、無  
毒株比較研究 推定 STX 生合成酵素 SxtA の  
免疫化学的手法によるタンパク発現解析、長  
由扶子、土屋 成輝、日出間 志寿、大村 卓  
朗、小池一彦、及川寛、此木敬一、大島泰克、  
山下まり

21. 2015、環太平洋国際化学会議、The  
simultaneous analysis of saxitoxin  
analogues and their biosynthetic  
intermediates by HILIC-LC-MS/MS, Yuko cho,  
Renpei Yoshioka, Shigeki Tsuchiya,  
Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima and Mari  
Yotsu-Yamashita

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/about/organization/graduate/bukka/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長 由扶子 (YUKO CHO)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：60323086

### (2) 研究分担者

日出間 志寿 (SHIZU HIDEWA)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：30241558

### (3) 連携研究者

山下 まり (MARI YAMASHITA)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：50192430

此木 敬一 (KEIICHI KONOKI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：40292825