

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07594

研究課題名(和文)シガテラ魚毒化機構の解明

研究課題名(英文)Verification of biooxidation of ciguatoxins leading to species specific toxin profiles

研究代表者

池原 強 (Ikehara, Tsuyoshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・教授

研究者番号：90359951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯や亜熱帯に生息するシガテラ魚によって引き起こされるシガテラ中毒の原因物質であるシガトキシン(CTX)の魚体内組成は、魚の生育環境や魚種によって異なり、シガテラ魚の毒化機構は未だ明らかにされていない。本研究では、シガテラ魚の毒化機構を明らかにするため、in vitro CTX酸化反応系の構築と酸化酵素の活性検出を行い、シガテラ魚及びその近縁種の肝臓抽出液を調製し、CTX酸化活性の比較を行った。その結果、渦鞭毛藻が生産するCTX4A/4B、CTX3Cが魚体中で酸化される過程をヒトCYP3A4、ヒトミクロソーム、及びシガテラ魚肝S9を用いたin vitro 実験で検証した。

研究成果の概要(英文)：Ciguatera fish poisoning is a clinical syndrome that causes neurological symptoms in patients and affects more than 50,000 people per year. This foodborne illness results from eating fish from warm water regions around the world that contain natural marine toxins that are collectively known as ciguatoxins (CTXs). In the Pacific, these toxins are produced by the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, which accumulates in fish through the food chain and undergoes oxidative modification, giving rise to numerous analogs. In this study, we aimed to verify the biooxidation process of CTXs in vitro using CTX4A/4B and CTX3C as substrates, and recombinant human CYP3A4, fish liver S9 fractions, and microsomal fractions as oxidizing enzymes. The reaction products were identified by LC-MS/MS analysis using reference toxins, which unambiguously confirmed the production of CTX1B, 54-deoxyCTX4B, 52-epi-54-deoxyCTX1B, 2-hydroxyCTX3C, and 2,3-dihydroxyCTX3C.

研究分野：海洋自然毒

キーワード：シガテラ シガトキシン 酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

シガテラはサンゴ礁域に生息する魚類(シガテラ魚)に起因する自然毒食中毒であり、年間2~6万人の被害が推定されている。原因毒のシガトキシン類(CTXs)は、渦鞭毛藻(*Gambierdiscus toxicus*)によって産生され、食物連鎖によって移行することから個体変化と地域差が大きく、多種類かつ超微量であるため、有毒魚の蒐集や分析に必要な標準毒の確保が困難であった。このような中、太平洋型CTXsの23成分の構造が決定され、基本骨格がCTX1BとCTX3Cに大別される事、同族体は分子末端の酸化や開環によって生じることが明らかにされ、現在30種類以上の同族体が報告されている。さらに、CTX類10成分を標品としてLC-MS/MS分析法が開発された。しかし、食物連鎖による毒化要因の追跡解析やシガテラ魚生体内における毒化機構の詳細は明らかにされていない。そこで、CTX酸化能が高く、試料の入手経路が確保されているバラフエダイ等の沖縄産シガテラ魚でCTX酸化酵素の活性を調べることで毒化機構の解明が可能である。

2. 研究の目的

熱帯・亜熱帯域の魚類は、食物連鎖を介して有毒渦鞭毛藻の毒シガトキシン(CTX)を蓄積し、食中毒(シガテラ)の原因となる。原因毒のCTX類は30種類以上の同族体が報告されており、食物連鎖の過程でシガテラ魚生体内において、毒性の弱い非酸化型から毒性の強い酸化型へ変換される事が推定されている。しかし、シガテラ魚に含まれるCTX類は多種類かつ超微量であるため、分析に必要な標準毒の確保が難しくその毒化機構は明らかにされていない。そこで本研究では、大量蒐集した沖縄産シガテラ魚から抽出精製して作製したCTX標準毒を基質にして、CTX酸化能が高いと考えられるバラフエダイ等のシガテラ魚肝臓から肝ホモジェネートを作製してそのCTX酸化活性を調べ、魚種間での活性比較によってシガテラ魚の毒化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

肝臓の異物代謝及び酸化反応に広く寄与し、よく研究されているヒトCYP3A4やヒト肝ミクロゾームを利用してCTXの*in vitro*酸化の反応条件を検討し、*in vitro*CTX酸化反応系を構築した。この反応系を利用してシガテラ魚肝臓から調製した肝ホモジェネート(S9画分)中のCTX酸化酵素の活性を検出した。LC-MSによる酸化生成物の分析を行うことによって魚種間のCTX酸化活性プロファイルを作成し、魚体内でのCTX酸化反応について明らかにした。LC-MS分析は、既報(文献1)の一斉分析法に準じて、国立医薬品食品衛生研究所の協力によって行われた。

実験試料は、沖縄県周辺海域に生息するシガテラ魚3種9個体(*Lutjanus bohar*、

L.monostigma、*Oplegnathus punctatus*)及びその近縁種で非シガテラ魚と知られる2種9個体(*L.gibbus*、*L.fulviflamma*)合わせて18個体を蒐集し、肝臓から肝組織抽出液(S9画分)を調製した。S9画分からさらに精製を進め、サイトゾール(Cyt)画分とミクロゾーム(Mic)画分を調製し、S9、Cyt、Micの各画分を*in vitro*CTX酸化反応系において各酵素溶液として使用した。

4. 研究成果

基質としてCTX4A/4B、及びCTX3Cを用いてヒトCYP3A4及びヒト肝ミクロゾームによるこれら基質の酸化反応を調べるため、反応条件(反応時間、反応温度、基質及び酵素量等)を検討し、*in vitro*におけるCTX酸化反応系の構築を試みた。その結果、反応条件として反応温度37℃、反応時間60分による*in vitro*CTX酸化反応系を構築することができた。LC/MSによるCTX酸化反応生成物の分析の結果、CTX4A/4Bを基質にした場合、ヒトCYP3A4による*in vitro*酸化反応において、CTX4A/4Bの酸化型であるCTX1B、M-*seco*-CTX4A/4B、及び7-hydroxyCTX4A/4Bが検出され(図1)、CTX3Cを基質にした場合、51-hydroxyCTX3Cが検出された(図2)。また、CTX4A/4Bを基質にした場合、ヒト肝ミクロゾームによる酸化反応物としてCTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、及びM-*seco*-CTX4A/4Bが検出された。これらの結果から、ヒトCYP3A4及びヒト肝ミクロゾームが*in vitro*におけるCTX酸化反応に利用可能であることが示された。

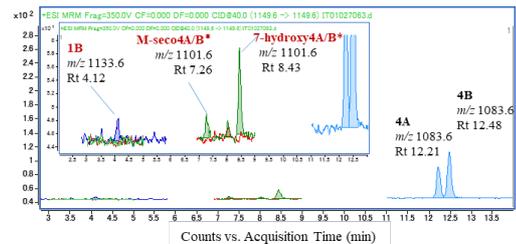


図1. ヒトCYP3A4によるCTX4A/4Bの*in vitro*酸化

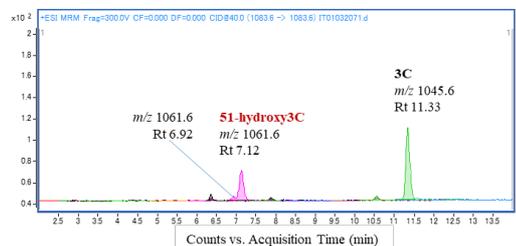


図2. ヒトCYP3A4によるCTX3Cの*in vitro*酸化

次に、表1に示した沖縄県周辺海域に生息するシガテラ魚3種9個体(バラフエダイ:*L.bohar*、イッテンフエダイ:*L.monostigma*、イシガキダイ:*O.punctatus*)及びその近縁種で非シガテラ魚と知られる2種9個体(ヒメフエダイ:*L.gibbus*、ニセクロホシフ

エダイ (*L. fulviflamma*) を蒐集し、肝組織抽出液 (S9 画分) を調製して、S9 画分に含まれる CTX 酸化酵素の活性の検出を行った。その結果、CTX4A/4B を基質に沖縄県周辺海域で代表的なシガテラ魚であるバラフエダイ (*L. bohar*) S9 画分を用いた *in vitro* CTX 酸化反応の場合、CTX4A/4B の酸化型である 54-deoxyCTX1B 及び、52-*epi*-54-deoxyCTX1B が検出された (図 3)。また、CTX 3C を基質にした場合は、CTX 3C の酸化型である 2,3-dihydroxyCTX3C が検出された (図 4)。さらに、CTX 酸化酵素の精製を進めるために、肝 S9 画分からミクロソーム画分及びサイトゾール画分の分離を行い、それぞれの画分による CTX4A/4B の酸化活性を調べたところ、CYP3A4 などの酸化酵素を含むミクロソーム画分による酸化反応において、S9 画分と同様に CTX4A/4B の酸化型である 52-*epi*-54-deoxyCTX1B 及び、54-deoxyCTX1B が検出された (図 5)。これらの結果から、54-deoxyCTX1B や 2,3-dihydroxyCTX3C 等の酸化型の CTX は、魚肝中に存在する CYP 等の酸化酵素によって CTX4A/4B や CTX3C が酸化された結果生じた酸化生成物であることが示された。

表 1. 蒐集した魚種リスト

Sample No	Species	Sample size	
		Body weight (kg)	Body length (cm)
1	<i>Lutjanus bohar</i>	3.80	63.0
2		1.50	45.0
3		1.10	42.0
4		3.80	62.0
5		0.50	31.0
6		0.50	30.0
7	<i>Lutjanus monostigma</i>	1.70	47.0
8	<i>Oplegnathus punctatus</i>	1.10	30.0
9		2.00	50.0
10	<i>Lutjanus gibbus</i>	0.88	37.0
11		0.82	38.0
12		0.72	36.0
13		0.86	38.5
14		0.84	38.0
15		0.42	29.0
16	<i>Lutjanus fulviflamma</i>	0.36	27.5
17		0.37	26.0
18		0.42	28.0

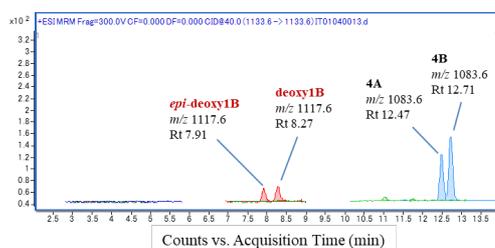


図 3. バラフエダイ肝臓 S9 画分による CTX4A/4B の *in vitro* 酸化

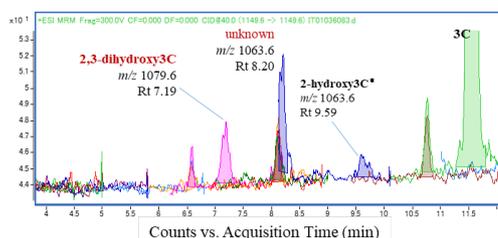


図 4. バラフエダイ肝臓 S9 画分による CTX3C の *in vitro* 酸化

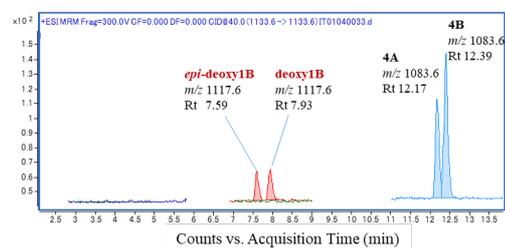


図 5. バラフエダイ肝臓 Mic 画分による CTX4A/4B の *in vitro* 酸化

バラフエダイに加えて、沖縄県周辺海域で代表的なシガテラ魚であるイッテンフエダイ (*L. monostigma*) 及びイシガキダイ (*Oplegnathus punctatus*) について同様の分析を行ったところ、CTX4A/4B 及び CTX3C を基質にした場合、イッテンフエダイ肝 S9 を用いた *in vitro* 酸化実験では、CTX4A/4B 及び CTX3C の酸化型である CTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、2-hydroxyCTX3C が検出され、イシガキダイ肝 S9 を用いた *in vitro* 酸化実験でも同じように CTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、M-*seco*-CTX4A/4B、2,3-dihydroxyCTX3C、51-hydroxyCTX3C が検出された。

一方、これらシガテラ魚の近縁種で、沖縄県周辺海域で非シガテラ魚 (無毒魚種) として知られるヒメフエダイ (*L. gibbus*) 及びニセクロホシフエダイ (*L. fluviflamma*) の肝 S9 を用いた *in vitro* 酸化反応では、酸化型 CTX である *epi*-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、及び CTX1B の高いピークが検出され、さらに、シガテラ魚に比べこれらの魚種の方が肝臓中の CTX 酸化活性が高いことが分かった (図 6)。

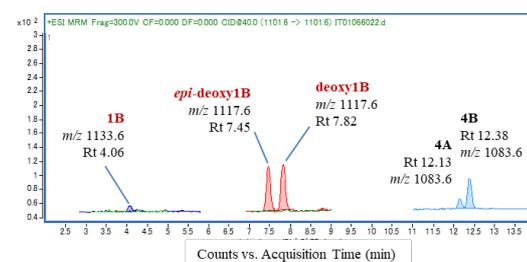


図 5. ヒメフエダイ肝臓 S9 画分による CTX4A/4B の *in vitro* 酸化

これらの結果から、ヒト CYP3A4、ヒトミクロソーム、及びシガテラ魚肝 S9 による CTX4A/4B 及び CTX 3C の *in vitro* 酸化反応は、図 6 に示すようにその分子両端で起こることが分かった。また、渦鞭毛藻が生産する CTX4A/4B、CTX3C が魚体中で酸化される過程をヒト CYP3A4、ヒトミクロソーム、及びシガテラ魚肝 S9 を用いた *in vitro* 実験で検証し、シガテラ魚毒組成の形成に寄与していると推定した。CTX4A/4B の酸化物として 52-*epi*-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、

CTX1B を検出し、酸化が更に進行することや M 環の開環も示唆された。さらに、バラフエダイ肝 S9 に見出された CTX4A/4B 酸化活性の強さは、個体間による違いがみられ、イッテンフエダイとの種間による酸化活性の強さの違いも見られたことから、酸化活性の違いがシガテラ魚毒組成の個体差や種間差を生む原因となると考えられる。

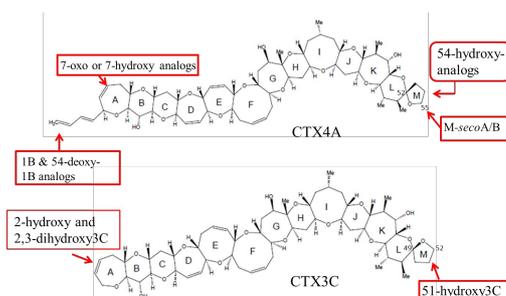


図 6 . 魚肝 S9 及びヒト CYP3A4 による CTX4A/4B、CTX3C の酸化部位

< 引用文献 >

1. K. Yogi, N. Oshiro, M. Hirama, T. Yasumoto, Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. *Anal. Chem.* 83, 8886-8891 (2011)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

T. Ikehara, J. Nakashima, S. Nakashima, T. Yasumoto: Different responses of primary normal human hepatocytes and human hepatoma cells toward cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, 査読有, *Toxicon* Vol 105, 4-9 (2015)

T. Nakagawa, T. Ikehara, M. Doiguchi, Y. Imamura, M. Higashi, M. Yoneda, T. Ito: Enhancer of Acetyltransferase Chameau (EACHm) Is a Novel Transcriptional Co-Activator, 査読有, *PLoS ONE*, 10(11): e0142305 (2015)

池原強: 下痢性貝毒の簡易検査法の開発 国際基準の導入へ向けた取り組み、査読無し、*海洋水産エンジニアリング*, 122; 117-121(2015)

T. Ikehara, S. Nakashima, J. Nakashima, T. Kinoshita, T. Yasumoto, Efficient production of recombinant PP2A at a low temperature using a baculovirus expression system, 査読有, *Biotechnology Reports*, Vol. 11, P86-P89,

(2016)

池原強, 木下翼, 黒川純花, 中島志穂子, 前川公彦, 大城直雅, 安元健: 「タンパク質脱リン酸化酵素 2A (PP2A) を利用した下痢性貝毒簡易検査法の評価」, 査読有, *日本水産学会誌*. 83(3), 367-372, (2017)

T. Ikehara, K. Kuniyoshi, N. Oshiro, T. Yasumoto, Biooxidation of Ciguatoxins Leads to Species-Specific Toxin Profiles, 査読有, *Toxins*, 2017, 9, 205; doi:10.3390/toxins9070205

[学会発表](計 6 件)

池原強, シガテラ魚 CTX 酸化酵素の検出, 第 29 回海洋生物活性談話会, 2015 年

池原強, ヒト正常肝細胞 (h-Nheps) 及びヒト肝がん由来細胞 (HepG2) に対するミクロシチン-LR の毒性評価, 日本分子生物学会日本生化学会合同大会, 2015 年
池原強, 酸化酵素によるシガトキシンの化学構造修飾, 第 30 回海洋生物活性談話会, 2016 年

池原強, ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) 可食部試料を用いた PP2A 活性阻害法による下痢性貝毒簡易分析法の評価, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年

IKEHARA Tsuyoshi, Verification of biooxidation products of ciguatoxins leading to species specific toxin profiles, First Workshop on Emerging Toxins (Spain), 2016 年

池原強, 酸化酵素によるシガトキシンの化学構造修飾, シガトキシン関連資料展示記念ワークショップ, 2018 年

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池原 強 (IKEHARA Tsuyoshi)
国立研究開発法人水産研究教育機構水産
大学校・食品科学科・教授
研究者番号：90359951

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

大城 直雅 (OSHIRO, Naomasa)
国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管
理部第二室・室長
研究者番号：20507032

(4) 研究協力者

安元 健 (YASUMOTO, Takeshi)