

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：33114
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K06241
 研究課題名(和文) フグ毒結合タンパク質の構造と機能に関する研究 - フグ毒に対する生体防御機構 -

 研究課題名(英文) Structure and function of pufferfish toxin, tetrodotoxin, binding proteins as biological defense agent

 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イソガニ体液中のTTX結合タンパク質とフグ血漿のTTX結合タンパク質について、組換えタンパク質を作製し、X線結晶回折を行い、TTXとの結合様式を調べることを目的とした。イソガニ体液TTX結合タンパク質HSTBPは、一次構造を解明した。HSTBPは3つのサブユニットから構成されていた。C末端領域のサブユニット2の組換えタンパク質を作製した。作製した組換えタンパク質rHSTBP-sub2は封入体として存在したため結晶化には至らなかったが、TTXと結合することが確認できた。
 フグ血漿のTTX結合タンパク質PSTBP 2は組換えタンパク質の合成に成功したが、結晶化できず立体構造を予測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 フグ毒テトロドトキシン(TTX)に対する生体防御機構の解明に資するため、イソガニ体液およびフグ科魚類血漿中のTTX結合タンパク質の組換えタンパク質を作製し、X線結晶回折を試みた。いずれも結晶化できなかったが、イソガニ体液TTX結合タンパク質の一次構造を決定し、新規タンパク質であることが分かった。作製した組換えタンパク質はTTXとの結合が確認された。フグ血漿TTX結合タンパク質では、立体構造を予測し、TTX結合部位が推測された。現在、フグ毒中毒の効果的な解毒薬がないため、これらTTX結合タンパク質はフグ毒中毒の解毒薬や治療法の開発に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pufferfish and tetrodotoxin (TTX)-bearing animals resist the administration of TTX, by which they could accumulate high levels of TTX in their body. It is thought that one of the resistance mechanisms against TTX is the occurrence of TTX-binding proteins, decreasing the toxicity of TTX. To examine the biological defense of TTX-bearing animals, we attempted X-ray crystal diffraction analysis of TTX-binding proteins derived from the shore crab *Hemigrapsus sanguineus* hemolymph and pufferfish plasma. The primary structure of TTX-binding protein from the crab was elucidated, composing three subunits. Subunit 2 with a molecular mass of 65 kDa in the C-terminus region appeared to bind TTX at a molar ratio of 1:1. The recombinant protein was present in the inclusion body and did not crystallize. The recombinant TTX-binding protein (PSTBP 2) from the pufferfish was succeeded in production but not crystallized. PSTBP 2 has a barrel-shaped structure, to which TTX was presumed to be bound.

研究分野：水産学

キーワード：水産学 生体分子 テトロドトキシン 機能性タンパク質 生体防御

1. 研究開始当初の背景

フグは餌を介して経口的にフグ毒テトロドトキシン (TTX) を摂取し、肝臓や卵巣などに高濃度に蓄積し、長期間保持することが給餌飼育実験で証明され、フグ養殖において TTX との接触を断つことで“無毒フグ”の産出が可能になった。しかしながら、フグがどのようにして TTX を取り込み、蓄積するかという毒化機構の根本的な部分は科学的には解明されていない。一方、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、例えば、フグ科魚類血漿には他魚種にはみられない TTX 結合タンパク質 PSTBP (pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin-binding protein) が存在し、肝臓への TTX 取り込みにはトランスポーターが関与していると推測されている。また、卵巣ではフグ毒の一部は卵黄タンパク質ピテロゲニン断片タンパク質と結合していることが明らかにされ、各組織でいろいろなタイプのタンパク質が毒化にかかわっていることが分かってきた。

フグや TTX 保有動物は、非保有動物に比べて TTX 投与に対して高い耐性を示すものの、最終的には TTX 投与により死亡する。これは、“フグにとっても TTX は毒である”ことを示している。したがって、フグが体内に高濃度の TTX を取り込み、蓄積するには、TTX に対する何らかの防御機構が必要になる。また、甲殻類イソガニはフグ毒をもたない“無毒種カニ”でありながら、例外的に TTX 投与に対して抵抗性を示し、体液中に TTX と特異的に結合するタンパク質成分が見出され、この成分は TTX のマウス致死作用を中和することが報告されているが、タンパク質の構造や機能については不明である。

2. 研究の目的

フグをはじめ TTX をもつ動物は TTX 投与に対して高い抵抗性を示し、これが TTX 保有動物の TTX に対する生体防御機構の一因と考えられている。この TTX 耐性には、TTX が特異的に作用する末梢神経 Na イオンチャネルのアミノ酸変異による TTX 不感受性と、組織に存在する TTX 結合タンパク質による減毒が関与している。そこで、本研究では、フグとイソガニがもつ TTX 結合タンパク質の構造と機能を調べ、生体防御としての役割を明らかにすることを目的に、フグ血漿の PSTBP とイソガニ体液の TTX 結合タンパク質 (*Hemigrapsus sanguineus* TTX-binding protein、HSTBP) を対象として、1) まず、タンパク質一次構造が明らかになっていない HSTBP を精製し、cDNA クローニングでタンパク質一次構造を決定する。2) 次に、PSTBP と HSTBP それぞれの組換えタンパク質を合成し、3) X 線結晶回折による立体構造解析を行うこととした。

3. 研究の方法

1) イソガニ体液 TTX 結合タンパク質 (HSTBP)

HSTBP の精製と性状

イソガニ体腔から採取した体液を試料とし、これに TTX を加えて 4℃ で 30 分間静置し、体液試料に TTX を結合させた。限外ろ過 (分画分子量 5000) で遊離の TTX を除き、得られた高分子画分を硫酸アンモニウムで塩析し、30~50% 硫酸画分を調製した。これを Con A-Sepharose カラム、MonoQ 5/50 陰イオン交換 HPLC、分取電気泳動に付し、最後に MonoQ 5/50 イオン交換 HPLC で精製して HSTBP を単離した。HSTBP は 280nm における吸光度でモニターし、各溶出画分の TTX は LC-MS/MS で測定した。

HSTBP 精製品の分子量は TSKgel G3000SWxL ゲル濾過 HPLC および SDS-PAGE で測定し、アミノ酸シーケンサーで N 末端アミノ酸配列を分析した。

HSTBP のクローニング

イソガニ内臓混合物から全 RNA を抽出し、オリゴ (dT) -セルロースカラムで mRNA を精製した。これを逆転写後、HSTBP の部分アミノ酸配列から設計した遺伝子特異プライマーを用いた RACE 法で HSTBP 遺伝子を増幅し、クローニングにより標的遺伝子の全塩基配列を決定した。

HSTBP 組換え体の作製

HSTBP 発現コンストラクトの作製 HSTBP の C 末端側サブユニット (HSTBP-sub2) 遺伝子情報に基づいて、大腸菌によるタンパク質発現に適した配列に改変したものを合成し、pCR-TOPO ベクターに挿入したプラスミドを得た。本プラスミドを NdeI および BamHI で順次反応させることで両端に粘着末端をもつ DNA 断片を調製した後、pET16 発現ベクターについても同様に消化させて直鎖化した。両者を混合し、T4DNA リガーゼで結合したものをクローニング用大腸菌 DH5 アルファに形質転換し、増幅したプラスミドを精製し、これを HSTBP-sub2 発現コンストラクトとした。

HSTBP-sub2 の発現 前述の発現コンストラクトをタンパク質発現用大腸菌 Rosetta-Gami B (DE3) pLysS に形質転換し、HSTBP-sub2 発現大腸菌とした。この大腸菌を選択用抗生物質 (ク

ロラムフェニコール 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびアンピシリン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む LB 培地に接種し、振とう培養槽で 37、一昼夜前培養した。前培養後に前述と同様の方法で予備培養した。予備培養した培地に終濃度 0.3 mM イソプロピル -D-チオガラクトシド (IPTG) を添加し、タンパク質発現の誘導を行い、菌体を遠心分離により回収した。

HSTBP-sub2 の精製とリフォールディング 前述の条件で HSTBP-sub2 は封入体として発現することが明らかとなった。封入体は 1% トリトン X100、0.01% リボヌクレアーゼおよび 0.01% デオキシリボヌクレアーゼを含む 150 mM NaCl-50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で菌体を溶解させた後、遠心分離して沈殿として得た。HSTBP-sub2 には pET16 由来のヒスチジンタグが付加されているため、得られた封入体を 6 M グアニジン塩酸-150 mM NaCl-50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で可溶化し、これをニッケルキレートカラムに結合させた。20 mM イミダゾールを加えた緩衝液で非吸着成分を洗浄し、500 mM イミダゾールを加えた緩衝液で HSTBP-sub2 を溶出した。

可溶化された HSTBP-sub2 に β -メルカプトエタノールを加え暗所で一晩静置しジスルフィド結合を解離した。還元された HSTBP-sub2 は 1 mM 還元型グルタチオン-0.1 mM 酸化型グルタチオン-500 mM L-アルギニン-150 mM NaCl-50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に滴下した。全量を滴下後、4 で 24 時間攪拌しリフォールディング反応を完了させた。その後、透析膜 (分画分子量 3,500) を用いて 500 mM L-アルギニン-150 mM NaCl-50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、還元型および酸化型グルタチオンを除去してリフォールディングされた HSTBP-sub2 を得た。HSTBP-sub2 の分子量は SDS-PAGE もしくは Superdex S200 ゲルろ過 HPLC で確認した。

HSTBP-sub2 組換えタンパク質と TTX の結合能

HSTBP-sub2 組換えタンパク質 (rHSTBP-sub2) と TTX の結合を調べるため、溶媒を 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に置換し、限外ろ過 (分画分子量 5000) で濃縮した。rHSTBP-sub2 (約 0.1 μmol) に過剰量の TTX (4.5 μmol) を添加して 4 で 3 時間静置した後、Sephacryl S-300 ゲル濾過カラムグラフィーに供した。溶出画分を 280nm の吸光度でモニターし、タンパク質は Protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いる蛍光検出法で、TTX は LC-MS/MS でそれぞれ測定した。

2) フグ科魚類血漿 TTX 結合タンパク質 (PSTBP)

トラフグ血漿 TTX 結合タンパク質組換え体 PSTBP の作製

トラフグ PSTBP にはホモログが複数存在する。このうち、PSTBP 1 および PSTBP 2 について、ヒスチジンタグ融合組換え体を合成した。具体的には、組換え体の遺伝子配列を組み込んだトランスファクターを用いて組換えバキュロウイルスを作製し、カイコに感染させた。蛹とバッファー (25 mM Tris-HCl (pH 7.4)-500 mM NaCl-0.5% CHAPS) を懸濁し、チオウレアを加えて超音波処理後、HisTrapExcel を用いて精製した。SDS-PAGE により組換え体が含まれる画分を決定し、統合して PBS(-) で透析した。ここで得られた組換え体は純度が低かったため、Ni-Sepharose アフィニティークロマトグラフィー、RESOURCE Q 陰イオン交換クロマトグラフィーおよび Superdex75 ゲル濾過 HPLC で順次精製した。

トラフグ血漿 TTX 結合タンパク質 (PSTBP 2) の精製および結晶化

カイコ蛹で発現させた PSTBP2 は C 末端側にヒスチジンを付加させており、第一段階の精製として Ni-Sepharose によるアフィニティークロマトグラフィーを行った。カイコ蛹を懸濁 buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.4)-500 mM NaCl-0.5% CHAPS) を添加して超音波破碎後、上清を Ni-Sepharose カラムに付した。Wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)-400 mM NaCl-50 mM imidazole) で洗浄後、Elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)-400 mM NaCl-200 mM imidazole) で PSTBP 2 を溶出した。PSTBP 2 を含む溶液は 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析を行った。PSTBP 2 を RESOURCE Q 陰イオン交換カラムに付し、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で NaCl 濃度が 25 カラム分で 0 から 0.66 M まで上がるように濃度勾配をかけて溶出させた。PSTBP 2 溶液を濃縮後、Superdex75 ゲル濾過 HPLC で分画した。PSTBP 2 を濃縮後、Crystal Screen HT、Wizard Classic 1&2、Wizard Classic 3&4 のキットを用いて 20 と 4 で結晶化を試みた。

4. 研究成果

1) イソガニ体液中の TTX 結合タンパク質 (HSTBP)

TTX 結合タンパク質は Con A-Sepharose カラムクロマトグラフィーにおいて 150 mM β -D-mannopyranoside-500 mM NaCl-10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 溶出画分に検出された。最初の MonoQ 5/50 イオン交換 HPLC では、NaCl 濃度 0.6-0.8M 付近で溶出された。これを分取電気泳動に付し、再度 MonoQ 5/50 イオン交換 HPLC に供したところ、2 つの TTX 結合タンパク質が得られ、このうち、タンパク質量および TTX 結合力が大きかった Peak を HSTBP とした (図 1-A)。HSTBP はネイティブ-PAGE で単一バンドを与え (図 1-B) 分子量はゲル濾過 HPLC で 400kDa と見積もられ、還元剤存在下での SDS-PAGE で分子量 88 kDa、65kDa および 26kDa にバンドが検出された (図 1-C)。カラムクロマトグラフィーの挙動から、HSTBP は分子量 400kDa の酸性糖タンパク質で、分子量 88 kDa、65kDa、26kDa の 3 つのサブユニット (分子量の大きい順にサブユニット 1、2、3 とする) から構成されることがわかった。

各サブユニットの N 末端アミノ酸配列から遺伝子特異プライマーを設計して cDNA クローニングを行い、全長 5391bp を解析した。cDNA の ORF は 5049bp で、1683 アミノ酸残基をコードして

おり、Arg³⁴ からが成熟タンパク質で、3つのサブユニットはサブユニット3 (Arg³⁴-Gln²⁶¹)、サブユニット1 (Asp²⁶²-Phe¹¹³⁸)、サブユニット2 (Val¹¹³⁹-Ser¹⁶⁸³)の順に連続的にコードされていた。成熟タンパク質 (Arg³⁴-Ser¹⁶⁸³) は分子量 185,080.6、等電点 5.2 と推定され、二量体と考えると精製時の挙動と一致する。

BLAST 検索の結果、HSTBP は甲殻類の血リンパ凝固タンパク質と 30%程度の相同性を示したが、一次構造が一致するタンパク質は見られず新規タンパク質と考えられた。C末端領域のサブユニット2は、卵黄タンパク質ビテロゲン断片タンパク質と約 20%の相同性が見られた。代表者らはヒガンフグ卵巣からフグ毒結合タンパク質としてビテロゲン断片タンパク質 vWF type D ドメインを明らかにしているため、サブユニット2が TTX 結合に関与しているものと推定し、サブユニット2に対して組換えタンパク質 (rHSTBP-sub2) を作製することにした。

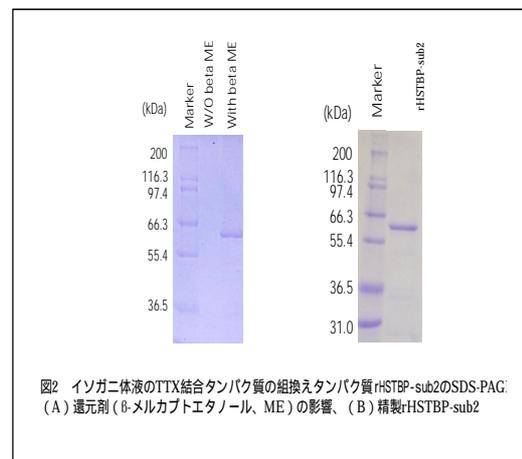
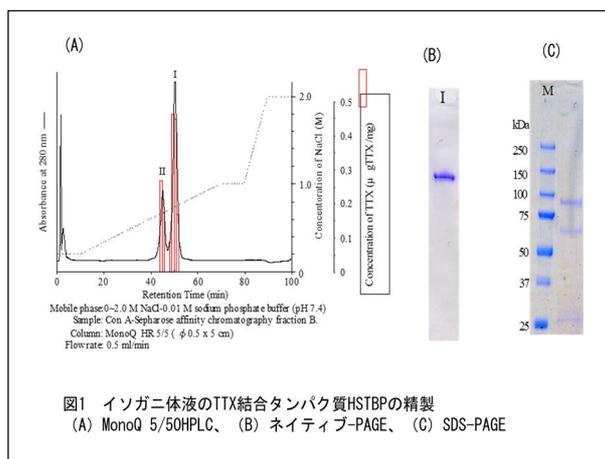
組換えタンパク質 rHSTBP-sub2 は封入体画分に検出された。グアニジン塩酸で可溶化させたものについて SDS-PAGE で分子量を確認したところ、還元剤とともに変性させた試料では設計上の分子量である 63 kDa 付近にバンドが観察されたが、還元剤を添加しない場合バンドはゲル内に観察されなかった (図 2-A)。これは分子間にジスルフィド結合が存在するため巨大な分子となり泳動ゲル内に進入できなかったと考えられ、ゲルろ過 HPLC の結果から、600 kDa 以上の複合体として存在することが示唆された。

そこで本実験では、HSTBP-sub2 に対して可溶化および還元・再酸化を伴うリフォールディング操作を実施した。還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの比率については 1:10 から 10:1 まで段階的に調製して沈澱の形成を指標に検討したところ、1 mM 還元型グルタチオンおよび 0.1 mM 酸化型グルタチオンの混合比が最も沈澱が少なかったことから、還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの比率は 10:1 が最適と判断した。リフォールディング後の HSTBP-sub2 について SDS-PAGE に供したところ、目的サイズの単一バンドが確認でき、リフォールディング操作による試料の分解などは認められなかった (図 2-B)。

本実験により、HSTBP-sub2 を大腸菌発現系で得ることができた。しかし、リフォールディングされた HSTBP-sub2 溶液からアルギニンを除去し、濃縮したところ不溶性の沈殿を形成したため、本実験で得られた HSTBP-sub2 をタンパク質結晶作製に供することができなかった。不溶性の原因として、リフォールディング後の HSTBP-sub2 に遊離のシステイン残基が残存しており、濃縮により他の分子と再結合したことが考えられる。今後結晶化する際には、リフォールディング後にシステイン残基をマスクする必要があると考える。

今回、HSTBP の N 末端のサブユニット3および中間のサブユニット1について検討できなかった。HSTBP は3つのサブユニットで分子を構成しているため、サブユニットの存在が TTX 結合タンパク質の構造安定性に寄与していることも考えられ、全長を含む発現コンストラクトの作製が今後の課題となる。

組換えタンパク質 rHSTBP-sub2 はアルギニンを除くと凝集したが、TTX との結合を調べるためアルギニンを除いた 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に置換してみた。溶液はやや懸濁していたが、これに過剰量の TTX を添加して、本混合物を Sephacryl S-300 ゲル濾過カラムに付した。その結果、タンパク質はカラムから回収され、タンパク質画分から TTX が検出された。目的タンパク質 rHSTBP-sub2 の溶解性に問題はあがるが、カラムから回収されたタンパク質は SDS-PAGE で rHSTBP-sub2 と同じ位置に検出され (図示せず)、タンパク質と TTX の結合量を求めたところ、両者はモル比 1:1 で結合していることが明らかになった。



2) フグ科魚類血漿 TTX 結合タンパク質 (PSTBP)

PSTBP は一次構造が明らかにされており、公開されている遺伝子情報をもとに組換えタンパク質の作製を行った。PSTBP はリボカリンファミリータンパク質で、リボカリンに特有の バレル

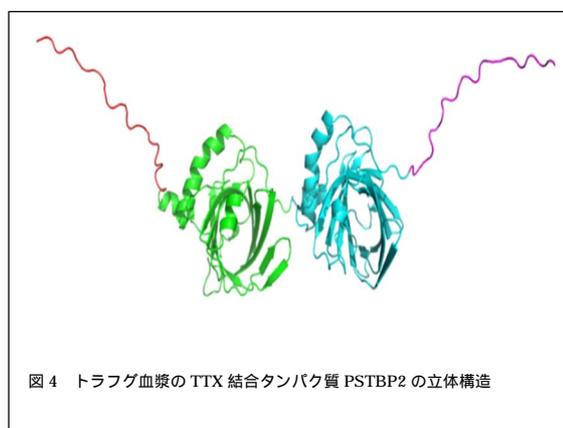
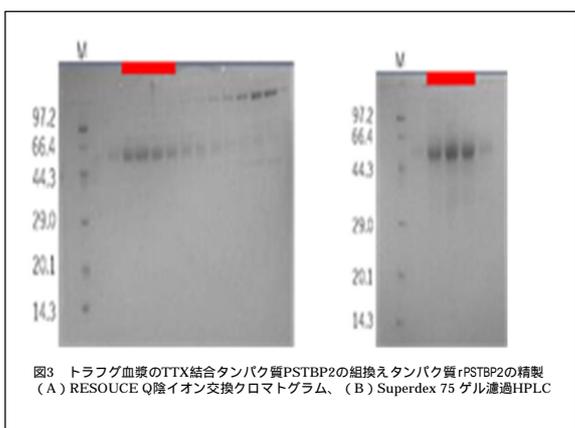
構造が 2 つ連なってできたタンパク質であることが知られている。リポカリンは糖含有率が高く、糖鎖がタンパク質の水溶性に大きく寄与しているため、今回は糖鎖付加が起こるバキュロウイルス・カイコ発現系を用いた。PSTBP は複数のホモログが存在しており、TTX との結合性が示唆されている PSTBP 1 と PSTBP 2 を合成した。しかし、PSTBP 1 は精製度が上がり量も少なかったため、1 回の合成で終了した。PSTBP2 については、1 回目の合成で結晶化条件のスクリーニングに必要な純度(90%以上)とタンパク質量(2 mg 以上) の組換え体を得ることができたので、さらに数回合成した。

X 線結晶回折するには、目的タンパク質を結晶化しなければならない。そのため、合成した rPSTBP 2 を精製した。RESOURCE Q イオン交換カラムによる分離では PSTBP 2 と夾雑タンパク質の 2 つのバンドが確認された(図 3-A)。PSTBP2 の画分を分取し、Superdex 75 ゲル濾過クロマトグラフィーに供した結果、単一のバンドが得られた(図 3-B)。そこで、3 種類のキットを用いて 20 と 4 で PSTBP 2 の結晶化を行ったが結晶は得られなかった。また、TTX の結合様式を解明するために PSTBP 2 とモル比で 10 倍量の TTX を添加した状態での結晶化も試みたが、結晶は得られなかった。

rPSTBP 2 を結晶化できなかったが、Alpha fold2 による構造予測を行った結果、図 4 のモデル構造が予想された。N 末端領域(赤色)と C 末端領域(紫色)は特定の構造を取っておらず、二つの β -バレル構造(緑色とシアン色)が独立して存在することも示された。したがって、構造を取らない N 末端領域および C 末端領域を除くことで結晶が取得できると考えられる。また、二つの β -バレル構造を独立して発現させることも結晶の作製に重要であると考えられ、予測された PSTBP の立体構造から、TTX は分子内の樽型構造に結合していると推測される。

本研究では、イソガニ体液中の TTX 結合タンパク質 HSTBP とフグ血漿の TTX 結合タンパク質 PSTBP について、それぞれ組換えタンパク質を作製し、その X 線結晶回折を行い、TTX との結合様式を調べることを目的とした。イソガニ体液中の TTX 結合タンパク質 HSTBP は、一次構造を解明した。HSTBP は 3 つのサブユニットから構成され、C 末端領域のサブユニット 2 が、代表者がヒガンフグ卵巣から見出したフグ毒結合タンパク質ピテロゲン断片タンパク質 vWF type D ドメインタンパク質と約 20% の相同性を示したため、これをターゲットとして組換えタンパク質を作製した。しかし、作製した組換えタンパク質 rHSTBP-sub2 は封入体として存在したため結晶化には至らなかったが、TTX と結合することが確認できた。

一方、フグ血漿の TTX 結合タンパク質 PSTBP2 は、組換えタンパク質の合成に成功したが、結晶化できなかった。しかし、予想された立体構造モデルから、TTX の結合部位は分子内の樽型構造と推測された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsumoto Takuya, Kitajima Saemi, Yamamoto Chisato, Aoyagi Mitsuru, Mitoma Yoshiharu, Harada Hiroyuki, Nagashima Yuji	4. 巻 86
2. 論文標題 Cloning and tissue distribution of the ATP-binding cassette subfamily G member 2 gene in the marine pufferfish Takifugu rubripes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 873 ~ 887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01451-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 長島裕二、大城直雅	4. 巻 43
2. 論文標題 気候変動とマリントキシン	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 365-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 W. Gao, M. Yamada, R. Ohki, Y. Nagashima, R. Tatsuno, K. Ikeda, K. Kawatsu, T. Takatani, O. Arakawa	4. 巻 174
2. 論文標題 Evaluation of the tetrodotoxin uptake ability of pufferfish Takifugu rubripes according to age using an in vitro tissue slice incubation method.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicon	6. 最初と最後の頁 8-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxicon.2019.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 M. Okai, Y. Ohki, S. Yamamoto, M. Takashio, M. Ishida, N. Urano	4. 巻 68
2. 論文標題 Comamonas sp. 3ah48 a dibenz[a, h] anthracene degrading bacteria that is tolerant to heavy metal.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lett. Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 589-596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.13158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 長島裕二、大城直雅	4. 巻 8
2. 論文標題 地球温暖化によるマリントキシンの拡大とリスク管理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JATAFFジャーナル	6. 最初と最後の頁 40-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 辰野竜平、梅枝真人、宮田祐実、出口梨々子、福田翼、古下学、井野靖子、吉川廣幸、高橋洋、長島裕二	4. 巻 62
2. 論文標題 熊野灘産ムシフグ <i>Takifugu exascurus</i> の毒性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 食品衛生学雑誌	6. 最初と最後の頁 28-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhu Hongchen, Sakai Towa, Nagashima Yuji, Doi Hiroyuki, Takatani Tomohiro, Arakawa Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Tetrodotoxin/Saxitoxins Selectivity of the Euryhaline Freshwater Pufferfish <i>Dichotomyctere fluviatilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 731 ~ 731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13100731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 5件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 長島裕二、藤本健太、石崎松一郎、木谷洋一郎、佐藤根紀奈、岡井公彦
2. 発表標題 イソガニ体液テトロドトキシン結合タンパク質の一次構造
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長島裕二
2. 発表標題 フグのフグ毒蓄積メカニズム
3. 学会等名 第57回金沢大学環日本海域環境研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Murata, K. Ogata, Y. Nagashima
2. 発表標題 Rapid and easy analysis of tetrodotoxin by direct probe ionization/tandem mass spectrometry (DPiMS).
3. 学会等名 67th American Society for Mass Spectrometry Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長島裕二
2. 発表標題 フグの毒性に関する最近の話題
3. 学会等名 第67回日本海水産物利用担当者会議（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長島裕二、小宮由希、大木理恵子、横塚峻介、石崎松一郎
2. 発表標題 しらす加工品へのフグ稚魚の混入
3. 学会等名 第115回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Nagashima
2. 発表標題 Pufferfish: Toxification mechanism and food safety
3. 学会等名 Seminar on pufferfish with Singapore Food Agency (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長島裕二
2. 発表標題 実況シンガポール食品庁SFAとのフグセミナー
3. 学会等名 第8回国際ふぐ協会セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長島裕二
2. 発表標題 マリントキシンに関する最近の話題
3. 学会等名 令和3年度第2回食品に関するリスクコミュニケーション公開セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川遼、小山寛喜、石崎松一郎、長島裕二
2. 発表標題 外観からアミメフグと推定されたフグ種のDNA解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 桐明純、長島裕二、塩見一雄（尾島孝男、落合芳博編）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 334
3. 書名 第4章 刺毒魚の毒素タンパク質「水圏生物タンパク質科学の新展開」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新潟食料農業大学 研究者紹介 https://nafu.ac.jp/faculty/foodindustry-teacher/yuji_nagashima/ 東京海洋大学研究者情報 https://olcr.kaiyodai.ac.jp/db/profile.php?yomi=OKAI,Masahiko 金沢大学研究者情報 http://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?kaken=70565340 新潟食料農業大学 研究者紹介 https://nafu.ac.jp/faculty/foodindustry-teacher/hina_satone 金沢大学研究者情報 http://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?kaken=70565340</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡井 公彦 (Okai Masahiko) (00596562)	東京海洋大学・学術研究院・准教授 (12614)	
研究分担者	佐藤根 妃奈 (Staone Hina) (60579291)	新潟食料農業大学・食料産業学科・助教 (33114)	
研究分担者	木谷 洋一郎 (Kitani Yoichiro) (70565340)	金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------