

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580295

研究課題名(和文)麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻のオミクス統合解析による無毒化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism for the non-toxic mutation of the paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates by integrated omics analysis

研究代表者

長 由扶子(Cho, Yuko)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60323086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：海産渦鞭毛藻*Alexandrium tamarense*は国内の麻痺性貝中毒のおもな原因生物の一種である。その有毒株と無毒株の低分子化合物組成を網羅的に比較したところ、無毒株には麻痺性貝毒類縁体のみならず、推定生合成経路の初期の中間体が存在しなかったことから、初期のアルギニンとプロピオニル基の縮合反応が進行していないことが予想された。分子生物学的手法により初期反応を触媒する酵素の推定遺伝子であるsxtA4について解析したところ、ゲノム及びmRNAレベルで無毒株にも存在するが、変異を有する上、発現量が著しく低下していることが明らかになった。すなわち無毒株の無毒化にはsxtA4の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：*Alexandrium tamarense* is one of the most popular marine dinoflagellates, which are causative for the paralytic shellfish poisoning in Japan. The metabolomics study on the toxic and non-toxic sub-clones of the dinoflagellate, *A. tamarense*, revealed that the putative intermediates of saxitoxin biosynthesis were not found in the non-toxic subclone. The low reactivity at the first stage was expected to be responsible for the loss of toxicity. The molecularbiological study using the toxic and non-toxic sub-clones was conducted on the basis of this hypothesis. SxtA4 gene, which is the putative saxitoxin biosynthesis gene assigned at the first stage, was observed in the genome and mRNA of the non-toxic sub-clone, however, they included mutation and its expression in the mRNA of the non-toxic sub-clone was extremely lower than that of the toxic sub-clone. The loss of toxicity was suggested to be related to the difference of sxtA4 gene.

研究分野：天然物化学

キーワード：麻痺性貝毒 無毒化 生合成 *Alexandrium tamarense* 渦鞭毛藻 生合成遺伝子 中間体 LC-MS

1. 研究開始当初の背景

我が国の貝による食中毒の主な原因物質の一種である麻痺性貝毒(サキシトキシン及びその同族体)は *Alexandrium tamarense* に代表される渦鞭毛藻という植物プランクトンによって生産される。株によって含有するサキシトキシン同族体の組成が異なることを利用して 1990 年代に交配実験により渦鞭毛藻のゲノムにその生合成遺伝子が存在することが示唆されていたものの、詳細は長年にわたって不明であった。

(1) サキシトキシン生合成遺伝子

一方淡水性の藍藻にも麻痺性貝毒を生産する種が発見され、出発物質がアルギニン、酢酸及び S-アデノシルメチオニンであることが、取り込み実験によって示された。さらに 2008 年に藍藻の推定サキシトキシン生合成遺伝子がクラスターを形成していることや、同族体間の推定変換酵素遺伝子も隣接していることが提唱された。それらの情報を渦鞭毛藻の網羅的配列解析データに応用して相同遺伝子をすべて見出すという試みは一部の相同遺伝子の発見にとどまっておらず、渦鞭毛藻に関しては藍藻とは異なり、遺伝子がクラスターを形成していないこと、異なる生合成経路が存在することが示唆されていた。このことから渦鞭毛藻の麻痺性貝毒生合成研究には藍藻とは違うアプローチが必要であると思われた。

(2) 阻害剤による渦鞭毛藻の細胞周期及び毒生産制御

筆者らは世界で初めて代謝阻害剤によって渦鞭毛藻の細胞周期及び毒生産を制御できる培養系の構築に成功していた。中でも 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR) は藍藻の推定サキシトキシン生合成酵素のひとつである SxtB と相同性のある酵素 (cytidine deaminase) の阻害活性を有する代謝阻害剤であり、直接麻痺性貝毒生合成を阻害しているものと予想された。しかしながら研究開始当初は推定中間体の構造が化学的に証明されていないこと、化学的性状が明らかでないこと、分析法が確立できていないことなどの理由で、FUdR 添加後の麻痺性貝毒とその中間体生合成の相関について不明であった。

(3) *sxtA* 遺伝子

推定サキシトキシン生合成遺伝子のひとつ *sxtA* 遺伝子は *sxtA1-4* というドメイン構造を有し、初期の反応を司る酵素の遺伝子と推定されている。分子生物学的研究により、中でも *sxtA4* 遺伝子は渦鞭毛藻の麻痺性貝毒生産の知られていない種には検出されないとの報告があった。一方麻痺性貝毒生産種でも天然から無毒株が単離されており、それらの無毒株には *sxtA4* 遺伝子が検出されることが PCR の結果からわかっていた。

2. 研究の目的

筆者らは麻痺性貝毒の毒力の異なる多数の同族体の標品を保有するというメリットをいかし、高感度一斉分析法を開発してきた。中でも HILIC カラムによる LC-MS の手法は麻痺性貝毒及び中間体を含んだ画分のメタボローム解析に応用可能であることが示唆された。そこで本研究では世界的にも貴重な同一細胞に由来する渦鞭毛藻 *A. tamarense* の有毒株及び無毒株を網羅的比較研究することで、サキシトキシン関連化合物を探索し、構造を明らかにした上で、生合成経路のどこで差異が生じているかを予想し、無毒株の無毒化の機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 麻痺性貝毒及び生合成中間体の LC-MS による一斉分析法の開発

既知の麻痺性貝毒標品及び合成した推定中間体 A', C' 2 及びアルギニンを親水性相互作用カラムによる高速液体クロマトグラフィ・エレクトロスプレーイオン化/質量分析 (HILIC-ESI-LC-MS, Q-TOF mass spectrometer, MicroTOFII) に供して、カラム、移動相、グラジエント条件などを最適化し、一斉に分析できる条件を検討した。渦鞭毛藻 *A. tamarense* の有毒株及び無毒株の抽出液を固相抽出処理して HILIC-ESI-LC-MS に供し、両株の含有成分を比較した。

(2) 代謝阻害剤 FUdR によるサキシトキシン生合成への影響

代謝阻害剤 FUdR 添加系で有毒株を 7 日間培養し、一日毎に収穫した。細胞密度と DNA 量とともに麻痺性貝毒及び中間体 A', C' 2 及びアルギニンを定量し、無添加のコントロールと比較した。中間体は粗抽出液の限外濾過液を API2000 (triple quadrupole tandem mass spectrometer) に導入して各化合物に特異的な Q1>Q3 の値を用いた MRM モードで定量した。

(3) 麻痺性貝毒類縁体の探索

HILIC-ESI-LC-MS 一斉分析法で有毒株と無毒株を比較し、有毒株にのみ検出された成分のうち組成式から麻痺性貝毒との関連が示唆された化合物について、MSMS スペクトルを取得した。化学的に誘導した標品と溶出時間及び MSMS スペクトルを比較した。さらに *Alexandrium* 属の他の種でも検出されるかどうか *A. catenella* 有毒株の抽出液についても分析した。

(4) 有毒株及び無毒株におけるサキシトキシン生合成遺伝子 *sxtA4* の比較

LC-MS による分析で有毒株に含有されていた中間体 A' が無毒株から検出されなかったことから、無毒株ではアルギニンから中間体 A' への縮合反応が進行していないのではな

いかと予想した。この反応は推定サキトキシン生合成経路で SxtA と名付けられた酵素が触媒すると推定されていた。そこで渦鞭毛藻 *A. tamarense* の有毒株及び無毒株の *sxtA4* 遺伝子を既報のプライマーを用いた PCR に供し、ゲノム及び RNA での配列を解析した。さらに新たに設計したプライマーでの PCR 産物をサブクローニングした後塩基配列を解析した。明暗周期及び培養周期の同じタイミングで収穫した有毒株と無毒株の mRNA における *sxtA4* 遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって調べた。

(5) ポストカラム蛍光化反応 HPLC の高感度化による麻痺性貝毒 3 群一斉一細胞分析

微量抽出法の確立とポストカラム蛍光化反応を用いた検出法の高感度化をはかり、標品でまず C 群の C1, C2 が一細胞で検出できる方法を検討した。C 群と G 群の 2 群 7 種、さらに 3 群 10 種の化合物が分離し、高感度で検出できる条件を調べ、毒組成の異なる実試料へ応用した。

4. 研究成果

(1) 麻痺性貝毒及び生合成中間体の LC-MS による一斉分析法の開発

3 種のガードカラムを連結して濃縮カラムとして用い SeQuant® ZIC®-HILIC カラムを分析カラムとして用いるカラムスイッチングシステムを採用し、ギ酸アンモニウム移動相のアセトニトリル濃度を变化させるグラジエント条件で溶出することにより、*Alexandrium* 属に主に含有される麻痺性貝毒 11 種 (C1, 2, GTX1-6, neoSTX, dcSTX, STX) と合成した推定中間体 A' 及び C' 2 及びアルギニンを分離することが可能となった。有毒株に検出された麻痺性貝毒及び中間体 A' 及び C' 2 のいずれも無毒株からは検出されなかった (S. Tsuchiya et al., 2014 及び 2015)。

(2) 代謝阻害剤 FudR によるサキトキシン生合成への影響

FudR は濃度依存的に増殖と毒生産を抑制することがわかった。203 μ M の FudR では 4 日目で細胞が S 期に停止し、毒生産は 2 日目以降抑制されていることが明らかとなった (Y. Cho et al., 2014)。さらに中間体 A' はコントロールの三倍程度まで蓄積したのに対し、中間体 C' 2 は減少傾向を示し、予想通りの結果となった。なお、この研究過程で中間体 B' が化学的に不安定で推定構造のままでは存在できないことも明らかとなったため、中間体 B' の分析は実施不可であった。FudR は cytidine deaminase と相同な SxtB を阻害することで、上流の中間体 A' の蓄積と下流の中間体 C' 2 の減少をまねき、ひいては最終産物である麻痺性貝毒の生産が抑制されたものと思われた。2 日目まで麻痺性貝毒がコントロールと同様の生産速度を示したのは、作用点が生合成の初期段階であっ

たことを支持する結果である。すなわち麻痺性貝毒は少なくとも 10 段階以上の反応によって生産されるが、FudR 添加時点には多くの中間体が細胞内に存在したため、それらが順次麻痺性貝毒に変換されていき、2 日目までは生産の抑制が見られなかったものと考えられる。渦鞭毛藻でもサキトキシン生合成初期の反応は藍藻での分子生物学的研究から推定された経路と同様であることが示唆された。

(3) 麻痺性貝毒類縁体の探索

HILIC-ESI-LC-MS での一斉分析で見出した m/z 241 の成分が麻痺性貝毒 dcSTX より酸素一個分小さい分子量を有することから関連化合物であると予想した。dcSTX を文献既知の条件 (水素化ホウ素ナトリウム、室温または 0 °C) で化学的に還元し、12-deoxy 体を取得した。12 位の立体異性体を分離できる条件を確立し、標品と比較したところ天然物は 12-deoxy decarbamoylsaxitoxin と溶出時間及び MSMS スペクトルが一致した。さらに改良した高感度ポストカラム蛍光化反応 HPLC を用いて酸化剤の有無によるピーク挙動の変化が標品と同様であることを確認したことから、サキトキシン骨格が証明された。毒組成の異なる *Alexandrium* 属の 2 株 (*A. catenella*) から本化合物が検出された。本化合物は藍藻 *Lyngbya wollei* から単離された LwTx4 と同一の化合物であり、渦鞭毛藻からの検出は初めてであった。

他にも有毒株のみにみられる推定サキトキシン関連化合物が得られており、従来の推定生合成経路と異なる経路の存在する可能性が示唆された。

(4) サキトキシン生合成遺伝子 *sxtA* の比較

有毒株、無毒株ゲノムから塩基長の等しい *sxtA4* 部分増幅産物が得られたが、塩基配列には複数の箇所に変異が見られ、完全に一致する配列は得られなかった。mRNA では既報のプライマーでは塩基長の等しい部分増幅産物が得られたが、新たに設計したプライマーでは無毒株から塩基長の短い配列あるいは変異や欠失を含む配列が検出された。さらに *sxtA4* 遺伝子発現量は無毒株で著しい低下が見られた。有毒単藻培養株から単離された無毒株、UAT-014-009 株の無毒化への *sxtA4* 遺伝子の関与が分子生物学的にも示唆された。

(5) ポストカラム蛍光化反応 HPLC の高感度化による麻痺性貝毒 3 群一斉一細胞分析

C 群の主要成分 C1, C2 を分離し、高感度で *A. tamarense* 一細胞から検出できる方法を確立し、細胞周期の異なる細胞の組成が違う培養液で一細胞分析し、本有毒株中の有毒細胞の毒量がきわめて多様であることを実験的に証明した (Y. Cho, et al., 2013)。一斉分析により *A. tamarense* 有毒株の一細胞か

ら C2 と GTX4 の同時検出にも成功した。今後遺伝子工学的研究への応用が期待される。

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 4 件)

1 . Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima, and Mari Yotsu-Yamashita, Synthesis of a tricyclic bisguanidine compound structurally related to saxitoxin and its identification in paralytic shellfish toxins-producing microorganisms, *Chem. Eur. J.* 7835-7840, 2015. 査読あり
DOI: 10.1002/chem.201500064

2 . Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, Synthesis and identification of proposed biosynthetic intermediates of saxitoxin in the cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04) and the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Axat-2), *Org. Biomol. Chem.*, 12, 3016-3020, 2014. 査読あり
DOI: 10.1039/c4ob00071d

3 . Yuko Cho, Motoo Ogawa, Mari Yotsu-Yamashita, and Yasukatsu Oshima, Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine on toxin production and cell cycle regulation in marine dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, *Harmful Algae*, 32, 64-72, 2014. 査読あり
DOI: 10.1016/j.hal.2013.12.007

4 . Yuko Cho, Ryoko Ozeki, Mari Yotsu-Yamashita, and Yasukatsu Oshima, Single-cell analysis of paralytic shellfish toxins in *Alexandrium tamarense* by HPLC with post-column fluorescent derivatization, *Harmful Algae*, 2013, 25, 47-53. 査読あり
doi.org/10.1016/j.hal.2013.02.005

[学会発表](計 2 件)

1 . 長 由扶子、日出間 志寿、土屋 成輝、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり、麻痺性貝毒生産 *Alexandrium tamarense* の無毒株における推定 STX 生合成遺伝子 A の変異について、平成 27 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学、東京都・品川、2015 年 3 月 27 日-31 日

2 . Yuko Cho, Renpei Yoshioka, Shigeki Tsuchiya, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima, and Mari Yotsu-Yamashita,

" Identification of

12 -deoxydecarbamoylsaxitoxin in the toxic marine dinoflagellate", The 16th International conference on Harmful Algae (Wellington, New Zealand, Oct. 27-31, 2014)

3 . 長 由扶子、吉岡 廉平、土屋 成輝、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* 有毒株の dcSTX-12 -ol の同定、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 27 日-31 日、北海道・函館市

4 . Yuko Cho, Shigeki Tsuchiya, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, 5-Fluoro-2'-deoxyuridine influenced the growth and the biosynthesis of intermediates for paralytic shellfish toxins of the dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch Chemical Society of Japan (Tohoku University, Sendai, Japan, Sep 28-30, 2013).

5 . Yuko Cho, Motoo Ogawa, Mari Yotsu-Yamashita and Yasukatsu Oshima, Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine on the cell proliferation and toxin production of *Alexandrium tamarense*, The 15th International Conference on Harmful Algae, (Changwon, Republic of Korea, Oct 29-Nov 2, 2012)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.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 Hidema)

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

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