

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660169

研究課題名(和文) フグ毒分解酵素と分解メカニズムの解明:フグ毒はだれがどのように分解するのか

研究課題名(英文) Microorganisms and enzymes implicated in degradation of tetrodotoxin, pufferfish toxin

研究代表者

長島 裕二 (Nagashima, Yuji)

東京海洋大学・その他部局等・教授

研究者番号：40180484

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): フグ毒テトロドトキシン(TTX)は水圏環境に広く分布しているが、TTXの分解に関する知見はほとんどない。そこで本研究では、製造工程中にフグ毒の毒性減少が知られているフグ卵巣糠漬けに着目し、TTXを分解する微生物と酵素をスクリーニングして、自然界におけるTTX分解メカニズムの解明に資することを目的とした。しかしながら、結論として、フグ卵巣糠漬けの毒性減少に微生物はほとんど関与しないことがわかった。一方、フグ卵巣糠漬け製造にかかわる微生物叢を次世代シーケンサーで調べたところ、極限環境微生物が検出され、これら微生物が干渉現象で有機物の分解、抑制を行っていることがメタゲノム解析により明らかとなった。

研究成果の概要(英文): Tetrodotoxin (TTX) is thought to originate in marine bacteria and widely distributes in aquatic environments. However, there has been no information about degradation of TTX in nature. Therefore, we explored microorganisms involved in degradation of TTX to clarify the toxin-degradation mechanism, focusing on pufferfish ovary fermented with rice bran, Japanese traditional fermented food. It is known by experience that the fermentation of pufferfish ovary remarkably decrease toxicity during process over 2 years. However, the present study demonstrated that TTX was just transferred from ovary to surrounding by salting and fermentation process, suggesting no or less implication of microorganisms in decreasing toxicity. Metagenomic analysis revealed that extremophiles were detected in salt and rice bran during preservation and the microorganisms managed degradation and/or depression of organic substances in fermented pufferfish ovary by interference.

研究分野：水産化学

キーワード：水産学 生体分子 フグ毒 糠漬け メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

自然界におけるフグ毒テトロドトキシン (TTX) の動態、すなわち、TTX の生産から生物間の移行、消長については謎が多い。細菌による TTX の生合成経路はいまだ解明されていないが、TTX の一次生産者は海洋細菌と考えられ、これを起点として高位の海洋生物へ生物濃縮されてフグなどの TTX 保有生物に蓄積するという“食物連鎖による毒化”が有力視されている。TTX は海洋環境中に広く、かつ大量に分布しており、TTX が海洋細菌によって産生され続けるのであれば、誰かがどこかで分解しないと地球は TTX であふれてしまうが、海洋環境中ではうまく循環しているのだろう。しかし、生物や環境中での TTX の分解に関する研究例はなく、唯一、フグ卵巣糠漬け製造工程中に毒性が減少することが知られているだけである。

フグ卵巣糠漬けにおけるフグ毒の減毒は、右田と橋本および小沢によって調べられ、塩蔵および糠漬け中にフグ卵巣から TTX が液汁や糠に移行する毒の希釈と、糠漬け製造工程に由来する微生物が毒を分解している可能性が報告された。その後、連携研究者の小林は、フグ卵巣糠漬け製造工程で分離した微生物 185 菌株の培地にそれぞれ TTX 標準溶液を添加し、培養後の毒性値をマウス試験法で測定したところ、22 株で明確な毒性低下を観察した。しかし、いずれも培養後の培地が弱アルカリ性に変化していたため、毒性の減少が微生物による TTX 分解なのか、pH 変化に伴うマウス毒性試験への影響なのか不明である。TTX は化学的に安定であり、一般的な調理加工程度の加熱では分解されず毒性が減少することはないので、自然界では酵素的な変換によって化学構造の変化や分解が起こっているものと推測される。

2. 研究の目的

本研究では、これまで検討されていない

TTX の分解に焦点を当て、製造工程中にフグ毒の毒性低下が観察されているフグ卵巣糠漬けを試料に用いて、TTX の変換、分解にかかわる微生物とその反応を触媒する酵素を探索する。そして、それらの存在が確認された場合、TTX 分解微生物と酵素を特定し、TTX の変換、分解メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、フグ卵巣糠漬け工程の塩漬けおよび糠漬けにおける微生物叢を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析する。

3. 研究の方法

(1) フグ卵巣糠漬けの毒性と毒成分分析

原料となるゴマフグ卵巣、製造工程中の中間製品ならびに市販されている製品を用いて、それらの毒性と毒成分を調べた。

2014 年 6 月と 2015 年 5 月にゴマフグ雌をそれぞれ 10 個体ずつ入手して、筋肉、皮、肝臓、卵巣を取り出した。中間製品には、糠漬け製造業者から恵与された塩漬け卵巣および滲出した液汁(塩漬け液)、糠漬け卵巣、糠、糠漬け中に滲出した液汁(糠漬け液)を用いた。製品には、市販のフグ卵巣ぬか漬けの卵巣および糠を用いた。各試料に 0.1% 酢酸を加え、沸騰水中で加熱してフグ毒を抽出した。中間製品および製品の抽出液は高濃度の塩分を含むため、マイクロアライザーで脱塩した。毒性はマウス試験法で測定し、フグ毒成分は抽出液を脱脂、遠心限外ろ過して LC-MS 法で分析した。

(2) 糠漬け液浸漬による卵巣の毒性変化

ゴマフグ卵巣 5g を不織布の袋に詰め、タコ糸で縛った。それを 50mL 容ファルコンチューブに入れ、糠漬け液 10mL を添加して、室温で 0 ~ 12 週間静置した(これを非滅菌試料区とする)。これとは別に、不織布の袋に入れたゴマフグ卵巣(5g)と、あらかじめオートクレーブ滅菌(121、15 分間)した

糠漬け液（10mL）を 50mL 容ファルコンチューブに入れ、室温で0~12週間静置した（これを滅菌試料区とする）。各試料の毒性測定と毒成分分析は、上記（1）と同様の方法で行った。

（3）次世代シーケンサーによる微生物群解析

TTX を分解または類似物質に変換すると推測される工程（塩漬け後の塩、糠漬け工程の糠および卵巣）について微生物の関与を考慮して、各試料における微生物種とそれらの存在比率を次世代シーケンサーで検討した。

有機物質の分解および変換は、細菌類以外に真菌および酵母類においても可能性があるため、同定には 16S リボソーム RNA と 18S リボソーム RNA を対象として遺伝子解析を行った。

本実験に前に、次世代シーケンサーでの菌同定率を上げるため、既知の 20 種類の細菌 DNA を用いて V1-V2 領域、V3 領域、V4 領域を対象に PCR で増幅して同定率を検討したところ、これまでに報告されている V3 領域よりも V1-V2 領域のプライマーセットの方が、分類がきめ細かく行えることが分かり、V1-V2 領域を解析の対象に用いた。

また、真菌類の同定は ITS 領域を対象に行った。メタゲノム解析にはイルミナ 6000 を用いて行った。

4. 研究成果

（1）フグ卵巣糠漬けの毒性と毒成分分析

試料のゴマフグは性成熟しており、生殖腺体指数（卵巣重量/体重）は 0.26~0.40 であった。卵巣の毒性値は<5~237 マウスユニット（MU）/g で、生殖腺体指数と毒性値の間に相関はみられなかった。毒成分として、TTX、4-*epi*-TTX、anhydroTTX、trideoxyTTX が検出された。ぬか漬け製造工場の塩漬け卵巣の毒性は 31.5~48.7 MU/g、塩漬け液は 7.1~15.8

MU/g で、塩漬け卵巣および塩漬け液から TTX、anhydroTTX、trideoxyTTX が検出され、塩漬け段階で、卵巣の毒が塩漬け液に流出するが、毒成分は変化しないことがわかった。

糠漬け卵巣、糠、糠漬け液の毒性はさらに低下し、これに伴いフグ毒成分は減少したが、“未知成分”が検出された。製品の卵巣と糠は無毒（5 MU/g 未満）で、TTX はみられず、trideoxyTTX と“未知成分”が検出された。なお、“未知成分”とは、LC-MS 分析 (m/z 320) において TTX より早い溶出時間（TTX に対する相対溶出時間 0.81 ± 0.03 ）に検出され、キナゾリン骨格に由来するフラグメントイオンを生じる物質と定義した。図 1 に示した各製造工程における TTX と“未知成分”の変化からわかるように、TTX の減少と“未知成分”の出現は糠漬け工程で起こることが明らかになった。

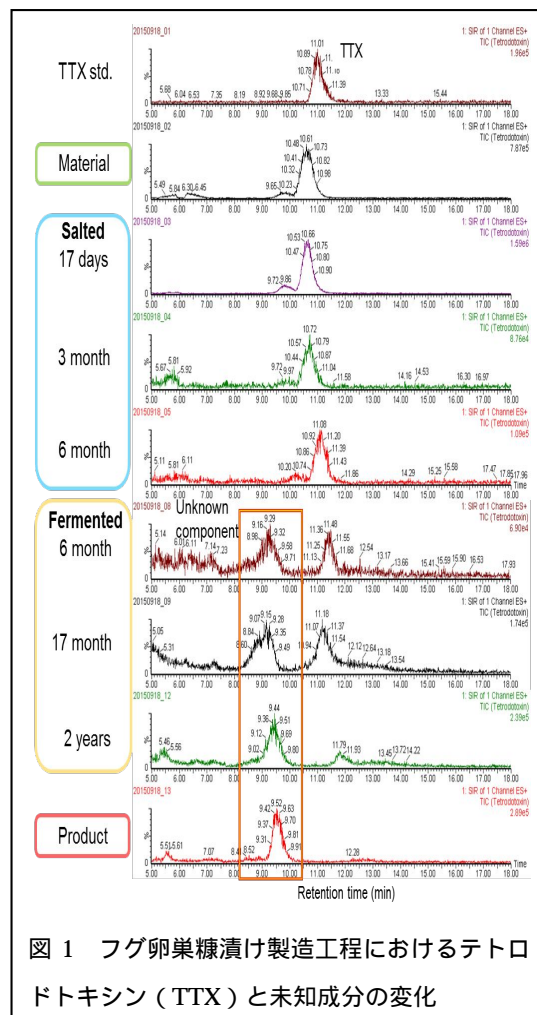


図 1 フグ卵巣糠漬け製造工程におけるテロドトキシン（TTX）と未知成分の変化

(2) 糠漬け液浸漬による卵巣の毒性変化

そこで、糠漬け工程での毒性と毒成分の変化を調べるため、モデル実験として、ゴマフグ卵巣を、滅菌した糠漬け液または滅菌しない糠漬け液に、それぞれ1~12週間浸漬した。

非滅菌の卵は、浸漬1週間で毒性値が57.1 MU/g から8.9 MU/g に減少したが、その後12週間まで変化はなかった。一方、糠漬け液の毒性は浸漬1週間で24.5 MU/mL となったが、その後は22.0~24.2 MU/mL とほぼ一定であった。卵と糠漬け液の毒量を合計した総毒量は、0週目286 MU、1~12週目266~289 MU であり、浸漬期間を通じて総毒量の変化はみられなかった。

糠漬け液を滅菌した場合でも、卵の毒性値は1週間で57.1 MU/g から8.2 MU/g に減少し、その後変化はなかった。糠漬け液の毒性値は、浸漬1~12週間で19.9~23.9 MU/g で、卵と糠漬け液の毒量の合計は、0週目286 MU、浸漬1~12週目243~280 MU となり、浸漬期間中の総毒量はほぼ一定であった。

毒成分に関しては、浸漬前の卵から、TTX、4-*epi*-TTX、anhydroTTX、trideoxyTTX が検出された。非滅菌の糠漬け液に浸漬した卵から、1週目に新たにdeoxyTTX と“未知成分”が検出され、その後12週目まで毒成分に変化はみられなかった。滅菌した糠漬け液に浸漬した卵でも同様の毒成分組成であった。

糠漬け液中の微生物がフグ毒の減毒や毒成分変化にかかわっているなら、非滅菌試料区で毒性の低下と毒成分の変換が行われ、滅菌試料区と差があるものと推測した。しかし、実験結果から、フグ毒は卵から糠漬け液に速やかに移行するものの、12週間程度の浸漬では毒性の低下は起こらないこと、また、糠漬け液を滅菌してもしなくても、糠漬け液に浸漬した卵の毒性と毒成分に差はないことが明らかになり、フグ毒の減毒に糠漬け液中の微生物が関与している可能性は考えにくい。

浸漬前の卵および糠漬け製造に使われる魚醤油いしるには“未知成分”は検出されず、糠漬け液ならびに糠漬けされた卵に“未知成分”が存在することから、“未知成分”は糠漬け中に生成していることが窺え、化学的な変換が起こっている可能性も考えられる。このため、“未知成分”の構造を解明して、フグ毒成分の変換の様子を明らかにすることが今後の検討課題である。

(3) 次世代シーケンサーによる微生物群解析

フグ卵巣糠漬けで微生物の関与が推測される塩漬け工程の塩と糠漬け工程の糠および卵巣について、菌種とそれらの存在比率を次世代シーケンサーで検討した。

塩漬け後の塩で検出された微生物のほとんどは極限環境微生物に属しており、内生孢子芽胞をつくり、さまざまな酵素を作るものが存在した。検出された原核生物の中で50%近くが*Bacillus*類で、5種類の属類に分類された。また、遺伝子変異体の細菌が多く存在した。

糠漬け工程の糠では、原核生物の70%近くを *Gammaproteobacteria* と *Alphaproteobacteria* が占めていたが、その内訳は様々であり、単なる遺伝子変異体による細菌の存在ではなく、異なる属類の細菌が存在した。

卵巣では、従来の *Clostridia* 類に加えて *Lactobacillus* 属、*Streptococcus* 属、*Veionella* 属、酵母などの通性嫌気性微生物が検出され、卵巣の内部ほど腸内細菌類が多く、外部ほど海水由来の細菌が多く存在することが明らかになった。

古細菌およびバチルスは、極限下において酵素類や細菌干渉に関する物質を代謝することが知られており、今回検出された菌群においても、タンパク質-水分子-塩イオンにより活性化される酵素を産生する細菌が存在

した。真菌においても、極限環境微生物に報告されているものが1/3近く存在し、そのほとんどが極限下にて酵素類を産生することが報告されている。

微生物は環境に応じて容易に遺伝子を変異させることが知られており、今後、これらの生きている菌を用いてTTX分解および物質変換活性について検討するとともに遺伝子発現についても検討する必要がある。

本研究では、唯一フグの毒性低下が知られているフグ卵巣糠漬けを手掛かりにして、フグ毒 TTX の分解に関与する微生物ならびに TTX の変換や分解を触媒する酵素の探索を目的としたが、フグ卵巣糠漬けの減毒に微生物の関与を支持する結果は得られなかった。しかし、長期間の糠漬け中に既知の TTX 関連化合物とは LC-MS での挙動が異なる“未知成分”が検出されたことから、微生物や酵素が関与しない、化学的な変換が起きている可能性も考えられる。

フグ卵巣糠漬けは、約1年間の塩漬けと1年以上の糠漬けで製造される発酵食品であり、塩漬けは飽和食塩水、糠漬けは高塩分濃度かつ嫌気的条件下であるため、そこで生育する微生物は特殊な環境に耐えるものとなる。次世代シーケンサーによる微生物網羅解析において、塩漬けに使用した塩ならびに糠漬け中の糠と卵巣から検出された微生物は、極限環境微生物がほとんどであったことは、そのことを初めて証明したものである。さらに重要なのは、それら多くの微生物が極限下の環境において、特殊な酵素の産生や塩類を得ることでタンパク分解を促進するペプチドを生産する性質をもっていることである。これらがフグ毒の分解や変換に関与しているのか、今後、微生物を単離して極限下における代謝および遺伝子発現について検討するとともに、TTX 関連化合物の化学変換についても検討する必要がある。

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1件)

— 長島裕二, 桐明 絢: 海洋危険生物 食べて中毒; とくに魚について. 中毒研究, 29巻, 3-9 (2016).

[学会発表](計5件)

長島裕二, 岡山桜子: ふぐ卵巣糠漬けの毒性低下のメカニズム. 第26回西日本ふぐ研究会. 2016年5月, 山口県下関市. 岡山桜子, 桐明 絢, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け製造工程における毒成分変化. 第110回日本食品衛生学会学術講演会. 2015年10月, 京都府京都市.

長島裕二: 海洋動物の毒. 第37回日本中毒学会総会・学術集会. 2015年7月, 和歌山県和歌山市.

長島裕二: 平成26年度神奈川県ふぐ包丁師衛生講習会. 2015年3月, 神奈川県横浜市.

岡山桜子, 太田 晶, 石崎松一郎, 長島裕二: ゴマフグ卵巣と卵巣糠漬けのフグ毒分析. 第108回日本食品衛生学会学術講演会. 2014年12月, 石川県金沢市.

[図書](計2件)

長島裕二, 荒川修, 佐藤繁: フグ毒. 「毒魚の自然史」(松浦啓一, 長島裕二編著), 北海道出版会, 北海道, 2015, pp. 33-103.

長島裕二: 自然毒. 「魚介の科学」(阿部宏喜編), 朝倉書店, 東京, 2015, pp. 185-196.

[その他]

ホームページ等

東京海洋大学食品生産科学科生体物質化学研究室

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~ishizak/>
東京海洋大学研究者総覧
<http://olcr.kaiyodai.ac.jp/kenkyusha-db.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長島裕二 (NAGASHIMA YUJI)
東京海洋大学・学術研究院・教授
研究者番号：40180484

(2) 研究分担者

永井慎 (NAGAI MAKOTO)
岐阜医療科学大学・保健科学科・准教授
研究者番号：30460497

(3) 連携研究者

小林武志 (KOBAYASHI TAKESHI)
東京海洋大学・学術研究院・准教授
研究者番号：60242327

(4) 研究協力者

桐明絢 (KIRIAKE AYA)
東京海洋大学・海洋科学部・博士研究員
太田晶 (OHTA AKIRA)
東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科・博士前期課程
岡山桜子 (OKAYAMA SAKURAKO)
東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科・博士前期課程