

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06242

研究課題名(和文) ウナギ血清毒の分子構造および作用機序の解明

研究課題名(英文) Identification and functional characterization of eel serum toxin

研究代表者

塚田 岳大 (Tsukada, Takehiro)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：50596210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、世界で初めてウナギ血清毒(EST)遺伝子を同定し、クローニングすることに成功した。さらに、ウナギ血漿からの精製法を確立し、ESTが約115kDaの血清タンパク質であることを突き止めた。In vitroでESTを投与すると、マウス腸を収縮させ、In vivo投与で、腹部や下肢を痙攣させた。このことから、ESTが筋肉をターゲットにしていることが示唆された。さらに、ESTを2回目に注射すると、アナフィラキシーを引き起こし、24時間以内に死亡することがわかった。熱変性したESTでは、このような作用がみられなかったことから、ESTの3次構造が毒性に重要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウナギ血清毒の存在は古くから知られているが、長い間遺伝子が同定されることはなかった。本研究でウナギ血清毒遺伝子を同定し、精製法を確立したことで、ウナギ血清毒の解明に大きく近づいたことは学術的に意義がある。また、ウナギ血清毒の毒性を評価し、マウスの筋肉を強力に収縮させることがわかった。これによりウナギ血清毒研究を起点とした創薬研究へと展開できる可能性が高まり、その点で社会的な意義があるといえる。

研究成果の概要(英文)：The existence of eel serum toxin (EST) has been long known, however, EST gene yet to be found. This study identified EST gene from eel genome database, and successfully cloned the full-length EST. We also established purification method from eel plasma, and found that EST was ca. 115 kDa serum protein. In vitro administration of EST strongly induced smooth muscle contraction of mouse intestine. In vivo administration of EST induced cramps on their stomach and lower limbs within a few min. These results suggest that EST targets muscles. Furthermore, second injection of EST induced severe anaphylaxis, and the mice died within 24h. Since heat-denatured EST did not have such in vitro and in vivo actions, tertiary structure of EST is important for sustaining its toxicity.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ニホンウナギ 血清毒

1. 研究開始当初の背景

ウナギ、アナゴ、ウツボなどのウナギ目の血清には、毒性がある。ウナギ血清を体内に摂取した場合、下痢、嘔吐、皮膚湿疹、チアノーゼなどの全身性の作用を引き起こすことが知られているが(表)[1]、日常生活においてウナギの血液に触れることがあまりないため、ウナギ血清が「危険」という認識はあまりない。しかし、日本では、古くから鰻を食べる食文化があり、鰻店の料理人や養鰻業者がウナギを加工する際に新鮮なウナギの血に触れ、舌や目に炎症を起こすことが知られている。口腔の症状としては、灼熱感、粘膜の発赤、唾液分泌の亢進、眼の症状としては、重度の灼熱感、流涙、結膜の発赤、まぶたの腫れ、異物感があり、それらの症状は数日間続く[2]。このように、ウナギ血清毒は食品衛生というよりもむしろ公衆衛生の観点から無視できない毒といえる。

表：ウナギ血清毒の化学的特性

種	ウナギ目(ウナギ・アナゴ・ウツボ)
化学特性	タンパク
分子量	100,000
等電点	6.1
症状	下痢、嘔吐、皮膚炎、チアノーゼ
致死量 (マウス)	670 µg protein/kg (IV) 0.30 to 0.74 ml serum/kg (IV)
遺伝子	不明
作用機序	不明

このウナギ血清毒の存在は古くから知られており「イクチオヘモトキシン=ichthyohemotoxin(ラテン語で ichthyo: 魚類, hemo: 血液, toxin: 毒)」と呼ばれている[3]。しかし、ウナギ目の血清毒に関する研究は極めて乏しい。その歴史をみると、1898年、フランスのチャールズ・ロバート・リシェ博士らが、犬にウナギの血清を注射する実験を行い、1回目ではなく、2回目以降の注射で犬の症状が悪化することを報告している[4]。そして、1913年、この研究がもととなりリシェはアナフィラキシーの発見で、ノーベル生理学・医学賞を受賞している[5]。次に、1964年、Rocca と Ghiretti はヨーロッパウナギ(*Anguilla vulgaris*)の血清を硫酸アンモニウム沈殿と DEAE カラムを用いて粗精製し、ウナギ血清毒がタンパク質であることを示唆した。しかし、他の化学的性質についての報告はなかった[6]。1966年に河内山らは、ウナギ血清から緑色のリポタンパク質であるビリベルジンを同定しているが、ビリベルジンが血清毒の本体ではないことを報告している[7]。そして、2008年、吉田らは、HPLCを組み合わせるウナギ血清から毒の単離し、分子量約 100 kDa、等電点 6.1 の単純酸性タンパク質であることをみつけた[2]。この精製毒は、マウス(静脈注射 LD₅₀: 670 µg/kg)とサワガニ(体腔内投与 LD₅₀: 450 µg/kg)に対して致死性があり(血清では、マウス静脈注射で 0.30-0.74 ml/kg、経口投与で約 15 ml/kg。ヒトの感受性がマウスと同じであると仮定すると、体重 60 kg のヒトにおけるウナギ血清の致死量は約 1L に相当する) 60 で 5 分加熱すると完全に毒性が失われることを報告している。さらに、吉田らは、この論文で単離したウナギ血清毒から下記の 3 つの部分ポリペプチド配列を見つけている。

- PYHSTDQCEVPLTCQNEYRPFPE
- XPNAFIPSQTGDVIYTCYK (X: 不明)
- IS(Q/T)CMLIF(Q/T)C (N 末端から 3 番目と 9 番目は Q または T)

しかし、当時はウナギのゲノムデータベースが構築されていなかったため、これらの配列からウナギ血清毒遺伝子を特定するに至らなかった。

2. 研究の目的

近年、我々は非公開のニホンウナギゲノムデータベースを用いて吉田らが単離した 3 つの部分ポリペプチド配列に非常によく似た配列を有する遺伝子を発見し、Eel Serum Toxin (EST) 遺伝子と命名した。本研究では、ウナギ EST の全長 mRNA 配列を特定し、血漿から EST タンパクを精製し、マウスを用いた毒性評価により EST の作用機序を明らかにする。また、ウナギ EST 遺伝子と他の生物種における血清毒遺伝子の配列を比較し、魚類における血清毒の進化を探るとともに、その生理的意義を明確にする。

3. 研究の方法

(1) クローニング、主要発現組織ならびに発現細胞の同定

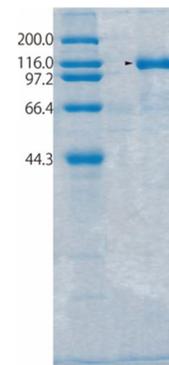
ニホンウナギゲノムデータベースから予測される EST 遺伝子をもとに縮重プライマーを設計し、全長クローニングを行った。得られた配列は、Signal-P6.0 により、シグナルペプチド配列を予想した。淡水ウナギ・海水ウナギの組織 cDNA と EST 遺伝子特異的プライマーを用いて、RT-PCR を行い、組織発現を調べた。EST 遺伝子は肝臓で強く発現していたため、*in situ* hybridization を用いて肝臓の組織内分布を調べた。

(2) 分子進化

系統解析に使用したアミノ酸配列やヌクレオチド配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースから取得した。配列のアライメントは CLUSTAL W を使用した。Neighbor-joining 法を用いた系統樹解析は、MEGA X を使用した。

(3) 精製法の確立と評価

淡水ウナギの血漿約 7 ml を用いて、硫酸分画を行った。予想 EST 分子量 (115 kDa) が現れる分画を収集し、TOYOPEARL Butyl-650 カラム (疎水性カラム) を用いた精製を行った。予想 EST が現れる分画を収集、透析後、TOYOPEARL DEAE-650 カラム (陰イオン交換カラム) を用いて精製を行った。Amicon Ultra-15 centrifugal Filter Devices で濃縮後、ブラッドフォード法により濃度を測定した。精製 EST を用いた SDS-PAGE を行い、ゲル上の 115 kDa 付近のバンド (右図) を切り出し、質量分析施設 (京都大学 医学・生命科学研究支援機構) に送付した。配列結果をクローニングした EST のアミノ酸配列と比較した。



(4) *in vivo* および *in vitro* における毒性の評価

腸管の収縮実験 (マグナス装置): マウス腸断片の両側をセルフインで挟み、片側を紐でトランスデューサーに吊るし、反対側を糸かけ管の底に固定した。次に、37 °C のタイロッド液に継続的に空気を入れたマグナス管内で腸組織を静置した。腸の自律収縮が安定した後、指定量の精製 EST、アセチルコリン、およびアトロピンをマグナス管に投与し、腸の収縮と弛緩をペンレコーダーで記録した。

ウナギ毒の投与方法 (腹腔内、胃内、筋肉注射): EST または熱変性させた EST を腹腔内に注射し、投与後 7 日間の行動を観察した。筋肉注射は、EST および熱変性させた EST をマウスの左右の大腿筋にそれぞれ注射した。

上記の *in vitro* および *in vivo* に用いた EST 処理後のマウス組織を用いて、病理標本を作製し、毒性の組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) クローニング、主要発現組織ならびに発現細胞の同定

縮重プライマーを用いた PCR クローニングにより、淡水および海水ウナギの肝臓 cDNA から EST 遺伝子を増幅し、EST の全長遺伝子配列を決定した。全長は、約 1000 アミノ酸で、シグナルペプチド配列を含んでいた (分子量 115 kDa)。RT-PCR を用いた組織発現解析では、EST 遺伝子は肝臓でのみ産生され、淡水ウナギと海水ウナギで発現量に差はなかった。また、*in situ* hybridization により、EST が肝細胞で強く発現していることがわかった。

(2) 分子進化

BLAST を用いて、クローニングした EST 配列に類似した遺伝子を探索したところ、別の遺伝子群がヒットした。これらの配列で系統樹解析 (最尤法) を行った結果、EST は、コイやニシンの別遺伝子群と同じクレードに属した。一方、軟骨魚類 (ジンベイザメ、ゾウギンザメ) の別遺伝子群や無脊椎動物 (エビ、イカ、イソギンチャク) の別遺伝子群とは別のクレードとなった。

(3) 精製法の確立と評価

ウナギ血漿から EST の単離するため、硫酸アンモニウム沈殿、ブチルカラム精製、DEAE カラム精製を行った。その結果、分子量 115 kDa のタンパク質の精製に成功した。精製タンパク質を質量分析によりアミノ酸配列を確認したところ、クローニングした EST の配列と 92% のカバーレッジであった。

(4) *in vivo* および *in vitro* における毒性の評価

マグナス装置を用いてマウス腸管における EST の作用を調べたところ、用量依存的に腸管の平滑筋を収縮させた。一方、熱変性させた EST は収縮能がなかった。アセチルコリン阻害剤で、EST の収縮作用は阻害されなかった。腹腔内に投与すると、足を引きずるような歩き方や腹部の痙攣が見られた。投与後のマウスの活動量を時間経過とともに測定した結果、EST を投与した群は、熱変性させたウナギ毒を投与した群と比べ、有意に活動量が減少した。しかし、投与後 1 日以降では、活動量が回復し、有意な差はみられなかった。一方、EST の胃投与は、マウスの活動量に影響を与えなかった。腹腔内に EST を投与したマウスに 2 回目の投与を行うと、1 分以内にアナフィラキシーショック状態となり、24 時間以内にエンドポイントを迎えた。大腿筋に投与したマウスでは脚の腫れが観察された。病理解剖の結果、腹腔内に EST を投与したマウスの腹膜に白い斑点状の炎症が見られた。EST を投与した腹膜は筋層が少なく体腔側の骨格筋細胞の肥大や間葉細胞の増殖像が確認された。腸管では筋層の一部が欠落し、肝臓では細胞質の空洞化、大腿筋では多くの好中球が観察された。

<引用文献>

- [1] Halstead BW (1967) Poisonous and venomous marine animals of the world, vol 2. United States Government Printing Office, Washington DC, pp 951-981
- [2] Yoshida M, Sone S, and Shiomi K (2008). Purification and characterization of a proteinaceous toxin from the Serum of Japanese eel *Anguilla japonica*. *The Protein Journal*. 27: 450-454
- [3] 自然毒のリスクプロファイル：魚類：血清毒 厚生労働省公式ウェブサイト (https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_06.html)
- [4] Ring J, Grosber M, Brockow K, and Christian Bergmann K (2014). Anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy*. 100: 54-61
- [5] Tan S Y, MD, JD and Yamanuha J (2010). Charles Robert Richet (1850-1935): discoverer of anaphylaxis. *Singapore Medical Journal*. 51 (3): 184-185
- [6] Rocca E and Ghiretti F (1964). A toxic protein from eel serum. *Toxicon*. 2: 79-80
- [7] Kochiyama Y, Yamaguchi K, Hashimoto K, and Matsuura F (1966) *Nippon Suisan Gakkai Shi*. 32 :867-872

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤綾乃、塚田岳大
2. 発表標題 ウナギ血清毒の全長クローニングと発現解析
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤綾乃、山口陽子、Marty K.S.Wong、後藤勝、塚田岳大
2. 発表標題 ウナギ血清毒遺伝子の発見と精製法の確立
3. 学会等名 第36回日本下垂体研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	後藤 勝 (Goto Masaru) (80379289)	東邦大学・理学部・准教授 (32661)	

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
---------	---------