

令和 4 年 10 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19195

研究課題名(和文) フグによるテトロドトキシン認識の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of recognition mechanism of tetrodotoxin by puffer fish

研究代表者

西川 俊夫 (Nishikawa, Toshio)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：90208158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：フグはフグ中毒の原因物質であるテトロドトキシン(TTX)を防御物質として利用していると考えられている。一方で、フグはTTXに誘引されるという興味深い報告がなされてきた。そこで、申請者らは、まずフグの嗅覚器で本当にTTXが感知されているかを、嗅電図(EOG：嗅上皮を匂い物質で刺激した時に発生する電場電位変化)を測定することで確認した。ところがTTXではなく、ほとんど無毒のTTX類縁体 5,6,11-trideoxyTTXに強いEOG応答が観測された。そこで、構造活性相関研究のために、そのTTX類縁体の関連化合物の化学合成とフグ個体を使った誘引行動実験とTTX類縁体の受容嗅細胞種の特定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の学術的意義は、これまでフグ誘引の活性の本体と考えられていたテトロドトキシン(TTX, フグ中毒の原因物質で猛毒)ではなく、無毒のTTX類縁体5,6,11-trideoxyTTXであることを初めて発見したことにある。この発見は、日本人に古くから馴染みの深いフグとフグが保有する毒素TTXの複雑な関係が、分子レベルで明らかになるきっかけとなるだろう。

研究成果の概要(英文)：Because of the strong toxicity of tetrodotoxin (TTX), pufferfish uses TTX as a protective substance. On the other hand, there have been interesting reports that pufferfish are attracted to TTX. We thus first attempted to confirm that the TTX is actually sensed by the pufferfish olfactory organ by measuring an olfactory electrogram (EOG: electric field potential change generated when the olfactory epithelium is stimulated with an odorant). Unexpectedly, a strong EOG response was observed for 5,6,11-trideoxyTTX, a non-toxic analog of TTX rather than toxic TTX. We then synthesized several related compounds of the TTX analog for structure-activity relationship studies, and attempted behavior experiment using pufferfish, and to identify attractive olfactory cell species that receive the TTX analog.

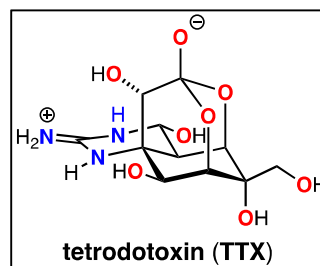
研究分野：有機合成、天然物化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：テトロドトキシン フグ毒 誘引物質 トリデオキシテトロドトキシン フグ EOG

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フグ中毒の原因物質テトロドトキシン (TTX) は、最も有名な海産天然物の一つである。この天然毒が極めて強力な毒性を示すことから、フグはこの化合物を防御物質として利用していると考えられている。一方で、水産系の研究者から、フグが TTX に誘引されるという現象が報告されてきた。1995 年に松村は、TTX がクサフグ (*Takifugu niphobles*) のフェロモンとして働いていると報告した (*Nature* **1995**, 378, 563-564.)。産卵期に雌が産卵とともに TTX を放出し雄を誘引するという研究報告である。彼らは、Y 字型水槽に TTX を溶かした海水を流し、産卵期の雄のクサフグが TTX に誘引されるが、雌は誘引されないことを示した。TTX はフグ以外の捕食生物に忌避的に作用するので、このフェロモン説は極めて魅力的である。ついで、2000 年に斉藤らは、水槽に TTX を固定したゼラチンを置き、その行動を見ることでトラフグ稚魚が TTX に誘引されることを示した (*Bull. Inst. Oceanic Res. & Develop. Tokai Univ.* **2000**, 21, 93-96.)。最近、沖田らは、Y 字型水槽を使って、トラフグの稚魚の嗅上皮 (嗅覚器官) を焼潰すと TTX に誘引されなくなることから、フグは TTX を嗅上皮で認識しているとした (*Ichthyol. Res.* **2013**, 60, 386-389.)。これらの行動学的研究は、強毒性を示す TTX がフグの誘引物質であることを示している。



そこで、研究代表者の西川は、魚類の神経生理学を専門とする研究分担者の阿部と、化学合成した高純度の TTX とクサフグを使って以下の実験を行った。すなわち、TTX によってフグの嗅覚器が応答するかを生理学的な方法、EOG (Electro-Olfact Gram, 嗅上皮を匂い物質で刺激した時に発生する電位変化) によって検出する実験である。その結果は予想外のもので、TTX は全く EOG 応答を示さなかったが、同時にフグに含まれる TTX のアナログ (化学合成品) の EOG 応答も調べたところ、毒性を示さない 5,6,11-trideoxyTTX に強力な応答が見られた。クサフグの誘引物質が TTX ではなく 5,6,11-trideoxyTTX であることを強く示唆した初めての研究結果である。

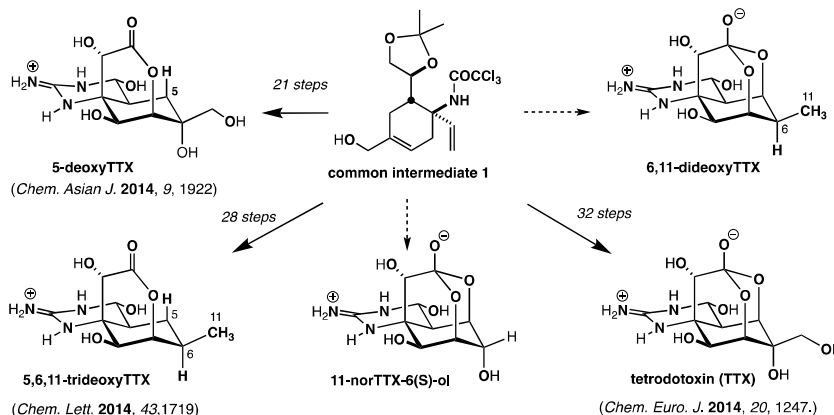
2. 研究の目的

本研究では、(1)フグの嗅上皮応答を示す TTX 関連物質を特定し、(2)実際にフグを誘引するが行動実験で確認すると共に、(3)フグによる TTX 関連物質の認識の分子機構を明らかにすることが目的である。

2. 研究の方法

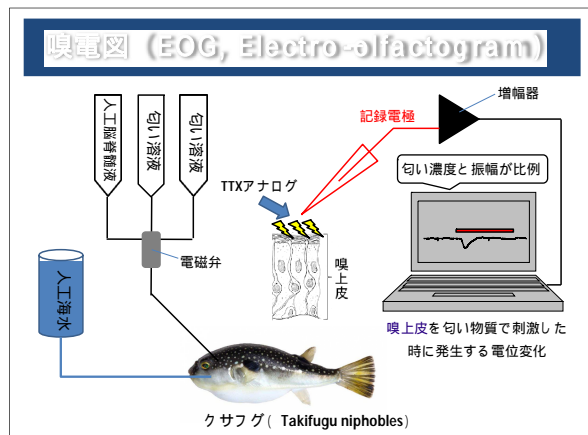
(1) フグの嗅上皮応答を示す TTX 関連物質の特定

本研究者が既に実施した実験では、TTX はクサフグ嗅上皮において EOG 応答を示さなかった。一方 TTX analog X は、対照実験で使っているアミノ酸 L-アルギニンを上回る EOG 応答を示した。しかし、クサフグは上記以外にも多くの TTX 関連物質を保有すると報告されており (M. Yotsu-Yamashita et al. *Anal. Chem.* **2006**, 352, 142-144.; *Mar. Drugs* **2010**, 8, 1049-1058.)、これら化合物もフグの誘引に関わっている可能性がある。そこで、これら TTX 類縁体を完全化学合成で調製し、高純度のものを使って EOG 活性を測定する。これらの類縁体のうち 5-deoxyTTX、11-deoxyTTX、5,6,11-trideoxyTTX は、過去に報告した方法 (*J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7847-7852; *Chem. Asian J.* **2014**, 9, 1922-1932.) を利用して合成する。その他の類縁体は、西川らが開発した TTX の第 3 世代合成法を利用して合成する計画である。概略をスキーム 1 に示す。



スキーム1. TTX類縁体の化学合成法の概略

次いで、合成した高純度のサンプルを使って EOG 応答実験をおこなう。この実験は、これまで TTX, 5,6,11-trideoxyTTX による EOG 応答を観測した実験と同じだが、具体的には以下のように実施する。実験に使うクサフグは、南知多町で採集し、円形水槽で 12 時間明期、12 時間暗期の照明条件で飼育したものを使用する。クサフグに麻酔をかけ不動化し、鼻腔を露出させた状態で、記録電極を嗅上皮に、参照電極を鼻腔付近の表皮上に設置し、嗅上皮には常に人工脳脊髄液 (ACSF) を還流させる。TTX 関連物質は、この ACSF に溶解させて投与する (左図)。なお、本 EOG 記録系の動作は、魚類における既知の匂い物質 L-アルギニンを使って確認する。これによって、フグのもつ TTX 類縁体を網羅的に調べる。



クサフグ (Takifugu niphobles)

(2) フグの誘引行動実験

上記の実験で EOG 応答を示した化合物に関して、クサフグを使った行動実験を実施する。過去に報告された 2 つの行動実験では、Y 字型水槽を使って海水を絶えず迷路上流から流す形式で実験を行っている。しかし、この方法では、大量の TTX 関連物質が必要になり、化学合成によって合成できる化合物の量を勘案すると現実的でない。そこで、前述の斉藤らの行動実験を参考にして、次のような行動実験の実施を計画した。水槽に TTX 関連物質を固定したゼラチン、あるいはアガロースを設置し、そこから溶出する TTX 関連物質に誘引されたフグが示す行動を観測する方法である。なお、フグの TTX 保有量は、繁殖期に最大になるとの報告 (S. Itoi et al. *Toxicol* 2015, 108, 141-146.) もあり、フグの誘引行動は繁殖期とそれを外れた時期では異なる可能性がある。フグの行動実験では、この点を留意して実験を進める。

(3) フグによる TTX 関連物質認識の分子機構

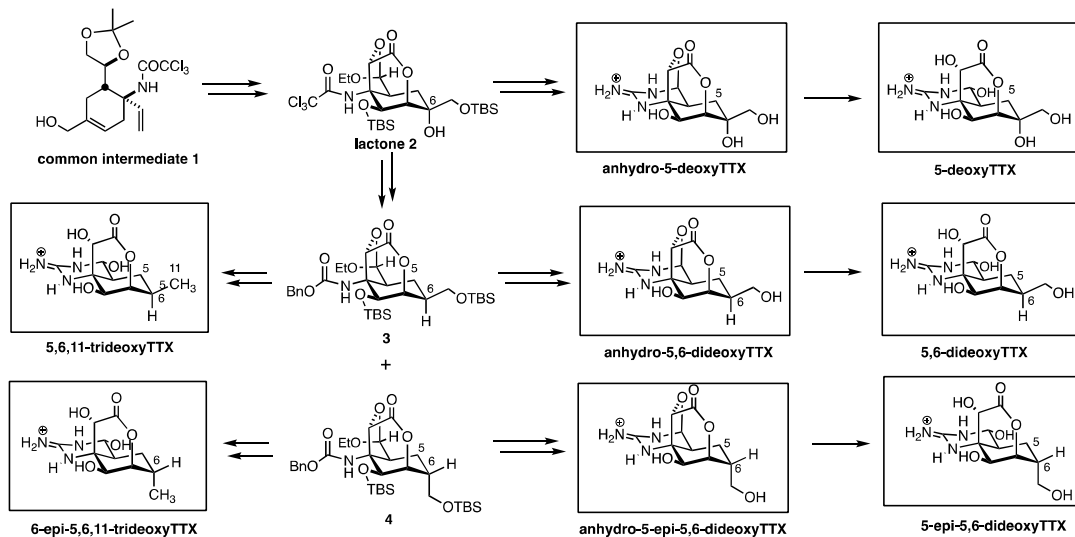
嗅上皮には特定の匂い物質に対して特異的に応答する嗅覚受容体 (OR) が発現する嗅上皮細胞が分布している (脊椎動物の嗅上皮細胞では一般に一個の細胞に 1 種類の嗅覚受容体が発現する)。一般に陸上生物の OR 数は極めて多い (マウスで 1400 近く) が、トラフグはゲノム解析より OR 遺伝子が 94 種類存在することが明らかにされており、その数は陸上生物に比べて非常に少ない。さらに、そのうち半数が偽遺伝子で、機能している OR 遺伝子は 40 種類であるとされている (Y. Niimura et al. *PNAS*, 2005, 102, 6039-6044.)。今回実験に使うクサフグのゲノムは解析されていないが、トラフグと近い数の OR 遺伝子が発現していて、そのうちのどれかが TTX analog 1 に応答すると考えられる。そこでまずフグ嗅上皮に存在するどの嗅上皮細胞が TTX 関連物質特異的 OR を発現するのか、嗅上皮のスライス標本を作製し、5,6,11-trideoxyTTX に対する OR 賦活化→細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を指標としてイメージングによって検出する。そして 5,6,11-trideoxyTTX に対して応答する嗅上皮細胞を特定後、その細胞まるごと、または細胞質を顕微鏡下でガラスピペットを用いて回収し、当該細胞で発現する OR 遺伝子を縮重プライマーを用いた単一細胞 RT-PCR 法によってクローニングする。最後に、クローニングした OR 遺伝子を培養細胞に発現させ、その受容体機能を検証する。

4. 研究成果

4-1. フグの嗅上皮応答を示す TTX 関連物質の特定

(a) TTX 類縁体の化学合成:

計画に従って、TTX 類縁体を網羅的に化学合成した。まず、共通中間体 1 から、ラクトン 2 を経て anhydro-5-deoxyTTX を合成し、加水分解によって、5-deoxyTTX へ変換した。次に、ラクトン 2 から 6 位水酸基を脱酸素化し、6 位に関するエピマー 3 と 4 を合成した。得られた 3 からは 5,6-dideoxyTTX、5,6,11-trideoxyTTX とその anhydro 体を合成した。一方、4 からは、6-epi-5,6-dideoxyTTX、6-epi-5,6,11-trideoxyTTX とその anhydro 体を合成した。



スキーム 2 . TTX 類縁体の化学合成

(b) 合成 TTX 類縁体の EOG 応答

クサフグの嗅上皮を使って、合成した TTX 関連物質の EOG を測定した。その結果を図 2 に示す。TTX と anhydroTTX には、EOG 応答はみられず、一方で 5,6,11-trideoxyTTX には、L-アルギニンを上回る強い EOG 応答が観測された。

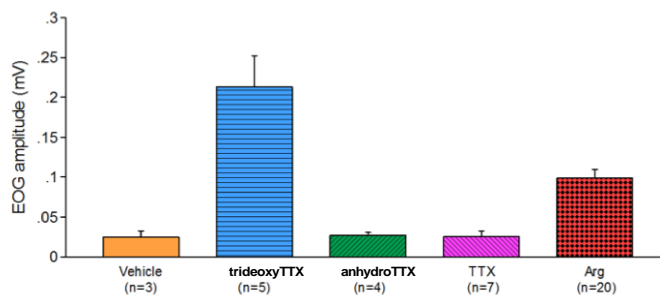


図 2 . TTX 関連物質の EOG 応答

(2) フグの誘引行動実験

当初計画した、水槽に TTX 関連物質を固定したゼラチン、あるいはアガロースを設置し、フグが示す行動を観測する方法では、有意な結果が得られなかった。そこで、長方形水槽にクサフグを遊泳させ 5,6,11-trideoxyTTX 投与前後での遊泳行動変化を解析したところ、投与側滞在時間増加、遊泳速度低下が生じ、探索様行動を示した。またミドリフグを使用した解析では円形水槽中央にメチルセルロースによって粘性を持たせた 5,6,11-trideoxyTTX を投与したところ水槽中央部への滞在時間が増加した。

(3) フグによる 5,6,11-trideoxyTTX 認識の分子機構

蛍光デキストラン標識によって繊毛細胞、微絨毛細胞とは異なる形態を持つ、嗅上皮表層に位置する大型細胞が標識された。そこで最初期遺伝子産物の一種 pERK に対する抗体を使用して 5,6,11-trideoxyTTX 受容嗅細胞の検出を試みた。クサフグ・ミドリフグ共に嗅上皮表層に位置する細胞が pERK 抗体で標識されたが、他の嗅細胞種も一部だが非特異的な標識が観察された。上述の方法で標識された嗅細胞種を特定するため、繊毛細胞・微絨毛細胞以外の嗅細胞で特異的に発現する転写因子、S100 に対する免疫組織化学を実施したところ、ミドリフグでは嗅上皮表層に位置する細胞が特異的に標識されたが、クサフグでは期間内に明瞭な染色像が得られなかった。

(4) まとめ

今回合成した多くの TTX 類縁体は、再現性の問題で未だクサフグを使った EOG 応答を測定する至っていない。しかし、以上の結果から、少なくとも 5,6,11-trideoxyTTX はフグの誘引行動を引き起こす活性を有していると考えられる。この結果は、従来報告されてきた「フグは TTX に誘引される」という行動実験の結果と矛盾する。しかし、5,6,11-trideoxyTTX はフグが保有する TTX 類縁体であると報告されており、既報において行動実験に使われたのが TTX の粗毒だっ

た事に原因があると考えられる。天然由来の TTX の精製は極めて困難で、特にアナログ間の完全な分離・精製には、特殊なイオン交換カラムを使った HPLC 分取が必要である。すなわち、TTX の粗毒に微量混入していた 5,6,11-trideoxyTTX がフグの誘引活性を引き起こしたと解釈できる。なお、ミドリフグをつかった実験でも、5,6,11-trideoxyTTX によって誘引行動が観測されたため、フグ類が一般に 5,6,11-trideoxyTTX によって誘引される可能性があり、今後確認が必要であろう。

一方で、フグが 5,6,11-trideoxyTTX を認識する受容嗅細胞の検出には至っていない。pERK 抗体による標識では 5,6,11-trideoxyTTX を受容する嗅細胞の特異的かつ再現性のある標識が現状困難だったため、別の最初期遺伝子産物に対する抗体の利用、5,6,11-trideoxyTTX と蛍光デキストランの共投与による嗅細胞標識等、標識法の改善によって 5,6,11-trideoxyTTX 受容嗅細胞種の確定を目指す。また組織学的解析の過程で、5,6,11-trideoxyTTX 受容嗅細胞の候補は嗅上皮内で繊毛細胞や微絨毛細胞の間に少数が散在するため、嗅上皮全体を Ca^{2+} 指示薬で染色してしまうと 5,6,11-trideoxyTTX 受容細胞を Ca^{2+} 指示薬の蛍光画像中で識別困難であることが判明した。そこでインジェクションによって 5,6,11-trideoxyTTX X 受容嗅細胞の候補に Ca^{2+} 指示薬を直接導入し、5,6,11-trideoxyTTX に対して応答する否か検証する。そしてその細胞の細胞質から RT-PCR を行うことで今後 5,6,11-trideoxyTTX 受容体の特定を進めようと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Ito, S.; Yamamoto, Y.; Nishikawa, T. A concise synthesis of peramine, a metabolite of endophytic fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, 82, 2053-2058. (DOI: 10.1080/09168451.2018.1511966)
- (2) Adachi, M.; Miyasaka, T.; Kudo, Y.; Sugimoto, K.; Yotsu-Yamashita, M.; Nishikawa, T. Total Syntheses and Determination of Absolute Configurations of Cep-212 and Cep-210, Predicted Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin Isolated from Toxic Newt. *Org. Lett.* **2019**, 21, 780-784. (DOI: 10.1021/acs.orglett.8b04043)
- (3) Yamamoto, Y.; Nakazaki, A.; Nishikawa, T. New regiocontrolled syntheses of pyrrolopyrazinones and its application to the synthesis of peramine. *Tetrahedron* **2017**, 73, 3443-3451. (DOI:org/10.1016/jet.2017.05.004)
- (4) Tsukamoto, T.; Chiba, Y.; Wakamori, M.; Yamada, T.; Tsunogae, S.; Cho, Y.; Sakakibara, R.; Imazu, T.; Tokoro, S.; Satake, Y.; Adachi, M.; Nishikawa, T.; Yotsu-Yamashita, M.; Konoki, K. Differential Binding of Tetrodotoxin and its Derivatives to Voltage-sensitive Sodium Channel Subtypes ($Na_v1.1$ to $Na_v1.7$). *Br. J. Pharmacol.* **2017**, 174, 3881-3892. (DOI:10.1111/bph.13985)

〔学会発表〕(計 23 件)

- (1) 宮坂忠親、安立昌篤、工藤雄大、杉本敬太、山下まり、西川俊夫：テトロドトキシンの推定生成中間体の全合成と絶対立体配置の決定。日本農芸化学会 2019 年度大会（東京）2019.3.24-2019.3.27.
- (2) 杉本敬太、工藤雄大、宮坂忠親、安立昌篤、長 由扶子、此木敬一、千葉親文、西川俊夫、山下まり：テトロドトキシンの推定生成中間体のテトロドトキシン含有生物への投与。日本農芸化学会 2019 年度大会（東京）2019.3.24-2019.3.27.
- (3) 西川俊夫、中崎敦夫、安立昌篤：天然物の網羅的合成と新生物機能の解明。日本農芸化学会 2019 年度大会シンポジウム「農芸化学における有機合成の力 その視点と未来」(東京) 2019.3.24-2019.3.27.
- (4) 西川俊夫：天然物の網羅的合成と生物機能の解明。第 5 回ケミカルバイオロジーセミナー in 信州大学農学部（長野）2018.11.9.
- (5) 西川俊夫：天然物の効率的合成のための新合成方法論の開発。平成 30 年度有機合成セミナー（岐阜）2018.6.30.
- (6) 宮坂忠親、安立昌篤、杉本敬太、山下まり、西川俊夫：テトロドトキシンの推定生成中間体の合成研究。第 113 回有機合成シンポジウム 2018 年（名古屋）2018.6.6-2018.6.7.
- (7) 野口能寿、榊原 良、佐竹佳樹、安立昌篤、西川俊夫、山本直之、阿部秀樹：クサフグ(*Takifugu niphobles*)におけるフグ毒類縁体に対する嗅覚感知機構。平成 30 年度日本水産学会（東京）

2018.3.26-2018.3.30

- (8) 中東亮太、安立昌篤、野口能寿、山本直之、阿部秀樹、西川俊夫：テトロドトキシンのフグ誘引活性の解明を目的とした類縁体の合成研究。日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋）2018.3.15-2018.3.18
- (9) 宮坂忠親、安立昌篤、杉本敬太、山下まり、西川俊夫：テトロドトキシンの推定生合成中間体の化学合成研究。日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋）2018.3.15-2018.3.18.
- (10) 西川俊夫：網羅合成を目指した連続反応による天然物合成。有機合成 2 月セミナー “有機合成のニュートレンド 2018”（大阪科学技術センター、大阪）2018.2.5-2018.2.6
- (11) 西川俊夫：カスケード型環化反応によるグアニジン系天然物の合成。東北大学天然物生命化学セミナー（仙台）2017.11.29
- (12) 杉本敬太、上山 望、長由扶子、此木敬一、西川俊夫、山下まり：フグ由来のテトロドトキシ関連化合物の合成。日本農芸化学会東北支部会（仙台）2017.11.4
- (13) 宮坂忠親、安立昌篤、西川俊夫：フグ毒テトロドトキシンの推定生合成中間体の化学合成研究。日本農芸化学会中部支部 180 回例会（名古屋）2017.10.7.
- (14) 野口能寿、榊原 良、佐竹佳樹、安立昌篤、西川俊夫、山本直之、阿部秀樹：蛍光デキストランを利用した匂い刺激に応答するクサフグ嗅上皮細胞の同定。日本動物学会第 88 回富山大会（富山）2017.9.21-2017.9.23.
- (15) 上山 望、杉本敬太、工藤雄大、此木敬一、西川俊夫、山下まり：フグの新規スピロ環状グアニジノ化合物の単離、構造決定と海産テトロドトキシンの生合成経路の推定。第 59 回天然有機化合物討論会（北海道）2017.9.20-2017.9.22
- (16) 上山 望、杉本敬太、西川俊夫、長由扶子、此木敬一、山下まり：フグのテトロドトキシ関連化合物の構造と推定生合成経路。第 28 回万有仙台シンポジウム（仙台）2017.6.24

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 西川俊夫、中崎敦夫：「カスケード型環化反応による環状グアニジン天然物の合成」天然有機化合物の全合成 独創的なものづくりの反応と戦略 日本化学会編（CSJ Current Review 27）化学同人 2018 年 pp86-93.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~organic/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：阿部秀樹

ローマ字氏名：Abe Hideki

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院生命農学研究科

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：90396804

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：安立昌篤

ローマ字氏名：Adachi Masaatsu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。