

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K15915

研究課題名（和文）毒結合タンパク質複合体の解析によるトラフグ毒輸送機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation on the tetrodotoxin transport mechanism in Takifugu rubripes by analysis of tetrodotoxin-binding protein complexes

研究代表者

辰野 竜平（Tatsuno, Ryohei）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師

研究者番号：70771872

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）：トラフグのTTX非保有個体（約1,600 g）にTTX含有飼料を経口投与したところ、消化管から取り込まれたTTXは肝臓もしくは卵巣に蓄積された。雌個体は雄個体より肝臓に蓄積されたTTXの量が少なく、その差は卵巣へのTTX蓄積が要因だと推察された。自然環境から採取したトラフグ（約2,000 g）の雌個体および雄個体から血液を採取し、フグ毒結合タンパク質（PSTBP）の抗体を用いたウエスタンブロット法に供した。その結果、複数のバンドが得られ、70～100 kDaのサイズでは既報とほぼ同サイズのバンドが得られた。一方で、それ以下のサイズでは既報よりも一つもしくは二つほど多く、バンドが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トラフグ属魚類は特定部位に多量のテトロドトキシン（TTX）を蓄積するが、それを担う分子機構は明らかになっていない。その点を解明するため、トラフグのTTX蓄積部位と毒結合タンパク質（PSTBP）に関する調査を実施した。その結果、成熟個体は肝臓もしくは卵巣が主要な蓄積部位であること、肝臓は雌個体の方が蓄積量が少なくその分は卵巣に蓄積されたことが推察された。トラフグの主要なTTX蓄積部位が成長、成熟段階で異なることは、トラフグを研究する上で重要な基礎知見となる。また、段階の異なる個体でPSTBPの構成に差があることも明らかとなり、今後の研究に貢献しうる知見が得られたことは学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Cultured Takifugu rubripes were orally administered TTX-containing feed homogenate (approximately 1,600 g). TTX take up from their digestive tract accumulated in the liver or ovaries. Females accumulated less TTX in their livers than males, and the difference was presumably due to TTX accumulation in the ovaries. Plasma were collected from female and male T. rubripes (approximately 2,000 g) from the natural environment. The plasma were subjected to Western blotting using an antibody for tetrodotoxin binding protein (PSTBP). The result showed that multiple bands were obtained, with the 70-100 kDa size band being almost the same size as previously reported. On the other hand, one or two more bands were detected at smaller sizes.

研究分野：食品衛生

キーワード：トラフグ テトロドトキシン 毒結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

日本ではトラフグ属魚類の有毒部位の誤食を原因とした食中毒がしばしば発生してきた。そのため、トラフグ属魚類と毒の原因物質であるテトロドトキシン(TTX)に関する研究が先駆的に進められてきた。同属魚類は総じて皮、肝臓、および卵巣に多量の TTX を蓄積するが、筋肉や精巣にはほとんど蓄積しない¹⁾。また、トラフグ属魚類は成長や成熟に伴い主要な TTX 蓄積部位が変動する^{2), 3)}。しかしながら、特定の部位に TTX が蓄積される要因や主要蓄積部位が移り変わるメカニズムは不明なままである。

ヒガンフグから報告された TTX 結合タンパク質 (PSTBP 1、PSTBP 2) は、血液中では二量体で存在する⁴⁾。しかしながら、その二量体が PSTBP 1 または 2 同士、もしくは PSTBP 1 と 2 で構成されるかどうかについては検証されていない。申請者はトラフグの TTX 非保有個体が PSTBP と配列相同性の高い遺伝子 (相同性 80~90%) を有し、2 ドメインタイプだけではなく、1 ドメインタイプもタンパク質として発現することを見出した⁵⁾。前述のとおり PSTBP が複数存在すること、および PSTBP が複合体を形成することについては報告されているが、その意義が検証された例はない。

2. 研究の目的

これまでにトラフグ属魚類は特定の部位に多量の TTX を蓄積すること、成長や成熟に伴い主要な TTX 蓄積部位が変動することが明らかとなってきた。しかし、それらを担う分子メカニズムは解明されていない。申請者はトラフグ属魚類が複数の PSTBP 遺伝子を有すること、タンパク質として複合体が形成されていることから、“PSTBP の複合体の構成が TTX 輸送先の部位を決定する”との仮説を立てるに至った。本研究ではトラフグを研究対象にして、自然環境から採取した個体(天然個体)や養殖により作出した TTX 非保有個体(養殖個体)を試料として用い、仮説の検証を目的とした。

3. 研究の方法

(1) トラフグの天然および養殖個体を用いた TTX の主要蓄積部位の調査

トラフグの天然個体(雌個体:約 1,700 g, 雄個体:1,500~2,400 g)を活魚で入手した。これらの試料について、血液を採取した後に皮、筋肉、肝臓、および生殖腺(卵巣もしくは精巣)を摘出した。成熟度を推定するため、体重と生殖腺重量から生殖腺体指数(GSI)を算出した。摘出した部位は抽出作業に供するまで -30℃ で保存した。TTX の抽出は食品衛生検査指針理化学編の参考法に準じて行った。得られた試験液の TTX 濃度(μg/g)は、蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフ(HPLC-FLD)に供することで測定した。

トラフグの養殖個体(雌個体:1,500~1,600 g, 雄個体:1,500~1,700 g)を活魚で入手し、TTX 含有餌料の経口経管投与と実験を行った。TTX 含有餌料を経口投与した個体は投与 24 時間後に取り上げて血液採取後に皮、筋肉、肝臓、生殖腺、および消化管を摘出した。成熟度の推定として天然個体と同様に GSI の算出を行った。また、生殖腺の一部をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色に供することで、卵巣と精巣の成熟段階を確認した。摘出した部位は天然個体と同様の作業を行い、TTX 濃度を測定した。

(2) トラフグの天然個体を用いた PSTBP の発現調査

トラフグの天然個体(約 2,000 g)を活魚で入手した。これらの試料について血液を採取し、遠心分離(4,700×g, 6分間)を行った。遠心後の上清を取り出し、実験に供するまで -30℃ で保存した。解凍した血漿を適宜希釈し、SDS-PAGE に供した。その後 PSTBP 抗体を用いたウエスタンブロット法に供することで、PSTBP 複合体を形成する各 PSTBP の検出を行った。

4. 研究成果

(1) トラフグ天然個体の GSI を算出したところ、雌個体は約 10、雄個体は 17~27 であった。これら試料の皮、筋肉、肝臓、および生殖腺に含まれる TTX を調べたところ、雌個体は卵巣もしくは肝臓が、雄個体は肝臓が主要な TTX の蓄積部位であることが推察された。TTX 投与実験に用いた養殖個体の GSI は雌個体が約 7、雄個体が約 18 であった。卵巣および精巣の組織学的観察の結果、卵巣では卵黄球期の卵母細胞が生殖細胞の多くを占めており、精巣では多数の精子が観察された(図 1)。これらの点から実験に用いたトラフグは成熟が進んだ個体だと推察された。

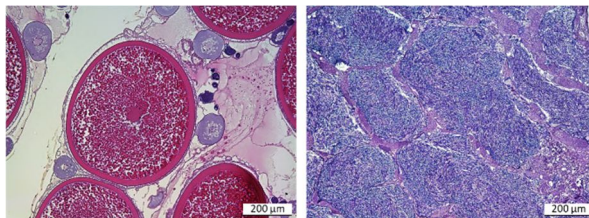


図 1 HE 染色に供したトラフグ生殖腺の組織切片

HPLC-FLD の結果、消化管、肝臓、および卵巣から TTX が検出された。雌個体と雄個体で総 TTX 量 ($\mu\text{g}/\text{individual}$) を比較したところ、雌雄差は認められなかった (図 2A)。この点から、TTX の体内への取り込みに雌個体と雄個体で差はないものと推察された。TTX 量 ($\mu\text{g}/\text{tissue}$) で 3 部位への蓄積状況を見ると、まず TTX 投与部位である消化管では雌雄差が認められなかった (図 2B)。一方で、肝臓では雌個体の方が雄個体よりも有意に低いことが分かった (図 2C)。また生殖腺の結果 (図 2D) も考慮すると、肝臓における TTX 量の雌雄差は卵巣への TTX 蓄積が原因であるものと推察された。

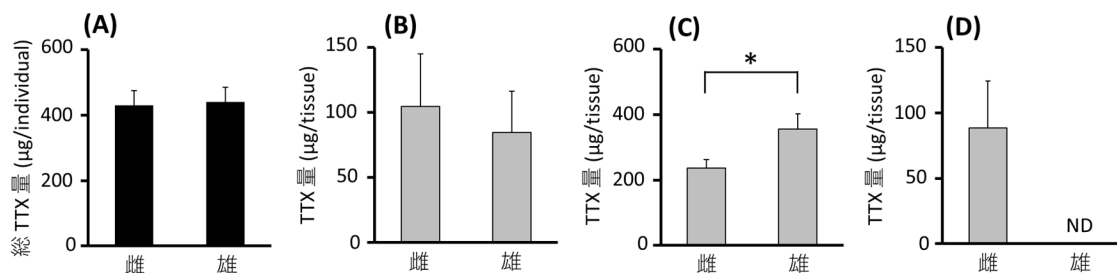


図 2 雌雄別の総 TTX 量 (A) と消化管 (B)、肝臓 (C) および生殖腺 (D) の雌雄別 TTX 量

(2) サンプル調製、SDS-PAGE、ウエスタンブロット法の条件を検討したところ、トラフグ血漿から複数のバンドを検出することができた。70~100 kDa のサイズでは、既報⁶⁾とほぼ同サイズのバンドが得られた。一方で、それ以下のサイズでは既報⁶⁾よりも一つもしくは二つほど多くバンドが検出された。既報⁶⁾は未成熟の個体を用いていることから、成熟段階の差が発現する PSTBP 複合体の違いに寄与する可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Noguchi, T., Arakawa, O. Tetrodotoxin – distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs* 6, 220-242.
- 2) Tatsuno, R., Shikina, M., Shirai, Y., Wang, J., Soyano, K., Nishihara, G.N., Takatani, T., Arakawa, O. Change in the transfer profile of orally administered tetrodotoxin to non-toxic cultured pufferfish *Takifugu rubripes* depending of its development stage. *Toxicon* 65, 76-80.
- 3) Ikeda, K., Emoto, Y., Tatsuno, R., Wang, J., Ngy, L., Taniyama, S., Takatani, T., Arakawa, O. Maturation-associated changes in toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus*. *Toxicon* 55, 289-297.
- 4) Yotsu-Yamashita, M., Sugimoto, A., Terakawa, T., Shoji, Y., Miyazawa, T., Yasumoto, T. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma of the puffer fish, *Fugu pardalis*. *European Journal of Biochemistry* 268, 5937-5946.
- 5) Tatsuno, R., Yamaguchi, K., Takatani, T., Arakawa, O. RT-PCR- and MALDI-TOF mass spectrometry-based identification and discrimination of isoforms homologous to pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin-binding protein in the plasma of non-toxic cultured pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77, 208-212.
- 6) Yotsu-Yamashita, M., Yamaki, H., Okoshi, N., Araki, N. Distribution of homologous proteins to puffer fish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein in the plasma of puffer fish and among the tissues of *Fugu pardalis* examined by Western blot analysis. *Toxicon* 55, 1119-1124.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TATSUNO RYOHEI, YOSHIKAWA HIROYUKI, INO YASUKO, FUKUDA TSUBASA, FURUSHITA MANABU, KISHIMOTO KENTA, KINOSHITA MASATO	4. 巻 88
2. 論文標題 Differences in tetrodotoxin accumulation in mature female and male <i>Takifugu rubripes</i>;	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NIPPON SUISAN GAKKAISHI	6. 最初と最後の頁 294 ~ 299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2331/suisan.22-00007	査読の有無 有
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、高谷智裕、荒川修	4. 巻 55
2. 論文標題 フグ毒保有魚類の成長や成熟に伴う毒蓄積組織の変動	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊海洋	6. 最初と最後の頁 17-21
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 Zhang Yafei, Minami Ryoma, Tatsuno Ryohei, Gao Wei, Ueno Mikinori, Yamada Akinori, Yoshida Asami, Sedanza Mary Grace, Arima Kazunari, Takatani Tomohiro, Yamaguchi Kenichi, Oshima Yuji, Arakawa Osamu	4. 巻 87
2. 論文標題 Wheat germ agglutinin affinity chromatography enrichment and glyco-proteomic characterization of tetrodotoxin-binding proteins from the plasma of cultured tiger pufferfish (<i>Takifugu rubripes</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad095	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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