

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380125

研究課題名(和文) 魚貝類の毒化機構を毒結合タンパク質の機能・進化から解明する

研究課題名(英文) A study on mechanism of tetrodotoxin poisoning in tiger pufferfish by binding protein

研究代表者

大嶋 雄治(Oshima, Yuji)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70176874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではトラフグ属魚類のテトロドトキシン(TTX)による毒化機構解明のため、まずTTX結合タンパク質とトリブチルスズ(TBT)結合タンパク質の遺伝子組換え体を分取・精製した後、TTXおよびTBT等との結合を証明した。さらに両結合タンパク質を体内で過剰に発現するトランスジェニックメダカ4系統の作製に成功した。本メダカ系統を用いた毒物投与実験の結果、結合タンパク質が毒物投与による生存低下を防ぐ可能性を示した。加えてトラフグ属魚類を中心に両タンパク質の遺伝子系統解析の結果、フグ毒結合タンパク質はTBT結合タンパク質が複数回の重複および融合をして生じた事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed to elucidate the mechanism of tetrodotoxin (TTX) poisoning in tiger pufferfish. First, recombinants of TTX binding protein and tributyltin (TBT) binding protein were successfully obtained from *Bombyx mori*. The results of binding assay using the recombinant proteins showed that these proteins could bind with TTX or TBT suggesting their detoxification function. In addition, transgenic medaka strains which over expressed TTX or TBT binding protein were successfully established. The results of TBT injection test to the transgenic medaka embryo suggested its detoxification function. Molecular phylogenetic study of toxin binding protein among several puffer fish species demonstrated a evolution pathway from TBT binding protein to TTX binding protein.

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産化学

キーワード：天然毒 フグ毒 トリブチルスズ 結合タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

トラフグ属魚類はテトロドトキシン (TTX) やサキシトキシン (STX) 等天然毒を蓄積して毒化することが知られており、水産上重要な問題である。トラフグ属の一種ヒガンフグは、フグ毒結合タンパク質 PSTBP を持つことが報告されており (Yotsu-Yamashita et al, 2001)、フグ科魚類の毒化には、PSTBP が重要な役割を持つと推定されている。

申請者らは広く魚類が毒結合タンパク質 (トリプチルスズ結合タンパク質：以下 TBT-bps) を持ち、フグ毒結合タンパク質 (以下 PSTBPs) は TBT-bp2 が 2 回繰り返した構造を持つことにより TBT-bp2 から進化したと推定した。また TBT-bps および PSTBPs は、リポカリンタンパク質に属し、中でも疎水性低分子と結合し輸送する性質を持つ 1 酸性糖タンパク質 (AGP) に最も類似していることから、TBT-bps および PSTBP は異物と結合し、体表粘液に排泄されることにより毒物の解毒・排泄に関与していると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、毒結合タンパク質 (トリプチルスズ結合タンパク質、TBT-bps とその進化型であるフグ毒結合タンパク質、PSTBPs) について、毒結合タンパク質の機能 (毒結合、解毒、輸送、排泄) を遺伝子組換え体タンパク質およびトランスジェニックメダカを用いて解明し、さらに毒結合タンパク質の分子進化を毒化する魚貝類 (トラフグ属魚類、ハコフグ、ツムギハゼ、ホタテ貝) 等で解析することにより、魚貝類における毒化機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 毒結合タンパク質遺伝子組換え体 (rTBT-bp1, rPSTBPs) の作製と発現
  - 1) トラフグ肝臓 cDNA に対し PCR を行い、全長 TBT-bps, PSTBPs 塩基配列情報を得、次に

それらの cDNA 配列を導入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、組換え体 (rTBT-bps, rPSTBPs) タンパク質をカイコの血液中に大量発現させた。次に得られた組換え体をアフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

- 2) 得られた毒結合タンパク質組換え体 (rTBT-bps, rPSTBPs) に対し、リポカリンの立体構造を探索する蛍光プローブとして 1-(5-(dimethylamino)-1-naphthalene-sulfonyl-amino) undecanoic acid (DAUDA) をリガンドとして組換え体との結合試験を行い、リポカリン特有の樽状立体構造が構築されているか確認を行った。
- 3) DAUDA との結合性を確認した後、TBT, TTX との結合試験を行った。また限外ろ過法による結合試験も実施した。

### (2) 毒結合タンパク質過剰発現トランスジェニックメダカの作製と解毒機能

- 1) 過剰発現型人工遺伝子の構築：  
beta-actin プロモーターもしくは熱誘導プロモーター (8xHSE) に毒結合タンパク質遺伝子をつなぎ、さらに GFP との間に IRES 配列を導入した。毒結合タンパク質 (TBT-bps または PSTBP) および GFP を含む一連の mRNA から、TBT-bp1 (または PSTBP) と GFP を独立したタンパク質として翻訳させ、過剰発現させることが可能となる遺伝子を作製した。また myc は TBT-bps (または PSTBPs) と融合タンパク質として発現させ、TBT-bp1 (または PSTBPs) の動態・機能解析時のエピトープとして使用した。

- a) 過剰発現型人工遺伝子 1 : (medaka promoter)-(medaka TBT-bps or PSTBPs)-(IRES)-(GFP)

b) 過剰発現型人工遺伝子 2 : (medaka promoter)-(medaka TBT-bps or PSTBP)(myc)-(IRES)-(GFP)

2) 毒結合タンパク質過剰発現トランスジェニックメダカを用いた解毒機能の証明

1)で作製し系統として確立できた毒結合タンパク質過剰発現トランスジェニックメダカを用いて胚に毒物 (TBT) をナノインジェクション投与して、その生存率を調べ、対照区と比較することにより毒結合タンパク質の TBT に対する解毒機能を解明した。

(3)毒化する魚貝類(トラフグ属魚類、ハコフグ、ツムギハゼ、ムラサキヒヨク等)における毒結合タンパク質遺伝子の解析を行うことにより、その分子進化を明らかにした。

1) 必要なサンプルの収集：10 種のフグ科魚類(トラフグ、クサフグ、ヒガンフグ、シヨウサイフグ、コモンフグ、ヨリトフグ、オキナワフグ、シロサバフグ、クロサバフグ、ミドリフグ)とツムギハゼの肝臓をサンプリングした。

2) フグ目魚類における TBT-bps のクローニング：これまでに解読してきたヒラメ TBT-bp1, 2 およびヒガンフグ PSTBP 遺伝子の配列をもとにフグ目魚類 TBT-bp1, TBT-bp2, PSTBP1, PSTBP2 それぞれについて縮重プライマーを作製した。サンプルから mRNA を抽出し、逆転写 PCR により TBT-bps 遺伝子の部分配列を決定する。部分配列が得られた種については、RACE 法を用いて TBT-bp1, TBT-bp2 または PSTBP) の mRNA 全長配列を決定した。

#### 4 . 研究成果

1) トラフグの毒結合タンパク質遺伝子TBT-bp1 およびPSTBP1, 2遺伝子cDNA配列を導入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、rTBT-bp1およびrPSTBP1, 2をカイコの血液中に大量発現させることに成功した。得られたタンパク質をクロマトグラフィーにより精製した後、TTXおよびTBTとの結合性を検討した。DAUDAとの競合結合法では、結合が認められなかったが、限外ろ過法による実験の結果、rTBT-bp1およびrPSTBP1はTTXと結合しないがrPSTBP2はTTXと結合することを証明した。またいずれの組換え体タンパク質もTBTと結合した。

2) トラフグPSTBPs遺伝子断片及びIRES、hrGFP2、pA配列を含む遺伝子断片を、つなぎPCR法によりコンストラクトを作製し、ベクター(pDs-actb4k-Gal4FF)に消化・ライゲーションしてDNA plasmid vectorを作製した。それを、メダカ胚にインジェクション投与後、胚発生および成長を経時的に観察するとともにGFP発現の確認を行った。その結果、以下の4系統のトランスジェニックメダカの作出に成功した。

1. 231-SK2  
(pDs-actb4k-PSTBP1-IRES-hrGFP2)
2. 232-d-rR  
(pDs-actb4k-PSTBP1-myc-IRES-hrGFP2)
3. 262-d-rR  
(pDs-8xHSE-PSTBP2-IRES-hrGFP2)
4. TBTbp1-d-rR  
(pDsIns-TBTbp1-Luc-42EGFP)

いずれの TG 系統においても、マーカーとなる GFP が観察された。熱誘導プロモーターである 8xHSE を含む系統では、37 ~ 29 °C、1 時間の加温により GFP 遺伝子の発現を全身で誘導できた。

さらに、232-d-rR (pDs-actb4k-PSTBP1-myc-IRES-hr GFP2) のメダカ胚に対して TBT (0, 3.3, 10 ng TBT/egg) をナノイン

ジェクション投与した。一般化線形モデルを用い検定を行った結果、TBT 濃度の上昇が死亡率の上昇の要因であることが証明された ( $p < 0.01$ )。また、対照区胚に比べて 232TG メダカ胚の死亡率が減少しており、遺伝子導入の有無が有意に作用していると判定された ( $p < 0.05$ )。よって、メダカ胚で発現したトラフグ PSTBP1 が TBT と結合することにより毒性を下げる機能を持ち、死亡率の減少につながったと考察された。現在 262-d-rR (pDs-8xHSE-PSTBP2 IRES-hrGFP2) の選抜育種をさらに進めており、ホモの胚が得られた後 TTX 投与実験を行う予定である。

- 3) 有毒な Takifugu 属 5 種 (トラフグ、ヒガンフグ、クサフグ、コモンフグ、ショウサイフグ)、無毒のサバフグ属 2 種 (シロサバフグ、クロサバフグ)、無毒種のヨリトフグ、有毒種ミドリフグ、オキナワフグ (有毒)、ツムギハゼ (有毒) それぞれの TBT-bp1、TBT-bp2 および PSTBP をクローニング後、データベース解析により調べた。TBT-bp1 はクサフグを除くすべての Takifugu 属およびミドリフグから 1 種類ずつ同定された。TBT-bp2 遺伝子はオキナワフグ、ツムギハゼを除くすべての種から見つかった。Takifugu 属では TBT-bp2 に 4-5 回の重複が生じており、重複により生じた遺伝子は配列の類似性から 2 つのタイプ (TBT-bp2a, TBT-bp2b) に分けられた。一方、PSTBP 遺伝子は Takifugu 属のみから見つかった。PSTBP にも 2 タイプが存在し、PSTBP1 (TBT-bp2a + TBT-bp2a) と PSTBP2 (TBT-bp2b + TBT-bp2a) に分けられた。このうち PSTBP1 は、本研究で初めて同定されたものである。なお Yotsu-Yamashita et al. (2001) で報告されている複数の PSTBP はいずれも PSTBP2 であった。ツムギハゼおよびオキナワフグ

からは TBT-bp2 および PSTBP は同定されなかった。TBT-bp2 および PSTBP 遺伝子の分子進化的解析から、PSTBP は Taikfugu 属の共通祖先における TBT-bp2 の 4-5 回程度の重複、1-2 回の融合、また遺伝子間の協調進化によって生じたことが明らかになった。このような特異な遺伝子の進化は、PSTBP が Takifugu 属の毒性の進化過程において何らかの自然選択を受けて急速に機能を獲得したことを示唆している。これらの結果をもとに、日本水産学会で発表を行った。また論文を執筆し、学術誌に投稿した。現在、論文の審査・改訂中である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Hashiguchi Y, Lee JM, Shiraishi M, Komatsu S, Miki S, Shimasaki Y, Mochioka N, Kusakabe T, Oshima Y. Characterization and evolutionary analysis of tributyltin-binding protein (TBT-bp) and pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein (PSTBP) genes in toxic and non-toxic pufferfishes. (投稿済み、改訂中)

Satone H, Akahoshi E, Nakamura A, Lee JM, Honda M, Shimasaki Y, Kawabata S, Kusakabe T, Oshima Y. Expression and functional characterization of recombinant tributyltin-binding protein type 2. J Toxicol I Sci. 38, 885-890 (2013)

Undap S, Pelle W, Isono R, Kishida C, Honda M, Shimasaki Y, Oshima Y. Toxicity of tributyltin to tropical marine fish, *Pterapogon kauderni*, and its accumulation. Report of the center of Advanced Instrumental Analysis Kyushu University,

31: 42-49. (2013)

Undap S, Honda M, Rumampuk N, Inoue S, Shimasaki Y, Rompas R, Mochioka N, Oshima Y. Monitoring of tributyltin contamination of demersal fish in coastal water in East China Sea. J. Fac. Agr, Kyu. Univ. 59: 103-107. (2014)

Undap S, Nirmala K, Miki S, Inoue S, Honda M, Shimasaki Y, Oshima Y. High tributyltin contamination in sediments from ports in Indonesia and northern Kyushu, Japan J. Fac. Agr, Kyu. Univ. 58:131-135. (2013)

〔学会発表〕(計 9件)

溝口直洋, 木下政人, 吉武修平, 後田真弥, 島崎洋平, 大嶋雄治. トランスジェニックメダカを用いたフグ毒結合タンパク質のTBT毒性軽減機能の証明. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 北海道大学, 平成 26 年 3 月 27-30 日

溝口直洋, 木下政人, 吉武修平, 後田真弥, 島崎洋平, 大嶋雄治. フグ毒結合タンパク質発現. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重大学, 平成25年9月19-22日

野中翔平, 中村愛子, 李 在萬, 小松正治, 辰野竜平, 荒川修, 島崎洋平, 日下部宣宏, 大嶋雄治. トラフグのフグ毒結合タンパク質組換え体の異物結合性. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重大学, 平成25年9月19-22日

小松正治, 李 在萬, 橋口康之, 白石真, 野中翔平, 島崎洋平, 望岡典隆, 日下部宣宏, 大嶋雄治. フグ毒結合タンパク質の魚種間分布. 平成 25 年度日本水産学会

春季大会, 東京海洋大学, 平成 25 年 3 月 27 日

橋口康之, Lee Jaeman, 白石真, 小松正治, 三木志津帆, 島崎洋平, 日下部宣宏, 大嶋雄治. フグ科魚類におけるフグ毒結合タンパク質の分子進化. 平成 24 年度日本水産学会, 東京海洋大学, 2012 年 3 月 27 日.

中村愛子, 李 在萬, 小松正治, 三木志津帆, 島崎洋平, 日下部宣宏, 大嶋雄治. トラフグ PSTBP および TBT-bp2 の組換え体を用いた生体内リガンドの探索. 平成 24 年度日本水産学会, 東京海洋大学, 平成 24 年 3 月 27 日.

大嶋雄治. トリブチルスズやフグ毒と結合する魚類リポカリンタンパク質. リスクサイエンスフォーラム, 福岡市, 福岡大学セミナーハウス, 平成 24 年 3 月 13 日.

中村愛子. 魚類異物結合タンパク質の遺伝子組換え体を用いた生体内リガンドの探索. 平成 23 年度水産学会九州支部大会, 鹿児島市, 鹿児島大学, 平成 24 年 1 月 28 日.

白石 真, 李 在萬, 橋口康之, 小松正治, 三木志津帆, 島崎洋平, 望岡典隆, 日下部宣宏, 大嶋雄治. フグ毒結合タンパク質の分子進化. 平成 23 年度水産学会九州支部大会, 鹿児島市, 鹿児島大学, 平成 24 年 1 月 28 日.

〔図書〕(計 1件)

橋口康之. 「エコゲノミクスの方法論」データベース解析:進化・適応研究における『仮説発見ツール』としての活用法」森長真一, 工藤洋(編)シリーズ現代の生態学7 エコゲノミクス-遺伝子からみた適応. 共立出版,

東京，2012.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/mes/tbtbp.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大嶋 雄治 (OSHIMA, Yuji)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70176874

### (2) 研究分担者

木下政人 (KINOSHITA, Masato)

京都大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：60263125

### (3) 研究分担者

橋口康之 (HASHIGUCHI, Yasuyuki)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70436517

### (4) 研究分担者

島崎洋平 (SHIMASAKI, Yohei)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40363329