

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580282

研究課題名(和文)トラフグにおけるフグ毒結合性タンパク質の分布と機能究明 - 性成熟の視点から

研究課題名(英文) Distribution and function of tetrodotoxin-binding proteins in the pufferfish Takifugu rubripes -elucidation from a viewpoint of sexual maturation

研究代表者

荒川 修 (ARAKAWA, Osamu)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：40232037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：無毒養殖フグを用いた種々のテトロドトキシン(TTX)投与実験、ならびに数種天然フグとツムギハゼの体内毒分布の調査により、これらのTTX保有魚類では、成長に伴う皮/肝臓の発達、および性成熟に伴う卵巣の発達/成熟に依存してTTXの体内動態が変化することを明らかにした。一方、数種のフグを対象にTTX結合性タンパク質(PSTBP)の相同遺伝子を探索し、トラフグには3つの候補遺伝子があり、そのうち2つはタンパク質として血漿中に存在すること、他の有毒フグ3種も2ドメインタイプのもをもち、それらの糖鎖結合部位の相違が毒蓄積能に関与する可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Various tetrodotoxin (TTX) administration experiments using non-toxic cultured pufferfish, and investigations on internal TTX distribution of several wild pufferfish species and the goby *Yongichthys criniger* demonstrated that TTX kinetics inside the body changes depending on the skin/liver development due to growth, and ovary development/maturation due to sexual maturation in these TTX-bearing fish. Moreover, searches for homologous genes of the TTX-binding protein (PSTBP) on several pufferfish species indicated that *Takifugu rubripes* possesses 3 candidate genes, 2 of which actually exist as proteins in the blood plasma, and that the other 3 toxic species also have 2-domain type candidate genes, and the difference in their sugar chain binding sites may be related to the toxin accumulation ability.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：テトロドトキシン フグ ツムギハゼ テトロドトキシン結合性タンパク質(PSTBP) 成熟

1. 研究開始当初の背景

フグ毒テトロドトキシン (TTX) に関する研究は、近年、主に日本でめざましい進歩を遂げた。すなわち、TTX はフグのみならず多様な生物に分布すること、フグは孵化時から無毒の餌を用いて人工飼育すると無毒になるが、そのような無毒個体に TTX を経口投与すると毒化すること、元来、海洋細菌が TTX を産生していること、などが順次明らかにされ、フグの毒化は細菌から始まる食物連鎖で説明することが可能となった。

一方、有毒餌生物を介してフグ体内に取り込まれた後の TTX の動態や存在形態に関しては、未だに不明な部分が少ない。Matsumoto らは、薬物速度論的なモデルを用い、フグ生体内に導入された TTX は血液を介して急速に肝臓に取り込まれることを明らかにした。研究代表者らも、トラフグの無毒養殖個体の筋肉に TTX を注射投与すると、血液を介して速やかに肝臓や皮に移行することを見出している。また、麻痺性貝毒 (PSP) を保有する淡水メコンフグの無毒養殖個体に PSP を投与した場合も、同様の移行が観察される。従って、フグの肝臓や皮には、特異な TTX/PSP 蓄積機構が存在するものと推察される。

関連して、Yotsu-Yamashita らはヒガンフグの血漿から TTX 結合性タンパク質 (PSTBP) を分離し、TTX 運搬への関与を示唆した。また、抗 PSTBP 抗体を用い、トラフグを含む数種のフグ科魚類は PSTBP 様タンパク質をもつこと、当該タンパク質はフグ科魚類特異的であることを見出している。研究代表者らは、天然コモンフグ血漿において、肝臓の毒性が高い通常期は遊離 TTX、卵巣の毒性が上昇する性成熟期には高分子物質と結合した TTX の割合が高くなることを見出した。このことは、性成熟期に血漿中の PSTBP 様タンパク質の量、組成もしくは活性が大きく変化し、肝臓から卵巣への能動的な毒の移行・蓄積が起こることを示唆している。すなわち、PSTBP 様タンパク質は単に TTX の輸送に関与するだけでなく、個体の性成熟にも深く関わる物質であると推察された。

2. 研究の目的

以上のような状況の下、フグにおける TTX の動態とそれに対する性成熟の影響、ならびにそこに関わる分子メカニズムの解明に資するため、初年度は早熟な人工交雑フグを用いて複数の TTX 投与実験を行うとともに、トラフグを対象として TTX 体内動態を担う候補遺伝子の探索を行った。次いで2年目は成熟段階と TTX 体内動態の関係を詳細に検討するため、成熟段階別個体の入手が困難なトラフグに代え、ツムギハゼを用いて TTX の体内分布に及ぼす性成熟の影響を評価した。一方、成熟のみならず、個体の成長が TTX の動

態に与える影響を検討するため、月齢の異なるトラフグ無毒個体に対する TTX 投与実験を行った。最終年度は、成熟および成長の影響を3種の天然有毒フグを用いて評価した。一方で、皮および肝臓の TTX 蓄積に関わる分子メカニズム推定のため、トラフグ無毒個体に対する3濃度の TTX 投与実験を行い、加えて無毒種および有毒種における PSTBP 相同遺伝子の存否について検討した。

3. 研究の方法

(1) 人工交雑フグへの TTX 投与実験

トラフグ雌個体の卵とクサフグ雄個体の精子を人工授精させて得た交雑フグ“トラクサ”31個体(月齢10ヶ月、 72 ± 15 g)を試験魚とし、そのうち27個体について TTX 標準品の生理的食塩水溶液を146 MU/個体の用量で筋肉内投与後、最長72時間飼育した。経時的に3~4尾ずつ取り上げ、LC/MS および ELISA で血漿、皮、筋肉、肝臓、および生殖腺の TTX 量を調べた。一方、トラフグ雌個体の卵とマフグ雄個体の精子を人工授精させて得た交雑フグ“トラマ”33個体(月齢8ヶ月、 213 ± 28 g)を試験魚とし、そのうち15個体ずつを2群(OGA群、IMA群)に分け、OGA群では TTX 添加飼料を400 MU/個体の用量で消化管内に経管投与後、IMA群では TTX 標準品の生理的食塩水溶液を同用量で筋肉内に投与後、最長120時間飼育した。経時的に各群3個体ずつ取り上げ、マウス毒性試験または LC/MS で血漿、皮、筋肉、および肝臓の TTX 量を調べた。トラマおよびトラクサの両実験において、毒を投与しなかった個体については、いずれの組織も無毒であることを確認した。

(2) トラフグにおける PSTBP 相同遺伝子の探索

ヒガンフグ PSTBP1 のアミノ酸配列を問い合わせ配列とした BLAST 検索により、トラフグの PSTBP ホモログを探索し、公開ゲノム情報で ORF 配列が不完全な場合、3'RACE で補完して完全 ORF を得た。続いて、養殖トラフグ無毒個体の皮、筋肉、肝臓、および卵巣における転写産物の発現を RT-PCR 法で解析した。さらに、抗 PSTBP1 抗体との免疫交差反応が報告されている120 kDa の血漿タンパク質を硫酸分画と SDS-PAGE により分離し、当該バンドに由来するトリプシン消化ペプチドの MS/MS 解析により、翻訳産物の同定を行った。

(3) ツムギハゼにおける TTX 体内分布の周年変動

2008年8月~2009年6月(群)、2009年11月~2010年8月(群)にかけて採取したツムギハゼ雌個体を試験魚とした。これらの試料について、皮、筋肉、肝臓、および生殖腺の TTX 量を LC/MS で測定するとともに、

生殖腺体指数 (GSI) の算出、および卵巣の組織学的観察によって、生殖周期および成熟段階の推定を行った。

(4) 月齢の異なるトラフグへの TTX 投与実験

無毒養殖トラフグ 8 個体 (月齢 6 ヶ月、 53.5 ± 6.9 g) および 5 個体 (月齢 15 ヶ月、 328 ± 36 g) を試験魚とし、TTX 添加飼料を 40 MU/20 g 魚体重の用量で消化管に投与した。24 時間後に取り上げ、皮 (背側、腹側)、筋肉、肝臓、および消化管に含まれる TTX 量を LC/MS で分析した。また、両群の生殖腺と肝臓の組織学的観察、ならびに GSI と HSI の算出を行い、TTX の移行・蓄積に影響を及ぼす生理的要因について検討した。

(5) 天然有毒フグ 3 種における TTX 体内分布の成熟および成長依存的変化

試験魚として、トラフグ小 6 個体 (20.9 ± 0.3 g)、大 5 個体 (261.5 ± 85.7 g)、オキナワフグ小 4 個体 (0.7 ± 0.3 g)、大 8 個体 (47.5 ± 14.0 g)、ヒガンフグ小 16 個体 (13.0 ± 11.8 g)、大 8 個体 (76.2 ± 22.0 g) を用いた。いずれも LC/MS により皮、筋肉、肝臓、および生殖腺の TTX 量を測定するとともに、皮の組織学的観察と HSI、GSI の算出を行い、TTX 体内分布の差異を生む要因を検討した。

(6) トラフグへの 3 濃度の TTX 投与実験

養無毒殖トラフグ (月齢 8 ヶ月、 144 ± 23.6 g) を試験魚として用いた。これらを I~III (n = 4~6) の 3 群に分け、TTX 標準品の生理的食塩水溶液をそれぞれ 150、450、および 1350 MU/個体の用量で筋肉内投与した。いずれも 24 時間後に取り上げ、皮、筋肉、および肝臓の TTX 量を LC/MS で測定するとともに、皮および肝臓については抗 TTX 抗体を用いる免疫組織科学的手法により、TTX の局在を可視化した。

(7) 天然フグ数種を用いた PSTBP 相同遺伝子の探索

シロサバフグ (無毒種)、マフグ、コモフグ、およびナシフグ (有毒種) を試験魚として用いた。肝臓から抽出した total RNA から cDNA を合成し、数種類のプライマーペアを用いて RT-PCR 法および 3'RACE 法を行って、全長配列の取得を試みた。

4. 研究成果

(1) 人工交雑フグへの TTX 投与実験

トラクサへの投与実験では、筋肉内投与した TTX は血液を介して速やかに他の組織に移行した。各組織の TTX 量では、卵巣への移行が際立っており、実験期間中、肝臓と皮は最高でも 4~8 MU/g 程度、精巣ではほとんどが 0.1 MU/g 未満であったのに対し、卵巣の毒量は漸増して 72 時間後には 53.5 MU/g に達し

た (図 1)。一方、TTX 蓄積率 (投与毒量に対する蓄積毒量の割合) は、皮、次いで肝臓の値がそれぞれ 20~54%、2~24% と高かったが、後者は 12 時間後以降次第に減少し、雌個体では 48 時間後以降卵巣の値を下回った。

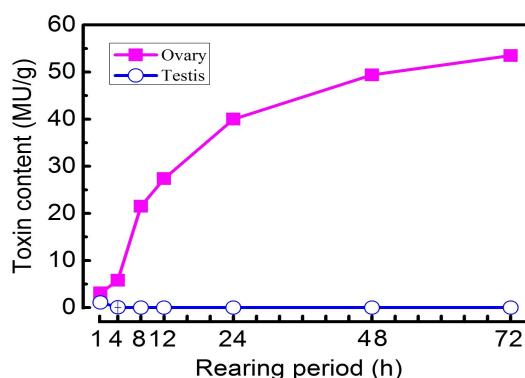


図 1 トラクサ雌 (上) および雄 (中) の各組織、ならびに生殖腺 (下) の TTX 量の経時変化

一方、トラマへの投与実験では、OGA 群は毒投与 24 時間後までは消化管の毒量 (MU/g) が急速に減少し、これに呼応して肝臓の毒量が増加したが、その後は肝臓の毒量が漸減するとともに、皮膚への毒の移行がみられた。一方、IMA 群では、TTX は血液を介して速やかに筋肉から肝臓と皮に移行した。TTX 蓄積率の推移を図 2 に示す。TTX 蓄積率は、OGA

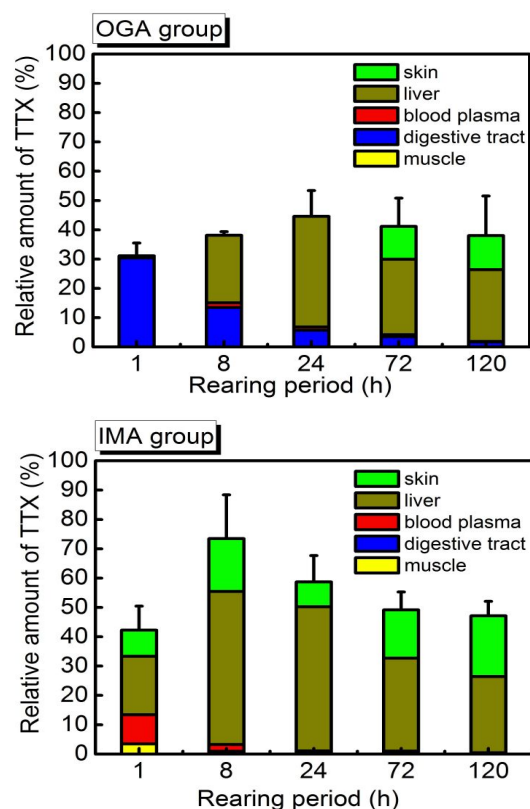


図 2 OGA 群 (上) および IMA 群 (下) の TTX 蓄積率の経時変化

群で 31~45%、IMA 群で 42~74%と総じて OGA 群の方が低かった。組織別にみると、両群ともに 8 時間後以降は肝臓の割合が 23~52%と最も多く、72 時間後以降は皮 (11~21%) がこれに次いだ。

以上、一旦肝臓に取り込まれた毒は、雌個体では卵巣、雄個体では皮に移行・蓄積するものと推察された。

(2) トラフグにおける PSTBP 相同遺伝子の探索

ゲノムデータベースから PSTBP に相同な配列が 3 つ得られ、これらを暫定的に toxin-binding protein related genes (*Tr*) 1-3 と命名した。*Tr* 遺伝子および PSTBP のドメイン構造を図 3 に示す。系統解析の結果、*Tr1* と *Tr2* は 1 つのリポカリンドメインからなる新規 PSTBP ホモログであること、*Tr3* は 2 つのリポカリンドメインをもつヒガンフグ PSTBP のオースログであることが示唆された。

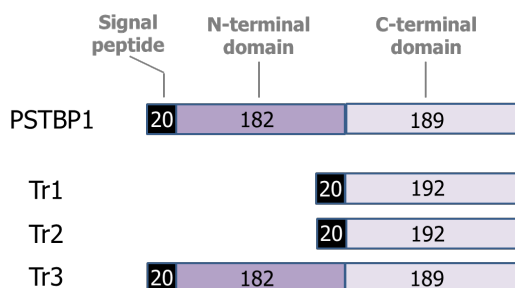


図 3 *Tr* 遺伝子および PSTBP のドメイン構造

Tr2 については、今回実験に供したいずれの組織でも mRNA の発現がみられなかったが、*Tr1* および *Tr3* の場合、肝臓で発現が認められ、それらの翻訳産物が 120-kDa 血漿タンパク質を構成することを確認できた。

以上、トラフグは無毒の状態においても PSTBP に相同な遺伝子 2 種を発現していることが明らかとなった。

(3) ツムギハゼにおける TTX 体内分布の周年変動

GSI の周年変化と生殖周期別の TTX 体内分布を図 4 に示す。群は、GSI の推移、および卵巣の組織学的観察から、前卵黄形成期、卵黄形成期、産卵期盛期、産卵期終期に群分けを行った。周期別の相対 TTX 量をみると、前卵黄形成期は皮の割合が 77%と最も高く、卵巣の割合は 1%程度であったが、卵黄形成期になると卵巣の割合が 45%にまで上昇した。さらに産卵期盛期になると 72%に達することがわかった。

群では、周辺仁期、卵黄胞期、第一次卵黄球期、第二次卵黄球期、第三次卵黄球期の卵母細胞が観察されたので、卵巣の中で最も発達した卵母細胞を当該個体の成熟段階とし、群分けを行った。相対 TTX 量では、周辺仁期および卵黄胞期の卵母細胞を持つ個体

群では、70%程度が皮に分布しており、卵巣の割合は 1%未満であった。しかし、第一次卵黄球期から卵巣の割合は 1%を越え、第二次卵黄球期で 24%、第三次卵黄球期で 52%と顕著な上昇がみられた。

以上、卵巣の成熟が進むにつれ、特に卵黄球期から TTX の卵巣への偏在が顕著になることが推察された。

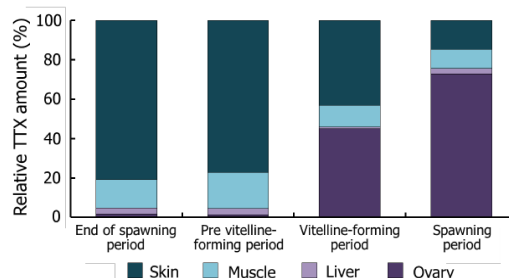
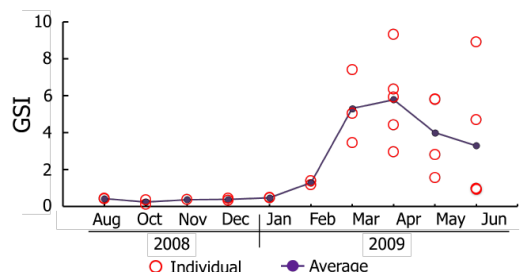


図 4 GSI の周年変化 (上) および生殖周期別の TTX 体内分布 (下)

(4) 月齢の異なるトラフグへの TTX 投与実験

両月齢群における TTX 蓄積率を図 5 に示す。両群の間には大きな差がみられ、6 ヶ月齢の個体群では投与毒量の約 30%を蓄積し、その大半が皮に分布していたのに対して、15 ヶ月齢の個体群では約 80%を蓄積しており、そのほとんどが肝臓から検出された。HSI と肝細胞の組織学的観察の結果から、15 ヶ月齢魚の肝臓は成魚と同程度に発達しており、対して 6 ヶ月齢魚は未発達であることが明らかとなった。

以上、トラフグでは肝臓の発達に伴い TTX の体内動態が変化するものと推察された。

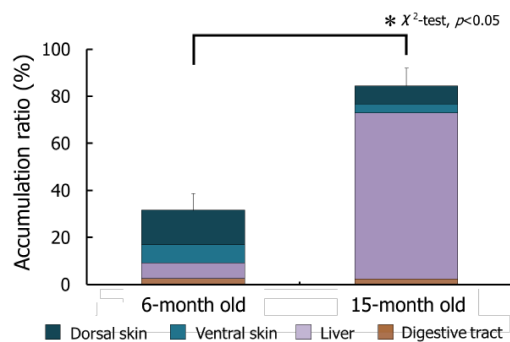


図 5 両月齢群における TTX 蓄積率

(5) 天然有毒フグ 3 種における体内毒分布の成熟および成長依存的変化

各種フグにおける小と大の体内毒分布を図 6 に示す。いずれのフグも小と大で TTX の体内分布が異なっていた。すなわち、トラフグの場合、小では総毒量の 93% が皮に局在していたのに対し、大では 39% が皮に、47% が肝臓に分布していた。ヒガンフグでは、小大ともに皮の毒量が 65~85% 程度を占めたが、大は小に比べ、雄では肝臓、雌では生殖腺に分布する毒の割合が高かった。一方、オキナワフグでは、皮への毒の局在が小(85%)より大(99%)でさらに進んでおり、肝臓の毒量はともに僅少であった。他方、3 種ともに小では筋肉にも顕著な毒の分布(5~10%程度)がみられた。

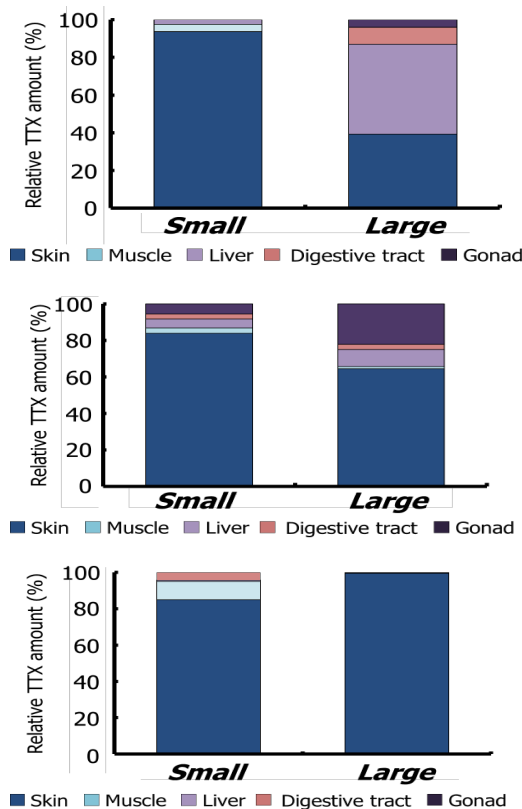


図 6 トラフグ(上)、ヒガンフグ(中)、オキナワフグ(下)における小および大の相対 TTX 量

以上に HSI と GSI の計測値、ならびに皮の組織学的観察の結果を加味すると、トラフグでは肝臓の発達、ヒガンフグの場合、雄では肝臓、雌では生殖腺の発達ないし成熟が、オキナワフグでは皮の発達、特に腺構造の分化が、小と大の体内毒分布に前述の差異をもたらした主要な要因と推察された。

(6) トラフグへの 3 濃度の TTX 投与実験

I~III 群の肝臓と皮の TTX 量を図 7 に示す。肝臓の TTX 量は、それぞれ 1.9 ± 1.0 、 7.8 ± 4.5 、および 27.3 ± 2.2 MU/g で、投与毒量に比例して直線的に増加した。一方、皮の TTX 量は、

それぞれ 2.2 ± 1.0 、 4.5 ± 2.3 、および 7.7 ± 5.9 MU/g で、投与毒量に依存して増加したが、増加の程度は肝臓より低かった。TTX 蓄積率をみると、肝臓は、いずれの群も 20% 程度であったのに対し、皮は 10~40% で、投与毒量が多いほど低い値を示した。

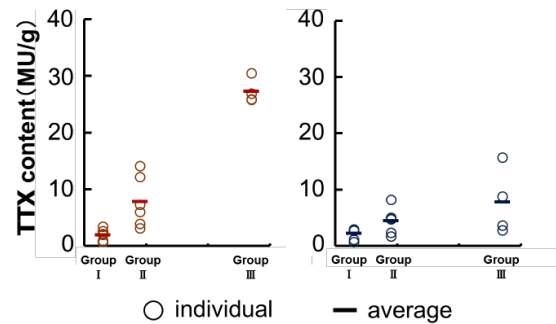


図 7 肝臓(左)と皮(右)における各群の TTX 量

免疫染色において、肝臓では群のみ瀰漫的な TTX 陽性反応が見られたのに対し、皮では投与毒量の多い群ほど、基底細胞から表皮細胞への陽性反応の広がりが観察されたことから、肝臓と皮では TTX の取り込み、もしくは蓄積の分子メカニズムが異なる可能性が示唆された。

(7) 天然フグ数種を用いた PSTBP 相同遺伝子の探索

RT-PCR 法により PSTBP 相同遺伝子(2 ドメインタイプ)の存否を検討したところ、電気泳動において有毒 3 種からそれぞれ目的サイズのバンドが得られたものの、無毒種のシロサバフグでは発現が確認できなかった。

数種類のプライマーペアを用いて RT-PCR および 3'RACE 法を行ったところ、有毒種 3 種の各 PSTBP 相同遺伝子配列が得られた。全長配列が明らかとなっているトラフグ、ヒガンフグの配列と比較したところ、3 種いずれも開始コドンがみあたらず、5'末端側に未知配列が残っているものと推察された。また、各 PSTBP 相同遺伝子間のアスパラギン(Asn)結合型糖鎖推定結合部位(Asn-Xaa-Ser/Thr)を比較すると、マフグで 8 ヶ所、コモフグで 9 ヶ所、ナシフグで 8 ヶ所存在した。既報のトラフグでは 7 ヶ所、ヒガンフグでは PSTBP1 で 8 ヶ所、PSTBP2 で 9 ヶ所であることから、糖鎖推定結合部位が最も少ないのはトラフグであることが明らかとなった。

以上、PSTBP 相同遺伝子が明らかとなった有毒種の中で、トラフグのみ TTX 体内分布が異なる(成魚は皮に毒をもたない)ため、糖鎖推定結合部位が TTX 体内分布と関わる可能性が考えられた。

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5件)

R. Tatsuno, M. Shikina, Y. Shirai, J. Wang, K. Soyano, G.N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa: 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 (2013).

R. Tatsuno, M. Shikina, K. Soyano, K. Ikeda, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the female goby *Yongeichthys criniger*. *Toxicon*, 63, 64-69 (2013).

R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani, O. Arakawa: 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*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 208-212 (2013).

J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, S. Nina, K. Ikeda, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of orally and intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of pufferfish, *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. *Food Hyg. Saf. Sci.*, 53, 33-38 (2012).

J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, S. Nina, K. Ikeda, M. Hamasaki, Y. Sakakura, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of pufferfish, *Takifugu rubripes* and *Takifugu niphobles*. *Toxicon*, 58, 565-569 (2011).

〔学会発表〕(計9件)

辰野竜平, 井樋洸太郎, 沖田光玄, 山中祐二, 高谷智裕, 荒川 修: トラフグに筋肉内投与したTTXの動態 - 肝臓と皮の毒蓄積様式の相違 -, 平成26年度日本水産学会春季大会, 函館, Mar. 27-31, 2014.

R. Tatsuno, T. Mine, Y. Yamanaka, K. Ikeda, T. Takatani, O. Arakawa: Growth-associated changes in internal tetrodotoxin distribution and skin structure in three species of pufferfish. 9th International Conference on the Marine Biodiversity and Environmental Fisheries Science of the East China Sea, Keelung, Sep. 29-Oct. 1, 2013.

辰野竜平, 山口健一, 高谷智裕, 荒川 修: 無毒養殖トラフグにおけるPSTBP相同アイソフォーム遺伝子の発現, 平成25年度日本水産学会春季大会, 東京, 2013年3月26-30日.

山中祐二, 峰 智香, 辰野竜平, 池田光彦,

高谷智裕, 荒川 修: 天然フグ3種における体内毒分布の成長依存的変化, 平成25年度日本水産学会春季大会, 東京, 2013年3月26-30日.

Y. Yamanaka, S. Niina, J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, K. Ikeda, M. Hamasaki, Y. Sakakura, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profiles of intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of the pufferfish: *Takifugu rubripes* × *Takifugu niphobles* and *T. niphobles* × *T. rubripes*, Joint International Symposium on Marine Science and Technology, Jeju, Oct. 25, 2012.

R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani, O. Arakawa: Two proteins homologous to pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin-binding protein (PSTBP) found in the plasma of non-toxic cultured specimens of the pufferfish (*Takifugu rubripes*), 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, Jul. 8-13, 2012.

新名真也, 荒木泰一郎, 王 俊杰, 辰野竜平, 濱崎将臣, 高谷智裕, 荒川 修: クサフグ×トラフグ人工交雑個体に筋肉内投与したテトロドトキシンの動態, 平成24年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012年3月29日.

王 俊杰, 荒木泰一郎, 辰野竜平, 新名真也, 池田光彦, 高谷智裕, 荒川 修: トラフグ×マフグ人工交雑個体の消化管および筋肉内に投与したテトロドトキシンの動態, 平成24年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012年3月29日.

R. Tatsuno, M. Shikina, Y. Shirai, T. Takatani, O. Arakawa: Growth-mediated change in the transfer profile of orally administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*, 8th International Workshop on Oceanography & Fisheries Science of the East China Sea, Naha, Nov. 25, 2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/FISH/>

[KENKYU/21arakawa/eisei.html](http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/FISH/KENKYU/21arakawa/eisei.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 修 (ARAKAWA, Osamu)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授
研究者番号: 40232037

(2) 研究分担者

高谷 智裕 (TAKATANI, Tomohiro)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授
研究者番号: 90304972