

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23658173

研究課題名（和文）フグ毒産生菌の全ゲノム解析によるフグ毒生合成経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the tetrodotoxin biosynthesis pathway by whole genome analysis of tetrodotoxin producing bacteria

研究代表者

渡部 終五 (WATABE SHUGO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40111489

研究成果の概要（和文）：本研究では、フグ毒テトロドトキシン(TTX)を産生する海洋細菌の全ゲノムを解読し、その TTX 生合成経路を明らかにすることを目的とした。そこで、相模湾産の天然クサフグの腸内細菌叢より、選択培地を用いて TTX 産生海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* を 6 株単離し、MALDI-TOF-MS 分析により、2 株から TTX を検出した。さらに本細菌からゲノム DNA を抽出して次世代シーケンサーによる全ゲノム解析に供した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the biosynthesis pathway of pufferfish toxin, tetrodotoxin (TTX), in TTX-producing marine bacterium *Vibrio alginolyticus* by the whole genome analysis. We identified 6 strains of *V. alginolyticus* from intestinal flora of pufferfish and TTX was detected from 2 strains by MALDI-TOF-MS analysis. Genomic DNA samples extracted from the TTX-producing *V. alginolyticus* strains were subjected to whole genome analysis by the next-generation sequencing technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：フグ毒，テトロドトキシン，フグ毒産生菌，*Vibrio alginolyticus*，生合成経路

1. 研究開始当初の背景

フグ類などに含まれる有毒成分フグ毒はテトロドトキシン(TTX)を主要成分とするが、生息域によってはサキシトキシンも含まれる。日本産フグ類の毒主要成分は TTX で、ナトリウムチャンネルへのナトリウムイオンの流入を特異的に阻害し、およそ 2 mg で成人を死に至らしめる猛毒である。TTX は、かつてはフグ類体内で生合成されると考えられていたが、両生類のカエルやイモリ、海洋生物ではヒョウモンダコやツムギハゼ、フグ類の餌となるヒモムシやカニからも相次いで検出され、これらの多様な保有動物が TTX を生合成している可能性は低いとされ

た。さらに、TTX を蓄積する有毒カニの消化管から TTX 産生能を示す細菌として *Vibrio* 属が、また紅藻類体表から TTX 産生能を示す *Alteromonas* 属と *Shewanella* 属が単離され、細菌が TTX の起源であることが初めて明らかとなり、マリントキシン分野で世界的な話題となった。

フグ科魚類でも腸内細菌叢、体表粘液、肝臓組織などから TTX 産生能を示す(共生)細菌が単離されており、現在では、フグ類が体内に蓄積する TTX は生物濃縮を伴った食物連鎖と体内の TTX 産生菌の両者から供給されることが示唆されている。近年では、TTX 産生能を示す菌株の同定に 16S rRNA 配列解

析が利用されているが、TTX 生合成遺伝子に関する知見はなく、これらの細菌の全ゲノム解析も行われていない。これまでの研究は、TTX 産生能を示す海洋細菌の単離が主な目的であり、TTX の生合成経路はほとんど研究されてこなかった。したがって、TTX 生合成に関わる遺伝子群が特定できれば、TTX の起源を解明する大きな成果となる。

わが国では、TTX を原因とする食中毒は全食中毒死者数の 4 割以上を占め、最も警戒を要する食中毒である。また、結合タンパク質や受容体などの蓄積や代謝に関連したタンパク質が特定できれば、TTX 産生菌細胞内の TTX の存在形態やトラフグ属魚類をはじめとする TTX 保有動物の毒蓄積機構の解明にも多大な貢献が期待できる。

申請者らは、以前より TTX 蓄積機構に関する生化学的研究を行っており、近年ではトラフグゲノムデータベースを利用して筋肉特異的遺伝子の組織特異的な発現変動解析を行ってきた。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて TTX 産生菌の全ゲノム解析を行い、TTX 生合成関連遺伝子の探索を行う。このようなアイデアは、当該分野においてきわめて斬新であり、フグ毒研究史上初の挑戦である。

先述のように、1980 年代から有毒カニ、フグ類の各組織およびその他の TTX 保有動物などで TTX 産生菌の探索が行われているが、TTX の生合成および代謝に関する生化学的な研究はほとんどなく、遺伝子工学的な手法を用いて TTX の存在意義を明らかにしようとする本研究のチャレンジ性はきわめて高い。TTX 産生海洋細菌はトラフグ属魚類をはじめとした TTX 保有動物の TTX の供給源として注目されている。

本研究によって TTX 産生海洋細菌から TTX 生合成関連遺伝子が特定できれば、これまで推定でしかなかった海洋環境での食物連鎖による TTX 保有動物の TTX の起源を遺伝子レベルで証明することができ、フグ毒研究において大きな成果となる。

本研究が成功を収め、海洋細菌から TTX 生合成関連遺伝子が見つければ、海洋環境以外に生息するイモリやカエルなどの TTX 保

有動物における毒の起源について大きな手がかりとなり、土壌や淡水環境における TTX 産生菌の探索に発展する可能性もある。

2. 研究の目的

本研究では、フグ毒テトロドトキシン (TTX) を保有するトラフグ属魚類などから TTX 産生能を有する海洋細菌を単離し、その全ゲノムを解読して TTX の生合成に関連する一連の遺伝子群を特定し、TTX 産生菌における TTX の生合成経路を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

日本沿岸で漁獲されるトラフグ属魚類の消化管内容物を段階希釈して調製した懸濁液を、*Vibrio* 属に対する選択培地に画線塗抹し、培地上に出現した *Vibrio* 属のコロニーをできるだけ多く単離する。得られた菌株を液体培地に移植して大量培養後、菌体から抽出した RNA 試料を対象に 16S rRNA 領域および *dnaJ* 遺伝子の特異的プライマーで PCR 増幅し、塩基配列を解析して菌株を同定する。さらに、菌体および培養液から抽出した毒成分試料をマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計 (MALDI-TOF-MS) に供し、フグ毒 TTX およびその関連化合物を検出して、単離した細菌の TTX 産生能を評価する。

TTX 産生能が認められた菌株について、大量培養した菌体を遠心分離し、沈殿として得た菌体からゲノム DNA を抽出する。さらに、DNA 試料を次世代シーケンサーに供して、その全ゲノムを解析し、TTX 生合成関連遺伝子を探索する。

4. 研究成果

(1) 天然クサフグ消化管内容物からの *Vibrio alginolyticus* の単離と菌株の同定

相模湾で漁獲した天然クサフグ(6尾)を解剖し、消化管を摘出して内容物を回収し、滅菌半海水で 1000 倍希釈して菌体希釈液とした。これを *V. alginolyticus* の選択培地である VAL agar に塗抹して 37°C で 24 時間培養したところ、図 1 のように黄緑色の陽性コロニーが認められた。これらを回収し、さらに、*Vibrio* 属の選択培地である TCBS 寒天培地に植菌して 37°C で 18 時間培養した。

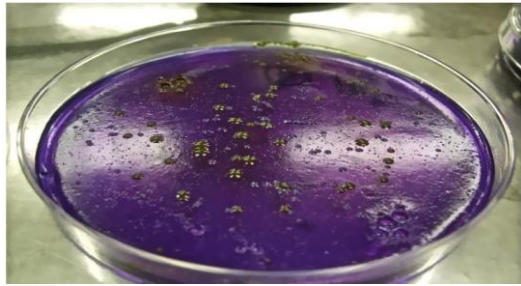


図 1. VAL agar 選択培地による *Vibrio alginolyticus* の単離。

以上のように、*Vibrio* 属に対する 2 段階の選択培養を経て、コロニーの形状が最も良い 6 つの菌株を単離した。これらのコロニーは、高い確率で *V. alginolyticus* であると推測される。そこで、0~10%NaCl を含む 1% phytone peptone 培養液に菌株を植菌して 37°C で一晩培養して塩分耐性を調べてみたところ、10%NaCl においても菌の増殖が認められた。腸炎ビブリオ食中毒の原因菌として知られる *V. parahaemolyticus* は 10%NaCl 環境下では生育できないため、本研究で得られたコロニーは *V. alginolyticus* であることが性状的に確認できた。

次に、リボソームサブユニットの構成 RNA である 16S rRNA 遺伝子とヒートショックタンパク質 40 をコードする *dnaJ* 遺伝子の部分配列を PCR で増幅し、塩基配列を決定して分子識別法による菌株の同定を行ったところ、本実験で得られたすべての菌株が *V. alginolyticus* であることが分かった。



図 2. 相模湾産の天然クサフグ消化管から単離した *Vibrio alginolyticus* の大量培養。

(2) TTX 産生能の検討

そこで、*V. alginolyticus* と同定された 6 つの菌株を、それぞれ 1%NaCl を含む 1% phytone peptone 液体培地 500 mL に植菌し

て 27°C で 7 日間培養した。図 2 のように、十分に菌体が増殖したところで、12,000 × g で 30 分間遠心分離して菌体を回収した。

菌体の TTX 産生能を検討するため、得られた菌体の一部に 9 倍量の 0.1% 酢酸を加えて 10 分間の超音波処理によって菌体を破壊した。さらに、沸騰水浴中にて 10 分間加熱して TTX を抽出後、遠心分離して上清を回収し、これを分画分子量 1,000 の限外濾過に供して濾液を TTX 抽出液とした。これをイオンペア HPLC に供して精製後、凍結乾燥して少量の蒸留水に再溶解し、MALDI-TOF-MS にてマスペクトルを測定した。図 3 に示すように、6 株のうち 2 株の *V. alginolyticus* 抽出液では、TTX 標準品を分析した場合と同様に TTX に相当する m/z 319.97 のマスペクトルが観察された。このことから、本研究においてクサフグの消化管内容物から単離培養した *V. alginolyticus* には TTX 産生能があることが分かった。

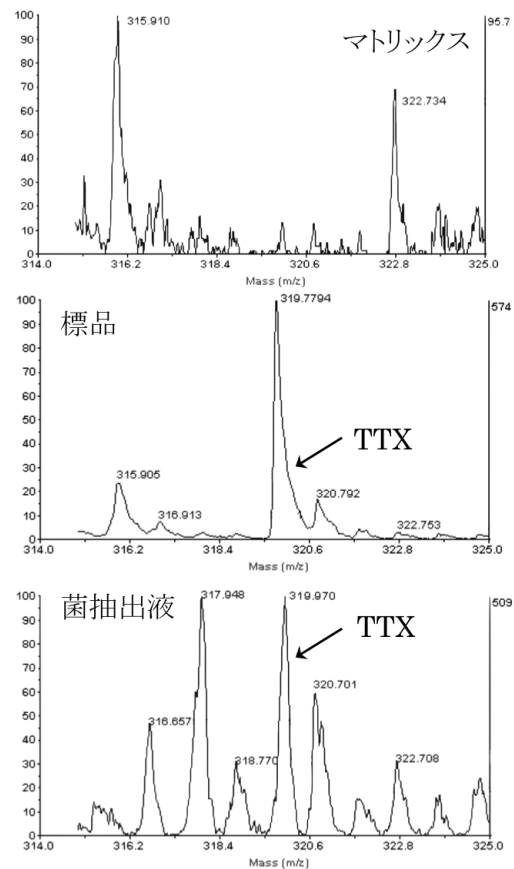


図 3. *Vibrio alginolyticus* 菌体抽出液の MALDI-TOF-MS 分析のマスペクトル。

(3) 次世代シーケンスによる全ゲノム解析

TTX 産生能が認められた *V. alginolyticus* の 2 株からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーにて全ゲノム解析を行った。シーケンス解析で得られた DNA 断片をアセンブルして、それぞれ 19 個 (5.55 Mb) と 35 個 (5.44 Mb) の scaffold にまとめた。現在、詳細な検討を行なっている。

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)

[学会発表] (計 7 件)

① H. Feroudj, T. Matsumoto, R. Kikuchi, Y. Kawana, H. Kondo, I. Hirono, S. Aki, T. Mochizuki, Y. Nagashima, G. Kaneko, H. Ushio, M. Kodama, S. Watabe : Expression analysis of genes related to tetrodotoxin pharmacokinetics in ovary tissues of wild pufferfish *Takifugu rubripes*. The international symposium on muscle biochemistry, 2011 年 10 月 28 日, 東京大学農学部 (東京都文京区).

② T. Matsumoto, H. Feroudj, R. Kikuchi, Y. Kawana, H. Kondo, I. Hirono, S. Aki, T. Mochizuki, Y. Nagashima, G. Kaneko, H. Ushio, M. Kodama, S. Watabe : Microarray analysis on the liver of cultured marine pufferfish *Takifugu rubripes* after the intramuscular administration of tetrodotoxin. The international symposium on muscle biochemistry, 2011 年 10 月 28 日, 東京大学農学部 (東京都文京区).

③ R. Kikuchi, T. Matsumoto, H. Feroudj, H. Doi, T. Ishibashi, Y. Nagashima, G. Kaneko, H. Ushio, M. Kodama, S. Watabe : Suppression subtractive hybridization analysis in the skin of cultured marine pufferfish *Takifugu snyderi* after the intramuscular administration of tetrodotoxin. The international symposium on muscle biochemistry, 2011 年 10 月 28 日, 東京大学農学部 (東京都文京区).

④ 渡部終五, 松本拓也 : III-3 フグ毒蓄積関連遺伝子. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会シンポジウム企画委員会主催シンポジウム「フグ研究とトラフグ生産技術開発の最前線」, 2011 年 10 月 2 日, 長崎大学水産学部 (長崎県長崎市).

⑤ 菊地遼輔, 松本拓也, Holger Feroudj, 土井啓行, 石橋敏章, 長島裕二, 金子 元, 潮 秀樹, 児玉正昭, 渡部終五 : フグ類皮膚におけるテトロドトキシン関連遺伝子の発現解析と TTX 腸内産生菌の単離の試み. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年 9 月 29 日, 長崎大学水産学部 (長崎県長崎市).

⑥ Feroudj Holger, 松本拓也, 菊地遼輔, 川名由利子, 近藤秀裕, 廣野育生, 安藝真一郎, 望月俊孝, 長島裕二, 金子 元, 潮 秀樹, 児玉正昭, 渡部終五 : Microarray analysis of tetrodotoxin accumulation-related genes in the ovary of wild pufferfish *Takifugu rubripes*. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年 9 月 29 日, 長崎大学水産学部 (長崎県長崎市).

[図書] (計 1 件)

① 松本拓也, 渡部終五 : 恒星社厚生閣, 日本水産学会監修, 水産学シリーズ 第 174 号「トラフグの生産技術開発と安全確保 (仮題)」, 10 章フグの毒化関連遺伝子, 2012 年出版予定

[その他]

ホームページ等

<http://mbl.fs.a.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 終五 (WATABE SHUGO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号 : 40111489

(2) 連携研究者

浅川 修一 (ASAKAWA SHUICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号 : 30231872

(3) 研究協力者

① 松本 拓也 (MATSUMOTO TAKUYA)

日本学術振興会・特別研究員・PD

② 菊地 遼輔 (KIKUCHI RYOSUKE)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・修士課程

③ Holger Feroudj (HOLGER FEROU DJ)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・修士課程