

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380116

研究課題名(和文) フグ毒のMRI三次元イメージング動態解析とフグ毒化関連分子の解明

研究課題名(英文) Studies on MRI analysis of tetrodotoxin and functional molecules implicated in toxicification of pufferfish

研究代表者

長島 裕二 (NAGASHIMA, YUJI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：40180484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：フグの毒化機構解明のため、高磁場MRI三次元イメージング法によるテトロドトキシン(TTX)検出法を開発し、フグ肝臓におけるTTXの分布を調べた。無毒の養殖トラフグに筋肉投与されたTTXは6時間後に肝臓で検出され、肝門脈に高濃度に存在した。60時間後、TTXは放射状に広がっていることが観察された。

TTXを投与されたトラフグの肝臓では、TTX非投与に比べ、代謝関連酵素、シグナル伝達系、免疫タンパク質をコードする推定転写産物が多く、高レベルで発現していた。トラフグ肝組織切片に蓄積したTTXの一部は高分子成分と結合し、in vitroでTTXを添加してもTTXは高分子成分と結合することが確認された。

研究成果の概要(英文)：Pufferfish accumulate high concentration of tetrodotoxin (TTX) in liver and ovary. However, the underlying toxicification mechanism of pufferfish is poorly understood. This study aims to develop the new method to analyze TTX by 3D-MRI (magnetic resonance imaging) and to investigate the genes and the proteins involved in toxicification of pufferfish.

MRI analysis showed when the non-toxic specimens of cultured pufferfish Takifugu rubripes were inoculated with TTX, the toxin was detected in the liver, particularly in the portal vein in higher levels 6 hours after administration, and then distributed radially in the liver after 60 hours. DNA microarray analysis demonstrated that the TTX administration significantly upregulated the hepatic genes encoding metabolic enzymes, signaling pathways, and immune-related proteins. TTX was accumulated in the liver slices by a tissue culture experiment. A part of the toxin was found to be bound with high molecular components in the liver tissue.

研究分野：水産学

キーワード：水産学 生体物質 フグ フグ毒 テトロドトキシン MRI

1. 研究開始当初の背景

トラフグは水産上重要で、食用魚種の中で唯一ゲノムデータベースが構築されており、ゲノム情報に基づいた育種への取り組みが行われているが、フグ毒をもつのが最大の難点である。フグはフグ毒テトロドトキシン (TTX) を生合成するのではなく、食物連鎖によって毒化することが給餌飼育実験等で立証されているが、フグの毒化機構の核心部分は科学的には解明されていない。このため、トラフグ養殖技術における危害要因および制御ポイントを特定できず、食品としてのフグの安全性を確保するためには、科学的な根拠に基づくフグの毒化機構の解明が必須である。

これまで研究代表者らは、フグの毒化機構を解明するため、毒化過程を消化管吸収、血液運搬、組織への取り込み、排出の4つの体内動態における支配要因に分けて解析を試みた。すなわち、トラフグと TTX 非保有魚を用いて、反転腸管法による TTX の消化管吸収、平衡透析法による TTX の血漿タンパク質結合、肝組織切片培養法による TTX の取り込みを *in vitro* 実験で比較し、どのステップが毒化の鍵となるかを調べた。その結果、肝臓での取り込みがフグの毒化を担う重要なキーステップであることがわかった。

ごく最近、トラフグに投与された TTX は脳に移行することが見いだされ、これは薬物などが血液脳関門を通過できないとされていた生理学の常識を覆す画期的な知見で、フグの毒化のみならず TTX の存在意義を知るうえで重要な意味をもつものと考えられる。

こうした背景の下、フグ体内における TTX 動態の全体像をより詳細に明らかにするには、従来の薬物動態解析法では不可能で、TTX の体内動態をリアルタイムで計測できる非破壊的な測定方法の開発が必要である。そこで、研究代表者らは医療や薬学研究で

薬物の体内クリアランスおよび造影剤の検討に重用されている高磁場 MRI (Magnetic Resonance Imaging) を用いることを考えた。さらに、フグの毒化にはいくつかのタンパク質成分が TTX の運搬、取り込み、蓄積にかかわることが示唆されているが、その構造や真の機能については不明な点が多い。また、フグの毒化に関与する遺伝子については、研究が緒に就いたばかりで本研究グループによる研究以外には見当たらない。

2. 研究の目的

本研究では、フグの毒化機構を解明し、フグ食の安全確保に資することを目的とし、以下の3項目について検討した。

(1) 高磁場 MRI 三次元イメージング法による TTX の体内動態解析 TTX を可視化検出するため、高磁場 MRI 三次元イメージング法を開発し、フグ体内における TTX 動態解析に最適な測定条件を確立する。TTX を無毒の養殖トラフグに経口投与し、TTX が消化管で吸収され、血液を介して運搬され、肝臓をはじめ各組織に移動する様子を三次元イメージングでとらえ動画として記録する。これは海洋生物毒の体内動態を可視化する初めての映像となる。

(2) トラフグ肝臓における TTX 代謝関連遺伝子の解析 無毒の養殖トラフグに TTX を投与して一定時間経過後に解剖し、肝臓から全 RNA を抽出する。RNA を鋳型として cDNA を合成し、DNA マイクロアレイ解析により TTX 投与後に発現量が有意に変化する遺伝子を網羅的に解析し、トラフグ肝臓において TTX の蓄積および代謝に関与する関連遺伝子を同定するとともに機能解析を行う。

(3) トラフグ肝臓における TTX 結合タンパク質の解明 TTX の存在形態を明らかにするため、TTX をリガンドとしてナノ磁性微粒子にカップリングさせた TTX アフィニティー磁性ナノビーズを作製し、それを用いて、各組織

における TTX 結合タンパク質のスクリーニングを行う。次に、目的タンパク質を抽出精製し、TTX 結合タンパク質の一次構造解析ならびに TTX との結合様式を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 高磁場 MRI 三次元イメージング法による TTX の体内動態解析 試料には TTX をもたない養殖トラフグ(体重 約 1kg)を用い、生理食塩水に溶解した TTX を 6 時間おきに 3 回背部筋肉に投与し(総投与 TTX 量 0.84mg)、最終投与 6 時間後に水槽から取り出した(投与 6 時間後試験区)、また、生理食塩水に溶解した TTX を 0 および 1 日目にそれぞれ 2 回ずつ合計 4 回背部筋肉に投与し(総投与 TTX 量 1.6mg)、最終投与 60 時間後に水槽から取り出した(投与 60 時間後試験区)、対照魚には、生理食塩水だけを同様の条件で投与した。トラフグを氷冷後、高磁場 MRI 測定に供した。TTX の特異的なプロトンスペクトラムは、TTX 標準品を用いて NMR 法にて確認した。トラフグ肝臓における TTX 分布は、4.7T の MRI (バリアン社製)を用い、TTX の特異的なプロトンスペクトラムにより選択的励起強調画像法にて連続測定し、画像処理にて三次元表示した。

(2) トラフグ肝臓における TTX 代謝関連遺伝子の解析 無毒の養殖トラフグに体重 1 kg あたり 0.25 mg TTX を筋肉注射して水槽中で 5 日間飼育後、肝臓を摘出して TTX 蓄積量を測定した。さらに、肝臓から全 RNA を抽出して、TTX の蓄積に伴い発現増大する遺伝子を DNA マイクロアレイ法で解析した。また、無毒の養殖トラフグから肝臓を摘出して緩衝液で灌流後、肝組織切片(直径 8 mm、厚さ 1 mm)を作製し、これを TTX 不含(対照区)、50 μ M TTX または 200 μ M TTX の培養液にて 20 時間で最大 24 時間培養し、肝組織切片に蓄積した TTX 濃度を測定するとともに、全 RNA を抽出して次世代シーケンサーで遺伝子発現レベルを解析した。

(3) トラフグ肝臓における TTX 結合タンパク

質の解明 TTX をナノ磁性微粒子に固定化するため、TTX の可溶化とナノ磁性微粒子を検討した。また、フグ肝臓におけるフグ毒結合タンパク質を調べるため、無毒の養殖トラフグの肝組織切片を 50 μ M TTX 含有緩衝液で 20、24 時間培養した後、ホモジナイズして、抽出液を Sephacryl S-400 ゲルろ過カラムに供した。次に、無毒の養殖トラフグ肝臓ホモジネートに TTX (終濃度 0.5 μ g/mL) を添加して、4 時間で 2 時間インキュベートした後、本混合物を Sephacryl S-400 ゲルろ過クロマトグラフィで分画した。TTX は LC-MS/MS で、タンパク質は Lowry 法で定量した。

4. 研究成果

(1) 高磁場 MRI 三次元イメージング法による TTX の体内動態解析 TTX 標準品を測定したところ、TTX における特異的なプロトンスペクトラムを確認した。図 1 に示すように肝臓を断層撮影した画像を三次元解析に用いた。TTX 投与 6 時間後試験区では、TTX が肝臓中に点在して検出され、肝門脈に高濃度に分布していた(図示せず)。投与 60 時間後試験区では、TTX は肝門脈から放射状に点在して分布していくことが確認された(図 2 右、赤枠)。一方、対照区のトラフグ肝臓では、TTX は確認されなかった(図 2 左)。以上の結果から、高磁場 MRI で、フグ体内の TTX を非破壊的に可視化検出することに成功し、本法は TTX の体内動態解析に応用可能であることが示された。

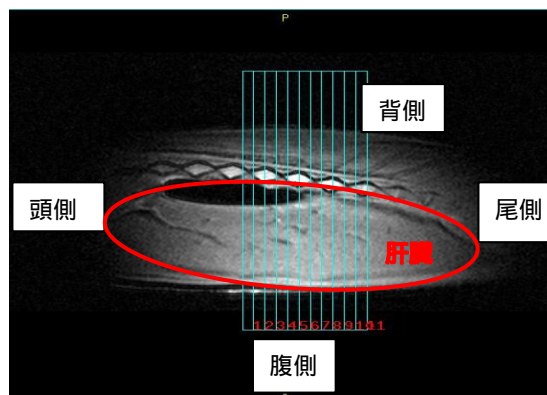


図 1 トラフグの MRI 撮影のポジショニング

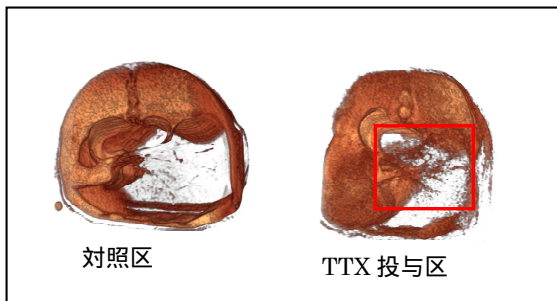


図2 トラフグ TTX 投与後 60 時間の MRI
(左:対照区、右:TTX 投与区)

(2) トラフグ肝臓における TTX 代謝関連遺伝子の解析 無毒の養殖トラフグに TTX を投与後、TTX の蓄積は肝臓、卵巣および皮膚に認められ、投与量に対する体内蓄積率は 67%に達し、肝臓の蓄積率は 28%であった。DNA マイクロアレイ法は、TTX 投与区と緩衝液を投与した対照区で肝臓の遺伝子発現レベルを比較した。その結果、対照区と比較して 2 倍以上の発現レベルの増大を示す 59 個の推定転写産物が認められた。最も高い発現レベルを示した Chymotrypsin-like elastase family member 2A をコードする推定転写産物について、Real-time PCR で発現レベルを調べると、対照区に比べて 27 倍の発現量を示した。GO(Gene Ontology)解析の結果、代謝関連酵素やシグナル伝達系および免疫タンパク質をコードする推定転写産物が多く、高いレベルで発現していることがわかった。

無毒のトラフグの肝臓から作製した組織スライスをを用いた実験では、肝臓組織スライスの TTX 濃度は、経時的に増加して 24 時間後には培養液 TTX 濃度の 4 倍以上を示し、TTX が肝組織切片に取り込まれて蓄積していることを確認した。これらの肝組織スライスから全 RNA を抽出して次世代シーケンサーで遺伝子発現レベルを解析すると、50 μ M TTX の培養液で 1 時間培養した場合は、182 個の推定転写産物に対照区に比べて 1.5 倍以上の発現増大が認められ、200 μ M TTX の培養液で 24 時間培養した場合は 391 の

推定転写産物に発現増大が認められ、総じて TTX 用量依存的な発現増大が観察された。GO 解析および KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 解析の結果、ミトコンドリアに由来する推定転写産物が多く発現増大していることが確認された。

(3) トラフグ肝臓における TTX 結合タンパク質の解明 TTX の化学的特性から COOH ビーズを選択して TTX 固定化の条件を種々検討したところ、ビーズに TTX を固定化できたが、固定化される TTX 量と再現性に問題があった。そこで、TTX アフィニティー磁性ナノビーズの作製を中断し、フグ肝臓におけるフグ毒結合タンパク質をカラムクロマト法で調べた。

TTX を蓄積させた肝組織切片をホモジナイズし、Sephacryl S-400 ゲルろ過カラムに供したところ、TTX の約 90%は遊離型としてカラム体積付近に検出したが、数%はカラムの分画範囲(分子量 $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$ Da)に検出された。

また、無毒の養殖トラフグ肝臓ホモジネートに TTX(終濃度 0.5 μ g/mL)を添加して、4 で 2 時間インキュベートした後、本混合物を Sephacryl S-400 ゲルろ過クロマトグラフィで分画した場合にも、高分子画分から TTX が検出され、*in vitro*で TTX を添加しても TTX は高分子成分と結合することが確認された。しかし、*in vitro*実験で得られた高分子画分をイオン交換カラムまたは SDS-PAGE に供すると TTX は遊離したため、TTX との結合力は弱く、天然有毒フグ肝臓で報告されているフグ毒結合タンパク質とは異なる成分が存在していることが示唆された。

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)

T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion

of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juveniles after intramuscular administration. *Toxicon*, 査読有, 93 巻, 98-102 (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.227>

T. Matsumoto, H. Feroudj, R. Kikuchi, Y. Kawana, H. Kondo, I. Hirono, T. Mochizuki, Y. Nagashima, G. Kaneko, H. Ushio, M. Kodama, S. Watabe: DNA microarray analysis on the gene differentially expressed in the liver of the pufferfish, *Takifugu rubripes*, following an intramuscular administration of tetrodotoxin. *Microarrays*, 査読有, 3 巻, 226-244 (2014). Doi: 10.3390/microarrays3040226

H. Feroudj, T. Matsumoto, Y. Kurosu, G. Kaneko, H. Ushio, K. Suzuki, H. Kondo, I. Hirono, Y. Nagashima, S. Akimoto, K. Usui, S. Kinoshita, S. Asakawa, M. Kodama, S. Watabe: DNA microarray analysis on gene candidates possibly related to tetrodotoxin accumulation in pufferfish. *Toxicon*, 査読有, 77 巻, 68-72 (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.030>

長島裕二、松本拓也：フグ毒化機構解明に向けた最近の研究。Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 査読無し, 218 巻, 266-275 (2013)。

長島裕二：食品中の魚毒（フグ毒）による食中毒とその予防。食品衛生研究, 査読無し, 63 巻, 21-30 (2013)。

〔学会発表〕(計 13 件)

永井 慎、長島裕二：トラフグ肝臓におけるテトロドトキシン投与後の三次元分布に関する研究。平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 29 日, 東京海洋大学 (東京

都港区)。

尹 顕哲、桐明 絢、太田 晶、石崎松一郎、長島裕二：ヒガンフグ卵巣から単離したフグ毒結合タンパク質の同定。平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 29 日, 東京海洋大学 (東京都港区)。

長島裕二：フグの安全性。平成 26 年度神奈川県ふぐ包丁師衛生講習会, 2015 年 3 月 12 日, 神奈川県自治会館 (神奈川県横浜市)。

長島裕二：フグ肝臓と卵巣におけるフグ毒蓄積タンパク質。平成 26 年度日本水産学会秋季大会シンポジウム, 2014 年 9 月 22 日, 九州大学 (福岡県福岡市)。

太田 晶、石崎松一郎、長島裕二：組織培養したトラフグ肝臓におけるフグ毒の分布と存在形態。平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 21 日, 九州大学 (福岡県福岡市)。

H. Feroudj, 平野 雪、佐藤根妃奈、松本拓也、金子 元、陳 盈光、浅川修一、渡部終五、潮秀樹：Analysis of tetrodotoxin dose dependent gene expression patterns in liver tissues of pufferfish *Takifugu rubripes*. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 21 日, 九州大学 (福岡県福岡市)。

桐明 絢、松本拓也、石崎松一郎、長島裕二：養殖トラフグ稚魚と成魚の肝臓発現遺伝子の比較。平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 20 日, 九州大学 (福岡県福岡市)。

松本拓也、桐明 絢、渡部終五、長島裕二：トラフグ幼魚におけるフグ毒テトロドトキシンの胆汁中排泄機構の検討。2014 年 3 月 28 日, 北海道大学 (北海道函館市)。

長島裕二：第 28 回日本中毒学会東日本地方会。2014 年 1 月 11 日, 北里大学 (東京都港区)。

太田 晶、須賀恵美、石崎松一郎、土井啓行、石橋敏章、松本拓也、長島裕二：食用フグの肝臓におけるテトロドトキシンおよび

麻痺性貝毒の蓄積. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会. 2013 年 11 月 22 日, 沖繩コンベンションセンター (沖繩県宜野湾市).

尹 顕哲、石崎松一郎、長島裕二 : LC-MS によるフグ毒関連物質の検出. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 2013 年 9 月 21 日, 三重大学 (三重県津市).

尹 顕哲、石崎松一郎、長島裕二 : ヒガンフグ卵巣におけるフグ毒の化学形態. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 2013 年 9 月 20 日, 三重大学 (三重県津市).

永井 慎、長島裕二 : 高磁場測定によるトラフグ肝臓におけるテトロドキシンの三次元分布可視化に関する研究. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 29 日, 東京海洋大学 (東京都港区).

[図書] (計 2 件)

長島裕二、荒川 修、佐藤 繁 : 北海道大学出版会, フグ毒. 「毒魚の自然史」(松浦啓一、長島裕二 編著), (2015), pp.312 (33-103).

長島裕二、松本拓也 : 日本臨牀社, フグ毒. 「別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 30 神経症候群 (第 2 版)」. (2014), pp. 876 (680-683).

[その他]

ホームページ等

1) 東京海洋大学食品生産科学科生体物質化学研究室

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~ishizak/>

2) 東京海洋大学研究者総覧

<http://olcr.kaiyodai.ac.jp/kenkyusha-db.html>

3) 県立広島大学研究者総覧

<https://hiris.pu-hiroshima.ac.jp/profile/ja.URMx8jJYneLsbeTC2WjIYA==.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長島裕二 (NAGASHIMA YUJI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号 : 40180484

(2) 研究分担者

1) 渡部終五 (WATABE SHUGO)

東京大学・農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号 : 40111489

2) 永井 慎 (NAGAI MAKOTO)

岐阜医療科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号 : 30460497

3) 松本拓也 (MATSUMOTO TAKUYA)

県立広島大学・生命環境学部・助教

研究者番号 : 30533400

(3) 連携研究者

石崎松一郎 (ISHIZAKI SHOICHIRO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号 : 40251681

(4) 研究協力者

1) 桐明 絢 (KIRIAKE AYA)

東京海洋大学・海洋科学部・博士研究員

2) Holger Feroudj

東京大学大学院・農学生命科学研究科・博士後期課程

3) 尹 顕哲 (YIN XIAN ZHE)

東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科・博士前期課程

4) 太田 晶 (OHTA AKIRA)

東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科・博士前期課程