

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 14 年度博士課程 進学

氏名 李 鎮熙

指導教員 渡部終五

論文題目 Studies on the genes related to pufferfish intoxication

(フグ類の毒化関連遺伝子に関する研究)

水産食品の利用は世界的に拡大しており、その消費量は近年、大きく増加している。この傾向に呼応して新しい水産資源の開拓も試みられているが、海洋生物の中には自然毒をもつものがあり、そのリスクも考慮する必要がある。また、人為的な要因による環境の変化に伴う有毒海洋生物の拡大も懸念されている。有毒生物の中でもフグ類、とくにトラフグ *Takifugu rubripes* は日本で高級食材として好まれているが、適正な調理法によらない加工品はときとして中毒を発生させる。フグ毒の主要成分は一般的にはテトロドトキシン (tetrodotoxin, TTX) であるが、近年の研究により麻痺性貝毒のサキシトキシン (saxitoxin, STX) もまた TTX とともにフグ類の体内に蓄積することが報告されている。TTX および STX はいずれも神経毒で、ナトリウム・チャンネルを特異的にブロックすることで呼吸麻痺を引き起こしてヒトを死に至らしめる。フグ類の毒化機構については種々の議論があるが、細菌を初めフグ類以外の種々の生物が TTX あるいは STX を保有していること、フグ類の毒組成および毒含有量は個体差や地域差が大きいこと、無毒の餌で陸上養殖されたフグ類はほぼ無毒で、有毒な餌を与えると毒化することなどから、フグ類の毒は食物連鎖により体内に蓄積するとの考えが支配的である。しかしながら、フグ類体内における毒の蓄積と代謝の機構については未だ不明な点が多い。

本研究はこのような背景の下、ヒガンフグ *T. pardalis* の血清から抽出した STX 結合タンパク質 (SBP)

の一次構造の解析を試みた。また、既報のフグ類 STX/TTX 結合タンパク質 (PSTBP) をコードする遺伝子の mRNA 蓄積パターンと毒含量との関連性を調べた。次に、TTX を多く蓄積しているアカメフグ *T. chrysops* およびクサフグ *T. niphobles* 肝臓の mRNA 蓄積パターンを調べて、無毒個体のそれと比較した。さらに、TTX を多量に蓄積した肝臓で多く発現する遺伝子をクローニングしてその同定を試み、クローン化された遺伝子の mRNA 蓄積量と TTX およびその誘導体含量との関係を調べた。得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. フグ類のSTX結合タンパク質

東京湾で採取したアカメフグ 19 尾、クサフグ 7 尾およびヒガンフグ 1 尾、さらに有毒アカメフグ肝臓を与えて毒化させた飼育トラフグおよび無毒餌で飼育したトラフグそれぞれ 14 尾および 15 尾を対象に、肝臓の毒成分組成を HPLC で分析した。有毒肝臓には TTX のほか、その誘導体 4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX が含まれていたが、アカメフグ肝臓では 0 - 265.3 nmol TTX/g、0 - 48.6 nmol 4-*epi*TTX/g および 0 - 1153.6 nmol 4,9-anhydroTTX/g、クサフグ肝臓では 0 - 226.8 nmol TTX/g、0 - 38.5 nmol 4-*epi*TTX/g および 0 - 387.7 nmol 4,9-anhydroTTX/g と測定され、個体差が大きかった。一方、有毒飼育トラフグからも TTX (0 - 40.9 nmol/g) およびその誘導体 (0 - 9.2 nmol 4-*epi*TTX/g および 24.9 - 197 nmol 4,9-anhydroTTX/g) が認められたが、無毒飼育個体からは TTX およびその誘導体は検出されなかった。

次に、STX を結合した Sepharose gel を用いるアフィニティークロマトグラフィーおよび FPLC ゲルろ過によりヒガンフグの血清から SBP を精製した。精製標品につきプロテアーゼ処理を行い、SDS-PAGE により分離したペプチド断片について N 末端アミノ酸配列分析を行ったが、供試した試料が少ないなどの理由から配列の決定には至らなかった。

次に、STX に結合するほか、TTX とも結合するとされる既報のヒガンフグ血清タンパク質 PSTBP をコードする遺伝子をクローン化し、mRNA 蓄積量と毒含量との関係を調べた。まず、アカメフグ肝臓から調製した cDNA を鋳型に PCR を行った。プライマーは、ヒガンフグ PSTBP をコードする遺伝子の塩基配列およびトラフグゲノム中の相同配列を比較し、相同性の高い領域の配列を基に設計した。PCR で得られたクローンの cDNA 塩基配列はヒガンフグ PSTBP をコードする遺伝子の相同塩基配列と 90% の高い塩基同一率を示した。

さらに、アカメフグ 10 尾、クサフグ 7 尾、有毒飼育トラフグ 14 尾および無毒飼育トラフグ 15 尾の肝臓から調製した全 RNA を対象にノーザンブロット解析を行った。アカメフグ、クサフグおよび有毒飼育トラフグから逆転写酵素を用いて調製した 1st strand cDNA を鋳型として、前述の PCR 増幅した約 500bp の cDNA 断片をプローブとして用いた。その結果、PSTBP の mRNA 蓄積量はアカメフグ、クサフグおよ

びトラフグでそれぞれ最大7倍、21倍および29倍の個体差が確認された。しかしながら、無毒飼育トラフグ PSTBP の mRNA 蓄積量は毒含量が最も高かった有毒トラフグ肝臓の 0.5-1.5 倍の値を示すなど、mRNA 蓄積量と毒含量との相関性は明白には認められなかった。

2. フグ類肝臓の毒化に関連する遺伝子

TTX 含量が高いアカメフグおよびクサフグ各 1 尾（それぞれ 42.2 および 226.8 nmol/g）の肝臓の遺伝子発現プロファイルを、TTX を含んでないアカメフグおよびクサフグ各 1 尾のそれと mRNA arbitrarily primed (RAP) RT-PCR により比較した。その結果、高 TTX 含量のアカメフグおよびクサフグ肝臓から抽出した試料で 669 bp および 383 bp DNA 断片の顕著な増幅が認められた。両断片の塩基配列を決定したが、669 bp DNA 断片の相同遺伝子はみつからなかった。一方、383 bp DNA 断片の演繹アミノ酸配列はアフリカツメガエル *Xenopus laevis* フィブリノーゲン様タンパク質の一部領域と相同性を示した。TTX を含んでないアカメフグおよびクサフグ肝臓では 2 つの DNA 断片の顕著な増幅が認められた。518 bp DNA 断片の塩基配列を決定したところ、脊椎動物 vitellin の precursor の一部領域と相同性を示した。一方、約 400 bp DNA 断片の塩基配列については、相同遺伝子はみつからなかった。

上述の 383 bp DNA 断片の塩基配列からプライマーを設計してアカメフグ肝臓から調製した cDNA を鋳型に RACE を行ったところ、フィブリノーゲン様タンパク質をコードする 3 種類の遺伝子 *flp-1*、*flp-2* および *flp-3* の存在が認められた。さらに、高毒量クサフグ肝臓からも同様に 3 遺伝子が見出された。そこで、各遺伝子の全塩基配列を決定したところ、アカメフグおよびクサフグ *flp-1* の演繹アミノ酸配列は 97% のアミノ酸同一率を示し、それぞれゼブラフィッシュ *Danio rerio* フィブリノーゲンの相同領域と 32 および 33%、アフリカツメガエルのフィブリノーゲン様タンパク質の相同領域と 25 および 29% のアミノ酸同一率を示した。また、アカメフグ *flp-1* の演繹アミノ酸配列を用いて、トラフグおよびミドリフグ *Tetraodon nigroviridis* ゲノムデータベースを検索したところ、高い相同性を示す遺伝子の存在が認められた。なお、アカメフグおよびクサフグ *flp-1* にはフィブリノーゲン様ドメインが存在しないことから、フィブリノーゲンとは異なる機能をもつタンパク質であることが示唆された。

flp-2 および *flp-3* の演繹アミノ酸配列は *flp-1* の N 末端領域のアミノ酸配列と一致した。*flp-2* の演繹アミノ酸配列には *flp-1* には含まれてない C 末端の 10 アミノ酸が存在し、特徴的であった。*flp-3* の演繹アミノ酸配列には *flp-1* および *flp-2* の演繹アミノ酸配列にはみられない特異な領域が存在し、この領域は脊椎動物の肝臓に含まれる抗菌性物質 hepcidin の precursor と相同性を示した。

肝臓から抽出した全 RNA の状態が最も良好なアカメフグおよびクサフグ各 3 尾を用いてノーザンブロット解析を行った結果、アカメフグの 17.2 nmol TTX/g 含有肝臓に比べて 39.3 および 76.5 nmol TTX/g 含

有肝臓でそれぞれ、1.7 および 2.8 倍の *flp-1* mRNA 蓄積量が認められた。また、TTX を含んでないクサフグ肝臓に比べて 27.4 および 226.8 nmol TTX/g 含有肝臓でそれぞれ、1.2 および 3.5 倍の *flp-1* mRNA 蓄積量が認められるなど、*flp-1* の mRNA 蓄積量は TTX 含量とよく相関した。ノーザンブロット解析結果から相関係数を調べたところ、アカメフグおよびクサフグ肝臓の *flp-1*、*flp-2* および *flp-3* の mRNA 蓄積量は TTX 含量と高い相関性を示した。

次に、アカメフグ 12 尾、クサフグ 7 尾、有毒飼育トラフグ 5 尾および無毒飼育トラフグ 5 尾を対象に、*flp-1* および *flp-3* の mRNA 蓄積量を定量的リアルタイム PCR で調べた。その結果、ノーザンブロット解析と同様にアカメフグ *flp-1* および *flp-3* の mRNA 蓄積量は TTX 含量と高い相関性を示した。一方、クサフグおよびトラフグ *flp-1* および *flp-3* の mRNA 蓄積量との相関性は認められなかった。その原因として、分析に供試した試料の状態が悪かったためと考えられた。なお、*flp-2* についてはその塩基配列が *flp-1* の 5'側および 3'側の一部領域と同一であるため、特異的プローブを作製してその蓄積量と TTX 含量との関係を定量的リアルタイム PCR で明らかにすることができなかった。

以上、本研究で、フグ類に STX 結合タンパク質 SBP の存在を認めたが、その性状を十分に明らかにできなかった。また、フグ類の肝臓を用いて STX/TTX 結合タンパク質 PSTBP の mRNA 蓄積量を調べたが、TTX 含量との関連性は明確には示されなかった。一方、高 TTX 量のアカメフグおよびクサフグの肝臓で毒化機構に関連する遺伝子、*flp-1*、*flp-2* および *flp-3* 成分の存在が示された。本遺伝子の演繹アミノ酸配列はアカメフグ、クサフグおよびトラフグではよく保存されていたが、ミドリフグ、ゼブラフィッシュあるいはアフリカツメガエルの相同タンパク質とのアミノ酸同一率は低かった。さらに、本遺伝子の mRNA 蓄積量は TTX 含量とよい相関性を示すなど、本研究はフグ類の毒化機構の一端を明らかにしたもので、食品衛生上に資するところが大きいものと考えられる。