

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 鎮 熙

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。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、まず、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 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。いずれの場合も STX はごく微量しか含まれていなかった。

次に、アカメフグ肝臓から調製した cDNA を鋳型に PCR で STX/TTX 結合血清タンパク質 PSTBP をコードする cDNA 断片を増幅した。この cDNA 断片をプローブに、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。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。

次に、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同一性を示した。

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、高い同一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。

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。

以上、本研究で、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* 成分が存在すること、本遺伝子の mRNA 蓄積量は TTX 含量と高い相関性を示すこと、などが明らかにされた。これらの成果は、フグ類の毒化機構の一端を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少ない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。