

# 論文の内容の要旨

氏名：尾山 輝

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：フグ毒保有生物の毒化機構および生態に関する研究

## 第1章 序論

フグが持つフグ毒 tetrodotoxin (TTX) は、電位依存性ナトリウムチャンネルを特異的に阻害する強力な神経毒の一つとして知られている。これまでに、ツムギハゼ、ヒョウモンダコ、*Vibrio* 属を含む海洋細菌など多種多様な分類群の生物で TTX の保有が知られている。また、陸上養殖や囲い養殖で育てられたフグは無毒であること、そのフグに TTX を含む餌を与えると毒化することが報告されている。これらのことから、フグが持つ TTX は、海洋細菌により生合成され、食物連鎖を通じた生物濃縮によりフグの体内に蓄積されていると考えられている。しかし、フグ毒保有生物の毒化機構や TTX の生合成機構について未だ不明な点が多く残されており、古来よりフグ食文化を持つ我が国においても、多くの検体により無毒であることが証明された養殖トラフグの肝臓の可食化に許可が下りない大きな障壁となっている。

最近の所属研究室の研究により、フグ毒保有生物の毒化にはオオツノヒラムシの関与が大きいことが明らかにされつつある。高濃度の TTX を保有することで知られるオオツノヒラムシは、体重依存的に体内の毒量を増加させること、卵や幼生が高濃度の TTX を保有することが報告されている。また、亜熱帯域に生息するオキナワフグおよびツムギハゼ、さらには、TTX を蓄積していた食用二枚貝のアカザラガイの消化管から、オオツノヒラムシの遺伝子の一部が検出された。これらは海洋環境中において、オオツノヒラムシがフグ毒保有生物における TTX の主要な供給源の一つであり、多様な生物の毒化に関与していることを示唆している。

そこで本研究では、様々な生物の TTX による毒化に関与するオオツノヒラムシの生態およびフグ毒保有生物の毒化機構の一端を解明することを目指した。

## 第2章 トラフグにおける TTX およびその生合成中間体の蓄積機構

TTX および TTX 生合成中間体を保有することで知られるオオツノヒラムシを無毒のトラフグに与え、トラフグ体内における TTX の蓄積機構の一端の解明を試みた。まず、産卵期のオオツノヒラムシを無毒のトラフグに与えた後、配合飼料を与えて 1 週間飼育した。その後、肝臓、皮、筋肉、生殖腺、腎臓、脾臓、胆のう、腸管、心臓、鰓、脳、血球および血漿に解剖し、TTX および生合成中間体を抽出した。抽出液は活性炭カラムを用いて精製し、1 mg/mL に調整後 LC-MS/MS に供して各組織における TTX、5,6,11-trideoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol の濃度および保有量を調べた。その結果、TTX 濃度は肝臓で最も高く、次いで皮、腸管、鰓で比較的高かった。5,6,11-trideoxyTTX 濃度は、肝臓で最も高く、次いで腸管、胆のう、脾臓で比較的高かった。11-norTTX-6(S)-ol 濃

度は肝臓で最も高く、次いで皮、胆のう、腸管で比較的高かった。各組織における保有量の割合は、TTX では皮に約71%と最も高く、次いで肝臓、腸管で高かった。5,6,11-trideoxyTTX は、肝臓に約58%と最も高く、次いで腸管、皮で高かった。11-norTTX-6(S)-ol は、皮に約64%と最も高く、次いで肝臓、腸管で比較的高かった。産卵期のオオツノヒラムシが保有する TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の割合は 1 : 1 であるのに対し、トラフグが蓄積した TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の割合は約 9 : 1 であった。これらの結果から、トラフグ体内において毒性が高い TTX や 11-norTTX-6(S)-ol と毒性がきわめて低い 5,6,11-trideoxyTTX では、異なる機構により蓄積されていることが示唆された。また、トラフグは TTX など毒性が高い化合物を優先的に体内に蓄積していると考えられる。

### 第3章 オオツノヒラムシの性成熟に伴う TTX およびその類縁化合物の局在変化

オオツノヒラムシの毒化機構の一端を明らかにするため、性成熟に伴う TTX、5,6,11-trideoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol の濃度および局在がオオツノヒラムシ体内でどのように変化しているかを調べた。本章では、貯精嚢に精子が溜まっていない幼体期、貯精嚢に精子が溜まっている交配期、受精嚢に卵母細胞が溜まっている産卵期、産卵を繰り返して体サイズが小型化した産卵後期の 4 つの成熟段階の各 3 個体を試料とした。各試料は、咽頭、貯精嚢に貯められた精子、受精嚢に貯められた卵母細胞を摘出した後、残りの組織をコルクボーラーで 12 部位に分けて LC-MS/MS に供し、TTX、5,6,11-trideoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol の定量解析を行った。これに加え、産卵期の個体を試料とし、MS imaging 解析を行った。その結果、TTX は、幼体期に咽頭で高い値を示し、交配期には、幼体期と同様に咽頭でも高く、体の前方および後方に位置する組織でも比較的高い濃度を示した。産卵期には、卵母細胞が最も高い濃度を示した。5,6,11-trideoxyTTX は、幼体時には体の前方に位置する組織で比較的高い値を示し、交配期には、体の後方で比較的高い値を示した。産卵期には、TTX と同様に卵母細胞で最も高い濃度を示した。11-norTTX-6(S)-ol は、全ての成熟段階を通して咽頭に最も高い濃度で局在していた。また MS imaging 解析の結果、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の濃度は卵母細胞で高く、11-norTTX-6(S)-ol 濃度は咽頭で高かった。これらの結果から、オオツノヒラムシの体内では、性成熟に伴って TTX、5,6,11-trideoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol の濃度および局在が変化していることが明らかとなった。この結果は、オオツノヒラムシは体内に TTX およびその類縁体の輸送に関わるタンパク質を保有している可能性を示唆している。

### 第4章 オオツノヒラムシの産卵生態および胚発生に及ぼす水温の影響

オオツノヒラムシの毒性についての知見は蓄積されつつあるものの、生態については不明な点が多く残されている。そこで本章では、オオツノヒラムシの生態の一端を明らかにするため、2 つの水温帯に分けた水槽を用いて、約 2 か月間オオツノヒラムシを飼育し、産卵行動を観察した。加えて、産卵された卵を異なる水温で保温し、ふ化までの日数および胚の観察を行った。水温は、オオツノヒラムシを採取した際の海水温である 12°C および自然環境下で産卵が確認される時期の海水温である 20°C とし、各 5 個体を個別に飼育して産卵行動を観察した。また産卵された卵板は回収して TTX 類を抽出し、LC-MS/MS に供して TTX および 5,6,11-trideoxyTTX を定量解析した。さらに、20°C で産卵された卵板を 20°C、18°C、16°C、14°C および 12°C の水槽に収容して保温し、ふ化までの日数および胚の観察を行った。その結果、20°C では多数の卵板が産卵されるとともに、オオツノヒラムシの産卵行動には規則性が認められ、大潮（満月および新月）に近づくにつれて産卵数が増加した。一方 12°C では、20°C と比較して約 3 週間遅く最初の産卵が確認された。また、産卵数も少なく、20°C で見られたような規則性は確認されなかった。卵板の TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の定量解析の結果、両水温とも卵重量に関わらず、卵板が持つ両化合物の濃度に大きな変化は認められなかった。異なる水温で保温した卵がふ化するまでの日数および胚

の観察を行った結果、20°C、18°Cおよび16°Cで保温された卵のふ化率は100%、14°Cで保温された卵のふ化率は20%であった。一方で、12°Cで保温された卵ふ化は観察されなかった。加えて、水温が2°C低下する毎に、ふ化までの日数は約1.6倍長くなり、積算温度は約1.4倍高くなることが明らかとなった。これらの結果から、海水温が上昇し、オオツノヒラムシの産卵数が増えるほど海洋環境中に放出される TTX を保有する幼生数が増加することが示唆されるとともに、オオツノヒラムシが原因で毒化する生物の強毒化を引き起こす可能性が示唆された。

## 第5章 フグ毒保有魚類の Na チャネルの一次構造解析

日本列島の南方海域における調査で TTX を保有することが知られていない魚種から TTX が検出された。そこでこれらフグ毒を保有していた魚類の毒化機構の一端を明らかにするため、TTX 耐性の発現に重要な Na チャネルの一次構造の決定を試みた。ツムギハゼおよび TTX を保有することが確認された魚種の筋肉を試料とし、全 RNA 抽出した後、1st strand cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型に、主に骨格筋に発現する Nav1.4 の P-loop 領域を増幅目的としたプライマーを設計し、PCR を行った。その後、増幅 DNA 断片の塩基配列を決定し、Nav1.4 の一次構造の比較を行った。その結果、ドメイン I においては TTX を保有することが知られていなかった魚種のみならずツムギハゼでも、フグ類とは異なり TTX 耐性を示さないアミノ酸配列を示した。ドメイン II では、ツムギハゼにおいて他の種ではトレオニン (Thr) である位置がアスパラギン (Asn) に置換されていた。ドメイン III では、TTX を保有することが知られていなかった魚種においてバリン (Val) がイソロイシン (Ile) に置換されていた。ドメイン IV では、TTX を保有することが知られていなかった魚種においてイソロイシン (Ile) がバリン (Val) に置換していた。加えて、ツムギハゼは、グリシン (Gly) がセリン (Ser) に置換していた。これらツムギハゼ等におけるアミノ酸残基の置換は、既報の TTX 耐性を示すアミノ酸配列と一致していることから、これら TTX を保有することが知られていなかった魚種の TTX 耐性に関与することが示唆された。

## 第6章 総括

トラフグは毒性の高い化合物を優先的に蓄積し、毒性により蓄積される組織が異なることから、その機構を明らかにする必要がある。オオツノヒラムシでは、成熟の進行に伴って体内の TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の濃度や局在組織を変化させていることから、体内に保有する TTX や生合成中間体などの輸送・蓄積に関与するタンパク質の同定が求められる。また、オオツノヒラムシの繁殖生態には水温が重要な要因であり、20°C前後で産卵数が増加し、孵化が可能な下限水温は14°C付近であることから、現在の分布域がオオツノヒラムシの幼生が浮遊、着底する時期の水温で規定されていることが示唆された。また、フグ毒を保有しないとされる魚種が TTX を保有し、その魚種が TTX 耐性を示す Na チャネルを保有していたことも踏まえると、今後、海水温上昇によりオオツノヒラムシなどフグ毒保有生物の生息域が拡大して資源量が増加し、現在は TTX を保有しないとされる生物群の毒化、フグ毒保有生物の強毒化に繋がり、予期せぬ食中毒を引き起こす可能性が考えられる。