

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 糸 井 史 朗

(副査) 教授 小 島 隆 人

教授 高 井 則 之

教授 福 島 英 登

本論文は、フグ毒として広く知られながら、その生合成過程や蓄積過程が不明なテトロドトキシン（以下 TTX）を保有する生物における TTX の供給源および TTX の保持に必要な体内機構の一端を解明することを目指したものである。

まず、TTX およびその類縁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 の蓄積システムの解明を試みた。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、各組織から TTX および類縁体を抽出・精製した。抽出液を LC-MS/MS 分析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、皮、腸管、鰓が続いた。5,6,11-trideoxyTTX 濃度は、肝臓で最も高く、腸管、胆のう、脾臓が続いた。11-norTTX-6(S)-ol 濃度は肝臓で最も高く、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、腸管が続いた。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の TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の割合は 1 : 1 であるのに対し、これを摂餌したトラフグから検出された 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、毒性の高い TTX や 11-norTTX-6(S)-ol ときわめて毒性の低い 5,6,11-trideoxyTTX は、異なるメカニズムでトラフグ体内に蓄積され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。

続いて、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、オオツノヒラムシの成熟に伴う TTX、5,6,11-trideoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol の濃度および局在の変化を調べた。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 12 部位に分けて LC-MS/MS 分析に供し、TTX、5,6,11-trideoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol の定量解析を行った。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、成熟段階を通して咽頭に最も高濃度に局在していた。さらに、産卵期の個体を試料として MS imaging 解析を行った結果、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。これらの結果は、オオツノヒラムシの体内では、成熟に伴って TTX、5,6,11-trideoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol の局在が変化しており、これら TTX および類縁体の輸送に関わるタンパク質の存在が示唆された。

オオツノヒラムシの生態の一端を明らかにするため、異なる水温でオオツノヒラムシを約2か月間飼育し、産卵行動を観察した。水温は、オオツノヒラムシを採取した際の水温である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分析に供してTTXおよび5,6,11-trideoxyTTXを定量解析した。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、満月および新月の大潮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、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。20°Cで産卵された卵板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結果、ふ化率は、20°C、18°Cおよび16°Cで保温された卵では100%、14°Cで保温された卵では20%であった。一方、12°Cで保温された卵はふ化しなかった。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た。

本研究では、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。これら魚種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チャンネルの一次構造の決定を試みた。ツムギハゼおよび新たに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を抽出した後、1st-strand cDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型にPCRを行い、主に骨格筋に発現するNav1.4のP-loop領域の一次構造の比較を行った。その結果、ドメインIでは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であった。ドメインIIでは、他の種ではトレオニンである位置がツムギハゼではアスパラギンに置換されていた。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でバリンがイソロイシンに置換されていた。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でイソロイシンがバリンに置換していた。また、ツムギハゼでは、グリシンがセリンに置換されていた。ツムギハゼ等におけるNav1.4のアミノ酸残基の置換は、既報のTTX耐性を示す配列と一致し、TTXを保有することが知られていなかった魚種のTTX耐性への関与が示唆された。

本研究では、上記成果をとりまとめ、TTX保有生物の毒化に関わるメカニズムの一端を明らかにしたものである。TTX保有生物の存在は、これまでに多くの知見が集積されているものの、その毒化機構については、生合成機構も含めてほぼ未解明であるため、本論文の結果は、学術上きわめて重要な知見となる。また、オオツノヒラムシの成熟に伴うTTXおよびTTX生合成中間体の局在変化については、査読付きの原著論文としてすでに国際誌に掲載されており、学術的意義があると判断された。したがって、本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和5年2月27日