

フグ毒 (TTX) 保有魚類における成長ないし性成熟依存的な体内毒分布の変化と TTX 結合性タンパク質の発現に関する研究

長崎大学大学院生産科学研究科
辰野 竜平

フグやある種のはげは強力な神経毒である tetrodotoxin (TTX) を保有する。これらの魚類において、TTX は外因性であり、海洋細菌を起源とする食物連鎖由来と考えられているが、餌生物を介して体内に取り込まれた後の TTX の移行・蓄積・排出機構や、それに影響を及ぼす生理的要因については未だに不明な点が多い。一方、天然ヒガンフグ *Takifugu pardalis* の血漿からは、TTX および saxitoxin と結合するタンパク質 (pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein ; PSTBP) が単離され、フグにおける TTX 体内輸送への関与が示唆されている。本研究では、TTX 保有魚類における毒の体内動態とそれに関わる分子機構解明に資するため、トラフグ *Takifugu rubripes* とツムギハゼ *Yongeichthys criniger* を対象に、成長ないし性成熟の視点から体内毒分布の変化に検討を加えるとともに、トラフグにつき PSTBP 相同遺伝子を探索し、無毒養殖個体におけるそれらの発現状況を調べた。

まず、天然トラフグ中型魚 (261 ± 66 g) につき、TTX の体内分布を調べたところ、相対 TTX 量 (総毒量に対する各組織の毒量の割合) は、肝臓 15~86%、皮 13~73% で、肝臓に相当量の毒の分布がみられた。これに対し、天然トラフグ若年魚 (20.9 ± 3.9 g) では、保有する毒のほとんどが皮に局在していた (相対 TTX 量 90~99%) (池田、2009)。生殖腺体指数 (GSI) と生殖腺の組織学的観察により、今回の中型魚は雌雄ともに未成熟と判断されることから、当該毒分布の差異は成熟ではなく成長段階の違いに起因するものと推察された。次に、6ヶ月齢 (53.5 ± 6.9 g) と 15ヶ月齢 (328 ± 36 g) の無毒養殖トラフグを用いて TTX の経口投与実験を行い、24時間後の TTX 体内分布を比較したところ、皮 (背側と腹側)、肝臓、および消化管における TTX の蓄積/残存状況には大きな違いがみられた。すなわち、6ヶ月齢魚では、皮と肝臓の TTX 量はともに消化管と同程度 (1.6~3.1 MU/g) であったのに対し、15ヶ月齢魚では、肝臓の TTX 量が 14.8 MU/g と他の部位より著しく高かった。相対蓄積毒量 (投与毒量に対する蓄積毒量の割合) は、6ヶ月齢魚では 31% で、その 71% が皮に、21% が肝臓に分布していた。一方、15ヶ月齢魚では投与毒量の 84% が蓄積しており、その 83% が肝臓から、14% が皮から検出された。GSI と生殖腺組織の成熟段階をみると、雌雄ともに両月齢魚間で大差なかったが、比肝重値 (HSI) と肝細胞の直径は 15ヶ月齢魚の方が 6ヶ月齢魚より大きかったことから、トラフグでは肝臓の発達に伴い TTX の体内動態が変化するものと推察された (第 I 章)。

一方、TTX の体内動態に及ぼす性成熟の影響を明らかにするため、2008 年 8 月～2009 年 6 月、および 2009 年 11 月～2010 年 8 月に沖縄本島億首川で採取した雌のツムギハゼ、それぞれ 29 個体（I 群）および 40 個体（II 群）を用い、性成熟に伴う TTX 体内分布の変化を調査した。I 群については、GSI の変化と一部の卵巢切片の組織学的観察に基づき生殖周期（前卵黄形成期、卵黄形成期、産卵期盛期、および産卵期終期）を推定し、II 群では全個体の卵巢切片を観察することで、周辺仁期、卵黄胞期、第一次卵黄球期、第二次卵黄球期、および第三次卵黄球期の個体にグループ分けした。まず I 群につき、各部位の TTX 量を測定したところ、前卵黄形成期には総毒量の 77% を皮、次いで 19% を筋肉が占めていたが、卵黄形成期に入ると 45% を卵巢が占めるようになり、皮の割合は 43% まで低下した。さらに産卵期盛期になると卵巢の毒量は 73% に達した。一方、産卵期終期では、81% を皮、14% を筋肉が占め、卵巢の割合は全体の 2% 程度と前卵黄形成期に酷似したパターンとなった。II 群についても同様に毒の体内分布を調べたところ、卵巢の毒量は、周辺仁期や卵黄胞期の未成熟な個体では総毒量の 1% に満たないが、第一次卵黄球期から第三次卵黄球期にかけて 2～52% へと大きく上昇した。すなわち、卵巢の成熟に伴い、卵巢への毒の偏在が顕著に進むことが示された（第 II 章）。

次いで、トラフグを対象に PSTBP 相同遺伝子の探索を試みたところ、BLAST 検索と 3'-RACE 法により PSTBP と高い配列類似性を示すアイソフォーム遺伝子 4 種 (*Tr1*～*Tr4*) が存在することを見出した。*Tr3* と *Tr4* のオープンリーディングフレーム (ORF) は、PSTBP と同様に 2 つもしくはそれ以上のリポカリンドメイン繰り返し配列を有する一方で、*Tr1* と *Tr2* の ORF はリポカリンドメイン 1 つからなる点で新規であった。無毒養殖トラフグの肝臓において *Tr1* および *Tr3* の両 mRNA の発現が RT-PCR 法により示され、いずれの翻訳産物も同試料魚の 120-kDa 血漿タンパク質として存在していることが SDS-PAGE と MALDI-TOF 質量分析により同定・判別できた。また同タンパク質をプロテインシーケンサで分析したところ、APSXEEXHKLTKAV の N 末端配列が示され、MALDI-TOF 質量分析の同定を支持する結果が得られた。従って、PSTBP 様タンパク質 *Tr1* と *Tr3* は、毒の保有とは無関係に恒常的に発現しているものと推察された（第 III 章）。

以上、本研究により、TTX 保有魚類では個体の成長や性成熟に依存して TTX の体内動態が変化する、すなわち、トラフグの場合、若年魚では体内に取り込まれた TTX は主に皮に移行するが、成長（肝臓の発達）に伴いその多くが肝臓に移行・蓄積するようになること、一方、ツムギハゼでは、卵黄形成期から産卵期盛期にかけ、性成熟（卵巢の成熟段階の進展）に伴い、卵巢に移行・蓄積する TTX の割合が顕著に上昇すること、などを示すと同時に、これらの変化に関わる分子機構の担い手の候補として、トラフグは PSTBP に相同な 4 種のアイソフォーム遺伝子を保有すること、うち 2 種については無毒個体でも血漿中に発現していること、などを明らかにすることができた。