フグはなぜ自分のフグ毒に中毒しないのか

中山 仁*

フグ毒はヒトをはじめほとんどの動物に神経毒として作用するのに、フグ自身が中毒しないのはなぜか？ 最近の研究成果から、この毒に対する耐性機構には標的分子 Na チャネル中のある限られた部位の変異が深く関わっていることがわかってきた。さらにフグの筋肉中には、Na チャネル以外にもテトロドトキシン結合能をもつタンパク質の存在も指摘されており、複数の機構で自分を守っているのかもしれない。

フグ毒と Na チャネル

昨今、人工の神経毒サリンが社会を騒がせているが、フグ毒テトロドトキシン (TTX) は代表的な天然の神経毒である。そのターゲット分子が、神経細胞や筋細胞などの細胞膜（いわゆる興奮膜）に高密度で存在する Na チャネルである。この Na チャネルは細胞膜の電位がある値以上に達すると開口する“電位依存性イオンチャネル”であり、上記の細胞に活動電位と呼ばれる電気インパルスが発生させる。したがって、生物個体内の迅速な刺激伝達の際に中心的な役割を果たしている。今日、Na チャネルの分子構造については、後述のように、かなり詳しくわかってきており、この研究過程で TTX が果たした役割は計りしれないものがある⁽¹⁾。1950 年代、Hodgkin と Huxley の電気生理学研究に基づく「神経興奮の Na イオン説」の提唱や、その後の薬理学、生化学分野での展開においても、TTX は不可欠な“分子ツール”であった。そして、1984 年には、Na チャネル分子の一次構造が明らかにされるに至った。

“フグ毒”と呼ばれていることからわかるように、TTX はある種のフグの卵巣や肝臓にかなり高濃度に含まれる。その

研究の歴史は古く、フグ卵巣からの TTX の抽出はすでに 1894 年に、田原良純博士らによって報告されている⁽²⁾。ところで、TTX あるいはその同族体はフグだけではなく、ツムギハゼ、ヒョウモンダコ、スベスベマンジュウガニやカリフォルニアイモリなどにも見いだされている。このことから、TTX はフグ自身が生合成するのではないことが推測されたが、実際に、ビブリオ属、アルテロモナス属などの細菌が生産することがわかってきている。これらの細菌を含むプランクトンや海藻を食したフグなどが担毒動物となる可能性が考えられており、これらに関するわかりやすい解説もある⁽³⁾。したがって、TTX の話を進める上では、当然フグ以外の TTX（およびその同族体）を体内にもつ動物も考慮する必要があるが、本稿では“フグ毒”と呼ばれることに敬意を表して、フグについてののみ記述することにする。

さて、Na チャネルは神経伝達を担う基本分子であるから、当然フグの神経や筋肉組織にも存在する。にもかかわらず、なぜフグは TTX で中毒しないのであろうか？ この問いに対する現時点での有力な答えは、次の 2 つであろう。第一

Why Puffer Fishes Are Not Intoxicated by Their Carrying Tetrodotoxin?
* Hitoshi NAKAYAMA, 熊本大学薬学部

は、Na チャネルの分子構造が TTX 感受性を示す他の動物とは異なっているとする考えであり、第二は、フグには TTX と結合することによってその毒作用の発現を抑えるタンパク質が存在するとの考えである。本稿では、私見も交じえながら、これらの内容を紹介してみたい。

Na チャネルの分子構造

Na チャネルは、1984 年に電気ウナギの発電器官（発生学的には筋肉組織）から mRNA の cDNA が初めてクローニングされ、そのアミノ酸配列が明らかにされた。その解析結果より、Na チャネルは膜に対して、図 1 に示すような配置をしているとするモデルが受け入れられている⁽¹⁾。6つの異なった膜貫通セグメント（S1～S6）が1つのドメイン（またはモチーフ）をつくり、このドメイン構造が4回くり返される。したがって、このドメインはリピート（I～IV）と呼ばれる。

さて、Na チャネルには TTX 感受性のものと、感受性が低いもの（ここでは便宜上“非感受性”と呼ぶ）の2種類がある。前述の電気ウナギ

発電器官や、脳、骨格筋のチャネルは TTX 感受性であり、哺乳類の心筋や、培養した骨格筋あるいは除神経処置した骨格筋のチャネルは TTX 非感受性である（表 1）。電気ウナギ発電器官に続いてラット脳や骨格筋、さらには心筋の Na チャネルの一次構造が相次いで明らかにされた。TTX 非感受性の分子メカニズムを知る上からも、両タイプのチャネルに違いがあるかどうか、特に TTX 結合部位と考えられる部分での比較に衆目が集まったのは当然である。

結論を先にいうと、TTX 結合部位の一部を構成するとみなされるリピート I 上の2箇所であミノ酸の置換が起こっていることが判明した⁽⁴⁾。すなわち、①385 番目のアミノ酸残基が、TTX 感受性のチャネルでは芳香族アミノ酸 Phe（一部では Tyr）であるのに対して、TTX 非感受性の心筋チャネルでは Cys に置換されており、②セグメント S5 と S6 の連結部の N 末端側の部分で、連続した 14 アミノ酸残基が欠除（deletion）していた（図 2）。

現在、TTX 結合部位がどのようなアミノ酸残基で構成されていると考えられているかについては、後で詳述するが、385 番目近辺がその一部であるとの知見はすでに得られていた。酸性アミノ酸 Glu-387 を、立体的に類似した中性アミノ酸 Gln に変換した変異チャネルでは、TTX 結合

表 1 ■ 代表的な組織における Na チャネルとトキシンの結合親和性

組織	結合親和性 (K _d)		
	テトロドトキシシン (nM)	[site1] サキントキシシン (nM)	μ-コノトキシシン (nM)
神経			
ラット脳	0.64	0.114	11,000
ニワトリ	0.24	0.043	—
ロブスター運動神経軸索			>10,000
骨格筋			
ラット	1.8	0.49	19~140
ラット (培養系)	1,000	300	
電気ウナギ発電器官	1.0	—	0.6~50
心筋			
ラット	300	10	>10,000
ラット (培養系)	1,000	50	
ニワトリ	0.60	0.95	—

図 1 ■ 最近の知見をもとに想定された Na₊チャネルの膜配置モデル
4つのくり返し構造（リピート I～IV）は、それぞれ S1～S5 のセグメントからなる。S5-S6 間のリンカー部は従来、膜の外側（点線）と考えられていたが、現在では膜の中に入っていることがわかっている。

図 2 ■テトロドトキシン感受性・非感受性 Na チャンネルのリピート I S5-S6 連結部のアミノ酸配列の比較⁽⁸⁾
上段 4 つは TTX 非感受性チャンネル (pfBNa 1, 2: フグ脳 Na チャンネル 1, 2; hHNa 1: ヒト心筋 Na チャンネル 1; rMNa 2: ラット骨格筋 Na チャンネル 2) で、下段 4 つは TTX 感受性チャンネル (rMNa 1: ラット骨格筋 Na チャンネル 1; rBNa 1~3: ラット脳 Na チャンネル 1~3) を示す。Na チャンネルすべてに保存されている Glu-387 と、非感受性チャンネルではアミノ酸置換が起こっている 385 番目と deletion が始まる 285 番目も示した。

能が大幅に低下することが実験的に確かめられていたのである⁽⁵⁾。TTX 結合部位を検索する目的でこの変異実験が計画された根拠は、①TTX が生理的条件では常に正電荷をもつグアニジニウム基という特別な官能基を有していることより、そのチャンネル上の受容部位は負電荷をもつ酸性アミノ酸残基であろう、②従来からの薬理学的、生理学的研究から、TTX は細胞膜の外側から Na チャンネルと結合することがほぼ確立していた、ことによるものであろう。

この①の考えに基づいて、心筋 Na チャンネルの一次構造がわかった当初には、TTX 非感受性の要因は次のように考えられていた。すなわち、Glu-387 に隣接する Asn-388 が正電荷をもつ Arg に置換されているため、Glu-387 の負電荷が実質的に相殺されてしまい、TTX グアニジニウム部の受容能が低下したことによる、と。しかし、実際はそうではなく、site-directed mutagenesis (部位特異的突然変異誘発) で Cys-385-Trp-386-Glu-387-Asn-388 とした心筋チャンネルでも TTX 結合能はまったく向上しないことから、Cys-385 の変異が心筋チャンネルの TTX 非感受性を決める主要因であると結論された⁽⁶⁾。同じ変異は、やはり TTX 非感受性である骨格筋チャンネルの一部のクローンでも観察されている⁽⁷⁾。

フグの Na チャンネルの構造

それでは、フグの Na チャンネルの分子構造はどうなのであろうか？

中沢 (山口大・医) らがトラフグの脳からクローニング⁽⁸⁾した 2 種の Na チャンネル遺伝子について、TTX 結合部位の一部を構成すると考えられるリピート I 中の S5-S6 連結部を調べてみると、1 つのクローンではこの部分に 14 アミノ酸残基の deletion が認められた (図 2)。同じ場所の deletion は、TTX 非感受性の心筋や一部の骨格筋 Na チャンネルでも起こっていることはすでに述べたが、Phe-385 の Cys への変異はフグでは認められなかった (図 2)。もう 1 つのクローンでは、deletion も認められなかった。ところで、TTX は有機強塩基化合物であり、疎水性が低いという化学的性質をも考慮すると、TTX 分子が毒性を示す濃度にまでフグ脳内に透過・浸透できるか、という疑問も残る。したがって、フグの TTX 非感受性と、このフグ脳 Na チャンネルの変異とは、直接には結びつかないのかもしれない。この問題に対する答えを得るためには、むしろフグ筋肉の Na チャンネルの構造を調べるほうが適切であると思われる。

安元 (東北大・農) らは、ヒガンフグ筋肉を使

TTX 結合部位の分子構造

このモデルでは、TTX のグアニジニウム基はリピート I, II の酸性アミノ酸クラスターと相互作用し、また光感受性基をもつ C-11 位はリピー

			379				383	384		386	387	388		391				
リピートⅠ	L	F	R	L	M	T	Q	D	F	W	E	N	L	Y	Q	L	T	
							941	942	943		945							
リピートⅡ	V	F	R	V	L	C	G	E	W	I	E	T	M	W	D	C	M	
								1422			1425	1426						
リピートⅢ	L	L	Q	V	A	T	F	K	G	W	M	D	I	M	Y	A	A	
								1714			1717							
リピートⅣ	L	F	Q	I	T	T	S	A	G	W	D	G	L	L	A	P	I	
	—SS1—						—SS2—											

化学と生物 Vol.33, No. 9, 1995

図 4 ■ 光反応性テトロドトキシン誘導体と、結合時に相互作用すると推定される Na チャンネル中のアミノ酸残基

ト III, IV 側に配向している。これは、これまでの実験結果をよく説明できる。また、安元は TTX 分子中の特定部分のみが変化した同族体 10 種類余を用いて、チャンネル分子との結合における構造-活性相関を調べた結果から、このモデルがよく合致するとしている。このモデルで STX の結合を考えてみると、一方のグアニジニウム基 (7, 8, 9 位) はリピート I, II の酸性アミノ酸クラスターと、また C-12 位のケタール水酸基の一方が (TTX のヘミアセタール酸素ほど十分ではないが) Lys-1422 と相互作用しうることになる。

モデルの妥当性を確かめる決め手は、TTX-チャンネル分子複合体の三次元構造解析を待たねばならないが、化学的手法によってもまだまだ肉迫できそうである。

TTX 結合タンパク質

フグが TTX 抵抗性を示すもう一つのメカニズムとして考えられるのは、フグ筋肉中にチャンネルとは別の TTX 結合タンパク質が存在する可能性である。安元らは、フグ脳を用いて測定した TTX 結合量は、別のタイプの Na チャンネル毒ブレバトキシンの結合量と同等であったが、フグ筋肉を用いて同様の実験を行なった場合には、ブレバトキシンの結合量から推定される Na チャンネルの量をはるかに上回る量の TTX が結合することを観察した。これより、フグ筋肉にはチャン

ネル以外にも TTX を結合するタンパク質が存在するのではないかと考えた⁽³⁾。筋肉膜を界面活性剤で処理すると、このタンパク質の TTX 結合能は消失することから、この結合タンパク質は筋肉膜上にあると推定されている。

ある種のカエル (*Rana catesbeiana*) は STX 感受性が低いことが知られているが、その血漿中から STX に強い結合能を示すタンパク質 (分子量 89 kDa) が分離されている⁽¹²⁾。

STX がカエル体内に入ってきて、このタンパク質でトラップされてしまうため、Na チャンネル機能を阻害しないことがこの動物における重要な STX 非感受性機構である、と考えるのは興味ある仮説である。おもしろいことに、このカエルのタンパク質は TTX 結合能をもたないという。TTX に耐性を示すカリフォルニアイモリの神経も STX ではブロックされる。このような、いわゆる TTX/STX 間の交差耐性が認められない例も、このような内在性のトキシン結合タンパク質によって説明できる可能性もある。

フグの TTX 耐性機構として、Na チャンネルの変異と TTX 結合タンパク質のどちらが大きく寄与しているかを現時点で断定するのは難しいが、筆者は、前者がフグ体内における最後の関門として“切り札”の役割を果たしているものと考えている。ただ、TTX 耐性 Na チャンネルといえども、“全か無か”の法則のように切れ味鋭く TTX 結合から免れるわけではないので、Na チャンネルに至る前の段階でガードできる TTX 結合タンパク質の存在は、フグの生体防御上、合目的である。TTX 結合タンパク質の存在は新しい知見であり、その寄与の度合いも含め、今後の展開が待たれる。

文献

- 1) 中山 仁: 薬史学雑誌, 29, 441 (1994).
- 2) 末廣雅也: 薬史学雑誌, 29, 428 (1994); 酒井 浄: *ibid.*,

- 29, 435 (1994).
- 3) 安元 健: 現代化学, No.282, 47 (1994).
- 4) R.B. Rogart, L.L. Cribbs, L.K. Muglia, D.D. Kephart & M.W. Kaiser: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8170 (1989).
- 5) M. Noda, H. Suzuki, S. Numa & W. Stuehmer: *FEBS Lett.*, 259, 213 (1989).
- 6) J. Satin, J.W. Kyle, M. Chen, P. Bell, L.L. Cribbs, H.A. Fozzard & R.B. Rogart: *Science*, 256, 1202 (1992).
- 7) M.E. Gellens, A.L. George, Jr., L. Chen, M. Chahine, R. Horn, R.L. Barchi & R.G. Kallen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 554 (1992).
- 8) M. Sharjahn, M. Yamada, M. Nagaya, M. Kawai & A. Nakazawa: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 707, 346 (1993).
- 9) H. Terlau, S.H. Heinemann, W. Stuehmer, M. Pusch, F. Conti, K. Imoto & S. Numa: *FEBS Lett.*, 293, 93 (1991).
- 10) H. Nakayama, Y. Hatanaka, E. Yoshida, K. Oka, M. Takanohashi, Y. Amano & Y. Kanaoka: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 900 (1992).
- 11) H. Nakayama, Y. Hatanaka, M. Taki, E. Yoshida & Y. Kanaoka: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 707, 349 (1993).
- 12) Y. Li & E. Moczydlowski: *J. Biol. Chem.*, 266, 15481 (1991).

フ ロ フ ィ ル

天野 洋 (Hiroshi Amano) 昭和26年5月14日生<略歴>1974年京都大学農学部農林生物学科卒業後、カナダ国トロント大学動物学科にて M.Sc. 修了、同 Ph.D. 修了、帰国後、千葉大学園芸学部助手を経て、助教授 (応用動物昆虫学研究室)、現在にいたる<研究テーマと抱負>生態系の中での天敵類のもつ役割の評価と、農生態系でのその利用<趣味>スポーツ (特にテニス, スキー), 旅行

岩崎 照雄 (Teruo Iwasaki) 昭和7年8月3日生<略歴>昭和30年九州大学農学部農芸化学科卒業/39年同大学大学院農学研究科博士課程修了/同年米国ボストン大学医学部生化学科研究員/43年兵庫農科大学農芸化学科助教授/44年神戸大学農学部農芸化学科助教授/61年同教授、現在にいたる<研究テーマと抱負>プロテアーゼおよび蛋白質性プロテアーゼインヒビター、マメゾウムシの蛋白質性成長阻害因子、植物の界面活性ペプチドなどの構造と機能の相關<趣味>釣り, 山歩き, 読書

鶴沢 浩隆 (Hirotaka Uzawa) 昭和39年9月6日生<略歴>昭和62年東北大学農学部食糧化学科卒業/平成3~5年日本学術振興会特別研究員/4年同大学大学院農学研究科博士課程修了/5年理化学研究所勤務/7年通商産業省工業技術院物質工業技術研究所入所、現在にいたる<研究テーマと抱負>分子認識などの機能をもつ有機材料の創製とその評価 (主には有機合成化学的方法による)<趣味>自然を満喫すること

大久保 敬 (Hiroshi Okubo) 昭和23年7月14日生<略歴>昭和49年九州大学農学部農学科卒業/51年同大学大学院修士課程修了/56年同博士課程退学、同農学部助手/平成2年同助教授、現在にいたる<研究テーマと抱負>球根作物の休眠生理、植物の生育のしくみを明らかにしたい<趣味>旅行

大森 俊雄 (Toshio Omori) 昭和16年8月5日生<略歴>1965年東京大学農学部農芸化学科卒業/1970年同農学部助手/1986年同助教授/1993年同生物生産工学研究センター教授、現在にいたる<研究テーマと抱負>微生物の共生系の解析と応用

大類 洋 (Hiroshi Orui) 昭和17年1月2日生<略歴>昭和40年東京大学農学部農芸化学科卒業/同年宇都宮産株式会社勤務/41年理化学研究所勤務/56年東北大学農学部食糧化学科 (現応用生物化学科) 助教授、現在にいたる<研究テーマと抱負>①キラリティーと分析, キラリティーと生命を含む自然現象, ②超高感度分析試薬の開発, ③抗ガン抗ウイルス活性スクレオシドの開発

岡田 吉美 (Yoshimi Okada) 昭和4年2月3日生<略歴>昭和27年大阪大学理学部化学科卒業/41年農林省植物ウイルス研究所研究室長/47年東京大学理学部生物化学科教授/平成元年帝京大学理工学部バイオサイエンス学科教授、現在にいたる<研究テーマと抱負>植物ウイルスの分子生物学, 植物を利用したワクチンの生産

金子 淳 (Jun Kaneko) 昭和37年12月18日生<略歴>昭和61年東北大学農学部農芸化学科卒業/63年同大学大学院農学研究科博士前期課程修了/平成元年同農学部助手、現在にいたる<研究テーマと抱負>黄色ブドウ球菌の二成分性血球崩壊毒素の作用機作, リジンデカルボキシルラーゼ (ダイズ)<趣味>旅行, 写真, 鉄道模型

神尾 好是 (Yoshiyuki Kamino) Vol. 31, No. 4, p. 234 参照

菊池 慎太郎 (Shintaro Kikuchi) 昭和25年10月29日生<略歴>昭和48年北海道大学農学部農芸化学科卒業/50年同大学大学院農学研究科修士課程修了/54年同博士課程修了 (薬博)/56年川崎医科大学医学部助手 (生化学)/62年室蘭工業大学工学部助教授 (微生物工学), 現在にいたる。この間、60~62年米国ワシントン州立大学生物化学研究所研究員<研究テーマと抱負>微生物の薬物代謝, 特に結核菌などの抗酸菌の物質代謝に興味<趣味>16, 7世紀の陶磁器の収集と鑑賞

佐藤 清隆 (Kiyotaka Sato) 昭和21年12月23日生<略歴>1974年名古屋大学大学院工学研究科博士課程応用物理学専攻単位取得退学/同年広島大学水畜産学部 (現生物生産学部) 助手, 助教授を経て、1991年教授、現在にいたる。1981~82年フランス・マルセイユ結晶成長機構研究所に給費留学生として滞在<研究テーマと抱負>生体構成物質の構造物性と機能の相關解析, 特に、脂質とその関連物質を幅広い応用に生かすこと<趣味>サッカー, ランニング, スキー, 音楽鑑賞

斉藤 和季 (Kazuki Saito) 昭和29年10月12日生<略歴>1977年東京大学薬学部製薬化学科卒業後、同大学大学院を経て、1982年慶応義塾大学医学部助手, 1985年千葉大学薬学部助手, 講師, 助教授を経て、1995年同教授、現在にいたる。この間、1987年ベルギー国ゲント大学遺伝学教室留学<研究テーマと抱負>広い意味での薬用植物の遺伝子資源応用という新しい研究分野を発展させ、質的レベルの高い研究をしたい<趣味>野山の散策, ジャズを聴くこと