シンポジウム記録 魚類における新しいタンパク質 Calycin 研究の新展開

III-3. フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質

長島裕二

東京海洋大学

III-3. Occurrence of tetrodotoxin-associated proteins
in pufferfish liver

YUJI NAGASHIMA

Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo
University of Marine Science and Technology, Minato,
Tokyo 108-8477, Japan

フグが外来物質のフグ毒テトロドトキシン (TTX) を体内に取り込み、高濃度に蓄積する毒化のメカニズムはいまだ不明な点が多い。Matsumoto らは、トラフグの消化管に投与された TTX は短時間で効率よく吸収され、血液で運搬され、肝臓に取り込まれ濃縮することを薬物動態解析で明らかにし、肝臓への取り込みが毒化の鍵を握ることを改めて確認した。¹⁾

フグの毒化過程において、さまざまなタンパク質が関与していると推測されるが、TTX 輸送に関与するタンパク質 puffer fish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein (PSTBP)²⁾を除いてほとんど知見がない。肝臓に関しては、天然フグの有毒肝臓抽出液をゲルろ過カラムで分離すると、フグ毒の一部は高分子画分に検出され、プロテアーゼや RNase 処理、酸加水分解でフグ毒が遊離することから、フグ肝臓中でフグ毒の一部はタンパク質や核酸などの高分子成分と結合していることが示唆されたが、詳細は不明である。^{3,4)}そこで、TTX を蓄積する主要な器官である肝臓中のフグ毒蓄積関連タンパク質について検討した。

1. TTX の細胞内分布

無毒の養殖トラフグ肝臓から肝組織切片を作製し、50 μ M TTX 含有緩衝液で 20°C, 24 時間培養して TTX を蓄積させた。肝組織切片をコラゲナーゼ処理して細胞分散し、肝細胞を Subcellular Protein Extraction Kit を用いて細胞分画を行い、細胞質画分、膜・オルガネラ画分、核画分、細胞骨格画分に分画した。その結果、TTX はほぼ細胞質画分にみられ、天然有毒フグ肝臓の結果と一致した。⁵⁾

2. TTX の存在形態

上記と同様の方法で TTX を蓄積させた肝組織切片をホモジナイズし、Sephacryl S-400 ゲルろ過カラムに供したところ、TTX の約 90% は遊離型としてカラム体積付近に検出されたが、数%はカラムの分画範囲 (分子量 2×10^4 – 8×10^6 Da) に検出され、一部の TTX は高分子成分と結合して存在していることが示唆された。次に、無毒の養殖トラフグ肝臓ホモジネートに TTX (終濃度 0.5 μ g/mL) を添加して、4°C, 2 時間インキュベートした後、Sephacryl S-400 ゲルろ過クロマトグラフィーで分画した場合にも、高分子画分から TTX が検出され、*in vitro* で TTX を添加した場合でも、TTX は高分子成分と結合することが確認された (長島ら、未発表)。

天然有毒フグでの先行研究の結果^{3,4)}とあわせ、フグ肝臓では TTX はほとんどが細胞質に遊離状態で存在する一方、一部は高分子結合型として存在することが明らかになった。しかし、*in vitro* 実験で得られた高分子画分をイオン交換カラムまたは SDS-PAGE に供すると TTX は遊離したため、TTX との結合力は弱く、天然有毒フグで存在が示唆されている高分子成分とは異なる と推察された。

文 献

- 1) Matsumoto T, Nagashima Y, Kusuha H, Ishizaki S, Shimakura K, Shiomi K. Pharmacokinetics of tetrodotoxin in puffer fish *Takifugu rubripes* by a single administration technique. *Toxicon*. 2008; **51**: 1051–1059.
- 2) Yotsu-Yamashita M, Sugimoto A, Terakawa T, Shoji Y, Miyazaki T, Yasumoto T. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma protein of the puffer fish, *Fugu pardalis*. *Eur. J. Biochem*. 2001; **268**: 5937–5946.
- 3) Kodama M, Noguchi T, Maruyama J, Ogata T, Hashimoto K. Release of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison from puffer liver by RNase. *J. Biochem*. 1983; **93**: 243–247.
- 4) Nagashima Y, Nagai T, Shiomi K, Tanaka M, Taguchi T, Shida Y. Tetrodotoxin-associated high molecular weight substances from toxic pufferfish liver. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1177–1182.
- 5) Nagashima Y, Hamada Y, Ushio H, Nishio S, Shimakura K, Shiomi K. Subcellular distribution of tetrodotoxin in puffer fish liver. *Toxicon* 1999; **37**: 1833–1837.