

フグ骨格筋 Na⁺チャネルの発現とフグ血漿中フグ毒結合蛋白質による毒の
体内輸送と蓄積

Functional expression of puffer fish muscle sodium channel, and transportation and
accumulation of tetrodotoxin and saxitoxin in puffer fish involved in the toxin binding
protein in its plasma

(日本農芸化学会推薦)

研究代表者	東北大学	山下まり	Tohoku University	Mari Yotsu-Yamashita
共同研究者	広島大学	山岡 薫	Hiroshima University	Kaoru Yamaoka
共同研究者	東北大学	山口高弘	Tohoku University	Takahiro Yamaguchi
共同研究者	東北大学	渡辺康一	Tohoku University	Koichi Watanabe

Puffer fish accumulate high level of tetrodotoxin (TTX) in their tissues. We are interested in the toxin resistance and accumulation of puffer fish. We previously cloned a cDNA coding a muscle voltage-gated sodium channel of the puffer fish, *Fugu pardalis* (fMNa1), and found a mutation which was supposed to be involved in TTX-resistance. In this study, we attempted to express fMNa1 in mammalian cell line to examine the functions. Although we have not succeeded expression of fMNa1 itself, the mutation found in fMNa1 (F385N) was introduced to TTX-sensitive rat brain sodium channel II (rNa_v1.2) and this mutant was expressed in HEK293. By electrophysiological experiments using the patch clamp method, the value of IC₅₀ against TTX of F385N mutant was estimated to be approximately 3,000 fold larger than that of the wild type, suggesting that fMNa1 was a TTX-resistant sodium channel at least due to this mutation. Further, we previously found a soluble glycoprotein, saxitoxin (STX) and TTX binding protein (PSTBP) in the plasma of *F. pardalis*. In this study, we prepared anti-serum

against the protein part of PSTBP expressed in *E. coli*, and studied localization of PSTBP in tissues of *F. pardalis* by Western blot analysis and by immunohistochemical staining by using this anti-serum.

研究目的

フグは主に卵巣や肝臓、皮膚にテトロドトキシン(TTX)を蓄積し、さらに麻痺性貝毒サキシトキシン(STX)を合わせ持つ場合がある。両毒は、電位依存性 Na^+ チャンネルの共通の部位に特異的に結合して、 Na^+ の細胞内流入を阻害する。我々は、フグの TTX, STX に対する耐性機構に興味をもち、 ^3H -STX の結合性をヒガンフグとラットで、脳と骨格筋において比べた結果、ヒガンフグ組織はラットに比べて非常に結合性が低いことが示された。そこで、ヒガンフグ骨格筋 Na^+ チャンネルタイプ 1(fMNa1)の全長 cDNA のクローニングを行い、TTX, STX 結合部位に両毒耐性を示唆する変異があることを明らかにした。本研究では、この変異が実際に耐性に関与するのかどうか、fMNa1 をほ乳類細胞に発現して機能解析を試みた。一方、これまでに、フグ血漿中に TTX, STX 両毒と結合する新規糖蛋白質(PSTBP)が高濃度で存在することを発見し、PSTBP の単離および cDNA のクローニングを行なった。本研究では、PSTBP に対する特異的抗体を作製し、その抗体を用いて PSTBP のフグ組織内、細胞内分布を調べ、PSTBP と TTX, STX のフグ体内輸送、蓄積との関わりについて考察した。

研究経過

1. ヒガンフグ骨格筋 Na^+ チャンネル fMNa1 の発現と機能解析

1) fMNa1 cDNA の再構成と発現の試み

fMNa1 をコードする cDNA (6722 bp)は、ヒガンフグ骨格筋 cDNA ライブラリーおよび RT-PCR 産物から得て、各断片を繋ぎ合わせ、哺乳類細胞発現用ベクター pcDNA3 に挿入した。これをヒト胎児腎臓細胞(HEK293)にトランスフェクションして発現を試みたが、パッチクランプ法で細胞膜の内外で電流が観測されず、未だ発現には成功していない。他のベクターに組み替え直すなど、さらに条件検討を継続している。

2) fMNa1 型変異の rNa_v1.2 への導入と TTX 耐性の変化

fMNa1 で示された変異 F/Y385N(385 は rNa_v1.2 のアミノ酸番号)は、心筋など TTX 耐性型 Na^+ チャンネルで見られる変異と同じアミノ酸でおこっていた。さらにこれまで報告された点変異実験から、このアミノ酸 1 つの置換で TTX 感受性が大

大きく変化することが証明されている。そのため、fMNa1 は TTX 耐性型ではないかと考えられ、それを確認するために TTX 感受性の rNa_v1.2 にこの変異(F385N)を導入して TTX 感受性の変化を調べた。rNa_v1.2 の cDNA は野田先生（生理研）から頂いたものを pCIneo に組み換え、F385N の変異を導入し、HEK293 にトランスフェクションして発現させた。パッチクランプ法により、野生型 rNa_v1.2 および F385N 変異体の TTX に対する IC₅₀ を調べた。それぞれ 11.6±4.8 nM (n=3, SD) 及び 33.3±5.7 μM (n=4, SD) であり、F385N 変異体が野生型の約 3,000 倍 TTX 耐性であることが示された。このことから、fMNa1 は少なくともこの変異から TTX 耐性であると推測された。

2. PSTBP のポリクロナール抗体の作製および PSTBP の分布と機能

1) *E.coli* による PSTBP 蛋白質部の発現とポリクロナール抗体の作製

大きな糖鎖を有する PSTBP は精製蛋白質をそのまま抗原としてウサギで免疫しても、非常に特異性の低い抗体しか得られなかった。そこで、PSTBP のシグナルペプチドを含まない cDNA を、C 端に HisTag 領域をもつ発現ベクター pET21b に組み込み、IPTG で発現を誘導して、

大腸菌 Rosetta gami (DE3) を用いて発現させた。その結果、大量発現には成功したが、発現蛋白質は封入体として得られたので、可溶化後リフォールディングし、Ni-NTA カラムで精製した。これを Recombinant-PSTBP (Re-PSTBP) と呼ぶ。Re-PSTBP は TTX, STX に対する結合活性を示さなかったが、これを抗原としてウサギに免疫し、ポリクロナール抗体を得た。この抗体を用いて *F. pardalis* 血漿のウエスタンブロットを検出すると、PSTBP に相当するほぼ単一のバンドが示され(Fig.1)、特異性の高い抗体が得られたと判断した。

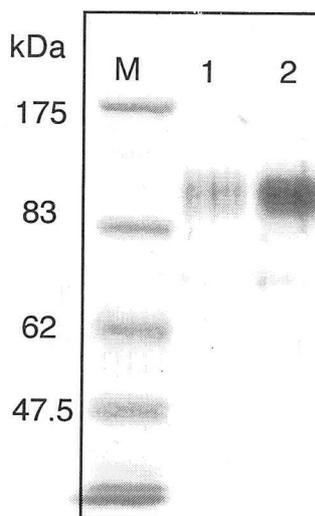


Fig.1 Western blotting analysis of PSTBP 5 ng (lane 1) and *F. pardalis* plasma 10 nl (lane 2) using anti Re-PSTBP anti-serum (1000 dilution). 7.5% SDS-PAGE

2) Re-PSTBP 抗体を用いた各種生物中の PSTBP の分布調査

8 種のフグ血漿と、その他の魚類（ナメタガレイ、クロソイ、アイナメ、ヒラメ）血漿を、Re-PSTBP 抗体を用いてウエスタンブロット解析した。その結果、フグ類は、*F. pardalis* と同じサイズあるいはそれよりも大きな分子量領域に 1 本あるいは 2 本のバンドを与えた。一方、他の魚類は全くバンドを与えなかった。この

ことから、PSTBP 類似蛋白質はフグ類血漿中に共通して存在し、今回調べた限りではフグ類以外の魚類血漿には存在しないと考えられた。*F. pardalis* 雌雄各組織の可溶性蛋白質をウエスタンブロット解析すると、どの組織にも PSTBP のバンドが示されたが、皮膚で有意に強く示された。TTX を多量に蓄積する肝臓、卵巣のバンドは皮膚より弱かった。また、TTX または STX 含有生物として、ヒラムシ (全体)、ホタテガイ (全体と中腸腺)、シリケンイモリ (皮膚、肝臓、血液、心臓) の可溶性蛋白質をそれぞれウエスタンブロット解析に供したが、全くバンドが検出されず、PSTBP はフグ類特有の蛋白質であることが示された。

3) *F. pardalis* 各組織の免疫組織化学的染色

F. pardalis 雌から、皮膚、腸、肝臓、卵巣、筋肉を切り出し、4%ホルムアルデヒドで固定し、凍結切片及びパラフィン抱埋切片を作製した。また、抗 Re-PSTBP 抗血清から Protein A カラムで精製した抗 Re-PSTBP IgG を用いて、1次抗体反応を行った。対照には、市販のウサギ IgG を用いた。続いて peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体で二次抗体反応を行い、DAB と H₂O₂ を含む緩衝液で発色し、光学顕微鏡で観察した。その結果、皮膚では、真皮が陽性であり、表皮は陰性であった。腸では粘膜固有層が陽性であった。TTX を高濃度に有する肝臓では肝細胞及び肝臓組織を形成する膵臓組織は陰性であった。卵では、卵膜の内側の部分が陽性であった。TTX 含有量の低い筋肉では、筋線維は陰性で、筋線維間の結合組織が弱い陽性であった。尚、これらの陽性部位は全て対照では陰性であった。さらに、免疫吸収試験を行って特異性を確認している。

考察

今回の点変異実験の結果から、ヒガンフグ骨格筋 Na⁺チャンネル fMNa1 で認められた F385N の変異は TTX 耐性型の変異であることが証明できた。しかし、fMNa1 cDNA 自体を哺乳類細胞で発現させることができれば、さらなる機能特性を探ることができるだろう。これまでの結果から、fMNa1 は主要なフグ骨格筋の Na⁺チャンネルサブタイプであると考えられるので、このチャンネルの変異はフグの TTX 耐性機構の一つと考えられた。

北里大学の山森は、クサフグ(*F. niphobles*)血漿中より単離した TTX 結合蛋白質 TBP に対する抗体を作製して免疫組織化学的染色を行い、皮膚の未分化基底細胞に免疫陽性反応が観察されることを報告した。我々の本実験では基底細胞は陰性であった。また、北里大学の児玉らは、*F. pardalis* の表皮に TTX を分泌する腺が存在し、その分泌腺は多量の TTX を含有していると報告した。また、野口らは、抗 TTX モノクローナル抗体を用いてナシフグ(*F. vermicularis*)の皮膚を免疫染色し、この TTX 分泌腺が陽性であることを報告した。今回、抗 Re-PSTBP IgG で染色し

た結果、この TTX 分泌腺は陰性であった。

本研究の結果から、*F. pardalis* 体内での TTX, STX の動態、蓄積と PSTBP の機能について次のような仮説を立てた。PSTBP は、ノーザンブロット解析の結果からフグ肝細胞で合成されて、血漿中に分泌されると考えられた。一方、腸管の粘膜固有層と皮膚の真皮が Re-PSTBP 抗体に陽性であったので、食餌などに含まれる外因性の TTX, STX は、腸管から吸収されて腸管の粘膜固有層に存在する PSTBP と結合して血漿中に入り、少なくとも皮膚の真皮に運ばれると考えた。今回の結果では、PSTBP は TTX 分泌細胞を取り巻く真皮に主に存在し、TTX 分泌細胞には多く存在しないことが示唆された。酸性条件では TTX は PSTBP から遊離することがわかっているため、pH 変化などの要因で TTX が PSTBP から遊離して TTX 分泌腺に移行し、外界へ放出されるとのではないかと考えた。もしそうであるならば、PSTBP は毒の蓄積よりもむしろ運搬機能を担う蛋白質と考えられる。卵巣や肝臓は通常、最も多くの毒を含有するが、今回のウエスタンブロット解析の結果では、これらの部位の PSTBP 含量は、皮膚よりも低いことが示された。このことから、毒の蓄積に関わる蛋白質は PSTBP 以外に存在するのではないかと考えられた。

口頭発表

- 1) 八巻 洋恵、山下 まり ヒガンフグ血漿中サキシトキシン、テトロドトキシン結合タンパク質に関する研究(II) 日本農芸化学会 2005 年度大会(札幌、2005).
- 2) 八巻洋恵、山下まり、荒木直生、庄司有希、渡辺康一、山口高弘 ヒガンフグ *Fugu pardalis* のサキシトキシン、テトロドトキシン結合蛋白質の抗体作製と分布解析 第 47 回天然有機化合物討論会 (徳島、2005).
- 3) 丸田 聡、山下 まり ヒガンフグ筋肉 Na⁺チャネルの発現と機能解析 日本農芸化学会 2006 年度大会(京都、2006).

誌上発表

- 1) 八巻洋恵、山下まり、荒木直生、庄司有希、渡辺康一、山口高弘 ヒガンフグ *Fugu pardalis* のサキシトキシン、テトロドトキシン結合蛋白質の抗体作製と分布解析 第 47 回天然有機化合物討論会講演要旨集 p487-491 (2005).
- 2) Mari Yotsu-Yamashita, Ayako Goto, and Toshio Nakagawa, Isolation of 4-S-cysteinyltetrodotoxin from the liver of the puffer fish *Fugu pardalis*, and formation of the adducts of tetrodotoxin with thiols, *Chem. Res. Toxicol.* 18, 865-871 (2005).
- 3) Raphael Ritson-Williams, Mari Yotsu-Yamashita, and Valerie Paul, Ecological functions of tetrodotoxin in a deadly polyclad flatworm, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA,103 (9) 3176-3179 (2006).

- 4) Toshio Nakagawa, Junho Jang, and Mari Yotsu-Yamashita, Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs, *Anal. Biochem.*, *in press*.