

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	食中毒に関わる海洋天然物の生合成・蓄積・変換機構の解明と食品衛生への応用
研究機関・部局・職名	東北大学・大学院農学研究科・教授
氏名	山下 まり

【研究目的】

フグ毒、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、海藻毒を中心に海洋天然毒の起源生物、生合成、蓄積、変換機能を解明し、食品衛生へ応用する。

(1) フグ毒テトロドトキシン(TTX)の生合成・蓄積・変換に関する研究

フグがフグ毒を生産しないことは、人工孵化させたクサフグは毒を持たないことから証明された。一方、細菌による TTX 生産が報告され、細菌から直接あるいは食物連鎖を介して間接的にフグに毒が移行すると考えられた。しかし、それ以上の発展には至っていない。そこで、本研究では下記のアプローチにより TTX の生合成、変換機構、および蓄積機構の解明を行う。

- 1) 新規抗 TTX 抗体を作製し、これを用いて TTX 生産微小生物のスクリーニングを行う。
- 2) 新規 TTX 天然類縁体を探索し、その化学構造からの生合成、変換機構を推定する。
- 3) フグに存在する TTX とサキシトキシン (STX) に結合するタンパク質のフグ組織内分布を調べ、フグの毒の蓄積機構を推定する。
- 4) メタゲノム的アプローチによる生合成、変換反応の追求に挑戦する。

(2) 麻痺性貝毒サキシトキシン(STX)類の生合成・蓄積・変換に関する研究

麻痺性貝毒の生合成研究は、オーストラリアの Neilan らにより、淡水産の藍藻及び海産渦鞭毛藻の毒生産に関わると思われる遺伝子が報告された (2011 年)。しかし、遺伝子にコードされていた酵素群から生合成経路は予測されても、生合成中間体の化学的同定はなされていなかった。また、日本産の有毒、無毒の藍藻、渦鞭毛藻の STX 生合成遺伝子については報告がまだない。そこで本研究では、下記アプローチによりこれらの解決を目指す。

- 1) 高感度 LC-MS/MS や蛍光 LC 分析による STX 類の分析方法を開発し、毒生産渦鞭毛藻の細胞 1 個の分析や変換反応について追求する。
- 2) 生合成中間体の化学合成 (標品調製) と有毒渦鞭毛藻、藍藻中での存在の証明：
遺伝子から予測された生合成経路では、アルギニンから誘導された数種の間体が示唆されたが、標品がないため同定されていない。その中間体を化学合成して標品とし、有毒藍藻、渦鞭毛藻に存在するのかどうかを調べる。また、合成生合成中間体で *in vivo* 変換反応を試み、産物を同定する。

3) 日本産の有毒、無毒、渦鞭毛藻および藍藻の STX 類生合成遺伝子の解明：

日本産の有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* およびその無毒株とオーストラリア産の有毒藍藻 *Anabaena circinalis* および日本の同種の無毒藍藻 4 株を有するので培養し、その STX 生合成遺伝子の有無、配列の違いを明らかにする。

(3) 下痢性貝毒の蓄積・変換に関する研究

下痢性貝毒、特にオカダ酸に限れば、プランクトンによる生合成経路はほぼ明らかになっている。また、海綿よりオカダ酸結合蛋白質が発見されている。一方、ホタテ貝中腸腺では、オカダ酸は 7 位エステルとして存在するケースが多いが、毒結合蛋白質はまだ見つかっていない。そこで、エステル化に関する酵素を調べ、二枚貝中の下痢性貝毒の蓄積、弱毒化変換機構を追求する。

(4) オゴノリの新規エイコサノイドの単離、構造決定と致死毒ポリカバノシド類生産藍藻の同定

食用の紅藻オゴノリによる致死性の食中毒は、太平洋地域で発生しており、グアムとフィリピンでの事件では、配糖体マクロリドのポリカバノシド類を同定した。しかし、日本国内での事件では、オゴノリからプロスタグランジン (PG) 類が同定された。最近、オゴノリの PG 合成酵素シクロオキシゲナーゼ (COX) の cDNA が解明され、動物と高い相同性が示された。本研究では、オゴノリより新規 PG 代謝物を発見したので構造決定し、存在意義を解明する。また、2002 年にフィリピンでポリカバノシド類による致死性オゴノリ中毒が発生し、その際に採集した藍藻を有するので、毒の起源生物を解明する。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① **総合所見**

本研究課題はフグ毒、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、海藻毒を中心に海洋天然毒の起源生物、生合成、蓄積、変換機能を解明し、食品衛生に応用しようとするものである。当初は東日本大震災の影響で一部研究に遅れの見られる部分があったが、その後順調に計画が進行した。高度に発達した化学分析技術を駆使して、テトロドトキシン (TTX) 中間体や新規プロスタグランジン (PG) の発見など、天然物化学の立場からはいくつもの有益な知見が得られ、所期の目的は達成が期待できたと評価できる。海洋環境も日々 (悪い方に) 変化しつつあり、これまでの生態系では起こり得なかったような新しい生物の接触により思わぬ毒がもたらされる可能性があるが、本研究課題は、一步先を予測できる筋道をもたらし、あらゆる人や家畜などにとって、生活の質を向上させるため、継続すべき活動といえる。

今後本研究課題を応用につなげるには生化学との連携が有用である。海産毒に限らず現在の天然物生合成研究においては、化学的アプローチだけでなく、生化学、分子生物学、ゲノム科学、インフォマティクス等の総合的アプローチが有効かつ必須であることを念頭に、研究体制を強化する等、更なる発展を期待する。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

被災にもかかわらず、目的に対し明確な意識をもって研究を進め、フグ毒、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、海藻毒のいずれの課題においても、計画に沿って目標が達成されている。イモリから類縁体を単離構造決定することで TTX の推定生合成経路に新たな知見を加えていること、また、TTX 生産細菌スクリーニングとサキシトキシン (STX) 生合成遺伝子解析で一部計画変更があるが、STX 生合成予想中間体を合成して藻類に存在を確認することで生合成経路を裏付けるなど、化学的には秀逸な成果を得ている。また、TTX 生産細菌のスクリーニングでは、TTX 認識抗体を用いる LC/MS 分析から B-V monooxygenase コンセンサス配列によるメタゲノム的スクリーニングへシフトし、数種の環状ケトンを経質として活性を証明している。その後も、麻痺性貝毒については、生合成中間体の化学合成 (標品調製) と有毒微小生物中での存在の証明、及び日本産の有毒、無毒、藍藻および渦鞭毛藻の STX 類生合成遺伝子の解明で成果を上げた。下痢性貝毒については、オカダ酸の 7 位の水酸基のアシル化反応が二枚貝で起こることを初めて証明し、至適条件とともに発表した。海藻毒については致死毒ポリカバノシド類生産藍藻と思われる藍藻を 16SrRNA の配列で確定できた。以上のように当初の目標を十分に達成している。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が

(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が

(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

TTX 認識抗体の作製、新規 TTX 類縁体の発見、STX 類縁体分析法の開発、STX 生合成中間体の同定、有毒無毒藍藻渦鞭毛藻類における STX 生合成遺伝子の解析、0A 7 位アシル化酵素の分布組織解析、ポリカバノシド生産藍藻の同定、などの成果は雑誌や会議等で公表、あるいは公表予定であり、海産毒研究としてのみならず天然物化学全般の中でも先進性・有意性が認められる。「これまでに、全く知られてなかった毒を見つける」などといった、特定分野の突出は認められないが、食物・食品として口に入りうる、生物由来の毒の解明と対策について、極めて着実に成果を挙げた。

抗体を用いて TTX 生産微小生物をスクリーニングし、その生物を材料に生合成経路を分子レベルで解明するという試みや、オゴノリを材料にして植物における PG 生合成経路

の知見を得ることは魅力的な計画であった。前者はポジティブな結果が得られなかったためにイモリを用いた化学的解析に方針が変更された。有毒イモリから単離同定した TTX 類縁体の一種は、従来考えられていた生合成経路とは異なる新規な経路の存在を示唆するものであり、関与する数種の生合成酵素が予測されることから、これを端緒として TTX 生合成全貌の解明が大きく進展するものと期待される。この点は、卓越した化学の能力を有する補助事業者の実力が発揮されていると評価される。後者は他の研究者によって COX 遺伝子が単離されたことは残念であったが、天然物化学は生化学や分子生物学と補完的に研究を進めることで大きな飛躍を遂げることができることにも理解を示す柔軟さを求めたい。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

有毒イモリから単離同定した TTX 類縁体の構造は、数種の新規生合成酵素を含む生合成経路を示唆するものであり、広くテルペノイド由来含窒素複素環生合成機構の解明に寄与するものと思われる。また、オカダ酸低毒化アシル化酵素を見出し、毒性軽減を考案する端緒を開いた。今回の補助事業では十分な成果を挙げるに至っていないが、TTX 抗体は将来的に有用性が期待される。

本研究課題の成果は、いずれも海洋生物の毒化軽減、毒化予測、低毒化、に直接応用可能なものであり、食品衛生上、また水産業にも貢献するものである。研究計画書に想定しているように海洋生物由来の毒の生合成や低毒化に関わる情報が整備されれば、生産や消費の現場において毒性を抑えるための方策の考案が可能となるであろう。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

東日本大震災の影響は小さくなかったと想像するが、研究代表者がリーダーシップを発揮し研究チーム全体でそれを克服する努力がなされたことに敬意を表す。震災の影響もあつてか一部研究に遅れの見られる部分があつたが、その後順調に計画が進行した。TTX 生産細菌スクリーニングや STX 生合成遺伝子の解析で予定の変更があるが、いずれも妥当な変更であり、助成金の使用、指摘事項への対応にも特に問題は見られない。一方で、研究目的の達成に向けて、化学的なアプローチが適切に進められてきたことに比べて、生化学的、分子生物学的アプローチは十分であったとは言い難い。人材が見つからずに PD は雇用していないようであるが、早い段階で適切な人材を研究チームに迎えていたら、幅広く研究の進展を図ることができたと思われる。今後は、分子生物学的アプローチがさらに重要になるため、関係協力研究者との綿密な情報交換や議論が可能となるような研究実施体制の確立とマネジメントに注力して更なる発展を期待したい。

雑誌 26 件、会議 64 件、と順調に公表発信されている。

高校生対象の対話の他、地方新聞コラムにおいて研究紹介コラムを執筆している。本研究課題は消費者、自由漁者に対する啓発が、研究そのものと同様に非常に重要であり、その意義を十分に果たしている。