

## フグ目魚類におけるトリブチルスズ結合タンパク質 の異物結合性と進化に関する研究

三木, 志津帆

<https://hdl.handle.net/2324/1398418>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名・(本籍・国籍)	み き しづほ 三 木 志津帆 (大阪府)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第715号
学位授与の日付	平成25年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	フグ目魚類におけるトリブチルスズ結合タンパク質の異物結合性と進化に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 大 嶋 雄 治 (副査) 教授 日下部 宣 宏 准教授 望 岡 典 隆

## 論 文 内 容 の 要 旨

船底等の防汚剤として大量に使用されたトリブチルスズ (tributyltin, TBT) は、水生生物に対して極めて強い内分泌攪乱作用と高い蓄積性を示し、現在も海洋環境を汚染している。TBT は魚類の血液に高濃度で蓄積するが、この機構として、魚類血液中に存在する TBT 結合タンパク質 (TBT-binding proteins, TBT-bps) の寄与が報告された。一方フグ目魚類では、フグ毒結合タンパク質 (pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin- binding proteins, PSTBPs) の存在が知られており、PSTBPs は TBT-bp2 が 2 回繰り返した塩基配列を持つことから、PSTBPs も TBT 蓄積へ寄与することが予想された。本博士論文ではこれらの点に着目し、広範囲の魚種について TBT の血液中濃度を調べた。また、TBT の血液蓄積に対する TBT-bp1 および PSTBP1 の寄与を、トラフグ (*Takifugu rubripes*) への TBT 投与試験で検討した。さらに、トラフグ属魚類を中心に TBT-bps および PSTBPs 遺伝子群の探索を行い、その分子系統を解析した。

はじめに、フグ目魚類を含む魚類 13 種、63 個体から血液、肝臓、筋肉を採取し、TBT の濃度を調べた。その結果、フグ目魚類 6 種の血液中に TBT が最も高濃度で蓄積していた。また他の魚種でも 7 魚種中 5 魚種で血液中の TBT 濃度が最も高かった。また、TBT の血液中濃度の周年変動をコモンフグ (*T. poecilonotus*) で調べたが、明確な季節性はなく、TBT およびフグ毒 (tetrodotoxin, TTX) の血液中濃度との間に関連は認められなかった。

魚類血液中における TBT 蓄積への PSTBPs の寄与を調べるため、トラフグに TBT を 1 mg /kg 魚体重の用量で腹腔内投与した。また TBT と TTX との血液蓄積における競合等相互作用が予想されたため、TTX も 1 mg /kg 魚体重の用量で単独もしくは TBT とともに複合投与した。投与の結果、血清中の TBT 濃度はコントロール区に比べて有意に上昇しその蓄積性を確認した。さらに、硫酸塩析およびゲルろ過カラムクロマトグラフィを用いてトラフグ血清から Trub.TBT-bp1 および Trub.PSTBP1 を分離し、そのタンパク質あたりの TBT 濃度を比較した。その結果、Trub.PSTBP1 において Trub.TBT-bp1 と同等もしくは高い濃度の TBT が検出されたことから、Trub.PSTBP1 も TBT の蓄積に寄与していることが示唆された。一方、Trub.TBT-bp1 および Trub.PSTBP1 から TTX は検出されず、TBT との相互作用も認められなかった。トラフグは投与前に既に海水または餌料由来と考えられる TBT に汚染されていたため、TBT の血液蓄積における両タンパク質の寄与度を明確にすることはできなかった。TBT に汚染されていない供試魚の入手は困難であり、より詳細に結合特性を解析するためには TBT や TTX を含まない組み換え体タンパク質が必要であると考察した。

次にトラフグの PSTBP1 の組み換え体 (rPSTBP1) を調整し、TBT および TTX との結合性を調べ

た。その結果、rPSTBP1 は TBT と結合し、PSTBP1 が TBT の蓄積に寄与していることが示唆された。一方、rPSTBP1 は TTX と結合せず、投与試験の結果と一致した。rPSTBP1 が TBT との結合性を示したことから、異物と結合して、その運搬や毒性の緩和等の機能をもつことが推定された。

さらにフグ目魚類を中心に、11 魚種における TBT-bps および PSTBPs 発現遺伝子の探索を行った。その結果、PSTBP1 および PSTBP2 はトラフグ属魚類にのみ発現が確認されたことから、魚類における祖先型 TBT-bp は、スズキ目魚類で TBT-bp1 と TBT-bp2 に分岐した後、トラフグ属魚類で TBT-bp2 が 2 回繰り返した塩基配列を持つ PSTBP1 および PSTBP2 に進化したと考えられた。

本研究の結果から、魚類血液中には TBT が高濃度で蓄積するが、トラフグ属魚類では TBT-bps だけでなく PSTBP1 も TBT の血液蓄積に寄与していることが明らかとなった。また、魚類における祖先型 TBT-bp は、異物結合機能を維持しながらトラフグ属魚類で PSTBP1 に進化したと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、強い内分泌かく乱化学物質であるトリブチルスズ(TBT)とトラフグ (*Takifugu rubripes*) の血液中で結合する TBT 結合タンパク質 (tributyltin binding protein 1, Trub.TBT-bp1) およびそのホモログであるフグ毒結合タンパク質 (pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin-binding protein 1, Trub.PSTBP1) について、それらの TBT 蓄積への寄与と進化を解析したものである。

まず、フグ目を含む魚類 13 種から血液、肝臓および筋肉を採取し、TBT の濃度を調べた。その結果、フグ目魚類 6 種全てにおいて TBT が血液に最も高濃度で存在することを示した。また他の魚種でも 7 魚種中 5 魚種で血液中の TBT 濃度が最も高いことを明らかにした。

次に、フグ目魚類血液中の TBT 蓄積に対する PSTBP1 の寄与を検証するため、トラフグに TBT を 1 mg/kg 魚体重の用量で腹腔内投与し、得られた血漿から硫酸塩析およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより Trub.TBT-bp1 および Trub.PSTBP1 を分離後、タンパク質あたりの TBT 濃度を比較した。その結果、Trub.PSTBP1 から Trub.TBT-bp1 と同等もしくはより高濃度の TBT を検出し、Trub.PSTBP1 も TBT の蓄積に寄与していることを示した。一方、TBT の血液蓄積においてテトロドトキシン (TTX) との競合が予想されたため、TTX を 1 mg/kg 魚体重の用量で腹腔内に単独もしくは TBT とともに複合投与したが、Trub.TBT-bp1 および Trub.PSTBP1 への TTX の結合は検出されず、TTX は TBT との結合に影響を与えなかったとしている。

さらに、より詳細に PSTBP1 への TBT または TTX との結合性を調べるため、Trub.PSTBP1 の組み換え体 (rPSTBP1) を調製し、TBT および TTX との結合性を、蛍光プローブを用いた競合結合法および限外ろ過法により調べた。その結果、rPSTBP1 は TBT と結合したが TTX とは結合せず、投与試験の結果と一致した。rPSTBP1 が TBT との結合性を示したことから、PSTBP1 は異物と結合して、その輸送や毒性の緩和等の機能を持つと推定している。

最後に、魚類 TBT-bps の分子進化を解明するため、フグ目魚類を中心に 11 魚種の肝臓を用いて TBT-bps および PSTBPs の発現解析および分子系統樹解析を行った。その結果、ヒガンフグを除く 4 種のトラフグ属魚類にのみ PSTBP1 とそのホモログである PSTBP2 の発現を確認した。系統樹解析の結果、魚類における祖先型 TBT-bp は、スズキ目魚類で TBT-bp1 と TBT-bp2 に分岐した後、トラフグ属魚類で TBT-bp2 が 2 回繰り返した塩基配列を持つ PSTBP1 および PSTBP2 に進化したと考察した。

以上要するに、本論文は、トラフグ属魚類において TBT-bp1 とともに PSTBP1 も TBT の血液蓄積に寄与しており、魚類における祖先型 TBT-bp は、遺伝子重複を繰り返しながら進化したことを示した。特にトラフグでは、5 種のホモログを有し、異物結合性を保持しながら PSTBP1 に進化したことを明らかにしたものであり、水産生物環境学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、

本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。