

課題番号	LS012
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

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

1. 当該年度の研究目的

本研究では、フグ毒、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、海藻毒など、食中毒に関与す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を目的としている。フグ毒に関しては、本年度も引き続き、イモリ、フグなどの有毒生物より、本予算で購入した高性能の Q-TOF LC-MS/MS システムと、独自で開発した手法を用いて、さらに詳細に微量の類縁体をスクリーニングし、単離、構造決定し、その構造より生合成経路に関与する酵素を推定する。前年度までに、イモリより得られた類縁体の構造から、フグ毒の生合成の最終段階で特定の酸化酵素の関与が示唆された。このことから、本年度はメタゲノム的手法を用いて本酵素の遺伝子も環境中より探索する。麻痺性貝毒では、近年、藍藻、渦鞭毛藻の生合成遺伝子クラスターおよび相同遺伝子が相次いで発表されたが、その遺伝子配列より推定された生合成中間体は化学的に同定はなされていない。本研究では、麻痺性貝毒類縁体をつくる藍藻および渦鞭毛藻を培養し、生合成中間体の化学合成を行い、データを蓄積してきた。本年度は、さらに未知の生合成中間体の探索と化学合成を行い、麻痺性貝毒類縁体を生産する生物に存在するのかどうかを調べる。下痢性貝毒では、オカダ酸類縁体の定量への応用を目指して、各種オカダ酸誘導体の海綿由来のオカダ酸結合タンパク質への結合の強さを調べて、構造活性相関について情報を得ることを目的とする。海藻由来の致死毒ポリカバノシド A については、致死性食中毒が発生時の検体を入手できたため、海藻および付着物を分析し、致死性中毒発生時の海藻の毒量を明らかにし、さらなる毒生産微生物の追求を行う。

2. 研究の実施状況

(1) フグ毒: 本研究費で購入した ESI-Q-TOFMS を用いてテトロドトキシン(TTX)を含有する海洋生物のフグ、巻貝、タコ、ヒラムシなどを調べた。その結果、新規類縁体として 6-deoxyTTX を単離、構造決定した。また、培養神経細胞を用いて、6-deoxyTTX の電位依存性 Na⁺チャネル阻害活性を調べて他の類縁体と比較した結果、6 位よりも 11 位のヒドロキシ基が Na⁺チャネル阻害活性に重要であることがわかった(論文掲載済:論文番号 2)。また、西川、磯部らが合成した標品を用いて、フグ、ヒラムシより新規 TTX 類縁体 5,11-dideoxyTTX を LC-MS で同定し、論文発表した(論文番号 8)。これらの類縁体の構造から海洋生物では、段階的な酸化を経て TTX が生合成されることを推定した。さらに、イモリより予想されなかった構造を有する重要 TTX 類縁体を単離、構造決定し、天然有機化合物討論会で口頭発表し

様式19 別紙1

た。その構造から予想された特定酸化酵素について、土壌メタゲノムよりスクリーニングを行なってクローニングに成功し、多様な未知の関連酵素が存在することが示唆された。

- (2) 麻痺性貝毒(PSP): 有毒渦鞭毛藻に各種酵素阻害剤を添加した場合の毒生産性について明らかにし、論文発表した(論文番号3)。また、Neilanらにより発見されたPSPの生合成遺伝子配列を基に推定された重要生合成中間体3種を化学合成し、2種をPSP生産生物よりLC-Q-TOFMSを用いて初めて同定し、論文発表した(論文番号1)。さらに、もう1成分を合成し、生産生物に存在することを示した。
- (3) 下痢性貝毒: オカダ酸の各類縁体を誘導し、蛍光ラベル体を含めてオカダ酸結合タンパク質との結合に関する構造活性相関を明らかにし、定量法への応用性が示され、論文発表した(論文番号6)。
- (4) 海藻毒、藍藻毒: 致死性中毒発生時の海藻のポリカバノシドAの含量が最高でも700 ng/g程度であり、ヒトの経口毒性が極めて高いことが示された。また、洗浄海藻にも毒が残ることが示された。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計11件
計12件	<ol style="list-style-type: none"> 1) Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima and <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Synthesis and identification of proposed biosynthetic intermediates of saxitoxin in the cyanobacterium <i>Anabaena circinalis</i> (TA04) and the dinoflagellate <i>Alexandrium tamarense</i> (Axat-2), <i>Org. Biomol. Chem.</i> 12, 3016-3020, 2014. 2) Yuta Kudo, Julian Finn, Kohei Fukushima, Satsuki Sakugawa, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Isolation of 6-deoxytetrodotoxin from the pufferfish, <i>takifugu pardalis</i>, and a comparison of the effects of the C-6 and C-11 hydroxy groups of tetrodotoxin on its activity, <i>J. Nat. Prod.</i>, 77, 1000-1004, 2014. 3) Yuko Cho, Motoo Ogawa, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, and Yasukatsu Oshima, Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine on toxin production and cell cycle regulation in marine dinoflagellate, <i>Alexandrium tamarense</i>, <i>Harmful Algae</i>, 32, 64-72, 2014. 4) Atsuo Nakazaki, Yuki Ishikawa, Yusuke Sawayama, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Toshio Nishikawa, Synthesis of crambescic acid, a potent inhibitor of voltage-gated sodium channels, <i>Org. Biomol. Chem.</i>, 12, 53-56, 2014. 5) Yoshihisa Tanaka, Masayuki Satake, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, and Yasukatsu Oshima, Gymnocin-A carboxylic acid and gymnocin-a2, cytotoxic polyethers from the red tide dinoflagellate <i>Karenia mikimotoi</i>, <i>Heterocycles</i>, 87 (10), 2037-2046, 2013. 6) Keiichi Konoki, Tatsuya Onoda, Sachie Furumochi, Yuko Cho, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Takeshi Yasumoto, The binding of okadaic acid analogues to recombinant OABP2.1 originally isolated from the marine sponge <i>Halichondria okadai</i>, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>, 23, 5833-5835, 2013. 7) Takafumi Akimoto, Asako Masuda, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Takatsugu Hirokawa, and Kazuo, Nagasawa, Synthesis of saxitoxin derivatives bearing guanidine and urea groups at C13 and evaluation of their inhibitory activity on voltage-gated sodium channel. <i>Org. Biomol. Chem.</i>, 11, 6642-6649, 2013. 8) <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Yuka Abe, Yuta Kudo, Raphael Ritson-Williams, Valerie J. Paul, Keiichi Konoki, Yuko Cho, Masaatsu Adachi, Takuya Imazu, Toshio Nishikawa, and Minoru Isobe. First identification of 5,11-dideoxytetrodotoxin in marine animals, and characterization of major fragment ions of tetrodotoxin and its analogs by high resolution ESI-MS/MS. <i>Marine Drugs</i>, 11, 2799-2813, 2013. (Open access: http://www.mdpi.com/1660-3397/11/8/2799/) 9) <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Natsumi Okoshi, Kouichi Watanabe, Nao Araki, Hiroe Yamaki, Yuki Shoji, and Takahiro Terakawa, Localization of pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein (PSTBP) in the tissues of the pufferfish, <i>Takifugu pardalis</i>, analyzed by immunohistochemical staining, <i>Toxicon</i>, 72, 23-28, 2013. 10) Haruhiko Fuwa, Masato Kawakami, Kenkichi Noto, akashi Muto, Yuto Suga, Keiichi Konoki, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Makoto Sasaki, Concise Synthesis and Biological Assessment of (+)-Neopeltolide and a 16-Member Stereoisomer Library of 8,9-Dehydroneopeltolide: Identification of Pharmacophoric Elements, <i>Chem. Eur. J.</i>, 19, 8100-8110, 2013. 11) Kazuya Ishigai, Haruhiko Fuwa, Keisuke Hashizume, Ryo Fukazawa, Yuko Cho, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, and Makoto Sasaki, Total Synthesis and Biological Evaluation of (+)-Gambieric Acid A and Its Analogues, <i>Chem. Eur. J.</i>, 19, 5276-5288, 2013.

様式19 別紙1

	<p>(掲載済み－査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載－査読有り) 計 1 件</p> <p>1) Mori, Tadashi; HIDAKA, Masafumi; Ikuji, Hiroko; Yoshizawa, Ibuki; TOYOHARA, Haruhiko; Okuda, Toru; Uchida, Chiyoko; Asano, Tomoichiro; <u>Yotsu-YAMASHITA, Mari</u>; UCHIDA, Takafumi, A High-Throughput Screen for Inhibitors of the Prolyl Isomerase, Pin1, Identifies a Seaweed Polyphenol that Reduces Adipose Cell Differentiation, <i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i>, accepted (5th March, 2014).</p>
<p>会議発表 計 22 件</p>	<p>専門家向け 計 22 件</p> <p>1) 工藤 佑馬、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一、イチイ <i>Taxus cuspidata</i>由来α、βチューブリンの発現とタキソール結合性の評価、口頭、日本農芸化学会2014年度大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県)、2014年3月27-30日</p> <p>2) 工藤 雄大、山下 瑤子、此木 敬一、長 由扶子、安元 健、山下 まり、口頭、10-hemiketal型テトロドトキシン類縁体の構造決定と生合成経路の考察 (同上)</p> <p>3) 前田 高輔、田谷 有妃、大水 絵理、Mirriam A. Cayme、長 由扶子、此木 敬一、Sherwood Hall、福代 康夫、安元 健、山下 まり、口頭、致死性海藻食中毒原因物質ポリカバノシドAの起源生物の推定 (同上)</p> <p>4) 此木 敬一、古用 幸愛、小野田 竜也、長 由扶子、山下 まり、口頭、ホタテ貝中で進行する下痢性貝毒オカダ酸のアシル化反応 (同上)</p> <p>5) 山下 瑤子、山下 まり、工藤 雄大、長 由扶子、此木 敬一、口頭、メタゲノムからの 新規 Baeyer-Villiger monooxygenaseのスクリーニング (同上)</p> <p>6) 土屋成輝、長由扶子、吉岡廉平、此木敬一、長澤和夫、大島泰克、山下まり、口頭、麻痺性貝毒の生合成中間体の定量及び未知中間体について (同上)</p> <p>7) 長由扶子、吉岡廉平、土屋成輝、此木敬一、大島泰克、山下まり、口頭、渦鞭毛藻<i>Alexandrium tamarense</i>有毒株のdcSTX-12α-olの同定、平成26年度日本水産学会春季大会、北海道大学函館キャンパス、2014年3月27-31日</p> <p>8) 前田高輔、山下まり、此木敬一、長由扶子、Sherwood Hall、安元健、グアムの致死性食中毒発生時に採集されたカタオゴノリのポリカバノシドAの分析 (同上)</p> <p>9) Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, Synthesis of putative biosynthetic intermediates in early stage for paralytic shellfish toxins, and their identification in toxin producing microorganisms, Tohoku University's Chemistry Summer School, 2013.8.29-30 (poster).</p> <p>10) Yuko Cho, Shigeki Tsuchiya, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, 5-Fluoro-2'-deoxyuridine influenced the growth and the biosynthesis of intermediates for paralytic shellfish toxins of the dinoflagellate, <i>Alexandrium tamarense</i>, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch Chemical Society of Japan, Tohoku University Kawauchi Campus, 2013.9.28-29 (poster).</p> <p>11) Tsuchiya Shigekia, Cho Yukoa, Konoki Keiichia, Nagasawa Kazuob, Oshima Yasukatsua, Yotsu-Yamashita Mari, Synthesis and identification of putative biosynthetic intermediates in early stage for paralytic shellfish toxins (poster) (Same as above).</p> <p>12) Mari Yotsu-Yamashita, Yuka Abe, Yuta Kudo, Keiichi Konoki, Yuko Cho, Toshio Nishikawa and Minoru Isobe, Identification of 5,11-dideoxytetrodotoxin in marine animals, and ccharacterization of ESI-MS fragment ions of tetrodotoxin and its analogs (poster) (Same as above).</p> <p>13) Yuta Kudo, Keiichi Konoki, Yuko Cho, and Mari Yotsu-Yamashita, The structure of the novel tetrodotoxin analog, 6-deoxytetrodotoxin, and structure activity relationship study on C-6 and C-11 hydroxyl groups of tetrodotoxin, (poster) (Same as above).</p> <p>14) 岡田華弥・小野田竜也・長由扶子・山下まり・此木敬一、オカダ酸貯蔵生物が獲得した生理機能、第8回化学生態学研究会、2013年6月28-29日、函館、湯の川プリンスホテル渚亭, poster.</p> <p>15) 工藤雄大、山下瑤子、此木敬一、長由扶子、安元健、山下まり、新規テトロドトキシン類縁体の構造と生合成経路の推定、口頭、第55回天然有機化合物討論会、同志社大学寒梅館、京都市、2013年9月18-20日。</p> <p>16) 吉岡廉平、土屋成輝、長由扶子、此木敬一、大島泰克、山下まり、麻痺性貝毒の生合成中間体の探索、口頭、日本農芸化学会東北支部第148回大会、2013年10月26日 岩手大学農学部 盛岡市</p> <p>17) 上野 美紗、野村 駿、此木 敬一、長 由扶子、山下 まり、抗フコキサンチンポリクローナル抗体の作製、口頭、(同上)</p> <p>18) 千葉雪絵、長由扶子、安立昌篤、榊原良、所聖太、今津拓也、磯部稔、西川俊夫、山下まり、此木敬一、Nav 安定発現系の構築と TTX 関連化合物の結合性評価、口頭、(同上)</p>

様式19 別紙1

	<p>19) Yuta Kudo, Keiichi Konoki, Yuko Cho, and Mari Yotsu-Yamashita, Isolation and structural determination of a novel tetrodotoxin analog, 6-deoxyTTX, and its voltage-gated sodium channel blocking activity, poster, American Society of Pharmacognosy 2013 annual meeting, 13th-15th, July, 2013, St. Louis, USA.</p> <p>20) 廣田一晃、菅悠人、此木敬一、山下まり、不破春彦、佐々木誠、光親和性標識基を導入したガンビエロール単純化類縁体の合成と生物活性評価、口頭、日本化学会第 94 春季年会(2014)、2014年3月27-30日、名古屋大学 東山キャンパス</p> <p>21) 山下まり、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、FIRSTシンポジウム「科学技術が拓く 2030 年」へのシナリオ、ポスター、2014年2月28日、新宿、ベルサール新宿グランド内コンファレンスセンター</p> <p>22) T. Nishikawa, M. Adachi, R. Sakakibara, T. Imazu, Y. Satake, S. Tokoro, A. Nakazaki, Y. Ishikawa, Y. Sawayama, M. Isobe, K. Konoki, M. Yamashita, Synthesis of Marine Toxins Aiming at Developing Ion-Channel Inhibitors ChemBioChem international symposium 2013.10.28-29.poster</p> <p>一般向け 計0件</p>
図書 計2件	<p>1) 工藤雄大、山下瑤子、此木敬一、長由扶子、安元健、<u>山下まり</u>、新規テトロドトキシン類縁体の構造と生合成経路の推定、p169-174、第55回天然有機化合物討論会要旨集、発行人 入江一浩、2013、総頁637.</p> <p>2) M. Carmen Louzao, Natalia Vilarino, and <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Polycavernosides and Other Scarce New Toxins, pp 857-284, in Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Third Edition, Edited by Luis M. Botana, total 1198 page, 2014, CRC Press, Taylor & Francis group, total 1198 pages, ISBN: 976-1-4665-054-8.</p>
産業財産権 出願・取得状況 計0件	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	<p>東北大学大学院農学研究科・生物産業創成科学専攻・天然物生物機能科学講座 天然物生命化学分野ホームページ http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.html</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>1) 2013年7月30-31日、東北大学大学院農学研究科、オープンキャンパス、高校生および一般参加者(総数2,200人)、本研究の成果について説明した。(標題: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)</p> <p>2) 2013年5月24日、出前授業:福島県成蹊高校理科講演会、標題:海洋生物毒の謎を探る、350名</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	<p>河北新報、科学の泉、6回連載、2013年8月20日-25日、海洋生物の毒</p>
その他	<p>なし</p>

4. その他特記事項

なし

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	79,000,000	70,000,000	9,000,000	0	0
間接経費	23,700,000	21,000,000	2,700,000	0	0
合計	102,700,000	91,000,000	11,700,000	0	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	2,914,035	9,000,000	0	11,914,035	11,914,035	0	0
間接経費	8,677,736	2,700,000	0	11,377,736	11,377,736	0	0
合計	11,591,771	11,700,000	0	23,291,771	23,291,771	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	10,733,740	クロマトグラフ、高速冷却遠心機、実験試薬、実験器具等
旅費	155,240	研究成果発表・情報収集旅費(京都)等
謝金・人件費等	0	
その他	1,025,055	送料、実験機器修理費、論文校正・投稿費等
直接経費計	11,914,035	
間接経費計	11,377,736	
合計	23,291,771	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
日立高速液体クロマト グラフ	5430形ダイオードア レイ検出器	1	1,627,500	1,627,500	2013/7/9	東北大学
高速冷却遠心機	日立工機株式会社製 CR21N	1	1,680,000	1,680,000	2014/1/24	東北大学
				0		