

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24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、藍藻毒など、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。本年度は、イモリ、フグなどの有毒生物より、前年度に購入した高性能の 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、構造決定する。その構造より、生合成経路に関与する酵素を推定し、その酵素反応を実際に行って生合成機構解明に迫る。また、前年度までに、独自の方法でテトロドトキシンのポリクローナル抗体は作製できたが、特異性をさらに上げる必要がある。このことから、さらなる誘導化の検討を試みる。麻痺性貝毒では、前年度に藍藻、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は同定はなされていない。これまで、麻痺性貝毒類縁体をつくる藍藻および渦鞭毛藻を手に入れ、培養できた。また、前年度より生合成中間体の化学合成を進めている。本年度は、それを完成させて、LC/MS を用いて実際に毒を生産する生物にこれらの中間体が存在するかどうかを調べることを目的とする。下痢性貝毒では、貝が下痢性貝毒を蓄積する場合に、毒性を軽減する機構があると考えられた。オカダ酸の 7 位がアシル化されると、オカダ酸の毒性が軽減される。下痢性貝毒を蓄積するホタテ貝に、オカダ酸の 7 位をアシル化する活性があることの詳細な証明、またその活性本体の物質的な特徴や反応の至適条件などを明らかにする。海藻毒については、海藻由来の致死毒ポリカバノシドと、発ガンプロモーター活性を有し、海藻中毒や皮膚炎原因物質である、アプリシアトキシシ、リングビアドキシシを生産する藍藻について同定することを目指す。

様式19 別紙1

2. 研究の実施状況

- (1) フグ毒: 本研究費で購入したESI-Q-TOFMSを多用して、テトロドトキシン(TTX)を含有する海洋生物および陸上の両生類のイモリ中の TTX 生合成中間体を精査した。その結果、海洋生物に共通して存在する新規 TTX 類縁体 2 種を発見し、単離、構造決定した。その構造から海洋生物では、デオキシ類縁体より2つ以上のルートで段階的酸化を経て TTX が生合成されることが示唆された。また、イモリから、極めて重要な生合成中間体を発見し、単離、構造決定に成功した。予想外の構造をもち、明らかに特定の酵素の関与を示唆した。この結果から、この酵素を指標にした生産微生物のスクリーニングが可能になった。この化合物は世界各地の有毒イモリに含まれ、無毒イモリには存在せず、TTX の重要中間体であることが裏付けられた。一方、フグがフグ毒や麻痺性貝毒を蓄積する機構の研究として、pufferfish saxitoxin tetrodotoxin binding protein (PSTBP)の抗体を作製し、ヒガンフグの各組織中の分布を免疫組織染色で明らかにした(論文: *Toxicon* に投稿し、受理された)。PSTBP は皮膚の毒分泌腺周辺に存在し、毒の移動に関わると考えられた。抗 TTX 抗体作製では、より安定なハプテン作製に成功した。
- (2) 麻痺性貝毒(PSP): 有毒渦鞭毛藻 1 個の細胞で STX 類縁体を分析できる蛍光-HPLC 法を開発し論文発表した。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た (2012 年天然有機化合物討論会発表)。
- (3) 下痢性貝毒: オカダ酸の 7 位水酸基をアシル化する酵素活性が、ホタテガイなど二枚貝に存在することを証明し、論文発表した。
- (4) アプリシアトキシン、リングビアトキシン、ポリカバノシド類: LC-MS/MS と 16S rDNA の解析から生産微生物をほぼ同定した。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 6 件
計 8 件	<p>1) 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.</p> <p>2) Yuko Cho, Ryoko Ozeki, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, and Yasukatsu Oshima, Single-cell analysis of paralytic shellfish toxins in <i>Alexandrium tamarense</i> by HPLC with post-column fluorescent derivatization. <i>Harmful Algae</i>, 25, 47-53, 2013.</p> <p>3) Keiichi Konoki Tatsuya Onoda, Ryuichi Watanabe, Yuko Cho, Shinnosuke Kaga, Toshiyuki Suzuki, and <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, In vitro Acylation of Okadaic Acid in the Presence of Various Bivalves' Extracts. <i>Marine Drugs</i>, 11, 300-315, 2013 (Open access: <a href="http://www.mdpi.com/1660-3397/11/2/300">http://www.mdpi.com/1660-3397/11/2/300</a>).</p> <p>4) <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Sawako Kondo, Shinya Segawa, Yi-chin Lin, Haruhiko Toyohara, Hisatomi Ito, Keiichi Konoki, Yuko Cho and Takafumi Uchida, Isolation and Structural Determination of Two Novel Phlorotannins from the Brown Alga <i>Ecklonia kurome</i> Okamura, and Their Radical Scavenging Activities, <i>Marine Drugs</i>, 11, 165-183, 2013 (Open access: <a href="http://www.mdpi.com/1660-3397/11/1/165">http://www.mdpi.com/1660-3397/11/1/165</a>).</p> <p>5) Noriyoshi Teramoto, Hai-Lei Zhu, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Tetsuichiro Inai, Thomas C. Cunnane, Resurgent-like currents in mouse vas deferens myocytes are mediated by NaV1.6 voltage-gated sodium channels, <i>Pflügers Archiv - European Journal of Physiology</i>, 464, 493-502, 2012.</p> <p>6) Dietrich Mebs, <u>Mari Yotsu-Yamashita</u>, Hanns Martin Seitz, Osamu Arakawa, Tetrodotoxin does not protect red-spotted newts, <i>Notophthalmus viridescens</i>, from intestinal parasites. <i>Toxicon</i>, 60, 66-69, 2012.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載一査読有り) 計 2 件</p>

	<p>1) 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>, Article first published online: 19 APR 2013, DOI: 10.1002/chem.201300664</p> <p>2) <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>, accepted.</p>
<p>会議発表 計 21 件</p>	<p>専門家向け 計 21 件</p> <p>1) 土屋成輝、長由扶子、此木敬一、長澤和夫、山下まり、麻痺性貝毒生成中間体の合成と毒生産生物からの同定、第 23 回万有仙台シンポジウム、仙台市、2012.6.2、万有生命科学振興国際交流財団</p> <p>2) 工藤雄大、此木敬一、長由扶子、安元健、山下まり、沖縄産シリケンイモリ(<i>Cynops ensicauda popei</i>)の新規テトロドトキシン類縁体の単離・構造決定、及びイモリとフグの毒組成比較、第 7 回化学生態学研究会、函館市、2012.6.29-30、化学生態学研究会</p> <p>3) 工藤佑馬・松浦宏樹・長由扶子・山下まり・此木敬一、質量分析によるイチイ中のタキソール結合タンパク質の探索(同上)</p> <p>4) 此木敬一、小野田竜也、長由扶子、加賀新之助、渡邊龍一、鈴木敏之、山下まり、ホタテ貝中の下痢性貝毒変換酵素の探索、第 59 回毒素シンポジウム、帯広市、2012.8.30-8.31、毒素シンポジウム事務局</p> <p>5) 土屋成輝、長由扶子、此木敬一、長澤和夫、大島泰克、山下まり、麻痺性貝毒生成初期中間体の合成と毒生産生物からの同定、第 54 回天然有機化合物討論会、2012.9.18-20、東京農大、東京都、日本化学会、日本薬学会、日本農芸化学会</p> <p>6) 工藤雄大、此木敬一、長由扶子、山下まり、HILIC-ESI-TOF-MS を用いた TTX 類縁体の一斉分析法の確立日本農芸化学会東北支部 第 147 回大会 2012.10.6 弘前大学農学生命学部、弘前市、日本農芸化学会</p> <p>7) 武田篤、長由扶子、佐久川さつき、須田彰一郎、此木敬一、山下まり、沖縄県阿嘉島産リングビアトキシン生産藍藻の 16S rDNA の部分塩基配列解析(同上)</p> <p>8) 工藤佑馬・阿部晃大・長由扶子・山下まり・此木敬一、質量分析を用いたイチイ中のタキソール結合タンパク質の探索(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, 15th International Conference on Harmful Algae, 1st Nov, 2012, oral presentation, Oct29-Nov2, 2012, CECO, Gyeongnam, Korea</p> <p>10) Yuko Cho, Motoo Ogawa, Mari Yotsu-Yamashita and Yasukatsu Oshima, Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine on the cell proliferation and toxin production of <i>Alexandrium tamarense</i>, 15th International Conference on Harmful Algae, 1st Nov, 2012, poster presentation, Oct29-Nov2, 2012, CECO, Gyeongnam, Korea</p> <p>11) 瀬川 慎也、伊藤 久富、山下 まり、褐藻クロメ <i>Ecklonia kurome</i> の硫酸化フロロタンニンの単離と構造研究、口頭、日本農芸化学会 2013 年度大会.2013.3.25-27、仙台市、東北大学、日本農芸化学会</p> <p>12) 土屋 成輝、長 由扶子、此木敬一、長澤 和夫、大島 泰克、山下 まり、麻痺性貝毒生成初期中間体の合成と毒生産生物からの同定(同上)</p> <p>13) 長 由扶子、土屋 成輝、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり、5-Fluoro-2'-deoxyuridine の渦鞭毛藻 <i>Alexandrium tamarense</i> における麻痺性貝毒生成初期中間体合成に与える影響(同上)</p> <p>14) 工藤雄大、此木敬一、長由扶子、山下まり、新規テトロドトキシン類縁体 6-デオキシテトロドトキシンの単離・構造決定(同上)</p> <p>15) 生地紘子、森正、吉澤いぶき、林宣瑾、豊原治彦、奥田徹、内田千代子、山下まり、内田隆史、プロリン異性化酵素 Pin1 阻害剤のハイスループットスクリーニングによる、脂肪細胞分化抑制効果を有する海藻ポリフェノールの同定(同上)</p> <p>16) 小濱真実、岡田華弥、西谷豪、長由扶子、山下まり、此木敬一、クロイソカイメン中でオカダ酸およびオカダ酸結合タンパク質 OABP2 を生産する生物の探索(同上)</p> <p>17) 小野田竜也、渡邊龍一、長由扶子、加賀新之助、鈴木敏之、山下まり、此木敬一、下痢性貝毒貯蔵生物における自己体制機構の探索(同上)</p> <p>18) 山下まり、シンポジウム:MS 解析による農学と医学の融合研究 LC-MS を用いた海洋天然物研究 2013 年 3 月 27 日(同上)</p> <p>19) 阿部由佳、小野寺健一、安元健、山下まり、腐食性巻貝シノミヨウバイ(<i>Nassarius velatus</i>)中のテトロドトキシン類縁体の同定と人工飼育による毒組成変化、平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京都、東京海洋大学、2013 年 3 月 29 日、日本水産学</p> <p>20) 増田朝子、篠原涼子、秋元隆史、山下まり、長澤和夫、C13 位 N 置換型サキトキシン誘導体類の合成と NaVCh 阻害活性評価、日本化学会第 93 春季年会(立命館 びわこ・くさつキャンパス)、草津市、2013</p>

様式19 別紙1

	<p>年 3 月 22 日～25 日、日本化学会</p> <p>21) 石貝 和也、深澤 亮、不破春彦、長由扶子、山下まり、佐々木誠、ガンビエル酸 A および類縁体の合成と生物活性評価 (同上)</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図 書</p> <p>計 3 件</p>	<p>1) 藻類ハンドブック、監修、編集委員長:渡邊信、第 2 節-5. 大型藻類の毒 山下まり (株)エヌティー・エス社 p268-270、総ページ数 768、2012 年、ISBN978-4-86469-002-7.</p> <p>2) 水産学シリーズ 174 フグ研究とトラフグ生産技術の最前線 日本水産学会監修 編集:長島裕二、村田修、渡部終五、恒星社厚生閣、第 9 章フグ毒化関連タンパク質 山下まり、p111-121、総ページ数 141、2012 年、ISBN978-4-7699-1285-9.</p> <p>3) 第 54 回天然有機化合物討論会講演要旨集、発行者:渡邊秀典、麻痺性貝毒生合成と毒生産生物からの同定、土屋成輝、長由扶子、此木敬一、長澤和夫、大島泰克、山下まり、p459-464、総ページ数 669、2012 年</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.html">http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.html</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>2012 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>新聞・一般雑 誌等掲載</p> <p>計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

該当なし

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 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	60,000,000	10,000,000	9,000,000	0
間接経費	23,700,000	18,000,000	3,000,000	2,700,000	0
合計	102,700,000	78,000,000	13,000,000	11,700,000	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	3,775	10,000,000	0	10,003,775	7,089,740	2,914,035	0
間接経費	8,570,528	3,000,000	0	11,570,528	2,892,792	8,677,736	0
合計	8,574,303	13,000,000	0	21,574,303	9,982,532	11,591,771	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	6,534,626	クロマトチャンバー、実験試薬、実験用動物等
旅費	334,595	研究成果発表・情報収集旅費(韓国昌原国際会議場)等
謝金・人件費等	0	
その他	220,519	実験機器修理費、論文校正・投稿費等
直接経費計	7,089,740	
間接経費計	2,892,792	
合計	9,982,532	

## 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
クロマトチャンバー	MC-8EF3	1	689,850	689,850	2013/3/13	東北大学
				0		
				0		