

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 フェルーディー ホルガー

ほるがー ふえるーでいー
Holger Feroudjの Studies on the effects of tetrodotoxin on gene expression in pufferfish *Takifugu rubripes* (テトロドトキシンがトラフグの遺伝子発現に及ぼす影響に関する研究) は、フグ毒テトロドトキシン (TTX) を蓄積するトラフグにおける生理的な役割を明らかにすることを目的として、TTX を投与したトラフグにおける遺伝子発現パターンを詳細に解析したものである。その概要を以下に示す。

フグ毒テトロドトキシン (TTX) は非常に致死性の高い物質で、フグのみならず多くの動物種に蓄積されることが知られている。フグは食物連鎖によって TTX を蓄積しているが、その詳細な機構やその生理的な意義については不明な点が多い。そこで本研究では、TTX の投与がトラフグ肝臓における遺伝子発現に及ぼす影響について詳細に検討を加えることとした。TTX は神経等の電位依存性 Na⁺チャンネルを阻害するため、神経系や内分泌系による制御系が存在する個体レベルの投与試験 (in vivo 試験) を 2 種とこれらの制御系が存在しない急性摘出肝検体を用いた試験 (ex vivo 試験) を実施した。in vivo 試験では、まず、TTX を蓄積した個体と蓄積していない個体間で、DNA アレイを用いて遺伝子発現パターンを比較した。TTX 蓄積魚では、vitellogenin 6, phospholipase A2 precursor, apolipoproteins A-IV1 and Bb, cytochrome P450 3A4 および glutathione S-transferase mu 3 の発現が有意に高く、diacylglycerol kinase eta, transmembrane proteins 165 and 102, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) coactivator 1-beta および NADH dehydrogenase subunits 1, 2 and 5 の発現が有意に低かった。次いで、TTX を腹腔内に投与したトラフグにおける遺伝子発現パターンを対照魚のものと比較したところ、chymotrypsin-like elastase family member 2a, transmembrane protein 168, Rho GTPase-activating protein 29, calcium channel alpha-1 subunit homolog および nicotinic acetylcholine receptor alpha 9d subunit の発現が有意に高く、nuclear receptor coactivator 2, transcription factor SOX-5, hepatocyte nuclear factor 3-gamma および plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 の発現が低かった。

次いで、ex vivo 試験として、Leibovitz's L-15 培地中で維持した急性摘出肝切片を用いて TTX の投与が肝臓の遺伝子発現パターンに及ぼす影響について検討を加えた。alamarBlue 染色によって確認したところ、投与試験中の 24 時間以内では肝臓の諸細胞は生命活動を維持していた。肝切片の TTX 蓄積量は培地中の濃度の 4 倍に達し、トラフグ肝臓は血流などがなくても能動的に TTX を蓄積するものと考えられた。次世代シーケンサー IonProton™ sequencer によって遺伝子発現解析 (RNA-Seq 解析) を行ったところ、ミ

トコンドリア関連遺伝子群の発現の低下が認められた。また、Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein (PSTBP) homologs Tr1 および Tr3 の発現に特徴的な変動が認められた。これらのことから、TTX の存在によってトラフグ肝臓では、エネルギー代謝系が抑制されることが明らかとなった。神経系や内分泌系が機能する *ex vivo* 系では、各種酸化分解系や神経伝達系などで不活化が認められ、TTX による神経系等の抑制に対する補償反応が存在する可能性が示唆された。

以上、本研究は、産業上重要種であるトラフグの TTX 蓄積の生理学的意義を明らかにする上で非常に重要な知見を提供したものであり、よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。