

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380126

研究課題名（和文）麻ひ性貝毒の起源に関する研究——特異抗体を用いる新たなアプローチ

研究課題名（英文）Study on the origin of paralytic shellfish poisoning toxins
----a new approach using specific antibody against saxitoxin

研究代表者

児玉 正昭（KODAMA MASAOKI） 北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号 40050588

研究成果の概要：

本研究の目的は、これまで植物プランクトンが生産すると考えられてきた麻ひ性貝毒（PSP）がプランクトンに共生あるいは寄生する細菌生体成分の構成成分であるという筆者らの仮説の証明にある。本研究では筆者らが開発した毒に対する特異抗体を用い、毒を結合している生体成分を分離し、同成分が細菌 RNA の一部であることを明らかにした。このことは PSP は細菌の生命維持に欠くことのできない物質の構成要素であることを示唆する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2007 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：水産生物化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：細菌、saxitoxin (STX), gonyautoxin (GTX), RNA, 抗 STX 抗体、affinity column、RNaseP1

1. 研究開始当初の背景

(1) 麻ひ性貝毒の毒生産生物における生物学的役割

海洋ではしばしば種々の毒を持つ単細胞藻類が発生し、これを餌とする二枚貝は毒を蓄積して毒化する。通常毒成分は無味無臭であるため毒化貝を知らずに食べた人が中毒し、重篤な

場合は死亡する食中毒が発生する。サキトキシン (STX) はこのような毒の中で最も強いものの一つで、わが国を含む世界の海域に広く分布し多くの中毒を引き起こしてきた。毒を生産する藻類は *Alexandrium tamarense* など数種の渦鞭毛藻であることが明らかにされており、これら有毒渦鞭毛藻の世界の海域における分布、発生状

況などの発生生態や発生に伴う二枚貝の毒化状況が詳細に調べられている。また毒の化学構造を含む化学的性状や、何故毒として働くかという薬理的性状についても詳細な研究がある。しかし毒を生産する有毒渦鞭毛藻における毒の生合成や代謝に関しては殆ど研究はなされておらず、毒を生産する生物における毒の生物学的存在意義については全く話題になることはなかった。

(2) 麻痺性貝毒の生物界における分布

麻痺性貝毒の生産は *Alexandrium* 属の数種および *Gymnodinium*、*Pyrodinium* 属のそれぞれ 1 種の渦鞭毛藻に認められる。しかしある種の有毒種には毒を生産しない無毒株の存在が知られている。また毒生産は *Aphanizomenon flos-aque* など淡水産藍藻にも認められる。この場合も有毒種の全てに毒生産が認められるわけではなく、殆どの株は無毒である。また麻痺性貝毒はこれら微細藻類との接触が考えにくい淡水、海水の生物、例えばフグ類、カブトガニ、オウギガニ科のカニなどにも蓄積することがある。この場合毒の来源がどのような生物であるかはまったく謎に包まれている。

(3) 細菌による麻痺性貝毒生産

筆者らは先に、麻痺性貝毒 (PSP) の原因渦鞭毛藻 *A. tamarense* の毒生産が遺伝形質ではないことを示唆し、同種の細胞内細菌が毒の一成分であるサキシトキシン (STX) を生産することを報告した。この研究は有毒渦鞭毛藻の毒の起源が細菌であることを示唆し、世界の多くの研究者の注目を集めた。欧米の複数の研究グループも異なる種の有毒渦鞭毛藻を用いこの問題を調べ、同様の結果を報告している。しかし筆者らの場合も含め、渦鞭毛藻から分離された細菌の毒生産量は著しく小さく、その毒量では渦鞭毛藻の持つ毒量を説明できない。この問題の解明には更なる新奇なアプローチが必要と考えられるが、現状では研究の進展を促す新たな発見は

なく、毒の細菌起源の問題は解明されることなく残されている。

(4) 新たな仮説

筆者らは以下のような状況証拠を基に毒が細菌の持つ生体成分の構成成分であるとする仮説を構築した。

① 筆者らは、PSP 生産菌の毒生産が細菌が飢餓状態に置かれたときに起こることを認めた。この結果は、細菌の自己消化により PSP を構成成分とする細菌成分が消化され PSP を遊離したと考えることもできる。また、生理機能を持つと思われる生体成分の構成要素である毒は生合成されるとすぐさま生体成分合成のため用いられるため、毒生産生物中に遊離の状態で大量に存在することは考えられない。このことは毒生産菌の毒生産量が小さいことと矛盾しない。有意な量の毒を持つ有毒渦鞭毛藻はこのような細菌成分を消化して毒成分を放出すると考えることもできる。

② 麻痺性貝毒はフグやカニなど有毒渦鞭毛藻とは関係のない生物にも蓄積することが知られている。これら生物が麻痺性貝毒を生産することは考えられず、これら生物における毒の起源は全く不明のままである。しかし毒の起源が細菌であるとすると、これら生物に取り込まれた細菌が有毒渦鞭毛藻と同様の代謝作用を持つことで毒化機構が説明可能となる。

2. 研究の目的

筆者らは 11-O-sulfate を持つ PSP 成分がチオール化合物と安定な複合体を形成する反応を見出し、これを利用して開発した STX をハプテンとする新奇抗原を基に種々の PSP 成分を認識できる特異抗体を開発し保有した。そこで予備的に、PSP 生産菌 buffer 抽出物と本抗体の反応を観察したところ抗体と反応するタンパク成分を観察した。この結果は PSP 生産菌に PSP を構成成分とするタンパク成分の存在を示唆する。本研究は PSP を構成成分とするタンパクに着目

し、有毒渦鞭毛藻ばかりでなく種々の、しかし限られた水圏生物に見られる PSP の起源を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗 STX 抗体と反応する高分子成分を持つ細菌のスクリーニング

筆者らが *A. tamarense* より分離して保存している PSP 生産菌 (PTB-1) 株および PSP 発生海域である大船渡湾より分離した細菌を用い、抗 STX 抗体に対する反応をスクリーニングした。スクリーニングは dot blot 分析で行い、反応が見られた試料についてはさらに western blot 分析を行った。

(2) スクリーニングにおいて陽性を示す菌株の大量培養で得た菌体を抽出して粗抽出物を得、抽出物中の抗体と反応する成分の性状を調べた。試料の分析は以下の方法で行った。

① タンパク質抽出物

抗原結合 affinity column で精製した抗 STX 抗体を結合した affinity column を作製し、タンパク質抽出物中の抗体と結合する成分を精製した。得られたタンパク質についてはプロテインシーケンサーによる N 末端アミノ酸の情報を基にさらなる情報を収集した。

② タンパク質以外的高分子成分中の PSP 関連成分の分離

ISOGEN を用いて菌体を抽出し、タンパク質、DNA および RNA に分離し、得られた成分と抗体との反応を調べた。

③ ISOGEN で得られた抗体と反応する画分はさらに抗体結合 affinity column で精製し、低分子成分に分解した後 PSP 成分が遊離されるか否かを HPLC 等の方法で調べた。PSP が検出された場合はこれを精製して PSP 成分であることをさらに精査した。

④ 本研究は PSP の起源生物が細菌であることを証明することも目的のひとつである。そこで対照として植物プランクトンの持つ毒が貝に蓄積する

他の貝毒である記憶喪失性貝毒について、野外調査を行い PSP と同様の手法で毒の起源を探った。

4. 研究成果

A. tamarense より分離して保存している PSP 生産菌 (PTB-1) 株および PSP 発生海域である大船渡湾より分離した細菌抽出物と抗 STX 抗体との反応を dot blot でスクリーニングした。PTB-1 を含む調べた細菌の多くが抗体と反応する成分を持つことが判明した (Fig. 1)。

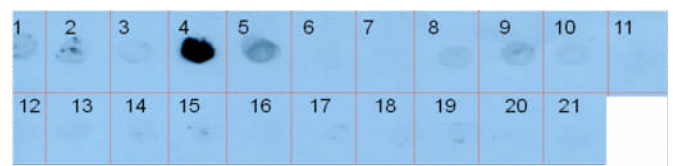


Fig. 1. 大船渡湾より分離した21菌株の dot blot 分析による抗体との反応性

最も強い反応を示した No.4 菌を western blot に付したところ、複数のタンパク質バンドが抗体で染色されたので、これらの成分を抗体結合 Sepharose column で精製した。その結果 Fig. 2

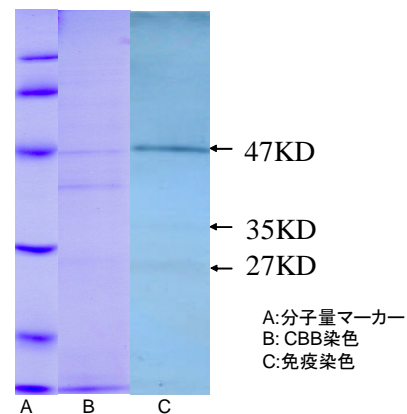


Fig. 2. No.2 菌抽出物の抗 STX 抗体を用いる western blot 分析 (抽出物は抗体結合 affinity column により精製した)

に示すように、47kD に強く染色されるタンパク質のバンドが明瞭に観察された。これ以外にも 35 および 27 kD にも微弱なバンドが観察された。この結果はこれらタンパク質成分が PSP を構成成分として持つことを示唆する。本実験を繰り返したところ、最も強く抗体と反応する 47kD 付近の

バンドは分子量が変化し、タンパク質染色では時に殆ど染色されない場合が観察された。この事実は PSP を結合した何らかの生体成分とタンパク質が共有結合のような強固なものでない、緩やかな様式で結合していることを示唆した。筆者らは先に予備的な状況証拠から PSP が RNA の構成成分であることを予想した。今回の結果は筆者らの過去の予想が事実である可能性を示唆する。そこで No.4 菌を ISOGEN で抽出して DNA, RNA およびタンパク質に分離し、これらの画分と抗 STX 抗体との反応を dot blot 分析で調べた。結果を Fig. 3 に示す。

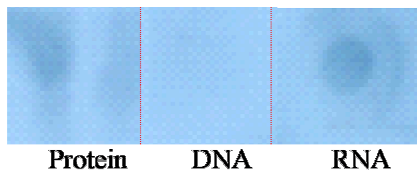


Fig. 3. ISOGENで分離したNo.2菌体の画分の抗STX抗体によるdot blot分析

予想したとおり抗体は RNA 画分と強く反応し、PSP が本菌 RNA の構成成分であることが示唆されたので、同菌より total RNA を分離した。dot blot により抗体との反応を確認した後これを抗体結合 Sepharose を用いる affinity column chromatography に付した。結果を Fig. 4 に示す。カラムに吸着される物質は 2 つのピークに分かれ、遅れて溶出するピーク(Peak 2)のほうが高かった。

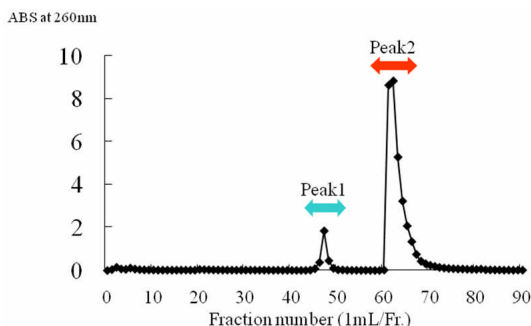


Fig. 4. No.2 菌より調製した total RNA の抗体結合 Sepharose affinity column chromatography

これら吸着画分の agarose gel 電気泳動像を非吸着画分および total RNA のそれと合わせて Fig. 5 に示す。affinity column に吸着しない画分は total RNA とほぼ同様の泳動像を示した。本画分(peak 1)はきわめて薄くしかエチジウムブロマイドで染色されなかったが、非吸着部に見られた 16s および 28s rRNA のバンドがかすかに観察された。一方遅く溶出する画分(Peak 2)では

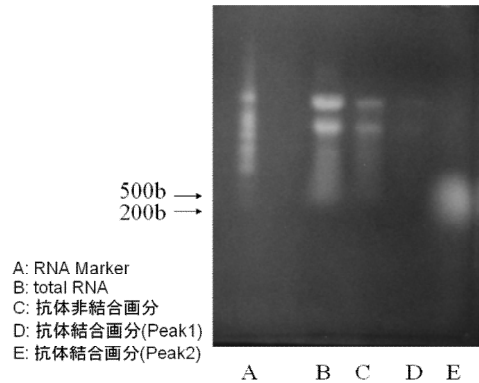


Fig. 5. Total RNAをaffinity columnで画分した画分の寒天電気泳動

200~500bp の部分に低分子 RNA がスポット状に観察された。これらの結果は PSP が一部の高分子 rRNA に結合して存在することを意味する。また、Peak 2 に認められた 200~500bp の低分子 RNA は上記高分子 rRNA が調製中に分解され低分子化した断片の、PSP を結合している部分であると考えられた。得られた画分の紫外吸収から算出した affinity column に吸着する RNA 量は total RNA の 0.7%であった。次に affinity column で得られた大きなピーク(Peak 2)を RNaseP1 で分解し、分解物を affinity column で再度処理して抗体と結合する成分を分離し、PSP 成分の遊離が起こるか否かを検討した。RNaseP1 による分解は同酵素の RNA 分解の最適条件である pH 5.3, 60℃、24 時間およびより温和な条件である pH7.4, 37℃、24 時間の 2 つの方法で行った。その結果温和な条件で分解した場合は GTX2,3 が、RNA 分解の最適条件で分解した場合は STX の遊離が観察された。得られた PSP 成分の分析は HPLC で行ったが、確認

のため HPLC で STX が検出された試料を MS/MS 分析し、 m/z 300 のピークイオンのフラグメントパターンを標品 STX のそれと比較した。Fig.6 に示す結果は両者のフラグメントパターンがよく一致し、両者が同一の物質であることを示している。ここには示さないが、*A. tamarense* より分離した PSP 生産菌 PTB-1 を No.4 菌と同様に処理した場合も同様の結果が得られた。

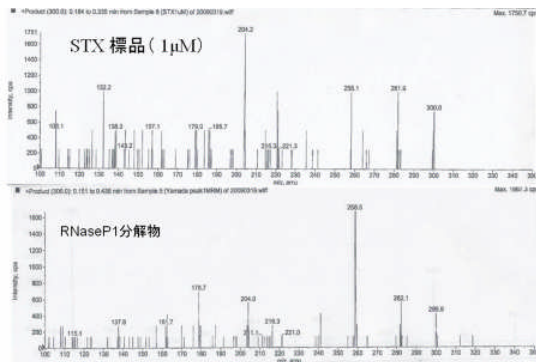


Fig. 6. affinity column で得られた RNA の RNaseP1 分解物中の STX の ms/ms 分析

以上の結果は GTX2,3 がある種細菌の rRNA と結合して存在することを示すものである。GTX2,3 と rRNA の結合がどのような形で結合しているかは今回の結果からは示すことは出来なかった。しかし遊離された PSP 成分は、RNA 分解酵素 RNaseP1 の分解条件により異なることが判明した。今回はこの点を詳細に検討することが出来なかったが、RNaseP1 を全ヌクレオチドが完全に分解される pH5.3, 60°C で分解した場合には GTX2,3 の 11-O-sulfate を失った STX が得られ、より温和な条件である pH 7.4, 37°C で処理した場合は GTX2,3 が得られた。この事実は RNaseP1 がリン酸エステルばかりでなく、硫酸エステルをも分解することを示唆する。すなわち GTX2,3 は RNA の一部と、例えば Fig. 7 のような形で硫酸エステル結合しているのかもしれない。この考え方を明確に示すには RNA の PSP との結合部分を含む断片を単離し、その化学構

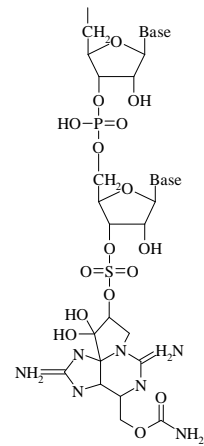


Fig. 7. RNA と PSP 成分の結合様式の推定図

造を明らかにする必要がある。今回は最終結論を明確に示すことが出来なかったが、酵素の反応条件により RNA より遊離する毒成分の差をもとに PSP と RNA の結合を論じる論文執筆は可能である。現在確認実験を行っており、同様の結果が得られ次第論文作製を開始する予定である。

筆者らは PSP による貝類毒化の問題を field 調査により精査し、貝類の毒化が有毒渦鞭毛藻の持つ毒の単なる食物連鎖による蓄積ではなく、毒を構成成分とする生体成分を持つ何らかの生物が関与する複雑な現象であることを指摘してきた。その中で毒化貝抽出物より毒を取り除いた高分子成分を RNase で処理すると GTX2,3 が遊離する現象を報告した(1982)。しかし当時は毒の分析技術や分子生物学の技術が現在ほど発達しておらず、筆者らの発見は確認されることなく放置されてきた。本研究の成果はこの問題に科学的根拠を与え、PSP は細菌の生命現象に重要な役割を持つ物質であることを示唆する。本研究で得られた知見はまた、これまでプランクトンが原因となると考えられてきた貝毒現象がプランクトンばかりでなく細菌が関与する複雑な現象であることを示す重要な発見であると考えられる。

比較のために行った記憶喪失性貝毒ドウモイ酸とその原因生物と考えられている珪藻につい

でもまず、PSP と同様の野外調査および培養実験を行ったが、この場合も毒の原因をプランクトンに限定した場合説明不可能な現象が観察され、環境に共存する細菌が原因珪藻の毒生産に直接関与することが明らかになった。本研究で得られたこれらの成果が、植物プランクトンの引き起こす生物の毒化問題を新たな視点から考え直すきっかけになることを期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件) [査読あり]

①Dao, V.H., Takata, Y., Omura, T., Nguyen, T.D., Nguyen, T.H., Sato, S., Fukuyo, Y., Kodama, M. (2009) Domoic acid in small-sized plankton in Nha Phu Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam. La mer (in print)

②Dao, V.H., Takata, Y., Omura, T., Sato, S., Fukuyo, Y., Kodama, M. (2009) Seasonal variation of domoic acid in *Spondylus versicolor* in association with that in plankton samples in Nha Phu Bay, Khanh Hoa, Vietnam. Fisheries Science 75: 507-512.

③Takata, Y., Sato, S., Dao, V.H., Montojo, U.M., Lirdwitayaprasit, T., Kamolsiripichaiorn, S., Kotaki, Y., Fukuyo, Y., Kodama, M. (2009) Occurrence of domoic acid in tropical bivalves. Fisheries Science 75: 473-480.

[学会発表] (計 6 件)

①児玉正昭・高田義宜・Ulysses M. Montojo・新保昌康・佐藤繁 麻痺性貝毒に対する抗体と反応する細菌成分 日本水産学会 春季大会 高知大学 2006年4月 p.192.

②Kodama, M., Takata, Y., Osako, T., Sato, S.

③Proteins bound with saxitoxin-analogue, a key substance for the study on metabolism of PSP toxins. The abstract of 13th international conference on harmful algae. 3-7 November 2008, Hong Kong, p. 63.

④Osako, T., Takata, Y., Sato, S., Kodama, M. Bacterial proteins which react with antibody against saxitoxin. 5th World Fisheries Congress. 20-25 October 2008, Yokohama Japan, p. 421.

⑤Takata, Y., Kodama, M., Bacterial proteins which react with antibody against domoic acid. 5th World Fisheries Congress. 20-25 October 2008, Yokohama Japan, p. 421.

⑥Sato, S., Kondo, S., Takata, Y., Kodama, M., Fukuyo, Y. An enzyme immunosorbent assay as alternative method of mouse test to detect shellfish poisoning toxins. The abstract of 7th IOC/WESTPAC international scientific symposium. 21-25 May 2008, Kota Kinabalu, p. 156.

[図書] (計 1 件)

Kodama, M., Doucette, G.J., Green, D.H: Relationships between Bacteria and Harmful Algae (Edna Graneli, J.T Turner Eds.) Ecology of Harmful Algae Germany Springer-Verlag GmbH p.243-255 2006.9

6. 研究組織

(1)研究代表者

児玉 正昭 北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号 40050588

(2)研究分担者

佐藤 繁 北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号 20170748