

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18580210

研究課題名 (和文) 麻ひ性貝毒の生体成分との反応性に着目した毒の分解に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on decomposition of paralytic shellfish toxins reacted with low molecule biological components

研究代表者 佐藤 繁 (SATO SHIGERU)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号 20170748

研究成果の概要：

麻ひ性貝毒(PSP)による貝類の毒化は公衆衛生上の問題であるだけでなく、貝類の養殖産業や流通産業に大きな被害をもたらしている。麻ひ性貝毒は還元型プリン骨格を持つ複数の成分の総称であり、11位に硫酸エステルを持つグループと11位が還元されたグループに大別される。本研究は、11位に硫酸エステルを持つPSP成分のL-システインならびにその誘導体と反応し無害化される機構、ならびに11位還元型のPSP成分が種々のポリフェノールと反応し、無害化される機構を検討したものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

研究分野：

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：麻ひ性貝毒・分解・サキシトキシン・ゴニオトキシン・システイン・ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

麻ひ性貝毒(PSP)による貝類の毒化は、わが国をはじめ貝類を食用とする各国において公衆衛生上ならびに産業上の深刻な問題となっている。貝に蓄積した毒は、環境水中から毒化の原因となる渦鞭毛藻が消失すると減少するが、貝の毒性が安全に消費できるレベルまで減少するには長期間を要し、このことが貝類養殖産業に大きな経済的損失を与えている。筆者は、ほぼ毎年麻ひ性貝毒が

発生する三陸沿岸において、長年岩手県と共同で毒化貝の毒性ならびに毒成分の推移を調べてきた。その過程で毒成分の組成が貝の体内で変化し、時に分解を受けること、およびこのような変化にグルタチオン(GSH)などの生体成分が関与することを明らかにしてきた。また、予備的に行なった試験では、麻ひ性貝毒成分のうちサキシトキシン(STX)を種々の陸上植物の抽出液中でインキュベートすると速やかに消失・無害化することを見

出している。これらの結果は麻ひ性貝毒成分が、これまで考えられてきた以上に反応性に富むことを示すものである。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では毒の分解反応に焦点を絞り、分解を引き起こす種々の生体成分ならびにそれらによる分解機構を明らかにすることを目的とした。すなわち、毒化ホタテガイの体内に分布する GSH と 11 位硫酸エステル型 PSP 成分であるゴニオトキシン(GTX)群との反応で生じたと考えられる成分、GTX 群と L-システインとの反応で生じる成分の性状を調べるとともに、11 位還元型 PSP 成分であるサキシトキシン(STX)群の分解に関する成分の本体を同定し、本成分による STX 群の分解機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

試料

岩手県大船渡湾に設置した試験研究用養殖筏から 2006 年 6 月、毒化したホタテガイ *Patinopecten yessoensis* 約 1000 個体採取し、腎臓と中腸腺を取り出した。中腸腺は希塩酸で熱浸抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 ならびに Bio-Rex 70 各カラムクロマトグラフィーを用いる常法で各 PSP 成分(C1, C2, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, STX および neoSTX)を分離した。大船渡湾産毒化貝に存在しない一部の PSP 成分すなわち B1, B2 および dcSTX は、有明海産毒化イガイから上記の常法で分離した。

グルタチオンおよびシステインなどの生物チオールの関与するゴニオトキシン群の分解機構

毒化ホタテガイの体内には、麻ひ性貝毒の HPLC 分析の際に GTX1 あるいは GTX4 の近傍に蛍光成分が妨害ピークとして観察されることが報告されている (Oshima Y., 1995)。これまでの研究で筆者は、この成分が無毒ホタテガイには存在せず、有毒ホタテガイの腎臓に集中して存在すること、および GTX 群や、GTX 群と GSH を反応して得られる GS-STX 複合体を無毒ホタテガイの腎臓等 γ GTP 活性の高い器官のホモジネート中でインキュベートするとこれらの減少に伴って本成分が生じるが、STX をインキュベートした場合には STX の減少は認められず、本蛍光成分も生じないことを確認している。毒化ホタテガイの腎臓抽出液から本成分を活性炭、陰イオン交換樹脂、逆相分配系の各種クロマトグラフィーで順次精製し、UV, MS ならびに NMR スペクトルを測定し、本成分の構造解析を試みた。

L-システインを GTX 群に中性条件下で作

用させて得られる蛍光成分についても同様に分離精製し、構造解析を試みた。

サキシトキシン群を無害化する生体成分のスクリーニング

種々の植物ならびに茶やワインなど植物由来の製品の抽出液中で STX をインキュベートし、STX の分解効率を調べた。分解反応の pH 依存性ならびに温度依存性についても合わせて検討した。STX の定量は Oshima (1995)の開発した HPLC 蛍光法を使用した。

ポリフェノールによる毒の分解条件の検討

種々のポリフェノールの STX に対する作用の pH 依存性を調べた。茶カテキン、紅茶ポリフェノール、没食子酸、没食子酸プロピル、び路がロールまたはクロロゲン酸を 0.1% 含む pH4.0-pH8.2 の溶液中に、STX を終末濃度が 10 μ M となるように添加混合し、沸騰浴中で 5 分間加熱した後、HPLC 蛍光法で残存する STX を定量した。

ポリフェノールの STX 消去作用に対する還元剤の影響

STX の消去効果が顕著に認められた没食子酸の中性水溶液中に STX を添加し、アスコルビン酸もしくは GSH を種々の濃度で添加して、沸騰浴中で 5 分間加熱し、STX の消去作用に対するこれら還元剤の影響を調べた。

種々の PSP 成分に対するポリフェノールの効果の検討

没食子酸を 0.01% 含む中性リン酸水溶液に、終末濃度が 10 μ M となるように STX、または neoSTX、GTX2+3(GTX2 と 3 の平衡混合物)、GTX1+4、dcSTX、B1、B2 および STX を NaBH₄ 水溶液中で処理して得られる STX-12ol をそれぞれ添加して、沸騰浴中で 5 分間加熱した後、前述の HPLC 蛍光法で分析した。

ポリフェノールによる STX の分解機構

10 μ mol の STX を、上記の試験で顕著な効果が認められた没食子酸プロピル(PG)を 0.1% 含む中性リン酸緩衝液 10mL に混合し、沸騰浴中で 3 分間加熱した。混合液を酢酸エチルで抽出し、水相の UV スペクトルおよび MS/MS(API-2000)上で Q1 scan ならびに product ion scan を測定した。STX を既報の方法に従って、0.01MNaOH/1%過酸化水素水中で処理し、酸化分解物(蛍光プリン)を調整し、比較標準とした。

4. 研究成果

11 位硫酸エステル型 PSP 成分の生物チオールによる分解機構

無毒ホタテガイの腎臓ホモジネートに GS-STX 複合体を混合して 37°C でインキュベートしたところ、毒化ホタテガイに認められる蛍光成分と HPLC 上で同一の retention time を示す成分が得られることを確認した。同様の成分は、GS-STX を γ GTP (牛腎臓由来) で処理した場合、ならびに GTX2+3 と L-システインを中性リン酸緩衝液中で混合し加温した場合にも認められるが、収率が著しく低く、精製して同定することはできなかった。毒化ホタテガイ腎臓から同蛍光成分を精製し、API-2000 の Q1 scan mode で測定したところ、分子量 189 を持つ成分が確認された。同成分は UV273nm ならびに 330nm 付近に極大吸収を示し、プリン骨格を有する蛍光成分であることが示唆された。同成分は 1H-NMR 上で 8.1ppm 付近に singlet を与えるほかに顕著なプロトンが観察されず、かつ水溶液中で短時間のうちに不溶化したため、これ以上の構造解析は遂行できなかった。不溶化した状態でろ液の質量を測定したところ、分子量 187 の成分が確認され、単離された状態ではさらに酸化されて 2H を失っていることが示唆された。これら蛍光成分はいずれも PSP 分析用の ELISA 上でまったく交差を示さず、基本骨格である tricyclic 系還元型プリン骨格を持たないことが確認された。

PSP 成分は塩基性条件下で 12 位の gem diol が keto に変化して不安定化し、容易に酸化されて蛍光プリン体を与えることが知られている。PSP 成分がこのような分解を受けにくい中性水溶液中でも、GS-STX を γ GTP で処理した場合、および GTX2+3 に L-システインを作用させた場合のいずれとも、蛍光プリン様成分が与えられる。以上の事実から、PSP とチオール複合体のチオール側の硫黄原子の近傍の遊離アミノ基が、PSP 分子の 12 位と分子内でシフ塩基を形成する、すなわち 12 位に sp² 混成が生じることが PSP の酸化分解のきっかけを作っているものと推定された (図 1)。

11 位還元型 PSP 成分のポリフェノールによる分解機構

種々の植物抽出液の STX 消失作用を調べたところ、ダイコンやジャガイモなど淡色根菜類のホモジネート中ではこの効果は著しく低かったのに対して、茶や赤ワインの中性抽出液は特に高い効果を示した。この時点で STX の消去に植物ポリフェノールが関与していると推定されたため、種々のポリフェノール市販標品を用いて検討したところ、カテキン類ならびに、タンニン酸やピロガロールなど、没食子酸誘導体に顕著な STX 消失作用が認められた。本作用は酸性条件下ではまったく認められず、pH6.8 以上の中性付近では顕著であり、没食子酸ならびに没食子酸プ

ロピルを 0.1% 含む中性リン酸緩衝液中、37°C でインキュベートした場合には 100 μ

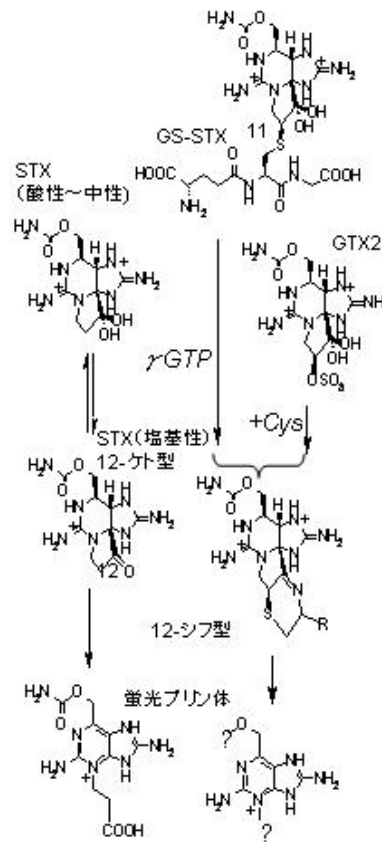


図 1 サキシトキシンの分解機構 (左) および生物チオールの関与する GTX 群 PSP 成分の推定分解機構 (右)

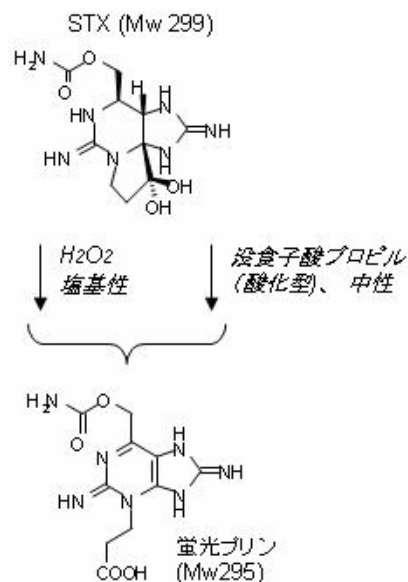


図 2 サキシトキシンの過酸化水素による塩基性条件下での酸化およびポリフェノールによる中性条件下での酸化

MのSTXが30分でほぼ消失した。

これらポリフェノールは中性溶液中でSTXの他、neoSTX、dcSTX、B1およびB2などの11位還元型PSP成分を効率よく消去した。これに対して、GTX1~4やC1、C2などの11位に硫酸エステルを持つ成分、ならびにSTXの12位を還元して得たSTX-12o1を、種々のポリフェノール溶液中で加温したところ、ポリフェノールを含まない中性溶液中で加温した対照よりも高い濃度で残存し、加温前のイニシヤルとほぼ同レベルの濃度で残存することが確認された。

これらポリフェノールによるSTXの消去作用は、反応系にポリフェノールと同等以上の濃度の還元型グルタチオンやアスコルビン酸を添加することにより抑制されたことから、反応系中に存在する酸化型ポリフェノールが毒を酸化し無害化しているものと推定された。没食子酸プロピルの中性水溶液中でSTXを加温した溶液に酢酸を添加した後、酢酸エチルで抽出し、水相の紫外線吸収スペクトルを測定したところ、273nmならびに330nmに極大吸収が認められた。本溶液を四重極MS/MS (API-2000)のQ1 scanモードで分析したところ、m/z296にSTXを弱塩基性条件下、過酸化水素水中で処理して得られる蛍光プリン体の[M+H]⁺に対応する分子イオンピークが観測された。本ピークを与える分子イオンならびにSTXの過酸化水素処理で与えられる当該分子イオンをMS/MSのproduct ion scanモードで解析したところ、両者のフラグメントイオンは完全に一致した。これに対してSTXを、ポリフェノールを含まない中性溶液中で加温した場合には、紫外線吸収スペクトルならびにMSスペクトルともに処理前のそれらとほぼ一致し、蛍光プリンは検出されなかった。以上の結果から、ポリフェノールが中性付近の温和な条件下でSTXを酸化分解し、蛍光プリンに導いて無害化することを確認した(図2)。

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2件)

① Takata Y, Sato S, Dao VH, Montojo UM, Lirdwitayaprasit T, Kamolsiripichalporn S, Kotaki Y, Fukuyo Y, Kodama M (2009): Occurrence of domoic acid in tropical bivalves. *Fisheries Science*, 75(2), 473-480.

② Dao VH, Takata Y, Sato S, Fukuyo Y, Kodama M (2009): Frequent occur

rence of the tetrodotoxin-bearing horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* in Vietnam. *Fisheries Science*, 75(2), 435-438.

[学会発表] (計3件)

① 佐藤 繁、坂田絵美子、武藤麻実子、梶原姿織、増田江利子、児玉正昭(2008): ポリフェノール溶液中でのサキシトキシン群麻痺性貝毒の分解、2008年度日本水産学会春季大会(於: 東海大学海洋学部) 講演要旨集、p. 64.

② 坂田絵美子、佐藤 繁、高橋一成、西村玲奈、児玉正昭、山崎 周、白山晴男、加賀新之助(2008): システイン含有飼料による麻痺性貝毒汚染貝からのゴニオトキシン群の除去方法、2008年度日本水産学会春季大会(於: 東海大学海洋学部) 講演要旨集、p. 65.

③ SATO, S (2008): Biochemical degradation of C11-0-sulfate paralytic shellfish poisoning toxins. WFC2008 5th World Fisheries Congress, 2008/10/21, パシフィコ横浜.

[図書] (計1件)

Kodama M, Sato S (2008): Metabolism of Paralytic Shellfish Toxins Incorporated into Bivalves. In "Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology, and Detection", L.M. Botana ed. CRC Press, Boca Raton, London, New York. pp. 165-175.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

① 佐藤 繁 (発明者)、麻痺性貝毒成分の除去、特願2008-016530、H20/1/28出願、権利者: 学校法人北里研究所.

② 佐藤 繁 (発明者) H20/10/22に上記1)より分割出願、特願2008-272146、権利者: 学校法人北里研究所.

○取得状況 (計1件)

特許第4232850号(特願2008-016530、H20年1月28日出願、麻痺性貝毒成分の除去、発明者: 佐藤 繁、権利者: 学校法人北里研究所).

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 佐藤 繁
(北里大学・海洋生命科学部・准教授)

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし