

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：42680

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780200

研究課題名（和文） 新しい水産資源としてのイソギンチャクの有効利用に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Study on facilitating further utilization of sea anemones as new marine resources

研究代表者

本間 智寛（HONMA TOMOHIRO）

東海大学短期大学部・食物栄養学科・講師

研究者番号：90435272

研究成果の概要（和文）：各種イソギンチャクから、サワガニに対する毒性を指標にして、ペプチド毒の探索を行った。その結果、3種イソギンチャクから、新規ペプチドを含む9成分のペプチド毒を単離し、その一次構造を解析することに成功した。なかでも隠岐の島沿岸で食用とされる深海産イソギンチャクからは、6成分のペプチド毒が単離され、内5成分は従来のイソギンチャクのペプチド毒とは全く異なる一次構造をした新規ペプチド毒であった。本研究によって、深海産イソギンチャクには、数多くの新規ペプチド毒が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The screening of peptide toxins with activity against freshwater crab were performed on various sea anemones. We have successfully isolated and analyzed the primary structure of 9 peptide toxins from 3 species of sea anemones. Interestingly, 6 peptide toxins were isolated from the deep-sea anemone which is eaten as food in the coast of Oki islands, and the chemical structure of 5 peptide toxins of them were completely differ from the known toxins have been isolated from sea anemones. This suggests that novel peptide toxins exist in deep-sea anemones more widely than expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：水産化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：イソギンチャク、ペプチド毒、水産資源、イオンチャネル、深海

1. 研究開始当初の背景

海洋動物の刺毒は一般に不安定であることから研究が立ち遅れているが、イソギンチャク毒は例外的に安定で取り扱いやすいことから、1970年代以降欧米を中心に活発な研究が行われてきた。これまでの研究により、イソギンチャクの毒は20kDaの溶血毒、3-5kDaのNaチャンネル毒および3.5-6.5kDaの

Kチャンネル毒に大別される。このうちペプチド毒（Naチャンネル毒とKチャンネル毒）は、イオンチャネルに対する作用や構造活性相関に関する研究が実を結び、貴重なイオンチャネル試薬として薬理学の分野などで汎用されている。特に詳しく研究されてきたNaチャンネル毒は、Naチャンネルのレセプターサイト3と結合し、Naチャンネルの不活性化ゲ

ートが閉じるのを抑制する。このような作用を示す毒は天然ではサソリの α -トキシンしか知られていない。また、K チャネル毒は1990年代に入ってからイソギンチャクの新しい毒として次々に登場してきたもので、電位依存性の *Shaker* 型あるいは *Shaw* 型を阻害する。イソギンチャクのペプチド毒に関する研究のほとんどは、上記 Na チャネル毒と K チャネル毒に向けられてきたが、まったく異なる一次構造をもつ新規ペプチド毒も報告されている。

世界に生息するイソギンチャクは約 800 種であるが、これまでに毒成分が調べられているのは約 30 種とわずかである。しかしながら、新規ペプチド毒がいくつか単離されていたことを考えると、イソギンチャクにはまだ数多くの新規ペプチド毒が存在すると予想された。こうした背景のもとに研究代表者は、各種イソギンチャクにおける新規ペプチド毒の探索、単離、一次構造解析を行ってきた。学術論文として未発表のものを含めると、9 種イソギンチャクから 25 成分のペプチド毒の単離・構造解析を行い、そのうち実に 11 成分もの毒が従来知られていない新規ペプチド毒であった。なかでもハタゴイソギンチャクから単離した gigantoxin I は哺乳類由来の上皮増殖因子 (EGF) と高い配列相同性を持つ新規ペプチド毒で、EGF 活性も認められた。Gigantoxin I は毒性と EGF 活性をあわせもつ世界最初のペプチドであった。このように研究代表者の一連の研究によって、イソギンチャクはまさに新規ペプチド毒の宝庫であることが証明され、海洋生化学資源として注目されるようになった。

2. 研究の目的

刺胞動物であるイソギンチャクは刺胞と呼ばれる小さな毒器官を無数に持ち、その中に含まれる毒成分を利用して餌動物であるカニや小魚などを麻痺させ捕食している。しかしながら、人類には古くからイソギンチャクを食用としてきた食習慣がある。世界では地中海沿岸やミクロネシア、日本では有明海沿岸や隠岐の島などで食用とされている。有毒生物の摂食でありながら、食品衛生上の安全性についてはまったく検討されていないのが実状である。

水産化学の分野でのイソギンチャクに関する研究は、毒成分の研究を中心に進展してきた。研究代表者もイソギンチャクのペプチド毒に関する研究に従事し、従来の分類には当てはまらない一次構造をした新規ペプチド毒を数多く単離してきた。これまでの研究成果により、ペプチド毒の一部は薬理学の分野では研究用試薬として市販され、医薬品の分野では多発性硬化症の治療薬としての応用も試みられている。その一方で、イソギン

チャクはクラゲと近縁種であることから、クラゲで注目されているコラーゲンや脂質成分といった食品機能性成分の存在も示唆されるが、食品としての観点からの研究はまったく行われていない。このような背景から、イソギンチャクを新しい水産資源としてさらに有効利用することを目的として、未調査のイソギンチャクからの新規ペプチド毒の探索、および食用イソギンチャクの食品衛生上の安全性の検討および毒成分の精製を試みた。

3. 研究の方法

(1) 粗抽出液の調製方法

凍結状態のイソギンチャク試料をホモジナイズし、得られたホモジネートに、5 倍量のイオン交換水を加えて再びホモジナイズした。その後、冷却遠心分離 (18800×g, 4℃, 15min) し、得られた上清を粗抽出液とした。

(2) 毒性の測定方法

サワガニに対する毒性の測定は、粗抽出液またはその段階的 2 倍希釈液を 1 群 3 匹のサワガニの第 4 歩脚基部から体腔内投与し、最大 2hr の観察を行った。投与液量は、サワガニの体重 1g あたり 10 μ l に設定した。致死活性は、各群 2 匹以上のサワガニが死亡した時を陽性とし、陽性と判断された最高希釈倍率 (titer) で表示した。麻痺活性は、各群 2 匹以上のサワガニが反転させても起き上がれない時を陽性とし、陽性と判断された最高希釈倍率 (titer) で表示した。

マウスに対する毒性の測定は、粗抽出液またはその段階的 2 倍希釈液を 1 群 2 匹のマウスに静脈投与、腹腔内投与、経口投与し、最大 24hr の観察を行った。投与液量は、マウスの体重 1g あたり 10 μ l に設定した。致死活性は、各群 2 匹のマウスが両方とも死亡した時を陽性とし、陽性と判断された最高希釈倍率 (titer) で表示した。

ウマの赤血球に対する溶血活性の測定は Shioimi *et al.* (1985) の方法に従って調べた。

(3) 毒成分の単離方法

粗抽出液を、0.15M NaCl を含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したサイズ排除クロマトグラフィーの Sephadex G-50 カラム (2.5×90cm) に供した。同緩衝液を用いて溶出し、溶出液はフラクションコレクターで 8ml ずつ分取した。各フラクションについて 280nm での吸光度を測定するとともに、サワガニに対する致死活性を調べた。サワガニ致死活性の認められたフラクションを集め、逆相クロマトグラフィーの TSKgel ODS-120T カラム (0.46×25cm) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した。カラムは 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液中のアセトニトリルの直線的濃度勾配により毒成分を溶

出した。ペプチドは UV 検出器を用いて 220nm の吸光度で検出した。

(4) 毒成分の構造決定

N 末端アミノ酸配列分析はエドマン分解法に基づいた気相式プロテインシーケンサーを用いて行った。単離したペプチド毒の分子量は、レーザーイオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI/TOFMS 法) により測定した。また cDNA クローニングは、凍結試料から TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出し、3' RACE 法と 5' RACE 法によって行った。また塩基配列分析はサブクローニング後、ジデオキシ法に基づいたキットに従って反応させ、DNA シーケンサーにより解析した。

4. 研究成果

(1) 平成 21 年度研究成果

- ① 有明海沿岸で食用とされるイシワケイソギンチャクの食品衛生上の安全性について検討した。その結果、粗抽出液のサワガニに対する毒性は、致死活性が 16 倍希釈液、麻痺活性が 128 倍希釈液まで認められたが、ウマ赤血球に対する溶血活性はみられず、またマウスに対する静脈投与、腹腔内投与、経口投与のいずれにおいても毒性は認められなかった。
- ② イシワケイソギンチャクから、サイズ排除クロマトグラフィーと逆相 HPLC によって、サワガニに致死活性を示す Toxin I を単離し、その N 末端アミノ酸配列を解明した。Toxin I はそのアミノ酸配列の特徴と MALDI/TOFMS での分子量から、イソギンチャクのタイプ 1 の Na チャネル毒であると推定された。また各種クロマトグラフィーによる毒成分精製の条件検討から、本研究で単離した Toxin I 以外に、イシワケイソギンチャクにはまだ単離されていない毒成分があることが示された。
- ③ 外国産イソギンチャク *Actinostephanus haeckeli* から、サイズ排除クロマトグラフィーと逆相 HPLC によって、サワガニに強い致死活性を示す Ah I および II を単離し、その N 末端アミノ酸配列を解明した。アミノ酸配列の特徴から Ah I および II は、タイプ 1 の Na チャネル毒と判断された。興味深いことに、Ah I および II は、タイプ 1 の Na チャネル毒の中でも、54 残基とペプチド鎖が最も長く、特異的な位置づけにあるウメボシイソギンチャクの Ae I と高い相性を示した。

(2) 平成 22 年度研究成果

- ① イシワケイソギンチャクから単離したペプチド毒の cDNA クローニングを行い、3' Race 法によって、C 末端部のアミノ酸配列を明らかにした。
- ② 隠岐の島沿岸で食用とされる深海産イソギンチャクの食品衛生上の安全性につい

て検討した。その結果、粗抽出液のサワガニに対する毒性は、致死活性が 32 倍希釈液、麻痺活性が 64 倍希釈液まで認められた。マウスに対する毒性は低く、静脈投与と腹腔内投与において、原液のみに活性が認められた。

- ③ 上記イソギンチャクからサワガニに対する毒性を指標にして、サイズ排除クロマトグラフィーと逆相 HPLC によって、サワガニに致死あるいは麻痺活性を示す 6 成分のペプチド毒を単離し、その N 末端アミノ酸配列を解明した。内 1 成分については、シマキカイソギンチャク由来の Am II と相性が見られたが、他の成分については、従来のイソギンチャクのペプチド毒とは相性を示さない新規ペプチド毒と判断された。

- ④ 養殖場の魚網などに付着して大量発生し、深刻な漁業被害をもたらすオヨギイソギンチャクの毒性を調べたところ、粗抽出液のサワガニに対する毒性は、致死活性が 16 倍希釈液、麻痺活性が 32 倍希釈液まで認められた。

(3) 平成 23 年度研究成果

- ① イシワケイソギンチャクから単離したペプチド毒および、外国産イソギンチャク *Actinostephanus haeckeli* から単離したペプチド毒について、3' Race 法と 5' Race 法による cDNA クローニングを行い、その前駆体構造を明らかにした。従来のイソギンチャクのペプチド毒前駆体と同様に、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから構成されていた。
- ② 隠岐の島沿岸で食用とされる深海産イソギンチャクから単離した 6 成分のペプチド毒の内、混合物とみられる 3 成分については、いずれの毒成分も従来のイソギンチャクのペプチド毒と同様に、安定性が非常に高く、逆相 HPLC によっても失活しなかったため、逆相クロマトグラフィーのカラム条件等を検討し、再精製を行った後、N 末端アミノ酸配列を解析した。
- ③ 前年度、サワガニに対して毒性が認められ、サイズ排除クロマトグラフィーの溶出位置からペプチド毒と推定されたオヨギイソギンチャクの毒成分は、従来のイソギンチャクのペプチド毒とは異なり、その安定性が低く、逆相 HPLC 後には活性を確認できなかった。現在、他のクロマトグラフィーによる精製を試みている。
- ④ 北海道から島根県に亘る日本海沿岸の水深 600~1400m ほどで採集された深海産イソギンチャク十数種を入手し、サワガニに対する毒性をスクリーニングしたところ、ヒダベリイソギンチャク科 *Metridium* 属のイソギンチャク粗抽出液に、致死活性が 8 倍希釈液、麻痺活性が 128 倍希釈液までの

活性が認められた。致死活性と麻痺活性との差が大きいことから、致死成分とは別に麻痺のみを示す新規ペプチド毒が存在する可能性も考えられることから、現在、サイズ排除クロマトグラフィーと逆相 HPLC によって、毒成分の単離を試みている。

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 1 件)

1. Tomohiro Honma, Emiko Nagashima, Hideo Tsukamoto, Kazuo Shiomi Isolation of novel peptide toxins from the sea anemone *Actinostephanus haeckeli*. PEPTIDE SCIENCE 2009, 141-142 (2010). (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 本間智寛・永島江美子・塚本秀雄・柳研介・塩見一雄：食用とされる深海産イソギンチャクの毒成分の性状解明. 第 14 回マリンバイオテクノロジー学会大会 (マリンバイオテクノロジー学会). 2011 年 5 月 29 日, 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡県)
2. 本間智寛・永島江美子・神口浩・塚本秀雄・塩見一雄：食用イソギンチャク毒の cDNA クローニング. 平成 22 年度中部支部大会 (日本水産学会). 2010 年 11 月 26 日, 静岡県水産技術研究所 (静岡県)
3. 本間智寛・永島江美子・塚本秀雄・塩見一雄：有明海沿岸で食用とされるイシワケイソギンチャクの毒成分の性状解明. 平成 22 年度日本水産学会春季大会 (日本水産学会). 2010 年 3 月 28 日, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県)
4. 本間智寛・永島江美子・塚本秀雄・塩見一雄：イソギンチャク *Actinostephanus haeckeli* の新規ペプチド毒の単離. 第 46 回ペプチド討論会 (日本ペプチド学会). 2009 年 11 月 5 日, 北九州国際会議場 (福岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 智寛 (HONMA TOMOHIRO)

東海大学短期大学部・食物栄養学科・講師

研究者番号：90435272