

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580284

研究課題名(和文)ポリフェノールによる麻痺性貝毒の分解機構

研究課題名(英文)Mechanism of degradation of paralytic shellfish toxin by polyphenols

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：赤ワインや茶などの植物抽出液中に含まれる没食子酸などの種々のポリフェノール(PPs)が、11位還元型の麻痺性貝毒成分を消失させることを確認した。毒は塩基性条件下で強酸化剤により分解され無毒のプリン化合物を与えるが、中性付近でPPsが作用することで、同じプリン化合物が得られることを確認した。中性リン酸水溶液にPPsを添加すると、+300mV付近にあった酸化還元電位が低下するが、インキュベーションにより分解する毒量は顕著に増加した。以上から、酸化型PPsが毒の分解を引き起こす本体であること、すなわちPPsは溶存酸素による毒の分解反応において、効率の良い触媒として機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Polyphenols (PPs) such as gallic acid and its derivatives in wine and tea were revealed to decompose 11-reduced paralytic shellfish toxins (PST). It was reported that incubation of PST with strong oxidants in such as hydro peroxide in basic solution gives fluorescent purines. A same purine derivative was found in the reaction mixture of PPs and PST after mild incubation in neutral aquatic solution. Addition of PPs to neutral phosphate buffer reduced oxidation-reduction potential of the solution, and enhanced the oxidation-degradation of PST. These findings indicate that oxidized PPs react with PST, or PPs act as effective catalysts to oxidize PST by dissolved oxygen.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：麻痺性貝毒 ポリフェノール 酸化還元電位 酸化分解 没食子酸

1. 研究開始当初の背景

麻痺性貝毒(PSP)は、有毒渦鞭毛藻が生産する強力な神経毒である。植物プランクトンを餌とする二枚貝等の filter feeders は時に高濃度の PSP を蓄積し、ヒトの食中毒を引き起こす。PSP はサキシトキシン(STX)とその類縁体の総称であり、いずれも水溶性で中性付近では加熱に安定である。したがって、毒化貝をスープにした場合には、汁のみで致命的な中毒が起こり得る。貝毒被害を抑制するためには、毒化貝の効果的な除毒法や、中毒に対する治療薬等の開発が必須であるが、いずれも現状では手がかりすら得られていなかった。

2. 研究の目的

11 位が還元された STX 群は、化学的に安定で毒性が強く、かつ毒化貝に長期に渡って残存する。筆者はこれまでの研究で、ワインや果汁、茶などの植物抽出液中でインキュベーションすると、これら 11 位還元型の PSP 成分が消失する現象を見出し、毒を消去する成分の本体がこれら植物に含まれるポリフェノール(PPs)であることを確認している。本研究では、毒を効率よく消去することのできる PPs の探索を行うとともに、PPs による毒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

(1) デカルバモイルサキシトキシン標準毒の調製

岩手県沿岸で有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の発生に伴って毒化したホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の中腸腺を、希塩酸で熱浸抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Toyopearl Super Q 各カラムクロマトグラフィーで処理して C トキシン群(C1+C2)を分離した。C1C2 の混合標品を 10%のメルカプトエタノールを含む中性リン酸緩衝液中で加熱処理し、生じたデカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)を Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーにより分離して、以下の実験に使用した。

(2) 種々の植物抽出液およびポリフェノール標品による毒の分解

種々の植物の葉や根茎、果実等の凍結乾燥粉末を、中性リン酸緩衝液にそれぞれ終末 1% になるように懸濁した。これらの溶液に終末で 20 μ M となるように dcSTX を混合し沸騰浴中で 5 分間煮沸した。煮沸前後の毒残存量を蛍光 HPLC 法(Oshima, 1995)で定量した。次に、没食子酸(GA)や 2,4-, 3,5-等 2 個のヒドロキシベンゼン環上に配置したジヒドロキシ安息香酸等のモデル化合物を用いて同様に処理し、dcSTX 分解能を調べた。

(3) ポリフェノールと毒の反応生成物の確認

凍結乾燥した dcSTX(1 μ mol)を、0.5%(w/v)の没食子酸プロピルを含む中性リン酸緩衝液中で 5 分間、沸騰浴中で加熱した。これとは別に、既報(Wong et al., 1971)の方法に従って同量の dcSTX を 0.1%NaOH を含む 1%過酸化水素中 5 分間加熱して dcSTX の酸化分解物であるプリン誘導体を調製し、没食子酸プロピルとの反応で得られた生成物との異同を四重極 MS/MS(API-2000)のプロダクトイオンモードを用いて検討した。ポリフェノールとの反応により、PSP 成分の構造を保持している未知の誘導体が生じている可能性も否定できないため、HPLC 蛍光法に加え、筆者らが開発した PSP 成分定量用の ELISA キットを用いて反応生成物を分析した。

(4) ポリフェノールによる毒の分解反応の濃度および pH 依存性

赤ワインを中性リン酸緩衝液に対し種々の混合比で希釈した溶液中に、dcSTX を添加して 5 分間煮沸し、残存する dcSTX を蛍光 HPLC 法で定量した。次に、種々の濃度の没食子酸(GA)を含む中性リン酸緩衝液中で dcSTX を加熱処理し、同様に分析した。別途調製した赤ワイン希釈液および GA 水溶液の酸化還元電位(ORP)を、ラコムテスター ORP 計(アズワン)を用いて測定した。さらに 0.5mM の GA を含む種々の pH の水溶液中に、終末で 50 μ M となるように dcSTX を添加して同様に処理し、毒の分解能を検討した。

4. 研究成果

(1) 植物抽出液およびポリフェノール標品による毒の分解

種々の植物試料の dcSTX に対する作用を検討したところ、紅茶、ウーロン茶、赤ワイン、タラの芽、レタス等の懸濁液中で dcSTX の顕著な減少が確認された。またヒジキやアラメ等、海藻類の懸濁液中でも、dcSTX の減少がみられた。一方、ブドウ(巨峰)や柑橘類(イヨカン)の場合、皮は dcSTX の分解能を示すのに対して、果実にはほとんど効果が確認されなかった。本実験で毒分解能が確認された陸上植物や藻類には、GA の重合体もしくは縮合体を主成分とする種々の PPs が含まれている。そこで次に GA 標品を用いて同様の試験を行ったところ、顕著な毒の分解能が確認された。没食子酸プロピルなどの誘導体も同様の効果を示した。一方、PPs のモデル化合物として使用したジヒドロキシ安息香酸類の溶液中では、dcSTX は少量しか減少しなかった(図 1)。

(2) ポリフェノールと毒の反応生成物の確認

PSP 成分はいずれも塩基性水溶液中では不安定であり、過酸化水素や過ヨウ素酸で酸化されて無毒の蛍光プリン体に変化する。没食子酸プロピルを含む中性水溶液中で dcSTX をインキュベートしたところ、dcSTX の減少に

伴って、対応する蛍光プリン体が生じることを MS/MS 上で確認した。一方、dcSTX が完全に消失した反応生成物中には ELISA で PSP 様成分は検出されず、加えた dcSTX の全量が蛍光プリン体に変化しているものと考えられた。この結果は PPs 溶液中で dcSTX が酸化分解されていることを意味する。すなわち毒の分解には反応混合溶液中に含まれる酸化型の PPs が作用していることが強く示唆された。

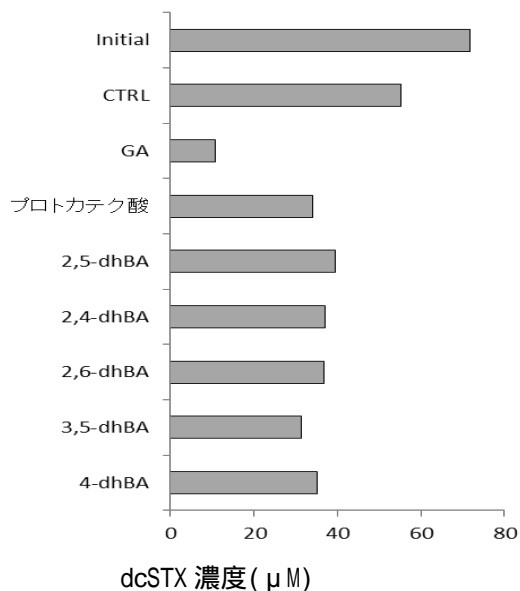


図 1 没食子酸 (GA) およびジヒドロ安息香酸 (dhBA) を含む中性水溶液中での dcSTX 残存量

(3) ポリフェノールによる毒の分解反応の濃度および pH 依存性

GA の毒分解能は中性付近で大きく、pH3 付近の弱酸性では効果は確認できなかった。最も高濃度 (25%) の中性ワイン溶液、およびこれを 5 倍程度まで希釈した溶液中で加熱した場合には、dcSTX (イニシャル 50 μM) の分解量は 20 ~ 30 μM 程度でほぼ横這いであった。ワインをさらに希釈した溶液では、ワインの濃度低下につれ毒の分解量も減少した。ワインのかわりに GA 溶液中で dcSTX の分解量を調べた場合でも、同様の傾向が認められ、1 μM の GA を含む水溶液中では 1 μM の dcSTX が消失した (図 2)。ORP は 25%ワイン (中性) で 130mV、5%ワインで 155mV、5mM の GA 溶液で 119mV であり、ワインおよび GA 濃度の低下に伴って ORP は増加し、PPs が含まれない中性リン酸緩衝液では 320mV であった。ORP が最も高い中性リン酸緩衝液単体では dcSTX はほとんど分解されないことを考え合わせると、GA やワインの PPs による毒の分解機構は以下のような 2 段階で進行するものと考えられる。1) 中性水溶液中に溶存する酸素が PPs を酸化する。2) 酸化型 PPs が毒を酸化分解する。2) の反応で酸化型 PPs が還元型 PPs に戻るので、PPs が反応系中の酸素による毒

分子の酸化分解を触媒していることが明らかとなった (図 3)。

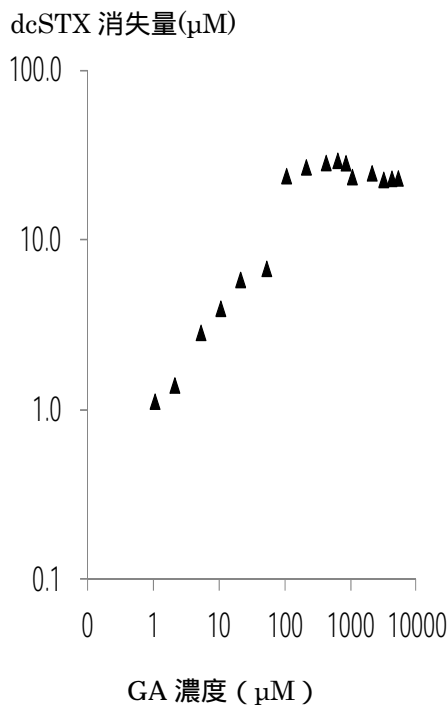


図 2 種々の濃度の没食子酸 (GA) 中性水溶液中、5 分間の煮沸によって消失する dcSTX 量

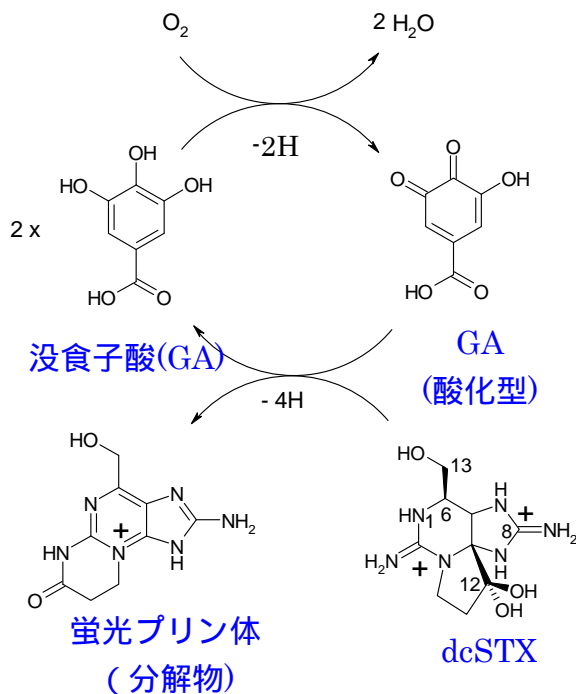


図 3 ポリフェノールによる毒の分解機構

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sato S, Takata Y, Kondo S, Kotoda A, Hongo N, Kodama M (2014): Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. J. AOAC Int. 97: 339-344.

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし