

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658175

研究課題名（和文） ドウモイ酸の起源と考えられる細菌成分

研究課題名（英文） Domoic acid-binding substance found in bacteria isolated from causative diatom of domoic acid

研究代表者

児玉 正昭（ Masaaki Kodama ）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：40050588

研究成果の概要（和文）：ドウモイ酸（DA）は紅藻ハナヤナギに見出された駆虫効果を持つ成分である。一方この物質は 1980 年代にカナダで発生した新規の食中毒の原因物質であることが明らかにされた。貝の毒化は *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の大量発生時に起こり、その際採集された *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の培養細胞にも DA 認められたことから同種が DA 生産藻であることが明らかにされている。一方、*Pseudo-nitzschia* 属珪藻の光学顕微鏡による同定は困難であり、従って同種の発生と貝の毒化の関連は明らかではない。筆者らは DA に対する抗体を開発して海水中のプランクトン試料中の DA 量と貝の毒化の関係を調べ、貝の毒化がプランクトンに毒が認められた後約 1 週間後に起こることを認めた。このことはプランクトン中に DA の前駆物質が存在し、貝に取り込まれた同物質が時間をかけて貝の体内で毒を遊離することを示唆する。本研究では毒を構成成分とする物質の存在を抗体との反応で検出する方法で調べ、同物質が毒化貝に含まれることを示した。同物質の詳しい性状の解明は今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：研究成果の概要（英文）：Domoic acid (DA) is a compound with anthelmintic activity which was identified for the first time in a red algae *Chondria armata*. On the other hand, DA was found to be the causative toxin for Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) that was first recognized in Canada in 1978. Accumulation of DA in shellfish was observed during the bloom of *Pseudo-nitzschia multiseries*, Thus this species was considered to be the causative species. Soon it was confirmed by culture experiment. Now several species of *Pseudo-nitzschia* are considered to be the causative species. The species identification of *Pseudo-nitzschia* spp. is usually performed by electron microscope. Thus it is impossible to know relation between DA accumulation and bloom of toxic *Pseudo-nitzschia* species. We developed an ELSA for DA and tried to survey the relation between the DA level in plankton samples and that accumulated in the shellfish. Interestingly, the DA level of shellfish did not increase during when significant level of DA was observed in plankton samples. In contrast, DA of shellfish increased much around 1 week after DA in plankton samples disappeared. These facts strongly suggest the occurrence of DA-binding substance in plankton cells. -DA may be released when the DA-binding substance was digested by the shellfish. In the present study, we could show the possible occurrence of the DA-binding substance in bivalve that accumulates high level of DA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：水産化学

科研費の分科・細目：

キーワード：ドウモイ酸、海洋細菌、抗ドウモイ酸抗体

### 1. 研究開始当初の背景

ドウモイ酸 (DA) は紅藻ハナヤナギの持つ駆虫成分としてわが国で見出された物質であるが、1970年代にカナダで発生した大規模な貝による食中毒の原因毒素として同定され注目を浴びた物質である。この中毒は通常の食中毒の症状に加え、重症の場合は記憶喪失を伴う点で特徴的で記憶喪失性貝中毒と命名され注目を集めた。起源生物は貝のえさとなる珪藻で、*Pseudo-nitzschia* 属に属する数種の珪藻が DA 生産能を持つことが明らかにされている。わが国では記憶喪失性貝中毒発生の記録はないが、DA 生産能を持つ *Pseudo-nitzschia* 属はわが国にも広く分布する。申請者のグループは岩手県大船渡湾にも DA 生産種とされる *P. multiseries* を認め同種の培養細胞に DA を検出したが、同種を捕食していると思われるホタテガイからは全く DA は検出できなかった。一方申請者らは熱帯域の貝類の DA を精査し、DA が *Spondylus* 属の貝に特異的に多量に蓄積される現象を認めた。そこで *Spondylus* 属の貝類が多く生息するベトナム、ニャフー湾をフィールドに海水中の DA 量と貝に蓄積する DA 量を調べた。その結果貝の DA の増加は海水中のプランクトンネット試料中の DA 量が検出された後約 1 週間後に増加する現象を認めた。この現象は数回の調査において常に認められ、*Spondylus* の毒化はプランクトン中の DA が単に蓄積するものではなく、プランクトンあるいはこれと共生する細菌が持つ DA 関連物質が貝の体内で DA に代わることによるのではないかと考えた。

*Pseudo-nitzschia* の DA 生産量は環境中の細菌の存在により大きく左右される。すなわち、高度の毒生産が認められる単種培養を無菌化すると DA 生産は殆どみられなくなるが、この無菌株に元の培養に存在した細菌を再導入すると DA 生産は復活し、最初の生産量をはるかに超える場合もある。この事実は、海洋細菌には DA を構成成分とする生体成分を持つものが存在し、これら細菌が *Pseudo-nitzschia* の細胞内に入りこみ消化される過程で、同成分から DA が遊離されるのではないかとこの考え方を支持する。

### 2. 研究の目的

*Pseudo-nitzschia* の DA 生産量は環境中の細菌の存在により大きく左右される。すな

わち、高度の毒生産が認められる単種培養を無菌化すると DA 生産は殆どみられなくなるが、この無菌株に元の培養に存在した細菌を再導入すると DA 生産は復活し、最初の生産量をはるかに超える場合もある。申請者はこの問題を追究し、海洋細菌には DA を構成成分とする生体成分を持つものが存在し、これら細菌が *Pseudo-nitzschia* の細胞内に入りこみ消化される過程で、同成分から DA が遊離されるのではないかと考えている。本研究の目的は、海洋細菌の持つ DA を構成成分とする生体成分を明らかにし、この考え方に科学的根拠を与えることである。

### 3. 研究の方法

本研究では *P. multiseries* あるいは同種と共存する細菌中に他分子と結合した状態の DA の存在を想定している。DA は 242nm に吸収極大を持つが、この吸収だけで DA の同定は不可能である。そこで Fig. 1 に示す方法で DA を hapten とする抗原を作成し、これをウサギに免疫して DA に対する特異抗体を作製し、DA と結合した物質が細菌あるいは貝類に存在するかを調べた。

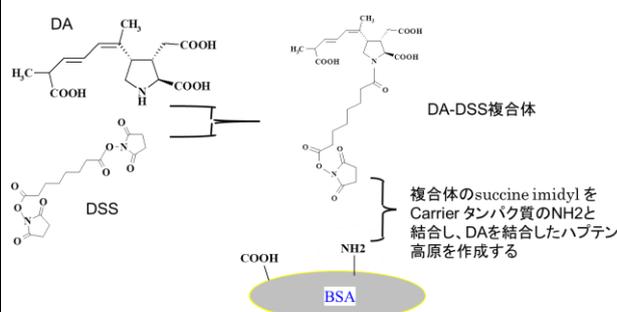


Fig. 1. ドウモイ酸をハプテンとする抗原の作製

### 4. 研究成果

#### 1. DA に対する特異抗体の作製

Fig. 1 に示すように DA はイミノ基を持つ。そこでこのイミノ基とタンパク質のアミノ基を 2 価性の架橋剤 disuccinimidyl suberate (Pierce) で結合した複合体 (Fig. 1) をハプテン抗原とし、これをウサギに免疫して抗血清は Fig. 2 に示すように DA に特異的に反応し、構造が類似した他の化合物には反応しなかった。

#### 2) 抗体の DA の種々の誘導体との反応

DAにはその共役ジエン構造による複数の誘導体が存在するが、毒性の殆どはDAのみが強い毒性を持つことが知られている。これまでの研究では貝あるいは*Pseudo-nitzschia*に蓄積する誘導体の含量はDAに比し著しく低いことが明らかにされているが、今後の研究の基礎データとするため得られた抗体の各種誘導体との反応を調べた。DA誘導体は鹿児島で採取したハナヤナギ *Chondria armata* より分離したものを Canada から販売されている HPLC 用標品を用いて定量した。Fig.3 に得られた精製標品の HPLC 分析結果を Canada より入手した標品と合わせて示す。この結果は得られた標品が HPLC 的に pure であることを示す。

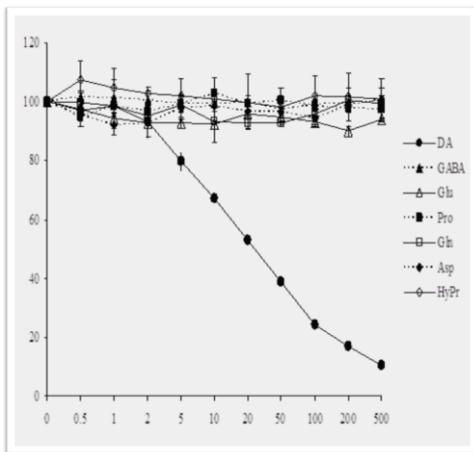


Fig.2 ドウモイ酸の構造類似化合物と抗ドウモイ酸抗体との反応

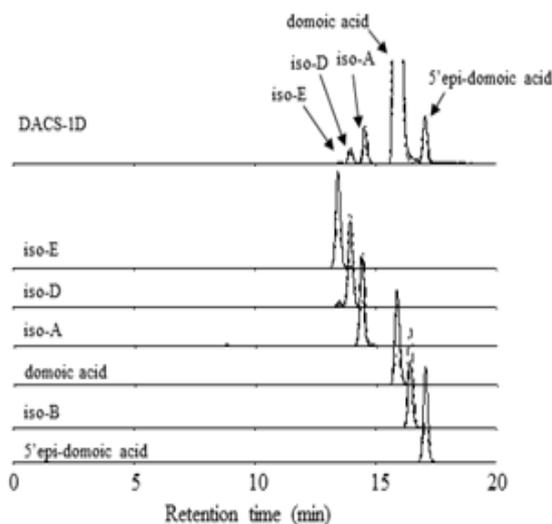


Fig. 3. 紅藻ハナヤナギより分離した DA 異性体の HPLC 分析

### 3) 抗体と種々の誘導体との反応

Fig. 3 に得られた抗体とハナヤナギより分離した種々の DA 異性体との交叉反応を調べた結果を示す。

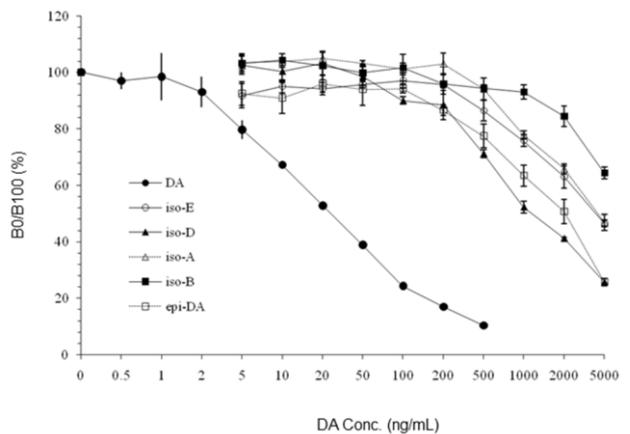


Fig. 4. 抗 DA 抗体と DA の種々の異性体との交叉反応

用いた DA 異性体の抗体との反応は DA に比し著しく低かったが、高濃度では抗体との反応が認められた。この事実は、本抗体を用いる ELISA では異性体の存在は事実上無視できると考えられた。

### 2. DA で毒化した *Spondylus* 抽出物中の DA を結合している未知成分

DA を蓄積した *Spondylus* 抽出物を DA 分析用 HPLC に付し 242nm でモニターしながら HPLC 溶出液を 1ml ずつ分取し、各画分の DA を ELISA で分析した。

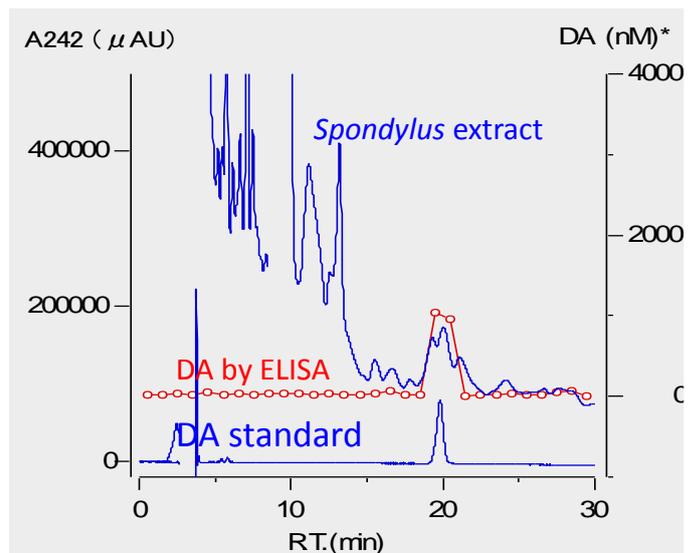


Fig. 5. *Spondylus* 抽出物の HPLC および ELISA による分析

Fig. 5に *Spondylus* sp.の抽出物を HPLC で分析した結果を DA 標品の分析結果とともに示す。RT20分弱のところに DA が溶出し、少し遅れて ELISA と反応する未同定のピークが観察された。HPLC 上で分取した各画分を ELISA で分析したところ、上記の 2つのピークが陽性を示した。上記 2つのピークのうち最初のピーク物質を再度 HPLC に付したところ DA が検出されたが、遅れて溶出するピークには DA はほとんど観察されなかった。この結果は遅れて溶出する物質が DA を結合した未知の DA 関連成分であることを示唆する。HPLC で分取した両者の画分の UV スペクトルを測定したところ、Fig. 6 に示すように DA に特徴的な吸収以外の吸収は認められなかった。

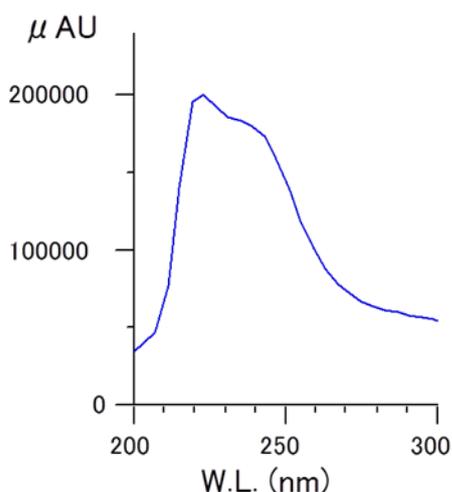


Fig. 6. *Spondylus* に認められた DA 関連物質と思われる成分の UV spectrum

この結果は DA 蓄積した二枚貝が DA 以外の DA 関連化合物を合わせ持つことを示唆する。本化合物はスペクトルからタンパク質ではなく、何らかの物質が DA と結合したものと考えられる。本画分を濃縮しタンパク質と同様の方法でセルロースアセテート膜にドットブロットし抗体で染色したところ陽性反応が得られた。この結果は本成分が DA を結合した高分子物質であることを強く示唆する。

以上本研究の結果は予備的にはあるが、DA を蓄積した二枚貝には誘導体とは異なる未知の DA 関連物質が含まれることを示すものである。

#### 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)

該当なし

[雑誌論文] (計 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

児玉 正昭 (Masaaki Kodama)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号: 40050588

##### (2) 研究分担者

潮 秀樹 (Hideki Ushio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 50251682

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: