

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510291

研究課題名(和文) ホタテ貝中で進行する下痢性貝毒オカダ酸の構造変換

研究課題名(英文) Structural transformation of a diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, in scallops

研究代表者

此木 敬一 (Konoki, Keiichi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40292825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒の一種、貝毒は、有毒プランクトンを摂取したホタテガイなどの食用二枚貝が毒化する現象である。可食部の有毒物質の濃度が規制値を越えると出荷が規制され、養殖業が被害を受ける。本研究では、下痢性貝毒であるオカダ酸(OA)という物質に注目し、二枚貝の解毒に関与すると推定されるOAの構造変換を調べた。その結果、1) OAの構造変換が人で言うならば「肝臓」に相当する「中腸腺」という臓器で進行する酵素反応であること、2) 本構造変換が二枚貝の種類を問わず進行すること、3) 試験管内で行った構造変換の収率は最大で1%前後であり、この変換酵素を精製するために新たな方法論の開発が必要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Shellfish poisoning is one of food poisoning that has causes financial breakdown the aquaculture industry. When the concentration of toxic substance synthesized by a specific type of plankton is beyond the regulated level, shipping of bivalves is stopped. Thus, it is important to elucidate a mechanism of the detoxification in bivalves. In this study, we studied a structural transformation of okadaic acid, a diarrhetic shellfish toxin, because the transformation was considered to be a key reaction for the detoxification. The results of our research study are 1) the structural modification proceeds only in the digestive gland of bivalve species; 2) the enzyme might be a membrane protein identified in the microsomal fraction; 3) the structural modification proceeds in various bivalve species.

研究分野：天然物化学

キーワード：下痢性貝毒 解毒機構 オカダ酸 変換酵素

### 1. 研究開始当初の背景

食中毒の一種、貝毒は、有毒プランクトンを摂取した食用二枚貝が毒化する現象である。日本では主に、麻痺性貝毒と下痢性貝毒が季節や場所によって発生し、可食部の有毒物質濃度が法律で定められた規制値を越えると出荷が規制され、養殖業が被害を受ける。麻痺性貝毒の主要原因毒は渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属が生産するサキシトキシンおよびその類縁体であり、下痢性貝毒の主要原因毒は渦鞭毛藻 *Dinophysis* 属もしくは *Prorocentrum* 属が生産するディノフィシストキシン1、オカダ酸である(図1)。

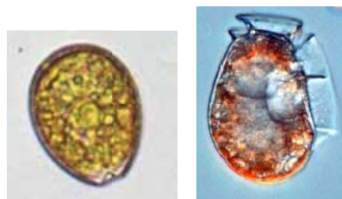


図1. オカダ酸生産性渦鞭毛藻.(左) *Prorocentrum lima* (右) *Dinophysis fortii* .

文字通り、サキシトキシン類は麻痺性をもたらす、ディノフィシストキシン1は下痢性をもたらす。いずれの食中毒も死亡者を生み出していないが、熱処理を施しても毒性が消失しないことが厄介であり、出荷規制の措置以外、対処のしようがない現実である。出荷前の食用二枚貝についても積極的な解毒方法は見出されておらず、有毒物質濃度が時間とともに減衰するの待つという受動的な方法に従っている。

### 2. 研究の目的

本研究は、*Dinophysis* 属や *Prorocentrum* 属の渦鞭毛藻(有毒プランクトン)により生産されるディノフィシストキシン1やオカダ酸が食用二枚貝中で酵素の働きにより低毒性の誘導体に変換される反応(構造変換: 図2)に注目し、その機構解明を目指した研究である。

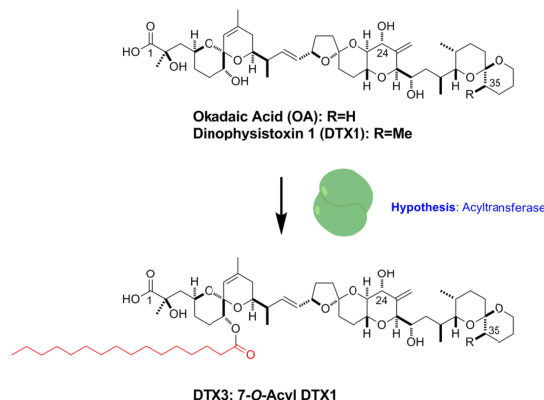


図2. 食用二枚貝の体内で進行する下痢性貝毒(オカダ酸(OA); ディノフィシストキシン1(DTX1))の構造変換. 生成物は出発物質に限らず、また、修飾する脂肪酸の種類に因

らず、ディノフィシストキシン3(DTX3)と呼ばれる。

この構造変換は、食用二枚貝が有する解毒機構と考えられており、より積極的に解毒をすすめられる食用二枚貝の創出、あるいは有毒物質を蓄積しない食用二枚貝の創出に繋げて行ければ、社会に与える貢献度は測りきれないと考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) スーパーマーケットで購入した新鮮なホタテガイ、マガキ、シジミ等の二枚貝を各々、臓器ごとに摘出し、緩衝液でホモジナイズした後、遠心分離処理を二回行い、ミクロソーム(器官)画分を得た。このミクロソーム画分とパルミトイルコエンザイムA(脂肪酸源)ならびにOAを試験管内で混合し、OAの7位水酸基がパルミトイル化されたエステル体7-O-パルミトイルオカダ酸(7-O-Palmitoyl OA; 通称、DTX3)の生成を確認した。

(2) 鈴木ら(Suzuki, T. et al., *Fish. Sci.* **2009**, 75, 1039-1048.)の手法を参考に、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)条件でLC-MS/MS測定を行った(質量分析計: API2000)。その際、プリカーサーイオンとして803、プロダクトイオンとして255を選択してOAを検出し、同じくプリカーサーイオンとして1041、プロダクトイオンとして255を選択して7-O-Palmitoyl OA(DTX3)を検出した。

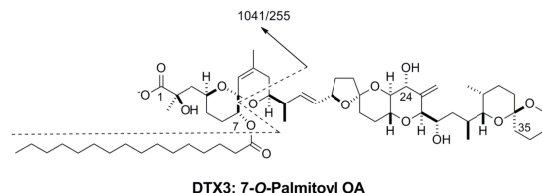


図3. MRM条件で7-O-パルミトイルオカダ酸(7-O-Palmitoyl OA(DTX3)), プリカーサーイオン:  $m/z$  1041)を検出するために利用するプロダクトイオン( $m/z$  255)。

### 4. 研究成果

(1) スーパーマーケットで購入した新鮮なホタテガイの中腸腺より調製したミクロソーム(器官)と、パルミトイルコエンザイムA(脂肪酸源)ならびにOAを試験管内で混合したところ、約1%の収率でOAに脂肪酸が縮合した誘導体への生成が確認された(図4)。

(2) (1)で観測したOAの構造変換が人と言うならば「肝臓」に相当する「中腸腺」という臓器のみで進行することを明らかにした(図4)。

(3) 本構造変換が二枚貝の種類を問わず進

行する普遍的な反応であることを明らかにした。

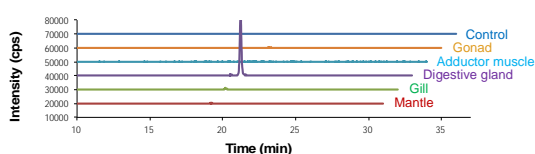


図4．ホタテガイの生殖腺 (Gonad)、貝柱 (Adductor muscle) 中腸腺 (Digestive gland)、えら (Gills)、外套膜 (Mantle) の各臓器より調製したマイクロソーム画分を用いて行ったオカダ酸 (OA) の構造変換・生成物である 7-O-パルミトイルオカダ酸 (図3) を MRM 条件 (プリカーサーイオン:  $m/z$  1041; プロダクトイオン:  $m/z$  255) で行った LC-MS/MS 測定にて定量した。

(4) 本構造変換は高分解能を有する質量分析計で確認されたが、別途、実施した変換酵素の分画実験の結果、変換酵素が膜タンパク質であることがわかったため、質量分析に替わる別の方法を考案する必要が生じた。それは、膜タンパク質の精製の際に避けて通れない「界面活性剤」の使用により、質量分析の感度が顕著に低下することが知られているためである。したがって、の変換酵素を精製するために新たな方法論の開発が必要であることがわかった。

(5) 界面活性剤の共存下でも検出に利用できる蛍光分析法を利用し、本変換反応の検出を試みる計画を立てた。そのため、本変換反応の後、蛍光色素による修飾が可能な各種脂肪酸誘導体を (1) で説明したパルミトイルコエンザイム A の代わりに用いることとした。

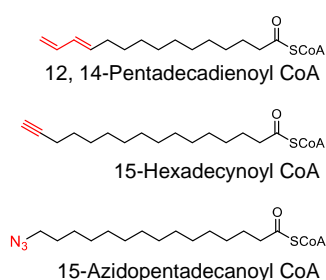


図5．蛍光色素による修飾が可能な脂肪酸コエンザイム A エステル (ケミカルプローブ)

代わりに用意した三種類の脂肪酸誘導体 (図5) はケミカルプローブとして、OA の構造変換を司る酵素の基質となりうるということがわかったが、酵素反応の収率が低いため、蛍光色素による誘導化を経た化合物の検出が困難であることも判明した。

(6) (5) の結果を受け、再び (1) の段階に戻り、当該変換反応の収率を向上させる

最適化の必要性を考えている。

## 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)

- (1) 此木敬一, 古用幸愛, 岡田華弥, 小野田竜也, 小濱真実, 松浦宏樹, 長由扶子, 渡邊龍一, 加賀新之助, 鈴木敏之, 山下まり, クロイツカイメンおよびホタテガイによる下痢性貝毒の蓄積機構、第56回天然有機化合物討論会要旨集, pp.453-458 (2014). (査読なし)
- (2) Keiichi Konoki, Tatsuya Onoda, Ryuichi Watanabe, Yuko Cho, Shinnosuke Kaga, Toshiyuki Suzuki, and Mari Yotsu-Yamashita, *In vitro* acylation of okadaic acid in the presence of various bivalves' extracts. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 300-315. (doi:10.3390/md11020300) (査読あり)
- (3) Keiichi Konoki, Tatsuya Onoda, Sachie Furumochi, Yuko Cho, Mari Yotsu-Yamashita, Takeshi Yasumoto, The binding of okadaic acid analogues to recombinant OABP2.1 originally isolated from the marine sponge *Halichondria okadai*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5833-5835. (doi:10.1016/j.bmcl.2013.08.099) (査読あり)

[学会発表] (計13件)

2014年度

- (1) 古用幸愛、小野田 竜也、長 由扶子、山下まり、此木敬一、「ホタテガイ中で進行する下痢性貝毒オカダ酸の構造変換および変換酵素の単離を目指すケミカルバイオロジー」(口頭) 日本農芸化学会 2015年度岡山大会 (岡山大学、岡山市、2015年3月28日)
- (2) 此木敬一、「天然毒を貯蔵する生物が獲得した解毒機構」(口頭) 第2回天然物化学研究会 (東京農業大学、世田谷区、2014年11月21日)
- (3) 此木敬一, 古用幸愛, 岡田華弥, 小野田竜也, 小濱真実, 松浦宏樹, 長由扶子, 渡邊龍一, 加賀新之助, 鈴木敏之, 山下まり, 「クロイツカイメンおよびホタテガイによる下痢性貝毒の蓄積機構」、第56回天然有機化合物討論 (高知県立県民文化ホール、高知市、2014年10月15-17日)

- (4) 岡田華弥、長由扶子、山下まり、此木敬二、「クロイソカイメン (*Halichondria okadai*) 共生菌からの有用物質探索」(口頭)、平成 26 年度日本農芸化学会北海道・東北合同支部大会(北海道大学、札幌市、2014 年 9 月 22-23 日)
- (5) 古用幸愛、小野田竜也、長由扶子、山下まり、此木敬二、「ホタテガイ中のオカダ酸アシル化酵素の探索」(口頭)、平成 26 年度日本農芸化学会北海道・東北合同支部大会(北海道大学、札幌市、2014 年 9 月 22-23 日)

2013 年度

- (1) 岡田華弥、小野田竜也、長由扶子、山下まり、此木敬二、「オカダ酸貯蔵生物が獲得した生理機能」(ポスター)、第 8 回化学生態学研究会(湯の川プリンスホテル渚亭、函館市、2013 年 6 月 28-29 日)
- (2) 此木敬二、古用幸愛、小野田竜也、長由扶子、山下まり、ホタテ貝中で進行する下痢性貝毒オカダ酸のアシル化反応(口頭)、日本農芸化学会 2014 年度大会、(明治大学、川崎市、2014 年 3 月 27-30 日)
- (3) Keiichi Konoki, "Physiological Function Acquired by Diarrheic Shellfish Poisoning-Accumulating Species" (poster), The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity (Pacifico Yokoyama, Yokohama, Japan, Oct 28-29, 2013)
- (4) 此木敬二、「クロイソカイメンおよびホタテ貝による下痢性貝毒の蓄積機構」、日本農芸化学会東北支部第 148 回大会(岩手大学、盛岡市、2013 年 10 月 26 日)
- (5) Keiichi Konoki, Tatsuya Onoda, Ryuichi Watanabe, Sachie Furumochi, Yuko Cho, Shinnosuke Kaga, Toshiyuki Suzuki, Mari Yotsu-Yamashita, "In vitro acylation of okadatic acid in the presence of various bivalves' extracts (poster), International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch Chemical Society of Japan (Tohoku University, Sep 28-30, 2013)

- (1) 小濱真実、岡田華弥、西谷豪、長由扶子、山下まり、此木敬二、「クロイソカイメン中でオカダ酸およびオカダ酸結合タンパク質 OABP2 を生産する生物の探索」(口頭)、日本農芸化学会 2013 年度大会(東北大学、仙台市、2013 年 3 月 24-28 日)
- (2) 小野田竜也、渡邊龍一、長由扶子、加賀新之助、鈴木敏之、山下まり、此木敬二、「下痢性貝毒貯蔵生物における自己体制機構の探索」(口頭)、日本農芸化学会 2013 年度大会(東北大学、仙台市、2013 年 3 月 24-28 日)
- (3) 此木敬二、ホタテ貝中の下痢性貝毒耐性機構 第 59 回トキシシンポジウム(とかちプラザ、帯広市、2012 年 8 月 30-31 日)(口頭発表)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

此木 敬一 (KONOKI, KEIICHI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：40292825

(2) 研究分担者

該当者不在

(3) 連携研究者

該当者不在