

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 28 年度分担研究報告書

デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

研究分担者 大城 直雅 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 佐藤 繁 北里大学海洋生命科学部応用生物化学講座
協力研究者 國吉 杏子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

麻痺性貝毒はサキシトキシン(STX)とその誘導体の総称である。これまでに毒化貝や原因微細藻から 20 を超える関連成分が分離されている。代表的な成分である STX は、現在、「化学兵器の開発、生産、貯蔵及び使用の禁止並びに廃棄に関する条約」(通称「化学兵器禁止条約」)の国内実施法である「化学兵器禁止法」(平成 7 年 4 月 5 日法律第 65 号)に規定される特定物質であり、その製造、使用は著しく困難な状況にある。デカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)は STX と同様、化学的に安定で比毒性が高く、STX の代替標準毒の第一候補とされているが、毒化貝や原因微細藻にはほとんど含まれておらず、その確保が急務となっている。我々は 11 位に硫酸エステルをもつゴニオトキシン(GTX)群麻痺性貝毒成分が 2-メルカプトエタノールと塩基性条件下で安定な結合体を形成することを応用し、日本沿岸で発生する麻痺性貝毒の主成分であり毒化した二枚貝から多量に確保できるゴニオトキシン(GTX)群を出発物質として、高収率で大量の dcSTX を調製する方法を確立した。

A. 研究目的

麻痺性貝毒(paralytic shellfish poisons, PSP)はサキシトキシン(STX)とその関連成分の総称である。これまでに毒化した貝や産生微細藻から 20 を超える関連成分が分離され、その構造が決定されている。PSP の代表的な成分である STX は、長年マウス毒性試験法(Sommer and Mayer, 1937)や ELISA など、種々の PSP 検査法の比較標準毒として使用されてきた。STX は現在、「化学兵器の開発、生産、貯蔵及び使用の禁止並びに廃棄に関する条約」(通称「化学兵器禁止条約」)の国内実施法である「化学兵器禁止法」(平成 7 年 4 月 5 日法律第 65 号)に規定される特定物質であり、その製造、使用は著しく困難な状況にある。デカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)は STX と同様、化学的に安定で比毒性が高く、STX の代替標準毒の第一候補とされているが、毒化貝や原因微細藻にはほとんど含まれておらず、その確保が急務となっている。現在のところ dcSTX は有毒ラン藻を培養して得られる C1、C2 を、数段階の反応を経て変換することにより調製され

ている(Watanabe et al., 2011)。この方法では、dcSTX のほか、ゴニオトキシン(GTX)2、GTX3 および GTX5 などの様々な成分の HPLC 分析用標準毒が得られる反面、マウス毒性試験用などで必要となる dcSTX を多量に確保するには不向きである。我々は、日本沿岸で発生する PSP の主成分であり毒化した二枚貝から多量に確保できる GTX 群を出発物質とし、GTX 群が 2-メルカプトエタノール(ME)と塩基性条件下で安定な結合体を形成することを応用して(Sato et al., 2000)、高収率で大量の dcSTX を調製する方法を開発した(佐藤ら 2016、特開 2016-204270)。以下、この方法に従って dcSTX を大量調製する手順について報告する。

B. 研究方法

1) 試料

2015 年 7 月、および 2014 年 6 月に岩手県大船渡湾清水定点の試験筏で採取した毒化ホタテガイ(むき身 20 kg、冷凍保存)を希塩酸で熱浸抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 に

よる各カラムクロマトグラフィーを用いる常法で順次精製して GTX1 と GTX4、GTX2 と GTX3 の混合物を分離した。GTX1 と GTX4 の混合物は Sato et al. (2014) の方法に従ってヘミン/アスコルビン酸中性水溶液中で処理して GTX2 と GTX3 の混合物に変換し、再度 Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーで精製して GTX2、3 混合物 (約 450 μmol) を得た。

2) ME-STX 結合体の調製

凍結乾燥した GTX2,3 混合物 (350 μmol) を 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) 300 mL に溶解し、これに ME (和光純薬工業社製, >95%) 3 mL を添加混合して室温で一晩静置した。この ME-STX 結合体を含む反応混合物を Bio-Gel P-2 のカラムに負荷し、カラムを超純水で洗浄後、希酢酸で溶出する画分を回収し、凍結乾燥して ME-STX 結合体 (約 330 μmol) を得た。

3) ME-STX 結合体のアルカリ加水分解

ME-STX 結合体 (330 μmol) を超純水 300 mL に溶解し、5 M NaOH を滴下して pH を 12.0 に調整した。これを沸騰浴中で 17 分間加熱した後に氷冷し、500 mM リン酸を滴下して pH 7.4 に調整した。反応混合液に ME 30 mL を加えて沸騰浴中で 10 分間加熱後、Bio-Gel P-2 カラム、次いで Bio-Rex 70 カラムを用いて順次精製した。画分中の ME-STX、ME-dcSTX および dcSTX の検出には、TOF-MS (Triple TOF 5600, ABSciex) を使用した。

4) 純度の確認

調製した dcSTX の純度を確認するために、トリプル四重極型 LC-MS/MS を用いて分析した。調製された dcSTX 溶液を超純水で希釈し、以下の条件で dcSTX および関連物質の分析を行った。

【HPLC】分析カラム: InertSustain Amide (2.1 \times 75 mm、粒径 3 μm)、カラム温度: 30、移動相: 2 mM ギ酸アンモニウム-3.5 mM ギ酸溶液 (A) と、95% アセトニトリル含有 2 mM ギ酸アンモニウム-3.5 mM ギ酸溶液 (B) グラジエント: 0 min (70% B) - 2 min (70% B) - 18 min (40% B) - 23 min (40% B) 流速: 0.2 mL/min、注入量: 2 μL 。

【MS】ESI (Positive)、ドライガス: N_2 (300、5 L/min)、シースガス: N_2 (380、11 L/min)、測定モード: SIM モード (モニターイオン (フラグメンター電圧) は以下のとおり。dcSTX: m/z 257.2 (100V)、STX: m/z 300.2 (100V)、C1、

C2、GTX3: m/z 396.2 (100V)、GTX1: m/z 332.2 (125V)、GTX2: m/z 316.2 (65V)、GTX4: m/z 412.2 (125V)、dcGTX2: m/z 396.2 (100V))

C. 研究結果

ME-STX 結合体をアルカリ加水分解処理することにより ME-STX は完全に消失し、ME-dcSTX が生じることを確認した。ME-dcSTX を含む中性水溶液に過剰の ME を加えて加熱することにより、ME が脱離して生じた dcSTX を精製し、268 μmol の目的成分を得た。

精製された dcSTX 溶液は約 40 $\mu\text{g/mL}$ と LC-MS で測定するには高濃度であったため、超純水で 5,000 倍 (8 ng/mL 程度) および 10,000 倍 (4 ng/mL 程度) に希釈して LC-MS 分析に供した。その結果、両希釈用液とも SIM クロマトグラムにおいて dcSTX (m/z 257) の単一ピークが確認され、STX をはじめとする他の PSP 関連成分は検出されなかった (図 1~3)。

D. 考察

毒化二枚貝や有毒微細藻に含まれる麻痺性貝毒の常在成分 (C1, C2, GTX1~6, neoSTX, dcSTX, STX 等) は、pH 8 以上で著しく不安定となり、酸化されて無毒の蛍光プリン体に分解される。一方、11 位に硫酸エステルを持つ GTX2 や GTX3 などの成分は、種々のチオール化合物と反応し、11 位に硫黄原子を介してチオールとの結合体を形成する (Sato et al., 2000)。

我々は 1,2-エタンジチオール (EDT) や 2-メルカプトエタノール (ME) が GTX2、3 に作用して生じる結合体は塩基性条件下で著しく安定であることを見出し、ME-STX を塩基性条件下で加熱し、側鎖カーバモイル基を加水分解することにより、高収率で ME-dcSTX が得られることを明らかにした (佐藤ら 2016、特開 2016-204270)。

前述のように現在のところ dcSTX 標品は、C1、C2 を ME などのチオールで処理して得られる GTX5 を中性付近で煮沸する、あるいは C1、C2 を中性付近で煮沸して得られる dcGTX2 と dcGTX3 の混合物を ME 処理することにより調製されている。これらの方法では最終産物である dcSTX 標品に混入する微量の STX をカラムクロマトグラフィーで完全に分離することは困難である。本研究で使用した、pH 12 の水溶液中で 15 分以上煮沸する条件下では、収率は若干低下する

ものの ME-STX の carbamoyl 側鎖を完全に加水分解・脱離して、ME-dcSTX のみを得ることが可能である。さらに ME-dcSTX からは ME 処理により容易に dcSTX を回収することが出来ることを確認した。

調製された dcSTX は LC-MS (SIM) 分析によって、PSP 関連物質が含まれていないことが確認された。次年度は qNMR により純度の検定と値付けについて検討する予定である。

E. 結論

日本沿岸で毒化した貝類の主要成分である GTX 群に ME を作用させて得られる ME-STX 結合体を塩基性条件下で加水分解して、ME-dcSTX 結合体を調製し、これを過剰の ME で処理することにより、高収率で dcSTX を得る方法を確立した。次年度は引き続き dcSTX の調製を継続しつつ、qNMR による値付けを検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴, 犬童優華, 佐伯富貴, 高石鈴香: デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 2017 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴(発明者): デカルバモイルサキシトキシソ及びその類縁体の製造方法. 特開 2016-204270 (P2016-204270A), 学校法人北里研究所(出願人).

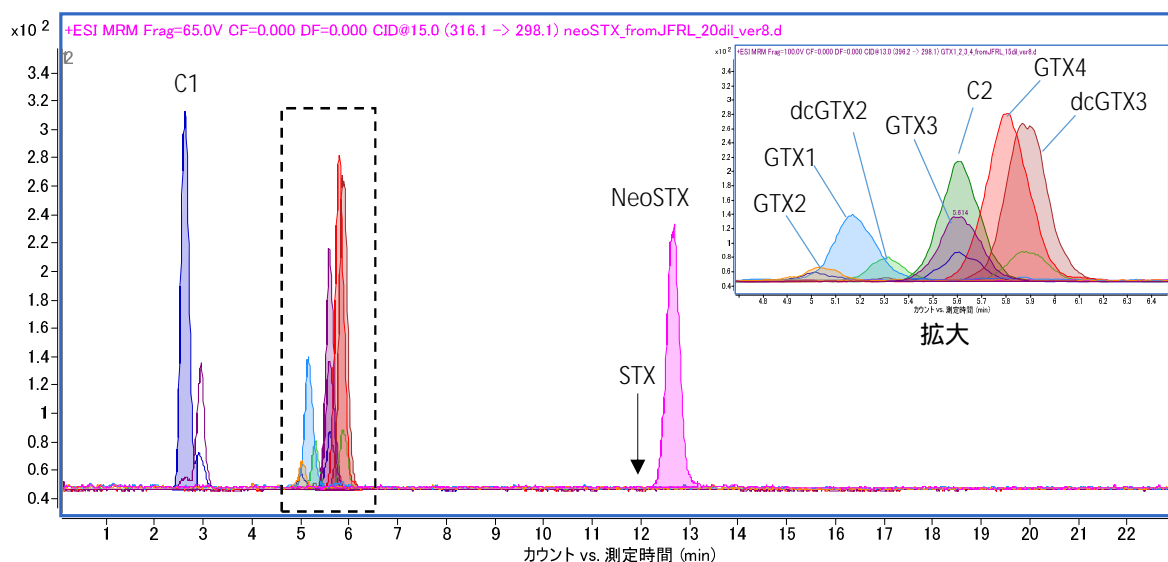


図 1. PSP 標準品の LC-MS (SIM) クロマトグラム。STX (m/z 300.2) の予想溶出位置は、文献等を参考に矢印 () で示した。

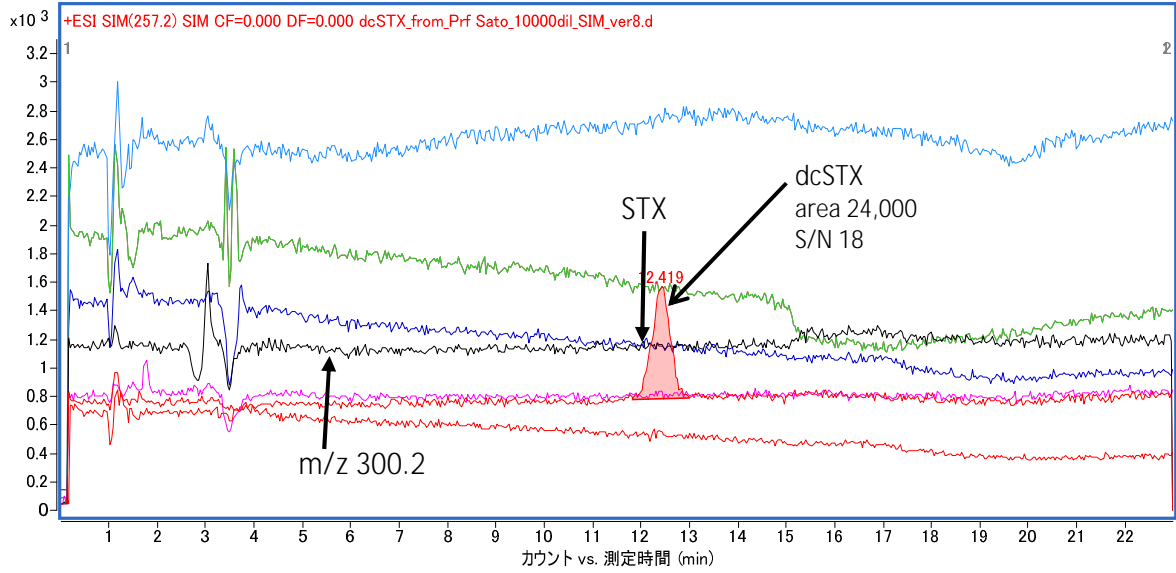


図 2 . dcSTX 調製溶液 (10,000 倍) の LC-MS (SIM) クロマトグラム。STX (m/z 300.2) の予想溶出位置は文献等を参考に示した。

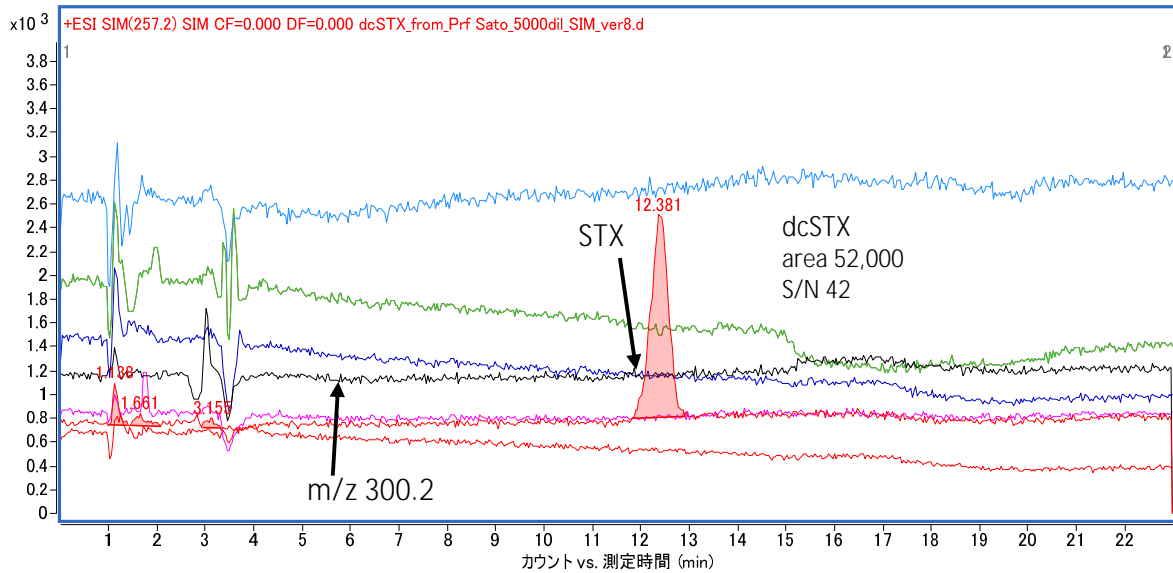


図 3 . dcSTX 調製溶液 (5,000 倍、8 ng/mL 程度) の LC-MS (SIM) クロマトグラム。STX (m/z 300.2) の予想溶出位置は文献等を参考に示した。