海洋生物毒の化学および動態に関する研究†

(1992 年度日本農芸化学会賞受賞)

安 元 健

(東北大学農学部)

わが国の食生活に占める水産食品の比重は他の先進諸国に比してきわめて高く、多様な海産物への嗜好や、芸術的な域にまで高められた調理法はわが国の食文化の基礎をなしている。また、海洋国として海洋生物および海洋環境に対する関心も深い。このような状況は食品衛生の研究にも反映され、細菌性食中毒の分野では海洋細菌のビブリオ菌による食中毒の研究で世界をリードしてきた。一方、自然毒については、フグ毒の構造決定と合成の輝かしい成果があった。しかし、輸入海産物の増加、養殖漁業の発達に伴う漁業形態の変化や食生活の多様化によって、水産食品の安全性確保は新しい時代の要請となった。そこで筆者は化学的手法を基礎に海洋生物毒を追究し、化学と生物を総合し、かつ、わが国の食生活や海洋国としての環境を生かした独自の領域の開拓を志した。まず、近年進歩の著しい分光学的手法を多用し、入手のきわめて困難な各種の毒の化学構造を微量試料で決定した。ついで、毒の化学性状に基づいた微量定量法を開発して毒性監視を容易にし、中毒発生防止および産業界の被害軽減への貢献を図った。さらに、これらの微量定量法を適用して食物連鎖や共生微生物による毒化機構を解明し、海洋生態系における毒の動態を明らかにした。また、毒の作用を追究し、生体機能解明試薬としての応用を心掛けた。主要な研究項目についての成果の概略を以下に述べる。

1. シガテラの解明

さんご礁海域では本来は無毒な多数の魚種が毒化してシガテラ (ciguatera) と呼ばれる中毒の原因となる⁽¹⁾。カリブ海産のサザエ近縁種に“cigua”と呼ばれる巻貝があり、この巻貝による食中毒の名称であったのが、後

に魚による食中毒も含めるようになったといわれる。カリブ海のみならず、太平洋やインド洋を含む広い海域で発生し、わが国でも南西諸島や伊豆諸島で発生する。症状としては下痢、嘔吐等の消化器障害と血圧降下、脈拍減少などの循環器障害に続いて知覚異常、関節痛、搔痒感などの神経症状が現れ、回復は遅いが死亡率はきわめて低い。年間患者数は2~5万に達すると推定され、自然毒食中毒としては最大規模である。公衆衛生上の対策および南方産魚類資源の有効利用の観点から、毒化機構の解明、原因毒の化学構造の決定、有毒個体検出法の開発が急務とされていた。しかしながら、ハワイ大学を中心とする多くの研究者の努力にもかかわらず、解明は遅れていた。中毒原因となる主要毒はScheuerらによって単離され、シガトキシン (ciguatoxin, CTX と略記) と命名され、分子内に多数のエーテル結合を有する化合物と推定されていた^(2,3)。しかし、有毒魚の入手難と、ppbレベルの低い毒含量のために、構造決定は遅れていた。

われわれは、まず、魚類の毒化の激しい仏領ポリネシアのガンビエル諸島に渡って毒化原因の追究を行い、海藻付着性の有毒渦鞭毛藻が毒の起源であり、食物連鎖によって各種の魚に毒が移行することを発見した⁽⁴⁾。この生物は最初は *Diplopsalis* sp. と同定されたが、後に新属新種の生物と判明し、*Gambierdiscus toxicus* と命名された⁽⁵⁾。天然に生育する *G. toxicus* からは CTX に性状が類似し、後に GT 4a, b, c と仮称された3種の毒と、マイトトキシン (maitotoxin, MTX と略記) と命名した極性の高い別種の毒が検出された。

毒の構造決定を行うために、*G. toxicus* の培養による毒の入手を試みたが、最初に培養の確立したクローンの GII 1 株では MTX しか生産しなかった。そこで有毒魚試料の入手可能な仏領ポリネシアにあるルイ・マラルデ医学研究所と共同研究を行った。まず、最も毒性の強いドクウツボを 870 尾採集し、その内臓 125 kg を抽出し

† Chemistry and Dynamics of Marine Toxins
Takeshi YASUMOTO (Faculty of Agriculture,
Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 981)

図 1 ウツボから得たシガトキシソ (1) と渦鞭毛藻から得た GT 4b (2) の構造

て 0.35 mg の CTX を得た⁽⁶⁾。同時に *G. toxicus* の天然藻体からも GT 4b を 0.74 mg 得た。それぞれ 1 mg にも満たないこの微量の毒を用いて構造決定に挑戦し、¹H-NMR スペクトルの注意深い解析と、分子力場計算とコンピュータシミュレーションによって、エーテル環が 13 個連結した複雑な構造 (図 1) を官能基の相対配置を含めて決定できた^(7,8)。この 2 種の毒の基本骨格は同一であり、分子両端での酸化の程度が異なるのみであった。その後、東北大学平間教授らが合成した部分構造と GT 4b の CD スペクトルを比較することによって、GT 4b が 5*R*, 9*S*, 10*R* の配置をとることが決定された⁽⁹⁾。また、その後に追加して得られた CTX のわずか 1.1 mg を用いて、¹³C-NMR の全シグナルを帰属した⁽¹⁰⁾。現在、CTX 以外の副成分として約 10 成分を単離し、構造解析を進めている。このような多成分の存在が中毒症状の多様性の原因であろうと推定される。

単離した CTX のマウス腹腔内投与における最小致死量は 0.35 μg/kg を示し、フグ毒テトロドキシソの約 30 倍も強い。ヒトの経口摂取による最小発症量はわずか 70 ng と推定された。このような微量の毒の検出・定量法として、分子末端にある 1 級水酸基を 1-anthroylnitrile⁽¹¹⁾ で蛍光ラベルし、HPLC で定量する条件を検討している。また、コハク酸ヘミエステルとした後に蛋白と結合させて抗原とし、免疫定量法を開発することも可能と考えている。

MTX は、中毒原因となることの多い藻食魚 (現地名 マイト) の症状が、CTX を主成分とする肉食魚による中毒症状とやや異なることに着目して発見・命名した⁽⁷⁾。

2 個の硫酸エステルを有し、分子量が 3,424 (2 Na 塩) の巨大なポリエーテル化合物である⁽¹²⁾。マウス腹腔内投与による最小致死量は 50 ng/kg であってテトロドキシソの 200 倍も強く、非蛋白性の物質としては最強の毒である。分子の両端を除くと CTX 同様にエーテル環が多数連結していると推定され、約 3 分の 1 の部分構造を推定している⁽¹³⁾。

MTX が多くの細胞系で Ca イオンの流入を引き起こすことが大泉ら⁽¹⁴⁾により発見されて以来、医化学、薬学の分野で作用の追究がなされた。解明が進めば、細胞情報伝達の新しい機構が発見されるものと期待される⁽¹⁵⁾。

G. toxicus の GII 1 株が培養では CTX 関連毒を生産しないので、ポリネシア各地で再度 *G. toxicus* を分離し、いくつかのクローンを作成した。そのなかの 1 株から新奇ポリエーテル毒 1 成分と CTX 関連化合物 2 成分を得た。この結果、*G. toxicus* が真に毒化原因生物であることが確定した。また、さんご礁の破壊によって出現した海藻が藻類付着性の有毒渦鞭毛藻の増殖をもたらし、シガテラ中毒の増加を招く機構も明らかとなった⁽¹⁶⁾。

2. 下痢性貝毒

昭和 51 年に発生したムラサキイガイによる食中毒下痢症を調査し、脂溶性区に出現する自然毒が原因であることを明らかにして下痢性貝毒と命名した⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。これまで二枚貝起源の原因不明下痢症とみなされていた症状の多くが下痢性貝毒であることが判明し、ヨーロッパでは年間 5,000 人もの患者数が記録された。二枚貝の毒

図 2 下痢性貝毒群の化学構造

化地域はわが国では東北・北海道を主としている。世界的には欧州大西洋岸、地中海、南米、北米のカナダ、豪州でも発生し、二枚貝養殖産業の脅威となっている。当初は単純な下痢症とみなされていたが、原因毒が強力な発ガンプロモーターであることが明らかにされ、公衆衛生上の懸念が指摘されている⁽²⁰⁾。貝の毒化による出荷停止期間は長期に及ぶことが多く、二枚貝養殖産業の被る被害も大きい。原因毒として基本骨格が異なる3群10成分のポリエテル化合物を決定した(図2)^(18,21-23)。第1のグループはクロイソカイメンから細胞毒性物質として単離されたオカダ酸(OA)を基本骨格とし、主要原因毒である。第2群のベクテノトキシシン類(PTX)は新奇骨格のマクロリドであり、肝臓毒性が強い⁽²⁴⁾。第3のイエットトキシシンはエーテル環が梯子状に連結したCTX様の骨格と硫酸基の存在が特徴である。カルボキシル基を有する主要成分については蛍光微量定量法⁽²⁵⁾や免疫学的定量法⁽²⁶⁾を開発して貝毒の監視を容易にし、中毒の発生や流通の混乱防止に貢献した。

研究の初期において、毒化原因生物が渦鞭毛藻の *Dinophysis fortii* であることを推定したが⁽¹⁸⁾、本種の海水中の出現密度は低く、人工培養も不可能であった。そこでプランクトンネットで濃縮した海水試料から容疑種を毛細管を使って純粋な状態で集め、蛍光微量定量法を用いて *Dinophysis* 属の8種に毒を検出して、毒化原因プランクトンを確定した⁽²⁷⁾。ただし、イエットトキシシンの

起源だけは未同定である。毒化原因種の確定により、海水中の密度を監視して、貝の毒化を事前に予測し、あるいは増殖に及ぼす海洋環境要因の解析が可能となった。

3. フグ毒

わが国ではフグは広く愛好されているが、中毒による死者も跡を絶たない。その一因として毒性の顕著な個体差、地域差が挙げられる。この現象はフグ毒テトロドトキシシン(TTX)の起源が外因性によるものと想定し、食物連鎖および共生微生物を追究した。まず、高感度・高特異性の分析装置を開発し、TTX含量が低いことが予想される食物連鎖下位の生物の分析を可能にした^(28,29)。TTXをアルカリと加熱するとC₉塩基と呼ばれるアミノキナゾリン誘導体を生じるが、同時に構造未知の不安定な蛍光物質を生じることを認め、この蛍光物質を測定するポストカラム法を開発した。この装置で藻食性の魚やカニ、ついで、その餌の海藻、そして最後に海藻やフグの共生微生物にTTXを検出し、フグ毒の起源が細菌であることを初めて明らかにした⁽³⁰⁾。さらに同分析装置を駆使してフグ、イモリのTTX画分を詳細に調べ、同族体の探査を行った。TTXの生合成や代謝の考察に重要な天然同族体の存在は従来は不明であった。探査の結果、5種の天然同族体(図3)を初めて単離・構造決定した⁽³¹⁻³⁴⁾。また、コスタリカ産のカエルに検出されていた構造未知の同族体チリキトキシシンも単離・構造決定で

図 3 テトロドトキシン天然同族体の化学構造

図 4 テトロドトキシンの推定生合成および代謝経路
() 内は未検出

きた (図 3)⁽³⁵⁾。これらの同族体の構造は TTX の生合成がアルギニンとイソペンレンユニットから出発し、生成した前駆体の 11 位メチル基が一連の酸化を受ける過程を示唆した (図 4)。これらの同族体のなかで、11 位がアルデヒドに酸化された成分は TTX よりも強い活性を示し、その他の成分もかなりの毒性を維持することも明らかとなった。TTX は生体の情報伝達に重要な役割を担っている Na イオンチャネルの特異的阻害剤であり、同チャネルの微細構造研究は医化学の重要な課題である。そこで TTX の 11 位水酸基をアルデヒドに酸化し、精製・単離した後還元し、高純度の蛍光あるいはトリチウム標識体を調製する方法を考察した⁽³²⁾。今後は実

際に標識体を使った研究の展開を予定している。

4. 麻痺性貝毒

有毒プランクトンの発生によって二枚貝が毒化する麻痺性貝毒は古くから知られていた。その検出はマウス毒性試験に頼っていたので微量蛍光定量法を開発した。毒は極性が高いので、各成分の塩基性に応じて長鎖スルホン酸またはテトラエチルアンモニウムとペアイオンを形成させ、逆相カラムで分離した後、アルカリ性で過ヨウ素酸酸化して蛍光物質に変換して測定した^(36,37)。この微量定量法は貝毒の迅速かつ正確な監視を可能にし、さらに、毒成分の代謝・変換過程の追究、微量の新奇誘導

図 5 渦鞭毛藻 *Prorocentrum lima* の生産するオカダ酸誘導

体の発見にも有用であった。また、有毒プランクトンの発生しないさんご礁海域の巻貝やカニの毒化を調べ、餌の海藻に麻痺性貝毒が存在することおよびカニから分離した細菌が麻痺性貝毒を生産する事実を明らかにした。

5. 渦鞭毛藻の生理活性ポリエーテル化合物

渦鞭毛藻類は真核生物のなかでは最も下等な部類に属し、その代謝産物の化学的・生物学的性状に興味を持たれながら、大量培養が困難なために十分な調査・研究が行われていなかった。前述の魚貝毒の項で述べたように、海産魚介類の毒化には渦鞭毛藻の関与する事例が多い。そこで前記の毒化原因種以外の種類についても生理活性物質の探索と性状の解明を行った。まず、シガテラ原因種と同様の海藻附着生育種 9 種について、マウス致死毒性、魚毒性、溶血性をスクリーニングし、全種に活性を検出した⁽³⁸⁾。顕著な活性を示した *Prorocentrum lima* のマウス致死毒成分として、オカダ酸の同族体およびジオールエステルを得た (図 5)⁽³⁹⁾。同種からは基本骨格が全く異なる新奇な含窒素マクロリドのプロロセントロ

図 6 *Prorocentrum lima* の生産物
プロロセントロリド

リド (図 6) も得られた。ついで、*Amphidinium klebsii* の生産する抗カビ物質アンフィジノール (図 7) を単離して構造を決定した⁽⁴⁰⁾。2つのエーテル環を含む炭素数 69 の長鎖の骨格に 22 の水酸基と 3つのメチルと 1つのメチレンが置換し、末端にはポリエン構造があり、水酸基の 1つは硫酸エステルを形成していて、ほかに類例の

図 7 渦鞭毛藻 *Amphidinium klebsii* の抗カビ成分アンフィジノール

図 8 渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の抗カビ成分

ない構造である。その構造は最新の NMR や MS/MS の手法を用いて決定されたが、培地に $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ を添加して ^{13}C の比率を高めることにより、わずか 3 mg の試料ですべての NMR 測が可能であった。 *Aspergillus niger* を検定菌としてペーパードISK法で測定した抗カビ活性はアンホテリシン B の 3 倍も強いものであった。一方、シガテラの原因生物として分離されながら CTX 関連化合物の生産の確認されなかった *G. toxicus* の GII 1 株からは、強力な抗カビ物質が培地中に分泌されていることが明らかになった。ガンビエル酸-A、-B、-C、-D と命名されたこれらの成分の構造 (図 8) は、CTX に似てエーテル環が梯子状に連結していた^(42,43)。しかし、末端がカルボキシル基に酸化されていて孤立環を有する点で異なっている。ガンビエル酸で最も注目されたのは、その前例のない強力な抗カビ作用である。ペーパードISK法で測定した *A. niger* の生育阻害作用はアンホテリシン B の 2000 倍にも達する強力なものであった。その他の抗カビ成分も検出されていて、原核生物の放線菌の生産物との構造や作用機構の差異に興味を持たれる。

- (1) 安元 健, 村田道雄: 化学と生物, **29**, 379—387 (1991).
- (2) P. J. Scheuer, W. Takahashi, J. Tsutsumi, and T. Yoshida: *Science*, **115**, 1267—1268 (1967).
- (3) K. Tachibana: Ph. D. Thesis University of Hawaii (1977).
- (4) T. Yasumoto, I. Nakajima, R. Bagnis, and R. Adachi: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 1021—1026 (1977).
- (5) R. Adachi and Y. Fukuyo: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **45**, 67—71 (1979).

- (6) A. M. Legrand, M. Litaudon, J. N. Genthon, R. Bagnis, and T. Yasumoto: *J. Appl. Phycol.*, **1**, 183—188 (1989).
- (7) M. Murata, A. M. Legrand, Y. Ishibashi, and T. Yasumoto: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8929—8931 (1989).
- (8) M. Murata, A. M. Legrand, Y. Ishibashi, M. Fukui, and T. Yasumoto: *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 4380—4386 (1990).
- (9) T. Suzuki, O. Sato, M. Hiramata, Y. Yamamoto, M. Murata, T. Yasumoto, and N. Harada: *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4505—4508 (1991).
- (10) M. Murata, A. M. Legrand, P. J. Scheuer, and T. Yasumoto: *Tetrahedron Lett.*, **33**, 525—526 (1992).
- (11) J. Goto, N. Goto, F. Shamsa, M. Saito, S. Komatsu, K. Suzuki, and T. Nambara: *Anal. Chim. Acta*, **147**, 397—400 (1983).
- (12) A. Yokoyama, M. Murata, Y. Oshima, T. Iwashita, and T. Yasumoto: *J. Biochem.*, **104**, 184—187 (1988).
- (13) M. Murata, T. Iwashita, A. Yokoyama, M. Sasaki, and T. Yasumoto: *J. Am. Chem. Soc.*, 印刷中.
- (14) 大泉 康: 続医薬品の開発 10 巻, 矢島治明, 塩入孝之, 大泉 康編, 廣川書店, 1992, pp. 516—524.
- (15) F. Gusovsky and J. W. Daly: *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1633—1639 (1990).
- (16) T. Yasumoto, A. Inoue, R. Bagnis, and M. Garcon: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **45**, 395—399 (1979).
- (17) T. Yasumoto, Y. Oshima, and M. Yamaguchi: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1249—1255 (1978).
- (18) T. Yasumoto, Y. Oshima, W. Sugawara, Y. Fukuyo, H. Oguri, T. Igarashi, and N.

- Fujita : *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1405-1411 (1980).
- (19) 安元 健 : 実験医学, **8**, 1243-1247(1990).
- (20) 菅沼雅美, 藤木博太 : 実験医学, **8**, 1232-1237 (1990).
- (21) T. Yasumoto, M. Murata, Y. Oshima, and M. Sano : *Tetrahedron*, **41**, 1019-1025 (1985).
- (22) M. Murata, M. Sano, T. Iwashita, H. Naoki, and T. Yasumoto : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2693-2695 (1986).
- (23) M. Murata, M. Kumagai, J. S. Lee, and T. Yasumoto : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5869-5872 (1987).
- (24) K. Terao, E. Ito, T. Yanagi, and T. Yasumoto : *Toxicon*, **24**, 1141-1151 (1986).
- (25) J. S. Lee, T. Yanagi, R. Kenma, and T. Yasumoto : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 877-881 (1987).
- (26) T. Usagawa, M. Nishimura, Y. Itoh, T. Uda, and T. Yasumoto : *Toxicon*, **27**, 1323-1330 (1989).
- (27) J. S. Lee, T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard, and T. Yasumoto : *J. Appl. Phycol.*, **1**, 147-152 (1989).
- (28) T. Yasumoto, M. Nakamura, Y. Oshima, and J. Takahata : *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1481-1483 (1982).
- (29) M. Yotsu, A. Endo, and T. Yasumoto : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 893-895 (1989).
- (30) T. Yasumoto, D. Yasumura, M. Yotsu, T. Michishita, A. Endo, and Y. Kotaki : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 793-795 (1986).
- (31) T. Yasumoto, M. Yotsu, M. Murata, and H. Naoki : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2344-2345 (1988).
- (32) A. Endo, S. S. Khora, M. Murata, H. Naoki, and T. Yasumoto : *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4127-4128 (1988).
- (33) S. S. Khora and T. Yasumoto : *Tetrahedron Lett.*, **30**, 4393-4394 (1989).
- (34) M. Yotsu, Y. Hayashi, S. S. Khora, S. Sato, and T. Yasumoto : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 370-371 (1992).
- (35) M. Yotsu, T. Yasumoto, Y. H. Kim, H. Naoki, and C. Y. Kao : *Tetrahedron Lett.*, **31**, 671-678 (1990).
- (36) 安元 健 : 化学と生物, **27**, 401-406 (1989).
- (37) Y. Oshima, K. Sugino, and T. Yasumoto : In "Mycotoxins and Phycotoxins '88," ed. by S. Natori, K. Hashimoto, and Y. Ueno, Elsevier, New York, 1989, pp.367-374.
- (38) I. Nakajima, Y. Oshima, and T. Yasumoto : *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1029-1033 (1981).
- (39) T. Yasumoto, N. Seino, Y. Murakami, and M. Murata : *Biol. Bull.*, **172**, 128-131 (1987).
- (40) K. Torigoe, M. Murata, T. Yasumoto, and T. Iwashita : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7876-7877 (1988).
- (41) M. Satake, M. Murata, T. Yasumoto, T. Fujita, and H. Naoki : *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9859-9861 (1991).
- (42) H. Nagai, K. Torigoe, M. Satake, M. Murata, T. Yasumoto, and H. Hirota : *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1102-1103 (1992).
- (43) H. Nagai, M. Murata, K. Torigoe, and T. Yasumoto : *J. Org. Chem.*, 印刷中.