

琉球大学学術リポジトリ

オニヒトデの毒素成分に関する研究：第1報 棘皮中に存在する毒素の分離と2,3 の性質について(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平良, 悦子, 棚原, 憲和, 船津, 勝, Taira, Etsuko, Tanahara, Norikazu, Funatsu, Masaru メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4332

オニヒトデの毒素成分に関する研究

第1報 棘皮中に存在する毒素の分離と 2, 3の性質について

平良悦子* 棚原憲和* 船津勝**

Etsuko TAIRA, Norikazu TANAHARA, Masaru FUNATSU:
Studies on the toxin in the spines of starfish *Acanthaster planci*. I. Isolation and some properties of the toxin found in spines.

I 緒 言

沖縄近海の珊瑚礁には、異常繁殖したオニヒトデ *Acanthaster planci* (Linnaeus) が生息し、その棘皮には、近海で仕事する漁夫、ダイバーらの体験から、ある種のかなり強力な毒素の存在が知られている。しかし、これまでオニヒトデの棘皮中の毒素について研究した報告はほとんど見当たらない。オニヒトデを水に浸したとき、かなりの発泡現象が見られることから、サポニン様物質の存在(1)も推定されるが、棘皮中に存在する毒素については intraepithel gland (acidphilic glandular cell) から分泌されていることが Halstead (2) によって示唆されているので、オニヒトデの全体に含まれるサポニン様物質とは異なる毒素がこの腺細胞から産生されていることも考えられる。また Alender ら (3, 4, 5) は、棘皮動物のラッパウニの近縁種 *Tripneustes gratilla* の叉棘中の毒素の主体はタンパク毒であると報告している。

本研究では、オニヒトデの棘皮中に存在する毒素を硫酸分画、等電点分画および Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーなどの方法により分離し、得られたそれぞれの各分画ごとに、主として致死作用および溶血作用を比較検討後、2, 3の理化学的性質についても調査したので現在までに得られた結果を報告する。

II 実験材料および方法

オニヒトデは昭和49年5月に沖縄本島南部の米須近海および沖縄本部半島今帰仁近海で採集し、採集後は速やかに碎氷で冷却しながら運搬し、数時間後水洗して-20℃のフリーザー中で凍結させた。生物活

* 琉球大学農学部農芸化学科

** 九州大学農学部農芸化学科

性測定に使用したマウスは九州大学純系動物飼育室より提供された ddN を使用した。試薬サポニン は和光純薬工業製の茶葉トリテルペノイドサポニンで蛋白質定量に用いたアルブミンは日本生化学工業社の Albumin Bovin Crystilized (Miles 8102), また Sephadex G-75 (fine) も同社のものを用いた。

1. オニヒトデの採取法

凍結したオニヒトデを氷上に置き, ピンセットで棘を折るようにして抜いた棘は再び -20°C のフリザーに保存し必要に応じて供試した。

2. 抽出液の調製

棘の重量に対し3倍量の 0.005 M -リン酸緩衝液 $\text{pH } 7.0$ を加え $18,000\text{ r/m}$ 15分間冷却しつつホモゲナイズした。得られたホモジネイトはさらに乳鉢ですりつぶし, 晒木綿で荒濾し, 日立18 PR-3形高速冷却遠心機で $4,200\text{ g}$ 20分間遠心分離後, 上清を抽出液とした。

3. 毒性試験

生後5~7週間(体重 $18\sim 28\text{ g}$)のマウス ddN の腹腔内に, マウス体重 20 g 当たり 0.5 ml の毒素液を注入し, 72時間後致死させる毒素の最少量を O.D. 280 nm または蛋白質量をもって表した。対照試験は 0.9% 生理食塩水を用いて各試験ごとに行った。

4. 蛋白質の定量法

蛋白質を相対的に定量するのに O.D. 280 nm と Lowry ら(6)による比色定量法を用いたが, サポニンは第1図に示すように蛋白質と同様に 280 nm に吸収を持つため, この波長での蛋白質の定量は正確さを欠くものと考えられた。

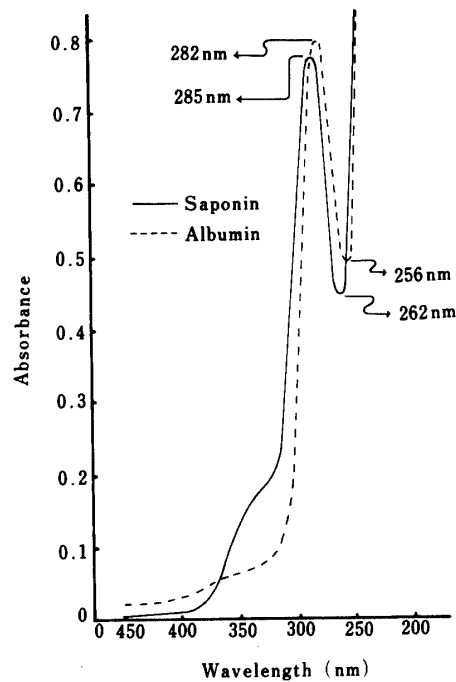


Fig. 1. Absorption spectra of saponin from tea leaves and albumin from eggs

しかしながら第2図に示すように Lowry 法による比色定量にはサポニンの影響がほとんど無い事が認められたので、本実験における蛋白質の定量には Lowry 法を用いた。

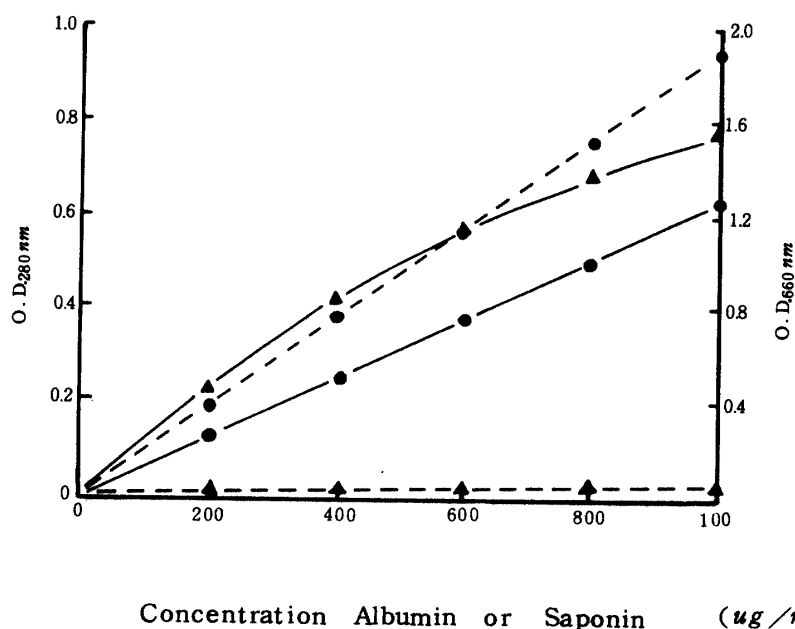


Fig. 2. Determination of protein and saponin by Lowry's method

●—● Albumin O.D.280 nm ●-----● Saponin O.D.280 nm
▲—▲ Albumin Lowry's method ▲-----▲ Saponin Lowry's method

5. 溶血反応試験

藤田，西本法(7)による溶血反応試験を一部修正して行った。

等張リン酸塩緩衝液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 16g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44g を蒸留水に溶解させ全量を1ℓとした(pH 7.4)。

血球浮游液：ヒト(O型)の血液1容量を3.6%クエン酸ナトリウム液0.1容量と上記の緩衝液1容量の混液に加えて混合した。十分かきまぜて凝固を防いだ後，緩衝液を追加して全容量を50量に希釈して2%血球浮游液とした。冷蔵中で約5~6日間保存できたが，測定には採血直後の血液を用いた。

試料液：抽出液または分画液を蒸留水で十分に透析し，さらに0.9%生理食塩水または前記の緩衝液で透析して試料液とした。

対照試験溶液：茶葉サポニンを前記の緩衝液で0.01-0.015%に調製した。冷蔵(5℃)して置くと2-3週間は使用可能であった。

測定法：小試験管に試料液を0.05mlおきに，順次増量しながら0.05-0.5mlまで採取し，次に緩衝液を加えて各試験管の内容を総量0.5mlとし，よく混和後，2%血球浮游液0.5mlずつを振り混ぜながら分注し，全量各1mlとする。分注直後泡起をさけて完全に混和させ，室温(15-20°)に静置し，同时对照試験液を用いて上記同様に調製した。結果の読み取りは8時間後に行ない，完全溶血(管底に全く血球の存在を認めない)から部分溶血(管底に血球を明視する)に移行する最後の完全溶血を起している試験管の試料の希釈倍率を溶血指数(Hemolysis index = H.I)とし，次式により算出した。

り算出した。

$$H.I = \frac{V}{\frac{P}{100} \times S}$$

V = 試験管内の全量
 P = 試料液の濃度%
 S = 用いた試料溶液

III 実験結果および考察

1. 粗毒素の分離

1) 抽出液中の毒素の透析性の検討

II-2で得られた抽出液を蒸留水(5℃)で約48時間透析(透析膜: Seamlles Cellulose Tubing 型 18/32)し, その内液と外液のそれぞれについてマウスに対する毒性を調べてみた(第1表)。

Table 1. Comparison of toxicities of the inner and outer solution obtained by dialysis with distilled water

Sample	Dose 0.5 ml / 20 g mouse (O.D 280)	Time (hr)		
		24	48	72
inner solution	3.2	—	—	++
	1.6	—	—	++
outer solution	2.9	—	—	—
	1.4	—	—	—
control	—	—	—	—

— : None of the mice died

— : One mouse died

++ : Two mice died

表に用いた記号—は使用したマウスが全く死亡しなかった場合を示し, 記号+は1検体の死亡, 記号++は2検体の死亡を意味する。以後, 毒性試験活性表示にはこの記号を用いる。毒性は内液の方にあり, 外液には見られなかった。このことから, この毒素は非透析性のものであろうと考えられた。

2) 硫酸分画

粉末硫酸を全飽和硫酸溶液になるように抽出液中に攪拌しながら添加していく。溶解後一昼夜室温で静置し, 十分に沈殿を生成させる。沈殿部分はさらに口紙で濾過し, 上清部分を得て, それぞれの毒性試験を行った。その結果毒性物質は沈殿部分に存在することが認められたので, 以下のようにして硫酸分画による毒素の分離を試みた。

硫酸全飽和で塩析された画分を流水および蒸留水にてそれぞれ24時間透析を行った後、生じた沈殿物を遠心分離して除去した。あらかじめ調製した100%飽和硫酸溶液を試料の容量と同容量を試料中に攪拌しながらゆっくり滴下し、 $\frac{1}{2}$ 飽和硫酸分画とする。次に試料1容量に対し100%飽和硫酸溶液2容量を前記同様滴下し、 $\frac{2}{3}$ 飽和硫酸分画を得た。それぞれの画分の毒性試験の結果を第2表に示す。これよ

Table 2. Comparison of activities of the toxin fractionated with ammonium sulfate

Fractions	Dose 0.5 ml / 20 g mouse (O.D280)	Time (hr)		
		24	48	72
100% sat. (ppt)	2.5	—	++	
	1.6	—	++	
100% sat. (sup.)	0.6	—	—	—
$\frac{2}{3}$ sat. (ppt.)	3.6	—	++	
	1.7	+	++	
$\frac{1}{2}$ sat. (ppt.)	3.3	—	—	—
	1.7	—	—	—
$\frac{1}{2}$ sat. (sup.)	1.6	—	++	
	0.8	—	+	++

り毒素は $\frac{1}{2}$ 飽和硫酸分画では塩析されず上清画分にくることが認められた。この上清画分と $\frac{2}{3}$ 飽和硫酸沈殿画分を比較すると上清画分の方が強い毒性を示したので、さらにこの画分に粉末硫酸を加えて全飽和硫酸沈殿を生じさせ、これを粗毒素として5℃で冷蔵保存した(第3表)。

Table 3. Procedure for extraction and fractionation by ammonium sulfate

Spines of <i>Acanthaster planci</i>	
	extraction with pH 7.0, 0.005M, phos. buff.
Extract	
	100% - saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Precipitate	
	dialysis with water (4°C)
	50% - saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Supernatant	
	100% - saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Precipitate	← Crude Toxin

3) マウスの雌雄別感受性の比較

分離された粗毒素に対するマウスの雌雄別感受性を比較した結果を第4表に示す。雌は7.7 μg pro-

Table 4. Comparison of male and female mouse sensitivities for crude toxin

	Dose μg protein/ g mouse	Time (hr)		
		24	48	72
♀	15.4	—	卅	卍
	7.7	—	卅	卍
	3.8	—	—	—
♂	15.4	—	卅	卍
	7.7	—	—	—
	3.3	—	—	—

tein/g mouse で72時間後に検体マウスの5匹とも死亡しているが、雄はその2倍量15.4 μg protein/g mouse で死亡していることから粗毒素に対しては雌の方が感受性が高いことが認められた。したがって以後の毒性試験はすべて雌を用いることにした。

2. 毒素の等電点分画

粗毒素を24時間流水および蒸留水透析して硫酸を除去し、1N-酢酸を滴下してpH 4.7に調整する。このpHで生じた沈殿物を遠心分離(17,400g 20min)し、沈殿部分と上清部分とに分けそれぞれの毒性を調べた(第5表)。

Table 5. Comparison of toxicities in supernatant and precipitate of crude toxin adjusted at pH 4.7

Sample	Dose μg protein/ g mouse	Time (hr)		
		24	48	72
Supernatant	17.5	—	卅	
	9.8	—	卅	
Precipitate	17.5	—	+	+
	9.8	—	+	+

毒性の強さは沈殿部分よりも上清部分に強いことが認められた。しかし、沈殿部分にも毒性が存在するので、もしこの毒素が同じ物であれば収量の点においてかなりの低下が考えられる。したがって、この酸による等電点分画についてはまだ検討の余地があるものと思われる。

3. セファデックス G-75 カラムクロマトグラフィーによる毒素の分離

等電点分画で得られた上清部分を pH 8.0, 0.05 M ホウ酸緩衝液で中和し, 同様の緩衝液で 2 日間透析する。あらかじめセファデックス G-75 をカラムに詰め, 上記の緩衝液で平衡化した。流出液は 280 nm の吸光度とペプチド結合に由来する 233 nm の吸光度を測定し, その溶出パターンを第 3 図に示し

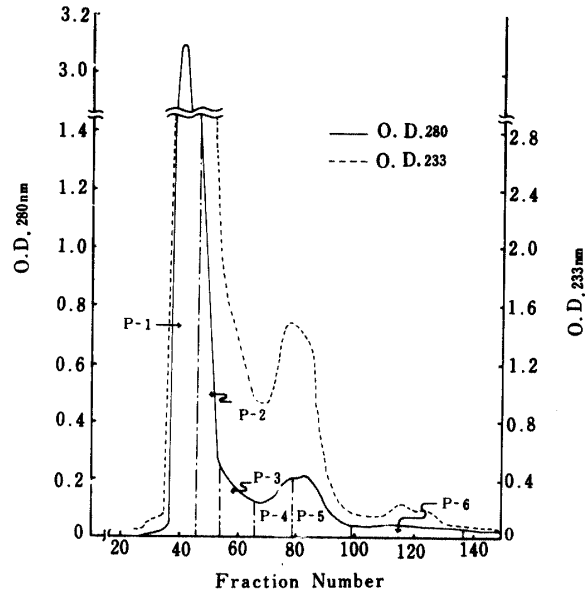


Fig. 3. Elution patterns from sephadex G-75 column chromatography

column size : 4.0 × 127 cm
 buffer : pH 8.0, 0.05M, sodium borate-HCl
 flow rate : 30 ml/hr
 one fraction vol: 10 ml

た。280 nm の吸収曲線と 233 nm における吸収曲線はほとんど類似していることから, 280 nm の吸収パターンはほとんど蛋白質の吸収によるものと考えてよい。

溶出パターンを 6 つに分画し, 各フラクションを P-1, P-2, P-3, P-4, P-5, P-6, とした。このカラムにアプライした Total O.D. 280 の 67.7% が P-1 に溶出し, P-2 では 10.4%, P-3 では 6.0%, P-4 では 5.9%, P-5 では 5.6%, P-6 では 3.3% で回収率は 98.9% であった。P-1 では茶褐色の色素も同時に溶出してきた。P-1 のピークの形は非対称形でかなりのショルダーが認められた。このショルダー部分を P-2 とした。P-2 には色素の残留が認められたが, 色素がほとんど溶出してこない部分から次のピークが現われる手前までのフラクションを P-3 とした。ピークの形から推して, それぞれ P-4, P-5, P-6 に分けた。

各ピークの毒性試験について比較した結果を第 6 表に示す。なお同時に抽出液, 粗毒素についての結果も比較して示した。抽出液では 72 時間後の致死量が 42.64 μg protein/g mouse, 粗毒素においては 7.7 で蛋白質当りの毒性は約 5.5 倍に上っていた。しかし, P-1, P-3 においては粗毒素に比べて毒性は逆に低下していた。その理由としては, 等電点分画の際の酢酸処理による毒性失活が考えられるが, 今後 pH 安定性, 酸処理による安定性と試料の透析性なども検討して, 毒素の失活や流出について検討する必要がある。

Table 6. Toxicities of extract, crude toxin and the fractions obtained by Sephadex G-75 column chromatography

Sample	Dose		Time (hr)		
	$\mu\text{g protein/g mouse}$	24	48	72	
Extract	42.6	—	++	+++	
	21.3	—	+	++	
	10.6	—	—	—	
Crude Toxin	15.4	—	+++		
	7.7	—	+	+++	
	3.8	—	—	—	
Sephadex G-75 P-1	24.4	—	+++	+++	
	12.2	—	+	+++	
	6.1	—	—	—	
P-3	39.0	—	+++	+++	
	19.5	—	++	+++	
	8.7	—	—	—	
P-4 +	32.6	—	—	—	
	16.3	—	—	—	
P-5	8.1	—	—	—	

4. 各分離段階で得られた毒素の致死作用と溶血作用との比較

溶血試験はII-5で述べたように行った。茶葉サポニンの平均溶血指数は22,222であった。第7表は蛋白質当りのマウスに対する致死量と溶血指数を示している。致死作用としての毒性の強さについて

Table 7. Comparison of lethal doses and hemolysis indexes for the toxin isolated by fractionation

Sample	Dose	Hemolysis index
	$\mu\text{g protein/g mouse}$	H. I
Extract	42.6	4196
Crude toxin	7.7	6801
Sephadex G-75		
P-1	12.2	1451
P-3	19.5	295
P-4	— ※	543
P-5	— ※	720

※ No toxicity

は第6表で比較検討した。溶血指数は硫安分画の段階、すなわち粗毒素では6801で高くなっているが、セファデックスカラムクロマトのP-3においては295.4で抽出液に比べて約 $\frac{1}{14}$ に低下していた。各分離段階で致死作用物質の蛋白当りの毒性は上っているが、溶血指数は低い値を示していることから、この致死作用物質と溶血作用物質は異成分であると推定される。

5. P-3の熱安定性とpH安定性

1) 熱安定性

試料(P-3)をあらかじめ0.9%生理食塩水に20時間透析後、同様の生理食塩水で782 μg protein/ml 濃度になるように調製した。これを一定の温度で15分間インキュベートし、碎氷で冷却(15 mm)して室温に戻し毒性試験を行った。その結果を第8表に示す。P-3毒素は50°までは安定で60°

Table 8. Effects of temperature on the stability of P-3

Temp °C	Time (hr)		
	24	48	72
20	—	—	卅
50	—	—	卅
60	—	—	—
65	—	—	—
70	—	—	—
75	—	—	—

からは毒性が落ち始め、70°では対照試験とほとんど変わらず完全に失活することが認められた。

2) pH安定性

1)と同様に生理食塩水に透析した後 $\frac{N}{20}$ - $\frac{N}{500}$ の塩酸または水酸化ナトリウムを滴下して一定のpHに調整した。0°Cで10時間放置した後、上記の塩酸または水酸化ナトリウムで中和し、pH 7にし、生理食塩水で希釈して782 μg protein/mlの濃度に調製した。なおpH 6, pH 7ではそのpHに調整するために水酸化ナトリウムのみを使用した。その結果を第9表に示す。全pH領域で毒性

Table 9. Effects of pH stability of P-3

pH	Time (hr)				
	24	48	72	96	120
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	+
7	—	—	—	—	+
8	—	—	—	—	卅
9	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—

の低下が見られ、特に pH 3, pH 10 では、毒性の症状さえ現われず、毒性が失活していた。pH 6, 7, 8 においても毒性の低下が見られたということは、pH 調整に使用した試薬が影響しているのではないかと考えられる。

IV 要 約

オニヒトデの棘皮中に存在する毒素を硫酸分画、等電点分画および Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーなどの方法により分離し、それぞれの画分において、マウスに対する致死作用および溶血作用を比較検討し、2, 3の理化学的性質について調べた。

その結果、抽出液から硫酸分画に至る毒性は約 5.5 倍に上った。Sephadex カラムクロマトグラフィーまでは、抽出液から約 2.2 倍で硫酸分画の段階よりも、むしろ毒性の低下が認められたけれども、溶血作用は、ゲル濾過の段階で抽出液の溶血指数に対して約 $\frac{1}{14}$ に低下した。

これらのことから、本実験で分離した毒素は致死作用を有し、溶血作用物質とは異なる成分ではないかと考えられた。

この毒素は非透析性であり、60°C で失活し、また pH 3 以下、pH 10 以上で失活することが認められ、さらに凍結、解凍をくり返すと失活することから、蛋白様物質であることが推定された。

終りに、本研究に使用したオニヒトデ採取に、多大な御協力をくださいました本部町役所経済課の喜屋武義和氏、および今帰仁村役所経済課の皆様へ深く感謝致します。

また、本研究に当り終始御懇切なる御指導を賜りました九州大学農学部船津軍喜助教授および東北大学農学部安元健助教授に深甚の謝意を表します。

文 献

1. GEORGE D. RUGGIERI, S.J. and ROSS F. NIGRELLI 1966 Effects of extracts of the sea star, *Acanthaster planci*, on the developing sea urchin, American Society of Zoologists, 6 (4) : 592 ~ 593
2. HALSTEAD, B.W. 1965 Poisonous and Venomous Marine Animals of World. 1 : p538 ~ 544 U.S. Government Printing Office
3. ALENDER, C.B., FEIGEN, G.A. and TOMITA, J.T. 1965 Isolation and characterization of sea urchin toxin, Toxicon 3 : 9 ~ 17
4. FEIGEN, G.A., SANZ, E. and ALENDER, C.B. 1966 Studies on the mode of action of sea urchin toxin-I. Conditions affecting release of histamine and other agents from isolated tissues, Toxicon 4 : 161 ~ 175
5. FEIGEN, G.A., Sanz, E., Tomita, J.T. and ALENDER, C.B. 1968 Studies on the mode of action of sea urchin toxin-II. Enzymatic and immunological behavior, Toxicon 6 : 17 ~ 43
6. 副島正美, 菅原潔 1971 蛋白質の定量法, p 86 ~ 91 東京 東京大学出版会
7. 山口一考 1905 植物成分分析法, 上 p 307 ~ 308 東京 南江堂

Summary

The toxin of starfish *Acanthaster planci* was isolated by ammonium sulfate fractionation, isoelectric focussing fractionation at pH 4.7, and Sephadex G-75 column chromatography. The toxicity of the ammonium sulfate fraction was approximately 5.5 times that of the extract. However, the toxicity of the gel filtrated fraction was 2.2 times that of the extract. This decrease of toxicity was probably caused by an acid-treatment in the isoelectric focussing fractionation.

Hemolysis of each fraction decreased in the order followed by the fractionation except the ammonium sulfate fraction. The hemolysis index of the gel filtrated fraction was $\frac{1}{14}$ times that of the extract.

From these facts, it is suggested that the toxin isolated in the present experiment has lethal action and is different from the toxin that has hemolytic action.

This toxin was non-dialyzable, and in thermal stability experiments it lost its activity at 60°C. On the pH stability, it lost its toxic activity at pH lower than 3.0 or higher than 10.0. In addition the toxin that was exposed to repetitive freezing (at -20°C) and thawing was non-active. From these observations, it is considered that starfish *Acanthaster planci* toxin is probably a protein-like substance.