

イソガニ血リンパ液中のテトロドトキシン結合物質の 精製と特性

河原栄二郎*¹, 金辻宏明*², 山森邦夫*³, 松居 隆*⁴, 楠田理一*¹

Purification and Characterization of Tetrodotoxin-binding Substance in Shore Crab Hemolymph

Eijiro Kawahara *^{1,a}, Hiroaki Kintsuji*², Kunio Yamamori*³, Takashi Matsui*⁴,
and Riichi Kusuda *¹

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (12), 37-44 (2001)

Tetrodotoxin-binding substance (TBS) was purified from the hemolymph of shore crab *Hemigrapsus sanguineus* by a combination of ammonium sulfate precipitation at 30% saturation and gel-filtration on Sepharose 6B. After gel-filtration, high molecular weight peak revealed a single band with a Rf-value of 0.01 by native-PAGE, and possessed tetrodotoxin-binding activity. The peak also showed a single precipitation arc in β -globulin region during immunoelectrophoresis with anti-shore crab hemolymph rabbit serum. Hence, the TBS was purified from the hemolymph in the purification procedure. The TBS has a molecular weight of over 1,600 kDa determined by SDS-PAGE. At least eleven kinds of subunits of the TBS were found by SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol.

Key words: tetrodotoxin-binding substance, shore crab, hemolymph

*¹ 海洋生物工学科 (Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292).

*² 滋賀県水産試験場 (Shiga Prefectural Fisheries Experimental Station, Hikone, Shiga 522-0057).

*³ 北里大学水産学部 (School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Ofunato, Iwate 022-0101).

*⁴ 東京大学大学院農学生命科学研究科 (Graduate School of Agricultural Life Science, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8567).

^a Corresponding author: Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2459, E-mail: kawahara@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp

テトロドトキシン (TTX) は古くからフグ毒の主成分として知られる。1964年にカリフォルニアイモリの毒が TTX に同定されて以来, これまでに微生物から両生類にいたる多種の生物に存在することが明らかにされてきた。^{1,2)} TTX は神経細胞の Na チャネルを選択的にブロックして, 神経の興奮を阻害する作用を持つ神経毒であるとされている。³⁾ TTX を保有しない一般の硬骨魚類の TTX の腹腔内投与に対する抵抗性はマウスと同程度の体重 20 g 当たり約 1 MU である。これに対して, TTX を保有するフグ有毒種は体重 20 g 当たり 300–750 MU の高い TTX 抵抗性を示すことが知られている。⁴⁾ いっぽう, イワガニ科に属するイソガニが TTX を保有しないにもかかわらず, 体重 20 g 当たり 23 MU 程度の比較的高い抵抗性を示す原因についても究明されており, イソガニのリンパ液中に TTX と結合して TTX の毒性を低下させる高分子物質が存在するためであることが示唆されている。⁵⁾

本研究では, イソガニの血リンパ液中に発見された TTX 結合物質の生理機能や役割を解明するための一環として, 同物質を精製して 2, 3 の物理化学的性状について検討した。

材料および方法

供試動物 岩手県大船渡市三陸町の崎浜漁港および泊漁港付近で採捕した平均体重 25.8 g のイソガニ *Hemigrapsus sanguineus* を用いた。

リンパ液の採取 リンパ液は凝固防止のために 0.1 M シュウ酸ナトリウムで潤した注射器を用い, イソガニの歩脚の基部から採血したのち, 3,000 rpm で 15 min の冷却遠心によって血球を沈殿させ, 上清を分離して採取した。なお, リンパ液は使用時まで -20°C で凍結保存した。

TTX 結合物質の精製 TTX 結合物質は TTX との結合活性を指標にして精製した。すなわち, まず 10 ml のリンパ液を 30% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて 4°C で 1 h 塩析した。塩析後, 10,000 rpm で 30 min 遠心分離した。得られた沈殿を 2% 塩化ナトリウムおよび 0.1% アジ化ナトリウムを含む pH7.0 の 20mM のトリス塩酸緩衝液 (THB) 1 ml に溶解した。

そして, 同緩衝液に対して 4°C で一晚透析した。透析後, Sepharose 6B カラム (Pharmacia ; 1.6 × 90 cm) を用いて流速 12 ml/h で THB で展開し, 3 ml ずつ分画して精製した。

TTX 結合物質の測定 TTX が低分子量物質, TTX 結合物質が高分子物質であることを利用して TTX 結合活性を測定した。すなわち, 試料に既知量の TTX を添加, 混合して試料中の TTX 結合物質に TTX を十分結合させたのち, 試料中の未結合 (遊離) の TTX 濃度を測定した。具体的には, 試料 192 μl に 100 MU/ml の TTX 8 μl を加えて混合後 (終濃度 4 MU/ml), 20°C で 30 min 静置した。その後, 排除限界 5 kDa の限外濾過膜 (Millipore) を用いて低分子画分 (濾液) を得た。そして, 濾液の TTX 濃度を遊離 TTX 濃度とした。添加 TTX 濃度から遊離 TTX 濃度を差し引いた TTX 濃度を TTX 結合物質と結合した TTX の濃度と考え, この濃度を TTX 結合活性とした。TTX 濃度は HPLC を用いた蛍光分析によって測定した。⁶⁾

イソガニの TTX 結合物質の精製と特性

純度の検定 純度の検定は 7.5%のポリアクリルアミドゲルを用いたディスク電気泳動法 (native-PAGE) ⁷⁾ で行った。泳動後、ゲルの染色は 0.05%クマシーブリリアントブルー、45%メタノールおよび 10%酢酸を含む染色液で行い、脱色は 5%メタノールおよび 7.5%酢酸を含む脱色液で行った。

抗血清の作製 免疫原はリンパ液とフロイントの不完全アジュバント (Difco) を等量混合して調製した。免疫は免疫原を体重 2.5kg のウサギの左右臀部筋肉内に 1ml ずつ、背部皮下に 2ml 接種して行った。そして、4 週間隔で 2 回追加免疫し、最終免疫 2 週後に採血して抗血清を分離した。

免疫電気泳動法 泳動用のゲルはイオン強度 0.025, pH 8.6 のペロナール緩衝液に精製寒天を 1.2% になるように添加し、加温溶解して調製した。ゲル 3ml をスライドガラス上で固めたのち、溝を切り、サンプル孔を開けた。電気泳動はサンプル孔に試料または 0.05%プロムフェノールブルー (BPB) 5 μ l を加え、スライドガラス 1 枚当たり 7 mA を通電させて行った。BPB が陽極から 5 mm に達したところで泳動を終了し、中央の溝を寒天を取り出し、溝に抗血清を加えて湿気中で 2 日間反応させた。反応後、ゲルを 0.85%塩化ナトリウムを含む pH 7.0 の 10 mM リン酸緩衝食塩水で 3 日間洗浄した。染色はゲルを蒸留水に 30 min 浸漬後、0.5%アミドブラック 10B を含む 90%メタノール-10%酢酸で 15 min 行い、7%酢酸で脱色した。

分子量の測定 TTX 結合物質の分子量およびサブユニットの分子量はそれぞれ Laemmli *et al.* ⁸⁾ の緩衝液系で作製した 3.6 または 10%ポリアクリルアミドゲルを用いた Sodium Dodecyl Sulfate 電気泳動法 (SDS-PAGE) で調べた。また、サブユニットの分子量は 5% 2-メルカプトエタノールで還元後、SDS-PAGE で求めた。なお、分子量マーカには HMW および LMW electrophoresis calibration kit (Pharmacia) を用いた。

結 果

リンパ液を塩析後、ゲル濾過法で分画した結果は Fig. 1 に示すとおりである。すなわち、280 nm の吸光度で 3 つのピークが認められ、TTX 結合活性は第 1 および第 2 ピークで検出された。また、第 1 および第 2 ピークの結合活性は最大で 1.71 および 1.25 MU/ml と求められた。なお、第 3 ピークの結合活性は検出されなかった。

TTX 結合活性を示す第 1 ピークの画分を native-PAGE で分析した結果は Fig. 2 に示すとおりである。すなわち、Rf 値 0.01 に 1 本のバンドを示した。したがって、この画分を精製標品として以後の実験に用いた。なお、30%飽和硫酸アンモニウム塩析画分を同様に調べたところ、少なくとも 16 本のバンドが認められた。

精製標品を免疫電気泳動法で調べた結果は Fig. 3 に示すとおりである。すなわち、抗イソガニリンパ液ウサギ抗血清との間に β 領域で 1 本の沈降線を形成した。なお、イソガニリンパ液と抗

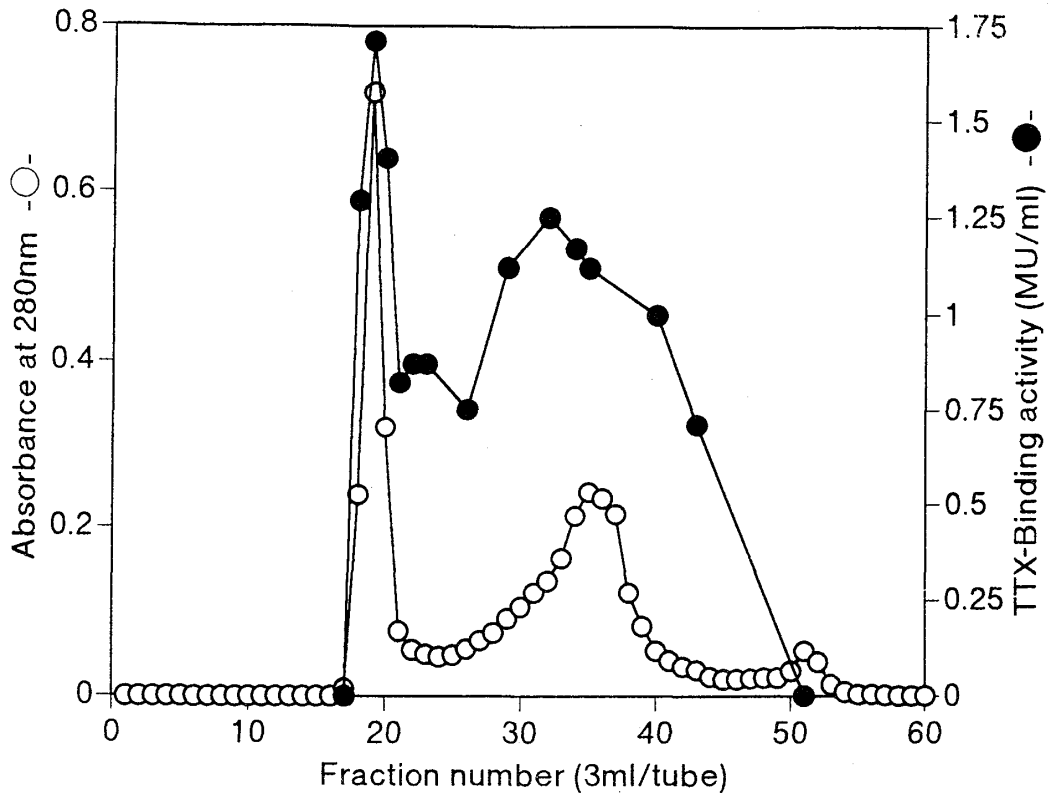


Fig. 1. Elution profile of shore crab hemolymph for gel-filtration chromatography on Sepharose 6B.

Closed circle represents TTX-binding activity.

血清の間には少なくとも10本の沈降線が形成された。

精製標品の分子量およびサブユニットの分子量を調べた結果は Fig. 4 に示すとおりである。すなわち, SDS-PAGE によって分子量は1,600 kDa 以上の領域に1本のバンドを示し, また本物質は2-メルカプトエタノールによって分子量約61から200 kDaの間で, 少なくとも11種類のサブユニットに解離した。

考 察

Shiomi *et al.*⁹⁾ は細胞成分を取り除いたイソガニリンバ液を Sepharose 6B で分画すると3つのタンパク質のピークが認められ, TTX 結合活性は最も分子量の大きい画分にだけ存在し, リンバ液1ml 当たり3.6-4.0 MU の TTX 中和能を有する高分子の TBS が存在するとしている。

イソガニの TTX 結合物質の精製と特性

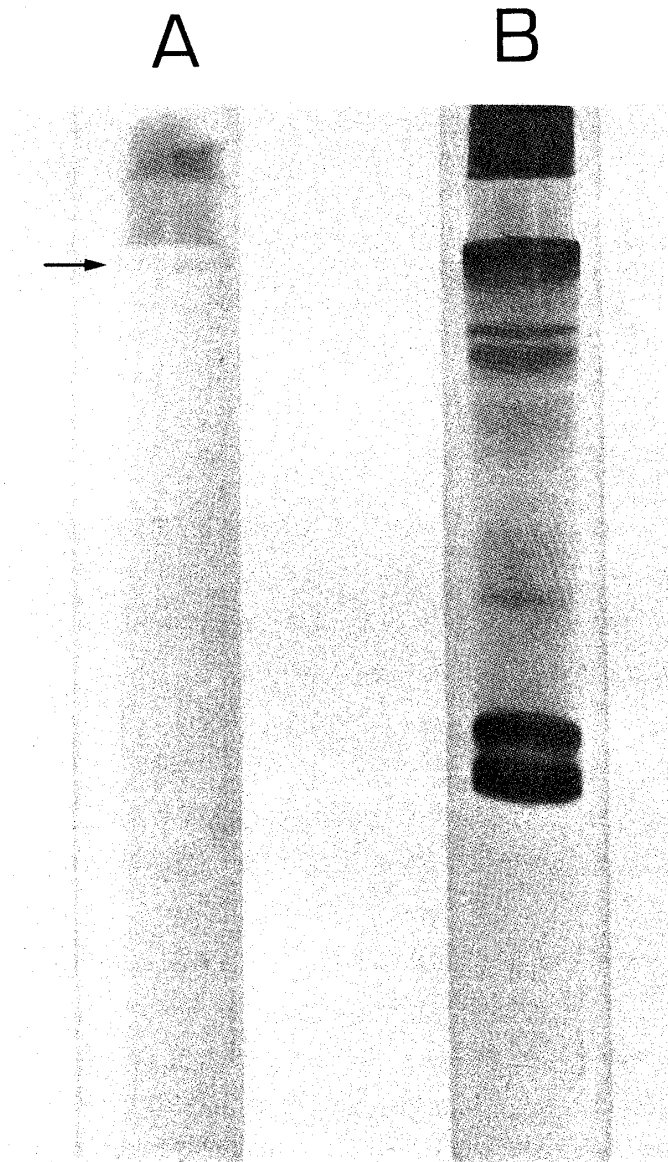


Fig. 2. Polyacrylamide gel disc electrophoretic analysis of shore crab hemolymph after gel-filtration (A) and salting out fraction (B).
Arrow shows purified TTX-binding substance.

本研究では、イソガニリンパ液を 30% 飽和硫酸アンモニウム塩析法で粗分画後、Sephacrose 6B を用いたゲル濾過法によって分画したところ、3つのタンパク質のピークが認められた。TTX 結合活性は第 1 ピークで 1.71 MU/ml、第 2 ピークで 1.25 MU/ml となった。また、第 1 ピーク画分

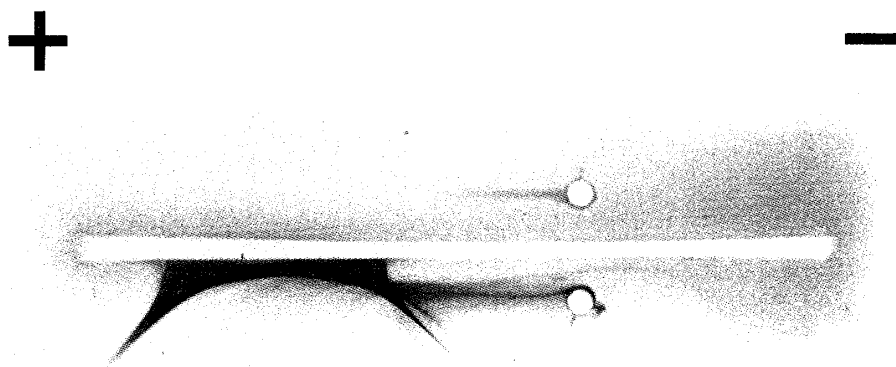


Fig. 3. Immunoelectrophoretic analysis of shore crab TTX-binding substance and hemolymph.

Trough, anti-shore crab hemolymph; upper well, purified TTX-binding substance; lower well, shore crab hemolymph.

を native-PAGE で分析すると, Rf 値 0.01 に 1 本のバンドを示したことから, TBS は純粋に精製されたと考えられる。なお, 第 2 ピークで検出された TTX 結合活性は第 1 ピークの TBS が解離したサブユニットであるか, または第 1 ピークの TBS とは異なる TBS ではないかと考えられる。

今回精製された TBS の分子量は, SDS-PAGE によって 1,600 kDa 以上であると測定された。さらに, 1 本のバンドを示したことから, 水素結合などから形成されるサブユニットはないと考えられる。また, TBS を還元後, 同様に分子量を調べたところ, 分子量約 61 から 200 kDa の間で, 少なくとも 11 種類のサブユニットが認められた。これまでに, Shiomu *et al.*⁹⁾ は TBS は Sepharose 6B のゲル濾過によってブルーデキストランが溶出する排除限界に検出されることから, 分子量は推定 2,000 kDa 以上であるとしている。これらのことから, TBS は多数のサブユニットから成る高分子タンパク質ではないかと推察される。また, TBS は 2-メルカプトエタノールで処理すると, TTX 結合活性が消失すると報告されている。^{*} したがって, TTX 結合活性は TBS のサブユニット間の 3 次構造に依存すると推察される。

今後, イソガニリンバ液中の TBS の定量法を確立するとともに, 組織内分布についても調べ, TBS の生理機能について検討する必要がある。

* 渡辺 聖, 長島裕二, 塩見一雄 (東水大) : イソガニ体液中のテトロドトキシン結合物質の性状. 平成 7 年度日本水産学会春期大会講演要旨集, p.35.

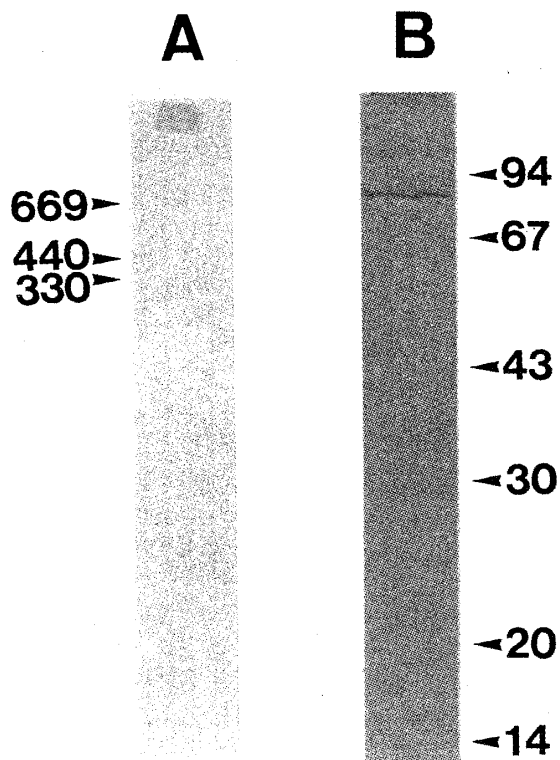


Fig. 4. Molecular weight estimation of shore crab TTX-binding substance by SDS-PAGE.

A, under non reducing condition on 3.6% polyacrylamide gel; B, under reducing condition on 10% polyacrylamide gel. The number shows molecular weight in kDa.

文 献

- 1) 加納碩雄：脊椎動物におけるフグ毒の分布. フグ毒研究の最新の進歩 (橋本周久編), 恒星社厚生閣, 東京, 1988, pp. 32-44.
- 2) 杉田治男、出口吉明：フグ毒保有生物の腸内細菌相とフグ毒産生菌. フグ毒研究の最新の進歩 (橋本周久編), 厚生社厚生閣, 東京, 1988, pp. 65-75.
- 3) 檜橋敏夫：テトロドトキシンの作用機構. 化学と生物, 4, 354-356 (1966).
- 4) 野口玉雄：食物連鎖によるフグ毒保有動物の毒化. フグ毒研究の最近の進歩 (橋本周久編), 厚生社厚生閣, 東京, 1988, pp. 85-93.

- 5) K. Yamamori, S. Yamaguchi, E. Maehara, and T. Matsui: Tolerance of shore crabs to tetrodotoxin and saxitoxin and antagonistic effect of their body fluid against the toxins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1157-1162 (1992).
- 6) 安元 健: 海産毒の分析と応用. *化学と生物*, **27**, 401-404 (1989).
- 7) B. J. Davis: Disc electrophoresis-II; Method and application to human serum proteins. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
- 8) U. K. Laemmli: Creavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 9) K. Shiomi, S. Yamaguchi, T. Kikuchi, K. Yamamori, and T. Matsui: Occurrence of tetrodotoxin-binding high molecular weight substances in the body fluid of shore crab (*Hemigrapsus sanguineus*). *Toxicon*, **30**, 1529-1537 (1992).