

0-1 アジアにおける水資源域の水質汚濁評価と有毒アオコ発生モニタリング手法の開発に関する研究

(3)アオコ等有毒藻類及び毒素のモニタリング手法の開発に関する研究

② 毒物質のモニタリング手法の開発に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

環境研究基盤技術ラボラトリー長

彼谷邦光

環境研究基盤技術ラボラトリー・環境分析化学研究室

佐野友春・高木博夫

<研究協力者>

中国科学院水生生物研究所

劉 永定

タイ国タイ科学技術研究所

Aparat Mahakhant

平成13～15年度合計予算額

16,426 千円

(うち、平成15年度予算額

5,473 千円)

[要旨] ①ミクロシスチンの種類の大部分を占めるノーマルミクロシスチンを選択的にモニタリングする手法を開発した。GSH-ノーマルミクロシスチン縮合物を合成し、この縮合物にトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNB) をさらに縮合させた。TNB-GSH-ミクロシスチンを比色法で計る液体クロマトグラフィー (LC) / 紫外線検出器 (UV)、LC/質量分析計 (MS) で測定することにより、全ノーマルミクロシスチン量を求めることができる。②GSH-ノーマルミクロシスチン縮合物を薄層クロマトグラフィーで展開し、ニンヒドリンで遊離アミノ基を発色させて検出することにより、分析機器のない開発途上国や有毒アオコ発生現場で簡単にミクロシスチンを検出することができる方法を開発した。③粒子径均一ポリマーを用いて、代表的な藍藻毒 (アオコ毒)、ミクロシスチン類 (Microcystin) に対して選択的な分子認識能を示す分離媒体を開発した。調製したポリマー粒子を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて評価した結果、ポリマー粒子の調製時に用いた添加物の構造が実際の Adda 部位の構造に近くなるにしたがって、MC-LR、MC-RRなどのMC類の保持に増加の傾向が見られ、用いた添加物によって Adda 部位を選択的に認識する部位が構築されていることが示唆された。また、メタクリル酸やビニルピリジンなどの機能性モノマーを用いて調製したポリマー粒子の評価では、MCの環状ペプチド部位の特定のカルボキシル基やグアニジル基を識別することが可能であることがわかり、約70種ともいわれるMC同族体の選択的な分離の可能性が示された。さらに、Adda部位に対する分子認識能の発現と環状ペプチド部位に対する識別能を組み合わせることで、これまで困難であるとされてきたミクロシスチンの一括分離の可能性が示唆された。

[キーワード] アオコ、全ノーマルミクロシスチン量、グルタチオン、TLC、分子鑄型

1. はじめに

淡水に生息する有毒微細藻類の中のシアノバクテリア〔藍藻〕は神経毒、肝臓毒や細胞毒などをつくっている。これらの毒素の中で毒性が強く、検出頻度の高い毒素はマイクロシスチンと呼ばれる環状ペプチド肝臓毒である。WHOは飲料水中のマイクロシスチンのガイドライン設定し、その暫定値マイクロシスチン-LRとして1mg/lとした。しかし、マイクロシスチンには70種類近い同族体があり、マイクロシスチン-LRだけではなく全てのマイクロシスチンを測定し、総マイクロシスチン量を求め、マイクロシスチン-LR換算等量として表すことが提唱されている。マイクロシスチンの総量を求める方法として、Kaya(1999)らの方法があるが、GC/MSを用いるために開発途上国向けではないと評価されている。中国やタイ等のアジア諸国や南アメリカの諸国からは高価な分析器機を用いない方法の開発が望まれている。

2. 研究目的

マイクロシスチンは7番目のアミノ酸の構造上の違いを基に4グループに分類される。7番目のアミノ酸がN-メチルデヒドロアラニン(Mdha)またはデヒドロアラニン(Dha)の場合はノーマルマイクロシスチンと呼ばれ、世界各地で検出されるマイクロシスチンの99%はこのグループに属する。アジア地域では100%がノーマルマイクロシスチンである。ノーマルマイクロシスチンの他、デヒドロブチリン(Dhb)の[Dhb7]-マイクロシスチン、L-セリン(L-Ser)の[L-Ser7]-マイクロシスチン、DL-アラニン(DL-Ala)の[DL-Ala7]-マイクロシスチン等がある。本研究ではアジアで検出されるノーマルマイクロシスチンを選択的に簡単に定量できる方法の開発を目的とした。

3. 研究方法

(1) マイクロシスチンのTLC

ノーマルマイクロシスチンは中国およびタイのアオコから抽出し、定法により固相抽出法によって分画した。この画分を酢酸ナトリウム中で無水酢酸で処理して、遊離のアミノ基をアセチル化した。アセチル化したマイクロシスチン画分を炭酸カリウム溶液とし、これにグルタチオン(GSH)を加えてSHをMdhaまたはDhaに付加させた。この反応溶液をODSカートリッジに添加し、GSH-マイクロシスチン縮合体を吸着させ、精製した。GSH-マイクロシスチン縮合体をクロロホルム：メタノール：水=15：60：25、V/Vの展開溶媒の薄層クロマトグラフィーで展開し、ニンヒドリン-エタノール溶液を噴霧し、ヒーター上で加熱して発色させた。

(2) マイクロシスチンのTNBS誘導体の調整

GSH-マイクロシスチン縮合体のグルタミン酸のアミノ基にトリニトロベンゼンスルホン酸(TNB)を付加させ、過剰のTNBを固相抽出法により除いた。TNB-GSH-マイクロシスチン縮合体は黄色の物質となり、比色定量できる。TNB-GSH-マイクロシスチン縮合体をさらに塩酸/メタノール中でメタノリシスすることにより、N-TNB-グルタミン酸ジメチルを得る。これを高速液体クロマトグラフィー(LC)またはLC/質量分析(MS)で測定することにより、マイクロシスチンを定量した。

(3) Adda 部位の構造類似物質の合成

① Phenylethyl methyl ether (Peme) の合成

乾燥 THF 20 ml に水素化ナトリウム 0.88 g (22 mmol) を加え、室温窒素雰囲気下でかく拌しな

から、乾燥 THF 30ml に溶解した 2-phenylethanol 2.44 g (20 mmol) を滴下し、さらに 1 時間室温でかく拌した。次に、ヨウ化メチル 3.54 g (25 mmol) を加え、マントルヒーターを用いて加熱還流しながら 2 時間かく拌を続けた。その後、水を加え酢酸エチルで抽出後、溶媒を減圧除去した。ヘキサン—酢酸エチル (4:1) の移動相でカラムクロマトグラフィーにより精製を行ない、無色液体を得た。

収量 1.96 g 収率 72.1%

¹H-NMR 200 MHz (CDCl₃) . : 2.88 (m, -CH₂-O-, 2H), 3.35 (s, -O-CH₃, 3H), 3.60 (m, Ph -CH₂-CH₂-, 2H), 7.10-7.35 (m, Ph -CH₂-, 5H)

MS; m/z 136 ([M]⁺)

② 2-methoxypropylbenzene (2mpb) の合成

乾燥 THF 20 ml に水素化ナトリウム 0.80 g (20 mmol) を加え、窒素雰囲気下でかく拌しながら、乾燥 THF 30 ml に溶解した 1-phenyl-2-propanol 2.50g (18 mmol) を滴下し、さらに 1 時間室温でかく拌した。次に、ヨウ化メチル 2.72 g (20 mmol) を加え、マントルヒーターを用いて加熱還流しながら 2 時間かく拌を続けた。その後、水を加え酢酸エチルで抽出後、溶媒を減圧除去した。ヘキサン—酢酸エチル (10:1) の移動相でカラムクロマトグラフィーにより精製を行ない、無色液体を得た。

収量 2.48 g 収率 89.9%

¹H-NMR 200 MHz (CDCl₃) . : 1.07 (d, -CH₃, 3H), 2.55-3.00 (m, Ph -CH₂-, 2H), 3.34 (s, -OCH₃, 3H), 3.47-3.60 (m, CH, 1H), 7.17-7.29 (m, Ph -CH₂-, 5H)

MS; m/z 150 ([M]⁺)

③ (2S, 3S)-3-methoxy-2-methyl-4-phenylbutyric acid methyl ester (MMPB methyl ester) の合成

図 7 に従い MMPB の合成を行なった。まず、乾燥 THF 40 ml に (R)-(+)-4-isopropyl-oxazolidin-2-one を 2.0 g (15.5 mmol) 加えて、窒素雰囲気下で -78 °C まで冷却しながらかく拌した。次に、*n*-BuLi (ヘキサン溶液 1.6 M) 9.6ml をゆっくりと滴下し、そのまま 30 分間かく拌を続けた。さらに、Propionyl chloride 1.49 g (16 mmol) をゆっくりと滴下し、30 分かかく拌後そのまま常温にした。次に少量の水を加え、分液精製の後、ヘキサン—酢酸エチル (9:1) の移動相でカラムクロマトグラフィーにより精製を行ない、4-isopropyl oxazolidin-2-one を得た。

収量 1.872 g 収率 65.3%

合成した 4-isopropyl oxazolidin-2-one を全量塩化メチレン 40 ml に加え、氷冷窒素雰囲気下でかく拌。次に、Dibutylbroryl triflate (塩化メチレン溶液 1.0 M) を 11.1 ml (11.1 mmol) と N,N-diisopropylethylamine を 1.57 g (12.2 mmol) を加えて 30 分かかく拌を続けた。その後、溶液を -80 °C まで冷却し、Phenylacetaldehyde 1.33 g (11.1 mmol) を加えて 30 分かかく拌し、さらに常温で 1.5 時間かく拌を続けた。次に、pH=7.5 のリン酸緩衝液 (0.5M) を加えて分液精製後、塩化メチレン相を濃縮。そこに、30 ml の MeOH を加えて溶液が均一になるまでかく拌後、30% H₂O₂ を 10 ml 加えて、さらに 1 時間かく拌。反応終了後、生成物を酢酸エチルで抽出し濃縮後、生成物をヘキサン—酢酸エチル (5:1) の移動相でカラムクロマトグラフィーにより精製を行ない、3-(3-hydroxy-2-methyl-5-methylene-oct-6-enoyl)-4-isopropyl oxazolidin-2-one を得た。

収量 1.848 g 収率 62.4%

合成した 3-(3-hydroxy-2-methyl-5-methylene-oct-6-enoyl)-4-isopropyl oxazolidin-2-one (0.52 g (17.7 mmol)) に MeOH を 5 ml 加え、次に 28% Sodium methoxide (MeOH 溶液) を 50 μ l 加えて氷冷下で 2 時間かく拌。反応終了後濃塩酸を 25 μ l 加えてさらにかく拌。濃縮後、塩化メチレン—MeOH (99:1) の移動相でカラムクロマトグラフィーにより精製を行ない、3-Hydroxy-2-methyl-4-phenyl-butyric acid methyl ester を得た。続いて、生成物全量をジメチルスルホキシド (DMSO) 3.5 ml, THF 1 ml, 水 25 μ l, ヨウ化メチル 0.75 ml と混合し、氷冷下でかく拌。さらに 0.3 g の NaOH を乳鉢ですりつぶして反応系に加えた。その後、50 ml の塩化メチレンと 20 ml のリン酸緩衝液 (pH=3.0, 0.5 M) を加えてかく拌を続けた。反応終了後、分液精製し、塩化メチレン—MeOH (98:2) の移動相でカラムクロマトグラフィーにより精製を行ない、無色液体の 3-Methoxy-2-methyl-4-phenylbutyric acid methyl ester を得た。生成物は、既知のスペクトルデータより目的物質であることを同定した (26)。

収量 247 mg (1.11 mmol) 収率 62.6%

¹H-NMR 500 MHz (CDCl₃) .: 1.25 (d, CH-CH₃, 3H), 2.51 (m, CH-CH₃, 1H), 2.70-2.87 (m, Ph-CH₂, 2H), 3.24 (s, CH-OCH₃, 3H), 3.65 (s, CO-OCH₃, 3H), 3.76 (m, CH-OCH₃, 1H), 7.18-7.29 (m, Ph-CH₂, 5H)

4. 結果・考察

マイクロシスチンの簡易分析法の開発

アジアで検出されるマイクロシスチンは全てノーマルマイクロシスチンでこのマイクロシスチンの簡易定量法はマイクロシスチンのモニタリング手法としても有用である。マイクロシスチン画分にはマイクロシスチンの他、種々のペプチドが混入してくる。これらのペプチドのアミノ基はマイクロシスチン定量時に妨害物質となるので、事前にマスクした。ノーマルマイクロシスチンと GSH との反応はノーマルマイクロシスチンの Mdha または Dha の α - β 二重結合へのスルフヒドリル基の求核反応である。従って、この反応は 7 番目のアミノ酸がアラニンやセリンとは反応しない。[Dhb7] マイクロシスチンのデヒドロブチリンには α - β 二重結合があるが末端にメチル基があり、スルフヒドリル基との反応性はない。従って、GSH と反応するマイクロシスチンはノーマルマイクロシスチンだけである。GSH-ノーマルマイクロシスチン縮合体は固相抽出用 ODS カートリッジに吸着され、反応液に含まれる試薬類と分離され、メタノールで溶出した。この縮合体の GSH 側にあるグルタミン酸のアミノ基を TNB でラベルされた TNB-GSH-マイクロシスチンを 332 nm で比色定量した。さらに、この縮合体を塩酸/メタノールでメタノリシスすることにより生成する N-TNB-グルタミン酸ジメチルを LC/UV332nm で定量し、これをノーマルマイクロシスチン量に換算した。より高感度化を目的として、LC/MS での条件を検討した。イオン化法としては大気圧イオン化法でネガティブイオンによる SIM [(m/z 385 (M-H)-)] が高感度で、安定したイオンが得られた。サロゲートとして 2-TNB アミノアジピン酸ジメチル [m/z 399 (M-H)-] を用いた。

液体クロマトグラフィー (LC) / 紫外線検出器 (UV)、LC/質量分析計 (MS) で測定することにより求めた全ノーマルマイクロシスチンの検出限界はそれぞれ 1 mg, 10ng および 0.1 ng であった。

GSH-ノーマルマイクロシスチン縮合体を薄層クロマトグラフィーで展開し、ニンヒドリンで発色させた。マイクロシスチンの GSH 縮合体の R_f 値はマイクロシスチン-R_R が 0.35、-L_R が 0.5

付近であった。Rf0.55付近に微量のニンヒドリン陽性のバンドが認められた。このバンドは-YRを推定された。検出限界は10 ng程度であった。このマイクロシスチン簡易測定法は分析機材の無いサンプリング場所でも短時間でスクリーニングするために開発された手法であり、今後、中国やタイの湖沼におけるマイクロシスチンのスクリーニングに利用する予定である。また、感度敵にも優れており、定量性にも問題がないことから、定量法としても利用できるものと考えられる。

分子鑄型によるマイクロシスチン用前処理剤の開発

Adda 部位の構造類似物質やアルキルベンゼンを添加物として用いたポリマー粒子において、マイクロシスチンに対する選択的な認識能が発現し、それは Adda 部位に対する認識が関与していることが示唆された。しかしながら、マイクロシスチンの環状ペプチド側の違いに依存する個々の MC に対する選択性の違いを制御することは不可能であった。これは MC の立体構造に依存していると考えられ、抗体を用いた実験では、同じ部位を認識する抗体を用いても、絶対的な保持能は環状ペプチド側の構造によって異なることが報告されている。このような構造の違いは、環状ペプチドの2つのアミノ酸の違いによるものであり、例えば、C18 カラムを用いた評価においては、移動相の pH を変化させたときにマイクロシスチン-LR、-RR の保持挙動の違いが生じる。したがって、マイクロシスチンの分離を行なう上で、環状ペプチド側に対する選択性を制御することが可能となれば、Adda 部位の認識能と合わせてより効率的な分離が期待できる。そこで、マイクロシスチンの環状ペプチドのいくつかの官能基と相互作用可能な機能性モノマーを導入したポリマー粒子を用いることによって、MC 同族体を選択的に識別できる可能性を検討した。

調製したポリマー粒子と MC 類の保持挙動

マイクロシスチンの環状ペプチド部位の識別を目的とした、機能性モノマー含むポリマー粒子を調製した。調製したポリマー粒子の略号ならびに組成を表2に示す。機能性モノマーを含むすべてのポリマー粒子において、架橋剤とともに機能性モノマーを膨潤段階で加え、重合を行なった。調製したポリマー粒子を前節までと同様の方法で HPLC を用いて評価を行ない、マイクロシスチンに対する保持の選択性を比較した。

表2. 機能性モノマーを含むポリマー粒子の略号と組成

	架橋剤	機能性モノマー	希釈剤
E-tol	EDMA	-----	Toluene
E-MAA	EDMA	Methacrylic acid (MAA) (5%)	Toluene
E-4Vp	EDMA	4-Vinylpyridine (4Vp) (5%)	Toluene
E-MAA-4Vp	EDMA	MAA (5%) + 4Vp (5%)	Toluene

MAA あるいは 4Vp のみを含むポリマー粒子における、MC 類の保持時間の比較を表3に示した。表7に示すように、MAA では MC-RR が、4Vp では MC-LR の保持が大きくなっていることが分かる。逆に、保持されていない MC 類については、機能性モノマーを含まない E-tol の場合よりも保持が小さくなっており、保持の効果以外に排除的な効果が働いていることも確認できる。この2つの MC の相違点は、環状ペプチド中の1つのアミノ酸残基の違いだけであり、それ以外はまったく同じである。したがって、マイクロシスチン L 型アミノ酸が保持に寄与していると考え

られる。また、塩基性モノマーである 4Vp を用いることによって MC-LR の保持が増加していることから、LL 型アミノ酸残基がグアニジル基の場合には、隣接するアスパラギン酸由来のカルボキシル基を遮蔽もしくは優先的にグアニジル基のみが保持されるためにこのような結果が得られたと思われる。これらの結果より、機能性モノマーを用いることによって、ミクロシスチンの環状ペプチド部位を識別できる可能性が示された。そこで、これらのモノマーを組み合わせることで、それぞれの MC 類に対して同程度の保持効果を示すポリマー粒子の調製が可能であると考え、表 2 に示すように MAA と 4Vp の両方を含むポリマー粒子を調製し、評価を行なった。また、調製したポリマー粒子と比較するために、E-MAA と E-4Vp を等量づつ混合したポリマー粒子（以下 Mix）も合わせて評価を行なった。それぞれのポリマー粒子における各溶質の保持時間の比較を図 17 に示した。図 17 に示すように、MAA と 4Vp の両方をポリマー調製時に加えた E-MAA-4Vp においては、MC 類ならびに酸性化合物である安息香酸に対して全く保持の効果が見られなかった。これは、MAA と 4Vp を同時に用いて調製したため、機能性モノマーの官能基同士が相互作用しており、溶質に対

表 3. 各ポリマー粒子での MC の溶出時間 (min)

	MC-LR	MC-RR
E-tol	2.31	3.60
E-4Vp	14.7	1.75
E-MAA	2.09	10.5

HPLC condition

Mobile phase; 100%methanol, Flow rate; 1.0 ml/min

Column size; 150 mm × 4.6 mm I.D., Temperature; 30 °C, Detection; UV 239 nm

する保持がなくなったものと考えられる。それに対して、それぞれのモノマーを含むポリマー粒子を混合した Mix においては、どちらの機能性モノマーの効果も発現していることが分かる。したがって、これらのポリマー粒子の混合比を変えることによって、MC 類の保持を選択的に制御し、一括して識別できる可能性が示された。

ミクロシスチンの一括分離の検討

以上の結果から、Adda 部位の構造類似物質を用いて調製したポリマー粒子では、架橋ポリマー構造の分子空隙の制御に基づく、Adda 部位に対する選択的な認識部位が構築されていることが示唆された。しかしながら、MC の環状ペプチドのアミノ酸残基の機能や構造の違いに由来する絶対的な保持の差は、Adda 部位の認識だけでは制御することが不可能であった。これは、先にも示した MC の抗体を用いた実験においても報告されており、仮に、毒性発現に関与する Adda 部位を選択的に認識しても、環状ペプチドに対する保持を制御しない限り、MC 同族体を一括して分離することは不可能であることを示している。したがって、現段階において、MC 類を一括分離する最良の手段は、Adda 部位に対する選択的な認識と機能性モノマーによる環状ペプチドに対する識別能の制御を組み合わせることであり、前節までに用いたポリマー粒子を同時に用いることによって MC 類の一括分離を試みた。

添加物を用いて調製したポリマー粒子 (E-tol-pentyl) と 4Vp を含むポリマー粒子 (E-4Vp) を混合し, 水-MeOH のスラリーを用いて HPLC 用カラムに充てんした. サンプルには凍結乾燥したアオコの細胞を MeOH により抽出したものを使用し, 比較対象として C18 カラムを用いて評価を行なった. 汎用の C18 カラムでは MC 類のピークは溶媒付近のピークに重なっており, 確認することは極めて困難である. それに対して, 調製したポリマー粒子を用いたカラムにおいては, MC 類のピークが完全に分離した状態で確認できる. この MC 類として示したピークの中には, 少なくとも MC-LR, MC-RR, MC-YR の 3 種の同族体が含まれていることが, 標準物質を用いた評価から明らかとなっている. このように, Adda 部位に対する選択的な認識能と環状ペプチドに対する選択的な識別能を利用することによって, MC 類の一括分離の可能性が示された.

5. 本研究により得られた成果

アジアで発生する微細藻類毒の中で最も頻繁に検出されるノーマルミクロシスチンの総量を求める新定量法を開発した. 本方法は調製した試料中のミクロシスチンの存在を現場でスクリーニングすることができる方法である.

6. 引用文献

- 1) K.Kaya and T. Sano. *Analytica Chimica Acta* 386, 107-112 (1999)
- 2) T. Sano and K. Kaya. *Tetrahedron Lett.* 47, 8603-8606 (1995)
- 3) T.Sano, K.A.Beattie, G.A.Codd, and K.Kaya. *J. Nat. Prod.*61, 851-853 (1998)
- 4) T. Sano and K.Kaya. *Tetrahedron* 54, 463-470 (1998)
- 5) K.A.Beattie, K.Kaya, T.Sano, and G.A. Codd. *Phytochem.* 47, 1289-1292 (1998)
- 6) M.Namikoshi, B. W. Choi, F. Sum, K.L Rinehart, W.W.Carmichael, W.R. Evans, V.R.Beasley. *J. Org. Chem.* 60, 3671-3679 (1992)
- 7) G.A. Codd, S. G. Bell, K. Kaya, C. J. Ward, K. A. Beattie, J. S. Metcalf. *Eur. J. Phycol.* 34, 405-415 (1999)
- 8) K.Kaya, T. Sano. *Anal. Chim. Acta* 450, 73-80 (2001)

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表 (学術誌・書籍)

<学術誌、(査読あり)>

- ① Kaya, K., Sano, T., Inoue, H., and Takagi, H. 2001, *Analytica Chimica Acta*, 450, 73-80. Selective determination of total normal microcystin by colometry, LC/UV detection and/or LC/MS.
- ② Kubo, T., Hosoya, K., Watabe Y., Tanaka, N., Sano, T. and Kaya, K. 2004, *J. Sep. Sci.*, 27, 316-324. Recognition of hepatotoxic homologues of microcystin using a combination of selective adsorption media.

<学術誌（査読なし）>

なし

<書籍>

①彼谷邦光、2001 「有毒シアノバクテリア」p148 （裳華房）

<報告書類等>

なし

(2) 口頭発表

①K.Kaya and T. Sano. A simple detection method of normal microcystin using thin layer chromatography. Xth International Conference on Harmful Algae. St. Pete Beach, Florida, USA. October 21 -25 (2002)

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

①彼谷邦光 2003,6月 「環境科学功績賞」日本環境化学会(2003)「シアノバクテリア(アオコ)の毒素の化学と分析法の開発」

(5) 一般への公表・報道等

①サイエンス・ゼロ NHK教育テレビ「有毒アオコの大発生を避け」2003年6月3日放映

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

本研究で開発したアオコ毒ミクロシスチンの定量法(MMPB法)は環境省の水質基準見直しの要監視項目となったミクロシスチンの定量法に指定されており、今後、全国調査に用いられる。MMPB法は各国のミクロシスチン定量法の中で最も精度の高い方法であることが、EUの行ったラボラトリー間クロスチェックで証明されているので、今後各国に普及するものと考えられる。