

琉球大学学術リポジトリ

[寄稿]組換え酵素を用いた下痢性貝毒簡易測定キット 「DSP Rapid Kit」の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): 下痢性貝毒, オカダ酸 キーワード (En): PP2A, Diarrhetic Shellfish Toxins, Okadaic acid 作成者: 池原, 強, 安元, 健, IKEHARA, Tsuyoshi, YASUMOTO, Takeshi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016633

寄 稿

組換え酵素を用いた下痢性貝毒簡易測定キット 「DSP Rapid Kit」の開発

池原 強*・安元 健**

* (株) トロピカルテクノセンター ** (財) 沖縄科学技術振興センター コア研究室

Development of rapid assay kit (DSP Rapid Kit) for okadaic acid using a recombinant enzyme

Tsuyoshi IKEHARA*, Takeshi YASUMOTO**

*Tropical Technology Center Ltd., **Okinawa Science and Technology Promotion Center

キーワード：下痢性貝毒、オカダ酸、PP2A

Keywords : Diarrhetic Shellfish Toxins, Okadaic acid, PP2A

概要

「DSP Rapid Kit」は、有毒プランクトンを捕食した二枚貝が原因となって起こる下痢性貝中毒の原因物質を簡便・迅速に検出・定量する事が出来る測定キットである。「DSP」とは Diarrhetic Shellfish Poisoning の略で、下痢性貝中毒を意味する。その原因物質（オカダ酸：OA、ジノフィシストキシン：DTX）を迅速に定量出来るキットということで「DSP Rapid Kit」という商品名が付けられた。本キットは、プロテインホスファターゼ2A (PP2A) 活性阻害法によって下痢性貝毒を迅速に定量することが出来る。バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を利用して生産した高純度の組換えPP2Aを使用しているため、測定精度と感度が非常に高く、すぐれた再現性があり、また、簡便な操作で1時間以内に結果が判定できるという点も優れて

いる。本稿では、組換えPP2Aの生産方法を中心にキット開発へ向けたこれまでの取り組みについて紹介する。

1. はじめに

下痢性貝毒とは、渦鞭毛藻に属する単細胞藻類が生産する毒で、二枚貝（ホタテガイ、ムラサキイガイ、カキ、アサリなど）に蓄積してヒトに下痢症を起す毒成分である。その代表的な成分であるオカダ酸（OA）は、複数のエーテル環を持ったカルボン酸であり（分子式 $C_{44}H_{68}O_{13}$ ）、オカダ酸以外の原因物質としては、オカダ酸の官能基の一部がメチル基やアシル基に置換されたジノフィシストキシン群（DTX群）が知られている（図1）。二枚貝の養殖は魚類と異なって餌の投与による環境負荷がなく、比較的単純な施設と技術で可能なので急速に拡大した。ところが、貝毒の出現も歩調を合わせて増加し、貝毒監視は世界的課題となった。従来、下痢性貝毒の検査方法では、貝の抽出物をマウスの腹腔内に投与し、致死活性を測定する方法（マウス法）が公定法となっており、その毒性をマウスユニット（MU）

*5-1 Suzaki, Uruma, Okinawa 904-2234, Japan

*〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎5-1

**12-75 Suzaki, Uruma, Okinawa 904-2234, Japan

**〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎12-17

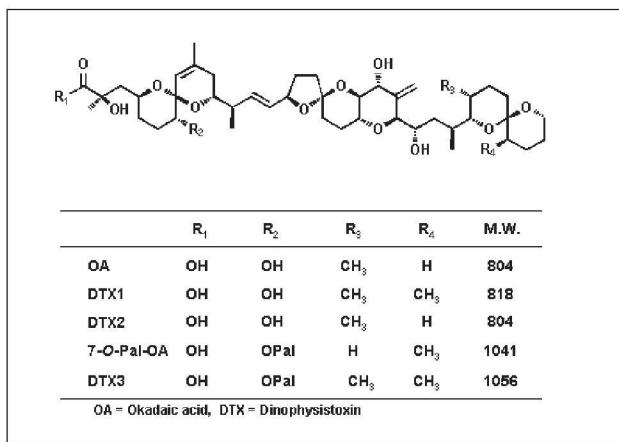


図1. オカダ酸 (OA) 群の構造

という単位で表している。このマウス法に関しては、動物愛護の面および検査に要する費用や時間の点から課題が多く、代替法の検討が世界的に進められている。

オカダ酸は、セリン・スレオニンホスファターゼ2A (PP2A) と呼ばれるタンパク質脱リン酸化酵素に極めて特異的に結合し、その酵素活性を濃度依存的に阻害することが知られている。PP2Aの基質としてパラニトロフェニルリン酸 (pNPP: 無色透明) を用いると脱リン酸化反応によってパラニトロフェノール (pNP: 黄色) が生成し、反応液が黄色に発色する。しかし、オカダ酸が存在すると、PP2Aの活性阻害が起こり、発色しない。従って、この発色の強度を測定することによってオカダ酸を定量する事が出来る(図2)¹⁾。この原理を利用して安元らは、下痢性貝毒測定キットを最初に試作した²⁾。二枚貝の毒化による被害は世界的な問題であることから、測定キットを普及させるためには、活性が安定したPP2Aを大量生産することが課題であった。従来、研究分野では、ウサギ骨格筋やヒト血球などの動物組織から煩雑な抽出・精製過程を経て調製さ

れたPP2Aが利用されてきた。これらのPP2A精製品は生化学試薬として大きな需要があることから、既に商品化されているものが幾つか存在する。しかし、これら動物組織から調製された市販のPP2Aは、高価なことに加えて活性が一定でなく、さらに供給が不安定なので、定量のための試薬としては、より優れた酵素の供給が望まれていた。そこで、PP2Aを下痢性貝毒測定キットの構成試薬として供給するために遺伝子工学的手法を用いた製造方法の確立を試みた。

2. バキュロウイルス発現系によるPP2Aの大量調製

PP2Aは、タンパク質のセリン・スレオニン残基に結合したリン酸基を加水分解するセリン・スレオニンホスファターゼの一つで、触媒サブユニット (Cサブユニット; PP2Ac) と調節サブユニット (Aサブユニット) のヘテロ2量体、さらにもう一つの調節サブユニット (Bサブユニット) とのヘテロ3量体を形成し真核細胞内に普遍的に存在する。これまでの研究から、大腸菌発現系を利用して生産されたリコンビナントPP2Aの触媒サブユニット (Cサブユニット; PP2Ac) は酵素活性を持たないことがわかっていた。これは、酵素活性を有するPP2Acを生産するためには、タンパク質を合成する段階で何らかの翻訳後修飾 (糖鎖の付加やリン酸化等) が必要であることを示唆している。大腸菌以外の発現系として、酵母を用いた発現系や昆虫細胞を用いた系、および哺乳動物の培養細胞を用いた系などを用いたリコンビナントPP2Acの製造が試みられていたが^{3~6)}、いずれも得られたリコンビナントPP2Acの酵素活性、収量および収率の点で実用化のレベルには至っていなかった。この様な状況の中、我々はバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を利用してリコンビナントPP2Acの製造を試みた。バキュロウイルス発現系を利用したPP2Aの発現・精製については、既に幾つかの報告例があった^{3,7)}。しかし、PP2Aの大量供給を行っていく上では、生産されたリコンビナントPP2Acの比活性、純度、および生産量をさらに上げ、精製スキームを簡略化する必要があった。そこで今回は、これまで検討されていなかった8個のヒスチジンからなるHisタ

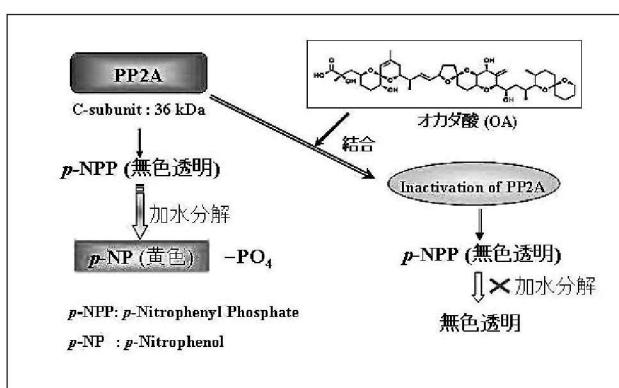


図2. PP2A活性阻害法の原理

グを PP2Ac のアミノ末端側に付加したリコンビナント PP2Ac (His-PP2Ac) 発現用の組換えバキュロウイルスを作製した。さらに、バキュロウイルス発現系で広く利用されている SF9 細胞よりもタンパク質の発現が数倍高いといわれている High Five 細胞を用いて、発現条件の検討と精製タンパクの活性測定、オカダ酸による活性阻害作用の確認を行った⁸⁾。His-PP2Ac は、High Five 細胞内で精製可能な可溶性タンパク質として高発現を示した。His タグを利用して PP2Ac の精製結果を図 3 に示す。SDS-PAGE 後の CBB 染色の結果から、目的タンパク質が高純度で精製できたことがわかる（図 3）。

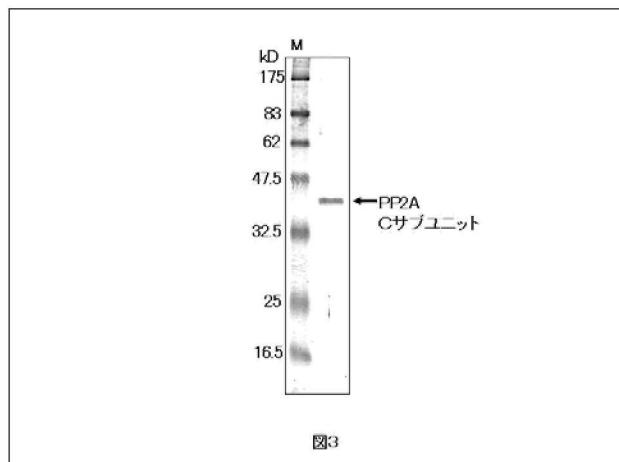


図3

図3. 精製された PP2A の SDS-PAGE

精製したリコンビナント His-PP2Ac は高い比活性を示し、オカダ酸によってその酵素活性は阻害された（図 4）。これらの結果から、High Five 細胞を

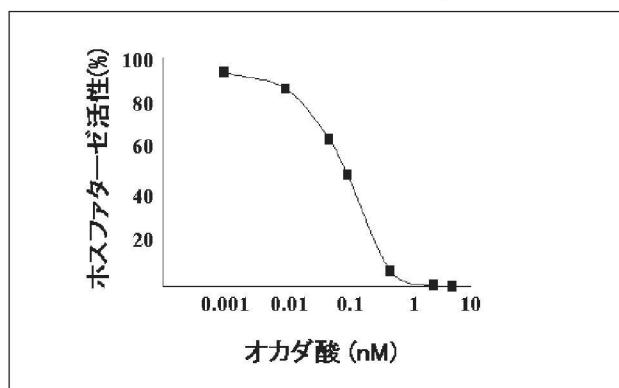


図4. オカダ酸による PP2A 活性阻害作用

用いたバキュロウイルス発現系を利用することによって、活性のあるリコンビナント PP2Ac の発現が可能であることがわかった。

さらに、リコンビナント PP2Ac の大量生産を効

率よく行うために、酵素発現時における昆虫細胞の培養条件について検討した。バキュロウイルス発現系で使用される昆虫細胞の一般的な培養温度は27°C であるが、ウイルス感染後の High Five 細胞を従来の培養温度よりも高い温度、または、低い温度で培養し、His-PP2Ac の発現量や精製されるタンパク質の比活性を比較した。その結果、従来の温度と比べて低い温度（16~20°C）で PP2A を発現させると、精製された PP2A の比活性が高くなることがわかった。特に、19°C で PP2A を発現させると、精製された His-PP2Ac の比活性は、従来の 27°C と比べて 6 倍も高くなった（図 5）。従来よりも低い

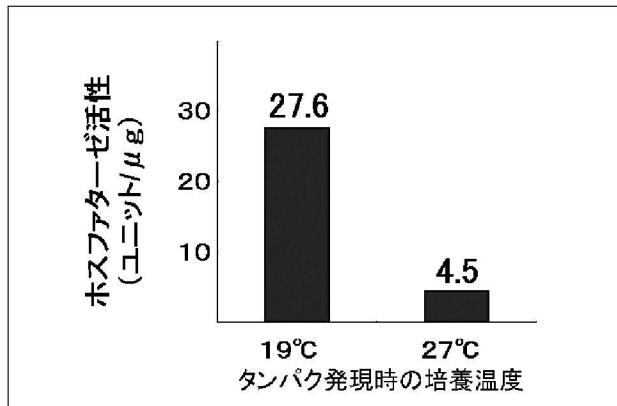


図5. PP2A 酵素活性の比較

温度でのタンパク質発現が PP2A の比活性を高めるメカニズムについては今のところよく分かっていない。しかし、比活性の上昇に加えて、精製純度や収量も多少上がること、および PP2A の活性に翻訳後修飾等の関与が示唆されていることから、低温でのリコンビナント PP2A の発現が、昆虫細胞内での分解や翻訳後修飾に何らかの影響を及ぼして、本来の活性を維持する方向に働いている可能性が考えられる。

これまで、下痢性貝毒簡易測定キットの開発において懸念材料であった PP2A の大量供給が、バキュロウイルス発現系を用いて PP2A を低温発現させることによって可能になった。この成果により、下痢性貝毒簡易測定キットの製品化へ向けた取り組みが加速することになった。

3. 「DSP Rapid Kit」の開発

バキュロウイルス発現系によって大量生産された PP2A を利用して、下痢性貝毒の原因物質であるオカダ酸の簡易測定キットの開発を行った。キット開

発のためには、キットに用いる PP2A の保存安定性を検証することがキットの使用方法及び使用期限の設定上、極めて重要な事柄の一つである。そこで、保存温度、保存溶液の組成等様々な条件設定を行い、長期間（6ヶ月以上）にわたり酵素の保存安定性を検証し、保存に最適な条件を決定した。また、オカダ酸による酵素活性の阻害効率を測定し、測定キットに最適な測定条件の検討を行い、操作マニュアルを作成した。製品化された下痢性貝毒簡易測定キット「DSP Rapid Kit」の概観を図 6 に、測定方法を図 7 に示す。本キットは、①高純度の組換え PP2A を用いているため、測定精度と感度が非常に高く、すぐれた再現性があり、②高額機器や高度な技術を必要とせずに下痢性貝毒を定量することが可能、また③簡便な操作で 1 時間以内に結果が判定できるという 3 つの点で優れており、輸入あるいは水揚げされる貝類の出荷の適否を即座に判定できるので、食品衛生や漁業関係者にとって朗報となっている。

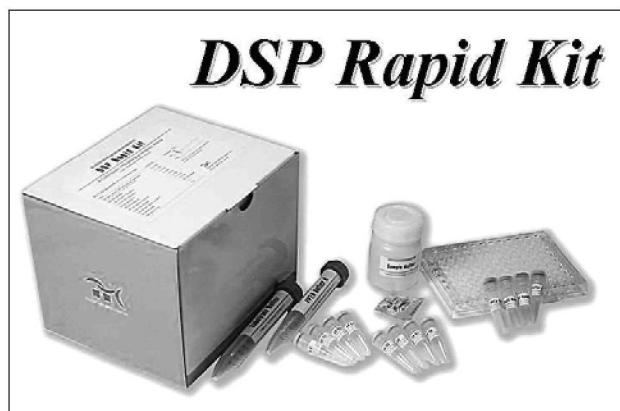


図 6. 下痢性貝毒簡易測定キット「DSP Rapid Kit」

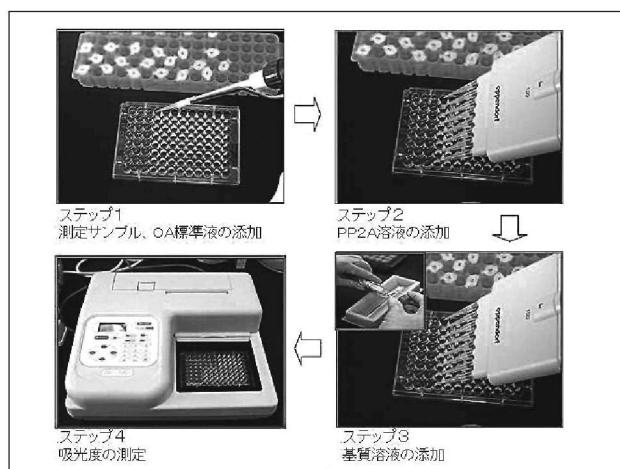


図 7. 「DSP Rapid Kit」の操作手順

4. 今後の展開

バキュロウイルス発現系による PP2A 生産技術は、平成15年に J S T と沖縄県による地域結集型共同研究事業「亜熱帯生物資源の高度利用」から生まれた。その後、平成18年度沖縄産学官共同研究推進事業へ引き継がれ、DSP キットの開発に至った。本キットによる測定方法は、食品や環境成分の分析法を評価する機関である AOACI (Association of Official Analytical Chemists International) において、世界的公定法の候補として取り上げられており、現在、承認に向けたデータの蓄積が進められている。沖縄から生まれた技術によって開発された商品が、世界の公定法として認められる日も近い。

(株)トロピカルテクノセンターでは、事業化に向けた取り組みに加えて、PP2A の構造・機能解析に関する基礎研究も行われている^{9~11)}。その研究成果は、海外を含めた多くの研究者に新たな情報を提供していることから、基礎研究の分野での貢献度も高いと考えられる^{12~14)}。今後、この様な基礎研究から新たな技術シーズが生まれてくることが期待できる。

参考文献

- 1) Takai A., Mieskes G., *Biochem. J.*, **275**, 233-239, (1991)
- 2) Tubaro A., Florio C., Luxich E., Sosa S., Loggia R. D., and Yasumoto T., *Toxicon* **34**, 743-752, (1996)
- 3) Kamibayashi C., Estes R., Lickteig R. L., Yang S. I., Craft C., and Mumby M. C., *J. Biol. Chem.* **269**, 20139-20148, (1994)
- 4) Wadzinski B. E., Eisfelder B. J., Peruski Jr. L. F., Mumby M. C., and Johnson G. L., *J. Biol. Chem.* **267**, 16883-16888, (1992)
- 5) Evans D. R., Myles T., Hofsteenge J., and Hemmings B. A., *J. Biol. Chem.* **274**, 24038-24046, (1999)
- 6) Swiatek W., Sugajska E., Lankiewicz L., Hemmings B. A., and Zolnierowicz S., *Eur. J. Biochem.* **267**, 5209-5216, (2000)
- 7) Myles T., Schmidt K., Evans D. R., Cron P., and Hemmings B. A., *Biochem. J.* **357**, 225-232, (2001)
- 8) Ikehara T., Shinjo F., Ikehara S., Imamura

- S., and Yasumoto T., *Protein Expr. Purif.* **45**, 150-156, (2006)
- 9) Ikehara T., Ikehara S., Imamura S., Shinjo F., and Yasumoto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 1052-1057, (2007)
- 10) Ikehara T., Imamura S., Sano T., Nakashima J., Kuniyoshi K., Oshiro N., Yoshimoto M., and Yasumoto T., *Toxicon*, **54**, 539-544, (2009)
- 11) Takemoto A., Maeshima K., Ikehara T., Yamaguchi K., Murayama A., Imamura S., Imamoto N., Yokoyama S., Hirano T., Watanabe Y., Hanaoka F., Yanagisawa J., and Kimura K., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, in press
- 12) Cho U.S., and Xu W., *Nature*, **445**, 53-57, (2006)
- 13) Xing Y., Li Z., Chen Y., Stock J. B., Jeffrey P. D., and Shi Y., *Cell*, **133**, 154-163, (2008)
- 14) Xu Y., Chen Y., Zhang P., Jeffrey P. D., and Shi Y., *Molecular Cell*, **31**, 873-885, (2008)