

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10697

研究課題名(和文) オンサイト分析を指向した幻覚性キノコ成分の新規アッセイシステム構築

研究課題名(英文) Development of new assay system for on-site analysis targeting hallucinogenic compounds in mushrooms

研究代表者

森田 いずみ (MORITA, IZUMI)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20299085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：規制薬物の拡散や乱用の取り締まりにおいて、被疑物質を簡便・迅速に特定できるオンサイト免疫測定法は有用である。しかし、その構築に必須となる高親和力抗体の入手は困難である。今回は、麻薬である幻覚性キノコの幻覚成分シロシビン、シロシンに対する新規モノクローナル抗体の調製を行った。この抗体を用いて、幻覚性キノコ中のシロシビンおよびシロシンを測定することが可能であった。さらに、シロシビンについては、試験管内親和性成熟により親和力を改善した変異一本鎖Fvフラグメントが得られ、これを用いて、クエンチ抗体を創製した。今回得られた抗体により、実用的なオンサイト分析法を確立できるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

規制薬物の分析は、現在、可搬性に乏しい大型機器を用いる機器分析が多用されているが、簡便・迅速に被疑物質を現場で特定できるオンサイト分析法を確立することは、その成分の拡散や乱用を防止するうえで極めて社会的意義が大きい。今回、分子量が小さく高親和力抗体の創製が特に難しいシロシビン、シロシンについて、免疫原を工夫することや、試験管内親和性成熟の手法を用いることで、実用的なモノクローナル抗体を新規に創製することが可能となった。本研究で確立した技術基盤は、その他のモニターが必須とされる低分子化合物のオンサイト免疫測定法の確立にも広く適応が可能と期待される。

研究成果の概要(英文)：Rapid, feasible on-site immunochemical assays are suitable for regulating the illicit use and circulation of controlled drugs. These approaches require specific antibodies, but no practical antibodies are available. In this study, we generated novel monoclonal antibodies to identify psilocybin (Pyb) and psilocin (Psi) contained within hallucinogenic mushrooms. The enzyme-linked immunosorbent assay systems developed using these antibodies enabled immunochemical determination of Pyb and Psi in a dried powder derived from the hallucinogenic mushroom, *P. cubensis*. In addition, mutant single-chain Fv fragments (scFv) that recognize Pyb with improved affinity were generated via in vitro affinity-maturation. The mutant scFvs were converted to Q-body for on-site immunochemical analysis. We expect that these antibodies will enable the development of practical on-site analytical systems targeting Pyb and Psi.

研究分野：分析化学

キーワード：抗体 シロシビン シロシン オンサイト分析

1. 研究開始当初の背景

昨今、麻薬、覚せい剤、危険ドラッグなど規制薬物のインターネットによる入手が可能となり、その乱用による事故などが後を絶たない。これら規制薬物の密輸の取り締まりや被疑者の使用歴の証明などのために、現在、質量分析計を検出手段とするクロマトグラフィー (LC/MS や GC/MS) など、大型機器による測定が行われている。しかし、試料の煩雑な前処理が必要で、高度な測定技術と機器の保守も求められるため、より簡便・迅速に結果が得られるオンサイト分析法の確立が望まれる。求められる諸条件を考慮すると、抗原抗体反応に基づく免疫測定法が適している。免疫測定法には多岐にわたる変法が存在するが、実用的な方法を確立するためには、分析対象に対して十分な親和力と特異性を示す抗体が必須となる。しかし、規制薬物の多くは、それ自体が免疫原性を持たず、そのまま動物に投与しても抗体が産生されない低分子化合物 (ハプテン) であり、高親和力抗体の産生は容易ではない。今回対象とする幻覚性キノコ含有の幻覚成分であるシロシビン、シロシンは、麻薬及び向精神薬取締法で規制されている。これらは、ハプテン抗原の中でも分子量が小さく (それぞれ 284.25、204.27)、高親和力抗体の調製が極めて難しい (図 1)。実際、シロシビンについては抗体産生の報告は皆無であり、シロシンについては、1 例の報告があるのみである。我々は、これまでに様々な低分子化合物について特異モノクローナル抗体を新規に調製し、免疫測定法を開発してきた。さらに、遺伝子工学的手法により、動物由来の天然型抗体よりも大きな親和力を有し、より高感度な免疫測定法を可能とする変異抗体へ改変することにも成功している。そこで、これまでに我々が培ってきた様々な手法を組み合わせ、難物抗原であるシロシビン、シロシンについて、目的に合う高親和力抗体を創製し、オンサイト分析系の確立を目指す。

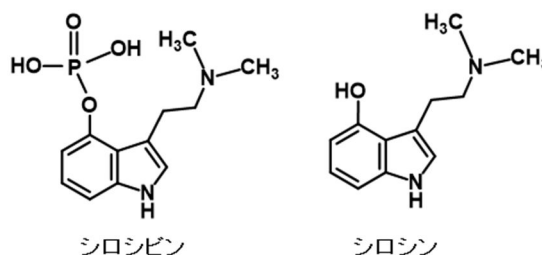


図 1. シロシビン、シロシンの構造

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、未だにオンサイト分析が困難なシロシビンとシロシンについて特異抗体をキー試薬とする簡易免疫測定法を開発し、その取り締まりに貢献することである。我々のこれまでの免疫化学と分子生物学の知識・技術を結集して、これまでに抗体産生例の少ないシロシビンおよびシロシンについて、実用的な抗体を創製する。さらに、創製した抗体を用いて、簡便・迅速なオンサイト免疫測定法の構築を試みる。

3. 研究の方法

シロシビンおよびシロシンは分子量が小さく、抗体の抗原結合部位を構築するアミノ酸側鎖との相互作用点が少ないため、高親和力抗体の誘導には工夫が必要になる。そこで、シロシビンは、より免疫原性を発揮させることを期待して、分子内のリン酸基エステルを未修飾の状態を高分子キャリアーと結合し、免疫原として調製することを企てた。シロシンについてはさらに分子量が小さく極性官能基に乏しいため、高親和力抗体の産生が難しい。そこで、かさ高い *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) 基を付加することでシロシンの分子量が増大することを利用した高親和力抗体の産生についても検討することとした。得られた 6 種の免疫原をそれぞれ A/J マウスおよび BALB/c マウスに投与し、良好な抗体産生が認められたマウスの脾細胞を用いて、常法に従い、ハイブリドーマ産生細胞株をそれぞれ樹立した。この細胞から産生されるモノクローナル抗体について、ELISA により詳細な性能評価を行った。さらに、シロシビンについては、「試験管内親和性成熟」により、高親和力抗体への改変を試みた。すなわち、抗シロシビン抗体の H 鎖と L 鎖の変換部を遺伝子操作により連結し、野生型 scFv へと変換した。その遺伝子の全域に error-prone PCR により、ランダム変異を導入して、変異 scFv ライブラリーを構築した。この変異 scFv ライブラリーについて、当研究室で開発したクローンアレイプロファイリング (CAP) 法に付し、改良型変異 scFv の探索を試みた。得られた変異 scFv を用いて、簡便・迅速な測定を可能にするオンサイト免疫測定法を構築すべく、新しい原理に基づく蛍光センサー素子のクエンチ抗体 (Q-body) の創製を試みた (図 2)。

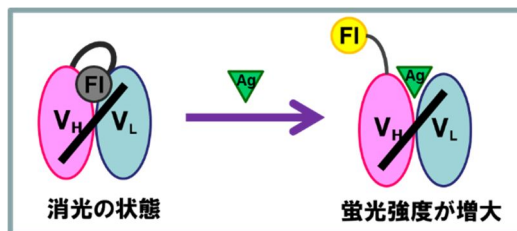


図 2. Q-body による測定原理

4. 研究成果

シロシピンについては、4-ヒドロキシ-N-メチルトリプタミンを出発物質として、3工程でリン酸基を持つカルボン酸に導いたのち、活性エステル法によりウシ血清アルブミン (BSA) あるいはスカシガイヘモシアニン (KLH) と結合させ、リン酸の保護基を除去して目的の免疫原 2 種を得た。シロシンについては、同じく 4-ヒドロキシ-N-メチルトリプタミンを用いて、そのヒドロキシ基を TBS 基で保護したのち、カルボン酸に導き、脱保護して BSA あるいは KLH と活性エステル法により結合させたシロシン - BSA、シロシン - KLH、および脱保護せずに結合させた TBS 化シロシン - BSA、TBS 化シロシン - KLH の計 4 種を免疫原として得た。これら 6 種の免疫原をそれぞれ A/J マウスおよび BALB/c マウスに投与したのち試験採血を行い、その血清中の抗体価を ELISA により評価し、特に良好な抗体の産生が認められたマウスに最終免疫を行った。得られたマウスの脾細胞と NS1 細胞を融合させ、HAT 培地による選択培養後、限界希釈法によるクローニングを経て、最終的にシロシピンについて 3 種、シロシンについて 3 種、TBS 化シロシンについて 14 種のハイブリドーマ抗体産生細胞株を樹立した。

次に、これら細胞から産生されるモノクローナル抗体について、ELISA 系を確立し、詳細な性能評価を行った (図 3)。すなわち、96 ウェルマイクロプレートに、それぞれシロシピン - BSA、シロシン - BSA あるいは TBS 化シロシン - BSA 結合体を固定化したのち、調製した各抗体と各種濃度のシロシピン、シロシンあるいは TBS 化シロシン標準溶液を加えて競合反応を行った。反応後、溶液を吸引除去して、固相に残る抗体をペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス抗体で検出した。その結果、抗シロシピン抗体#74 に対する用量作用曲線は、測定範囲は 0.20 - 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 、50% 阻害値 1.37 $\mu\text{g}/\text{assay}$ で、検出限界は 0.140 $\mu\text{g}/\text{assay}$ と求められた。また、BLI 法により結合定数 (K_a) を求めたところ、 $9.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と算出された。抗シロシン抗体 #105 では、測定範囲 0.04 - 2.0 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 、50% 阻害値 257 ng/assay 、検出限界は 29.4 ng/assay であり、 K_a は、 $5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と算出された (図 4)。抗 TBS 化シロシン抗体 #13 においては、測定範囲 0.50 - 30 ng/assay 、50% 阻害値は 3.87 ng/assay 、検出限界は 0.344 ng/assay であり、 K_a は、 $3.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と算出された。期待通り、TBS 化シロシンに対する抗体は、抗シロシン抗体より 69 倍親和力の高いものが得られ、ELISA における 50% 阻害値は約 100 倍高感度であった。さらに、抗シロシピン抗体 #74 と抗シロシン抗体 #105 を用いた ELISA で、幻覚性キノコであるミナモトシビレタケの乾燥粉末抽出液中のシロシピンとシロシン含量を測定したところ、それぞれ 0.39 (w/w)%, 0.32 (w/w)% と求められ、従来の報告と符合するものであった。同様に測定を行ったシイタケ、マイタケ、マッシュルーム、キクラゲにおいては、いずれからもシロシピンおよびシロシンは検出されず、特異性の高い測定法が確立できたと考えられる。

しかし、抗シロシピン抗体、抗シロシン抗体ともその親和力は、十分とはいえないものであったため、抗シロシピン抗体について、「試験管内親和性成熟」による高親和力抗体への改変を試みた。すなわち、抗シロシピン抗体 #74 の H 鎖および L 鎖可変部を遺伝子操作により連結し、野生型の一本鎖 Fv フラグメント (scFv) へ変換したのち、この遺伝子の全域に error-prone PCR によりランダム変異を導入して、変異 scFv ライブラリーを構築した。この変異 scFv ライブラリーについて、当研究室で開発したクローンアレイプロファイリング (CAP) 法を用いて、改良型変異 scFv の探索を試みた。その結果、ELISA において野生型 scFv より小さい 50% 阻害用量を示す変異体が 5 種得られ、クローン #107 は、野生型 scFv より約 27 倍大きな K_a 値を示し、約 9 倍高感度な ELISA を可能にした。

次に、シロシピンに対して、簡便・迅速な測定を可能にするオンサイト免疫法を構築すべく、この抗シロシピン scFv を用いて、Q-body の創製を試みた。野生型抗シロシピン scFv (#WT) および変異抗シロシピン scFv (#107) について、それぞれの野生型、さらにクエンチ (消光) の増強が期待される 32 番目あるいは 91 番目のチロシンをトリプトファンに置換した (Y32W, Y91W)

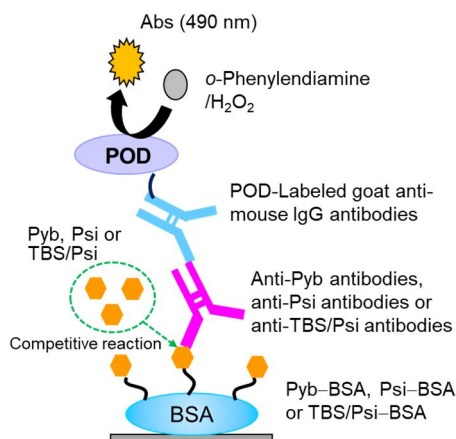


図 3. シロシピン、シロシン、TBS 化シロシンの ELISA 系

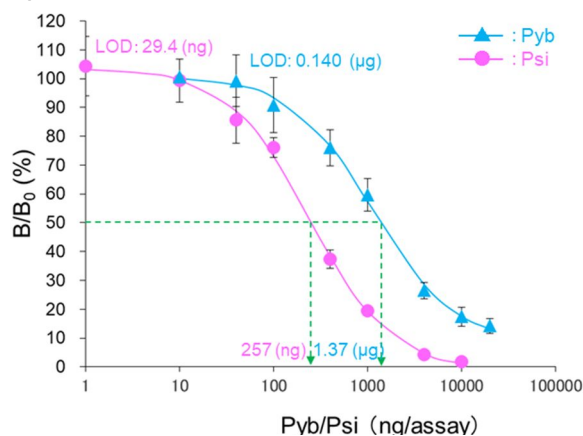


図 4. シロシピン、シロシンを測定する ELISA の用量作用曲線

およびその両者の置換体 (2mut) 計 8 種の Q-body を調製し、その評価を行った。その結果、Q-body#WT-Y32W がシロシピンに対して最も高感度な応答を示し、シロシピン 0.1 - 20 μg 添加で用量依存的に Q-body 由来の蛍光強度の増大が確認された。しかしながら、現在のところ、その測定値の再現性に問題があり、諸条件などを検討中である。さらに、幻覚性キノコであるミナミシビレタケおよび食用キノコ (シイタケ、キクラゲ、マイタケ、マッシュルーム、ナメコ) のメタノール抽出エキスについても検討を行った。その結果、シロシピンを含むミナミシビレタケ抽出エキスにおいては、Q-body 由来の蛍光が観察され、シイタケ、キクラゲの抽出エキスでは、Q-body 由来の蛍光は観察されなかった。しかし、マイタケ、マッシュルーム、ナメコ抽出エキスでは、蛍光が観察され、夾雑物による交差反応が認められた。今回作製した Q-body については、親和性や特異性のさらなる改善が必要である。

以上のように、難物抗原であるシロシピン、シロシンに対する実用的な抗体を創製した。なお、シロシピンについての抗体はこれが初めての報告となる。これら抗体を用いて、迅速かつ実用的なシロシピン、シロシンのオンサイト分析法が確立できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morita Izumi, Oyama Hiroyuki, Kiguchi Yuki, Oguri Akari, Fujimoto Natsumi, Takeuchi Atsuko, Tanaka Rie, Ogata Jun, Kikura-Hanajiri Ruri, Kobayashi Norihiro	4. 巻 190
2. 論文標題 Immunochemical monitoring of psilocybin and psilocin to identify hallucinogenic mushrooms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 113485 ~ 113485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2020.113485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiguchi Yuki, Oyama Hiroyuki, Morita Izumi, Morikawa Mai, Nakano Asuka, Fujihara Wakana, Inoue Yukari, Sasaki Megumi, Saijo Yuki, Kanemoto Yuki, Murayama Kaho, Baba Yuki, Takeuchi Atsuko, Kobayashi Norihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Clonal array profiling of scFv-displaying phages for high-throughput discovery of affinity-matured antibody mutants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71037-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dong Jinhua, Miyake Chihiro, Yasuda Takanobu, Oyama Hiroyuki, Morita Izumi, Tsukahara Tomoya, Takahashi Masaki, Jeong Hee-Jin, Kitaguchi Tetsuya, Kobayashi Norihiro, Ueda Hiroshi	4. 巻 165
2. 論文標題 PM Q-probe: A fluorescent binding protein that converts many antibodies to a fluorescent biosensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112425 ~ 112425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2020.112425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oyama Hiroyuki, Kiguchi Yuki, Morita Izumi, Yamamoto Chika, Higashi Yuka, Taguchi Miku, Tagawa Tatsuya, Enami Yuri, Takamine Yuriko, Hasegawa Hanako, Takeuchi Atsuko, Kobayashi Norihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Seeking high-priority mutations enabling successful antibody-breeding: systematic analysis of a mutant that gained over 100-fold enhanced affinity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61529-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morita Izumi, Kiguchi Yuki, Oyama Hiroyuki, Takeuchi Atsuko, Tode Chisato, Tanaka Rie, Ogata Jun, Kikura-Hanajiri Ruri, Kobayashi Norihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Derivatization-assisted enzyme-linked immunosorbent assay for identifying hallucinogenic mushrooms with enhanced sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Methods	6. 最初と最後の頁 3954 ~ 3962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ay01157j	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 森田 いずみ、大山 浩之、木口 裕貴、田中 理恵、緒方 潤、花尻 (木倉) 瑠理、小林 典裕
2. 発表標題 幻覚性キノコ成分シロシンの高感度検出を可能にする誘導体化ELISA
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木口 裕貴、大山 浩之、森田 いずみ、大澤 愛、小林 典裕
2. 発表標題 幻覚性キノコのオンサイト同定を目指す抗シロシピンscFvの試験管内親和性成熟
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 いずみ、大山 浩之、木口 裕貴、田中 理恵、緒方 潤、花尻 (木倉) 瑠理、小林 典裕
2. 発表標題 マジックマッシュルーム中シロシピン、シロシンのELISA
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 I. Morita, H. Oyama, R. Tanaka, R. Kikura-Hanajiri, N. Kobayashi.
2. 発表標題 Generation of monoclonal antibodies for on-site analysis of psilocin and psilocybin in hallucinogenic mushrooms
3. 学会等名 European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Kobayashi N.
2. 発表標題 In vitro affinity maturation of anti-cortisol antibodies to develop sensitive immunoassays
3. 学会等名 European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 いずみ、大山 浩之、田中 理恵、花尻(木倉) 瑠理、小林 典裕
2. 発表標題 幻覚性キノコ成分のオンサイト分析を目的とするシロシンシリル化体に対する新規モノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 いずみ、大山 浩之、木口 裕貴、田中 理恵、花尻(木倉) 瑠理、上田 宏、小林 典裕
2. 発表標題 試験管内親和性成熟を目的とする抗シロシピン一本鎖Fvフラグメントの作製
3. 学会等名 日本法中毒学会第38年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 典裕 (KOBAYASHI NORIHIRO) (90205477)	神戸薬科大学・薬学部・教授 (34512)	
研究分担者	大山 浩之 (OYAMA HIROYUKI) (80572966)	神戸薬科大学・薬学部・准教授 (34512)	
研究分担者	上田 宏 (UEDA HIROSHI) (60232758)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------