

平成 21 年 0 5 月 2 2 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580231

研究課題名 (和文) 二枚貝の麻痺性貝毒変換酵素遺伝子の探索と分子進化解析

研究課題名 (英文) Cloning and molecular evolutionary genetics analysis of paralytic shellfish toxin transforming enzyme from bivalves

研究代表者 長 由扶子 (CHO YUKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60323086

## 研究成果の概要：

麻痺性貝毒変換酵素は本研究代表者のグループが世界ではじめて 2 種の国産二枚貝から単離に成功した酵素である。本酵素の起源を解明するためサラガイとバカガイの麻痺性貝毒変換酵素性状を比較したところ、異なる分子種の酵素と推定された。さらに遺伝子のクローニングを試みサラガイのライブラリーからスルホカルバミラーゼ I の遺伝子の候補と考えられる 121bp の断片を得た。遺伝子の全長取得にむけて今後の研究が展開できる成果であった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：水産学、生理活性、変換酵素、二枚貝、麻痺性貝毒

## 1. 研究開始当初の背景

貝毒として代表的なものは麻痺性、下痢性、神経性、記憶喪失性貝毒であり、中でも麻痺性貝毒は最も古くから知られる貝毒である。国内では 1948 年に愛知県のアサリにより 12 名の患者が報告されて以降、昨年までに国内各地で 155 名の患者と 4 名の死者が報告されている。中毒症状は口唇、顔面から四肢のしびれ、麻痺であり、重症の場合は頭痛、嘔吐、運動失調、言語障害、浮遊感、呼吸麻痺の症状が現れ、死にいたることもある。フグ毒テトロドトキシンに匹敵する強さの毒である。特別な治療法がないので、胃洗浄、利尿薬な

どで毒の速やかな排出をはかるとともに人口呼吸などの対症療法がおこなわれる。幸い後遺症はなく予後は良好である。

麻痺性貝毒とはサキシトキシン (STX と略す) に代表される 30 種以上の化学物質の総称であり、通常は貝体内で官能基や側鎖の構造の異なる数種の同族体の混合物として存在する。毒は貝が生産しているのではなく、えさとして摂取した渦鞭毛藻と呼ばれるプランクトンが生産した毒が貝に移行、蓄積し毒化する。多くの貝は海域のプランクトンの麻痺性貝毒成分組成と類似した組成を示すが、まれに全く異なる毒成分組成を示す種がある

ことが知られていた。この違いはプランクトンから移行した麻痺性貝毒が体内の化学物質または酵素で構造変換されることによる。中でも酵素的変換を受けた毒は場合によって100倍もの毒力を有するようになることがわかっており、食品衛生上重要な問題となっている。) サリバンは1983年にはじめてアメリカ産のリトルネッククラムの中腸腺(消化管の中腸の部分に開口する盲嚢状の器官で肝臓とも呼ばれる。)に麻痺性貝毒変換酵素が存在することを証明した。日本国内の貝については研究代表者らのグループの大島らが食用のおもな貝18種(ホタテ、カキ、アサリ、ハマグリなど)について調べ、バカガイ(別名アオヤギ、*Mactra chinensis*)とサラガイ(別名シロガイ、*Peronidia venulosa*)のみが変換酵素を有することを明らかにした。他にはアメリカ産二枚貝1種とポルトガル産2種にも同様な酵素の存在が報告されている。

麻痺性貝毒変換酵素は不安定な上、微量であるため単離は困難を極め長年不明なままであったが、2004年に研究代表者らのグループのLinは国産二枚貝バカガイの中腸腺から麻痺性貝毒変換酵素の単離に世界ではじめて成功し、Carbamoylase Iと命名した。本酵素は分子量190 kDaの糖タンパク質であり、94 kDaのサブユニット2個がS-S結合を介して結合したホモダイマーであった。基質としてカルバメート毒群とN-スルホカルバメート毒群の両方を認識しデカルバモイル毒を生成する。

麻痺性貝毒変換酵素を有するもう1種の国産二枚貝であるサラガイの酵素についてはバカガイと同時に研究が進行していたもののバカガイの酵素よりもさらに分子量が大きく不安定であったため単離には至っていなかった。その後研究代表者はサラガイの晶桿体(中腸腺の中にある半透明の組織で消化酵素などの蓄積器官)から酵素の単離に成功し、Sulfocarbamoylase Iと命名した。

## 2. 研究の目的

本研究では単離したバカガイ及びサラガイの麻痺性貝毒変換酵素の性状を詳細に比較し、それぞれの分子種の特徴を明らかにすること、さらにそれぞれの遺伝子をクローニングし、リコンビナントタンパク質を作製し、その特性を他種の二枚貝の配列相同性の高い酵素と比較することで二枚貝における麻痺性貝毒変換酵素の分子進化を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) サラガイの晶桿体から単離したSulfocarbamoylase Iの性状の詳細を調べ、バカガイのCarbamoylase Iと比較した。

(2) アミノ酸配列解析によってCarbamoylase IからはN末端及び5種の内部配列、Sulfocarbamoylase Iからは内部配列6種がすでに得られていたので、それらの配列を基に縮重プライマーを設計した。PCRで麻痺性貝毒変換酵素遺伝子の増幅を試みた。

## 4. 研究成果

(1) バカガイとサラガイの麻痺性貝毒変換酵素の性状比較

単離されたサラガイの酵素は弱毒性のN-スルホカルバメート毒群を認識し、強毒性のデカルバモイル毒群に変換した。(図1)

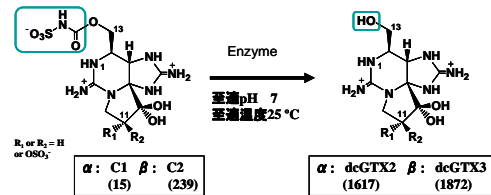


図1. 麻痺性貝毒変換反応の一例  
括弧内の数値は各化合物の比毒性(MU/μmol)

バカガイのCarbamoylase Iは分子量94kDaのサブユニット(うち糖部が少なくとも14kDa以上)がS-S結合によって2個結合した190kDaの糖タンパクであったのに対し、サラガイのSulfocarbamoylase Iは150kDaのサブユニットが静電相互作用によって2個結合した300kDaの酵素であった。(図2)

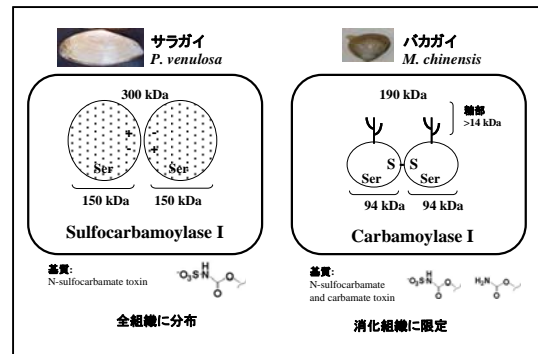


図2. 国産二枚貝から単離された麻痺性貝毒変換酵素の模式図と特徴

既知の同様な分子量のエステラーゼの遺伝子の情報を基に塩基長は2kbp程度及び4kbp程度と推定された。ともにセリンプロテアーゼ阻害剤によって活性が阻害されたことから、活性中心にセリンを有すると推定された。(図3)

	Chemicals	Relative activity (%)	Enzyme typically inhibited
Proteinase inhibitor	AEBSF (1mM)	■ <i>M. Chinensis</i> □ <i>P. venulosa</i>	Serine proteinase Serine esterase
	BSF (1mM)		
	Leupeptin (3 μg/mL)		Kallikrein, Trypsin
	Aprotinin (5 μg/mL)		
	Bestatin (3 μg/mL)		
Metal chelating agent	E-64 (3 μg/mL)		Aminopeptidase
	EDTA-2Na (1mM)		Cysteine proteinase
Control	Without additives		Metalloenzyme

図3. 各種化合物の活性へ及ぼす影響

サラガイの Sulfocarbamoylase I と 12 種の麻痺性貝毒標品を用いた基質特異性試験では、STX や GTX2/3 のようなカルバメート毒群は全く認識されず、C1, C2, C3, C4, GTX5 及び GTX6 のような N-スルホカルバメート毒群のみが加水分解され、対応するデカルバメート毒に変換された。(表 1)

表 1. サラガイの Sulfocarbamoylase I の基質特異性

毒群名	基質	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	生成物	消費率 (%)
Carbamate	STX	H	H			0
	neoSTX	OH	H			0
	GTX1	OH	OSO <sub>2</sub> (Φ)		H	0
	GTX4	OH	OSO <sub>2</sub> (Φ)		なし	0
	GTX2	OH	OSO <sub>2</sub> (Φ)			0
	GTX3	H	OSO <sub>2</sub> (Φ)			0
N-Sulfocarbamate	C1	H	OSO <sub>2</sub> (Φ)		deGTX2	6
	C2	H	OSO <sub>2</sub> (Φ)		deGTX3	67
	C3	OH	OSO <sub>2</sub> (Φ)	SO <sub>2</sub>	deGTX1	*
	C4	OH	OSO <sub>2</sub> (Φ)		deGTX4	*
	GTX5	H	H		deSTX	1
	GTX6	OH	H		deneoSTX	7

\*定量用標準品が無い場合、数値は示さないが定性的に生成が確認された。

サラガイの産地である北海道苫小牧で麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* が出現している時期の水温が、酵素が活性を示す温度と一致することからサラガイの酵素が天然でも機能していることが示唆された。(図 4)

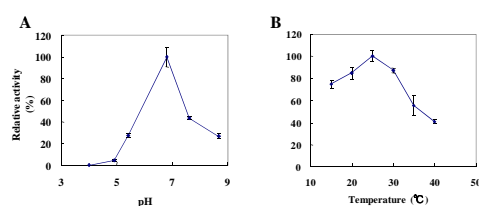


図 4. Sulfocarbamoylase I の活性に pH (A) 及び温度 (B) の及ぼす影響

サラガイとバカガイの酵素を比較すると、両者とも活性部位にセリンを有するホモダイマーの加水分解酵素という点は共通しているが、分子量、サブユニットの結合様式、糖鎖構造、基質特異性、組織分布などに違いがみられ、異なる分子種の酵素と推定している(図 2)。自然界のカルバミラーゼとしては細菌の N-カルバミル-D/L-アミノ酸アミドヒドラーゼや β-ウレイドプロピオナーゼが知られている。これらは N-カルバミル化合物のアミド結合を加水分解する酵素である。本研究のバカガイの Carbamoylase I 及びサラガイの Sulfocarbamoylase I は O-カルバミル化合物のエステル結合を加水分解する酵素であり、特に Sulfocarbamoylase I はカルバミル基の窒素にスルホン基が結合した N-スルホカルバメート毒群のみを認識する。このような酵素は筆者らの知る限り他に例がない。

## (2) 遺伝子のクローニング

両者とも比較的大きなタンパクである上、体内の存在量が微量であることからまず cDNA を断片化して、アダプターを連結する

ことで増幅しやすくなることを期待した。バカガイ中腸腺由来のアダプター連結 cDNA 断片を鋳型としてカルバミラーゼ I の内部配列から設計した縮重プライマーとアダプター配列のプライマーで nestedPCR して得られた増幅断片を塩基配列解析したところ、多くは非特異的に増幅した断片であった。1 種は設計したプライマーの配列を有したが下流の配列が元の内部配列のアミノ酸配列と一致せず、プライマーを設計した部分のアミノ酸配列の読み枠ではストップコドンが多く入るため目的遺伝子ではないと判断した。次にバカガイ及びサラガイの中腸腺から mRNA を抽出し、Creator™ Smart™ cDNA Library Construction Kit により、完全長 cDNA のライブラリーを作成した。得られたプラスミドライブラリーから M13 の forward と M13reverse プライマーを用いた PCR によりインサート部分を増幅した。本増幅産物を鋳型として、ベクター (pDNR-LIB) の配列から設計したプライマーと Carbamoylase I または Sulfocarbamoylase I の内部配列から設計した縮重プライマーを用いて nestedPCR し、得られた増幅断片を塩基配列解析した。バカガイのライブラリーからは非特異的に増幅した断片のみ得られたが、サラガイのライブラリーからは特異的に増幅した 121bp の断片が得られた。本配列はスルホカルバミラーゼ I の内部配列 EVGSFEA に対応するプライマーの配列及び 1 個のストップコドンに続いて非コード領域と polyA を有することが分かった。本配列は NCBI の BLAST による相同性検索で相同性の高い遺伝子がヒットしない新規な配列であり、目的遺伝子の候補と考える。麻痺性貝毒変換酵素は体内に極微量しか存在しない高分子量のタンパクであり、遺伝子の全長取得は困難であったが候補遺伝子断片がヒットしたことから今後の研究が展開できる成果が得られた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

### 1. 長 由扶子、小川 徳之、大島 泰克

二枚貝の麻痺性貝毒変換酵素

低毒成分の毒性を 100 倍にする新規な酵素 Sulfocarbamoylase I の単離と性状、化学と生物, 47, 2009, 80-82. 査読なし

### 2. Yuko Cho, Noriyuki Ogawa, Miyako Takahashi, His-Pin Lin, Yasukatsu Oshima, Purification and characterization of paralytic shellfish toxin transforming enzyme, sulfocarbamoylase I, from

Japanese bivalve, *Peronidia venulosa*.  
BBA - Proteins and Proteomics, 1784, 2008,  
1277 - 1285. 査読あり

〔学会発表〕（計 1 件）

Yuko Cho, Noriyuki Ogawa, Miyako  
Takahashi, His-Pin Lin and Yasukatsu  
Oshima, Sulfocarbamoylase I, a novel  
paralytic shellfish toxin transforming  
enzyme from bivalves, *Peronidia venulosa*,  
The 13th international Conference on  
Harmful Algae, 2008 年（平成 20 年）11 月  
3 日-7 日, 香港、中国

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長 由扶子 (CHO YUKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60323086

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし