

研究協力報告書

大麻成分の生合成酵素遺伝子に関する研究

研究協力者 正山 征洋 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 本年度は大麻成分生合成酵素である THCA synthase について、クローン化した cDNA を昆虫細胞に導入することで組み換え酵素を大量発現、精製し、これを用いたキャラクタリゼーションを行うことにより、本酵素が FAD を有するタイプのオキシダーゼであることを初めて明らかにした。

A. 研究目的

大麻成分の生合成酵素である THCA synthase に関しては基質 CBGA のモノテルペン部を酸化的に閉環するという特異な反応を触媒する酵素であることを明らかにしていたが、大麻より精製可能な酵素が微量だったため、本反応のメカニズムを完全に解明するには至っていなかった。本年度は本酵素を昆虫細胞で大量発現し、反応メカニズムについて詳細に検討することを目的として研究を行った

B. 研究方法

1. 昆虫細胞での発現と精製

THCA synthase の cDNA を Invitrogen 社、Bac-to-Bac システムによりバキュロウイルスの polyhedrin プロモーター下流に組み込んだ。次いでこれをウイルス数と細胞数の比が 1 対 1 となるよう昆虫培養細胞(Sf9)に感染した。培養液から粗酵素液を調製してヒドロキシルアパタイトカラムに付し、リン酸カリウム及び塩化ナトリウムのグラジエントにより吸着した THCA synthase を溶出した。精製した組み換え酵素の純度は SDSPAGE により確認した。また、吸光及び蛍光光度計を用

い組み換え酵素の分光学的性質を解析した。

2. ポイントミュータントの作製及び発現

変異導入用のプライマーを用いた PCR により、種々の変異遺伝子を作製した。これら遺伝子は野生型と同様の方法でバキュロウイルスに組み込み、これを昆虫培養細胞に感染させることにより、各変異酵素を調製した。

3. 酵素活性の測定

200 μ M CBGA を含む基質バッファー (pH5.0) に酵素液を加え、30 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、生成した THCA を HPLC で測定することにより酵素活性を測定した。本反応の酸素要求性については反応液及び酵素液中の酸素を glucose oxidase および catalase によりあらかじめ除去することで検討した。酵素反応により生成した過酸化水素は peroxidase により測定した。

C. 研究結果

THCA synthase はその推定アミノ酸配列中に FAD 結合部位に特徴的な配列 (110RSGGH114) を有することが明らかとなっており、flavoenzyme であると推定され

ている。そこで電気泳動上単一に精製した組み換え酵素について分光学的性質を検討したところ、flavoenzyme に特徴的な性質(450nm での吸収極大および 515nm での蛍光など)を示したことから本酵素が実際に FAD と結合していることを確認した。

次いで FAD の結合部位についてポイントミューテーションにより検討した。種々の変異酵素のうち H114 をアラニンに変異したもので活性及び蛍光が完全に消失したことから H114 が FAD 結合部位であり、また、FAD は酵素活性に必須であると確認した。

さらに本酵素反応は酸素の存在下のみに進行し、また本酵素反応により THCA と過酸化水素が 1:1 の比率で生成することが明かとなった。以上より本酵素はオキシダーゼであると結論した。

D. 考察

基質中のテルペン部分の閉環反応を触媒する flavoenzyme は本酵素が最初である。本酵素の活性部位の構造には極めて興味をもたれることから、X線結晶解析などの手法によりこれを原子レベルで解明することが今後の検討課題と考えている。

E. 結論

本研究より THCA synthase は FAD 依存型のオキシダーゼであることを証明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Anggadiredja K., Yamaguchi T., Tanaka

H., Shoyama Y., Watanabe S., Yamamoto T., Prostaglandin E2 attenuates SR 141716A-precipitated withdrawal In tetrahydrocannabinol-dependent mice, *Brain Res.*, **966**, 47-53, (2003)

2. Egashira N, Mishima K, Uchida T, Hasebe N, Nagai H, Mizuki A, Iwasaki K, Ishii H, Nishimura R, Shoyama Y, Fujiwara M, Anandamide inhibits the DOI-induced head-twitch response in mice, *Psychopharmacology*, **171**, 382-389 (2004)

H. 学会発表

1. 正山祥生、田浦太志、正山征洋、森元聡、アサの細胞増殖因子に関する研究、日本薬学会第 123 年会(2003 年 3 月、長崎)

2. 田中眞一、田浦太志、森元聡、正山征洋、大麻プレニルトランスフェラーゼ遺伝子に関する研究、日本生薬学会第 50 回年会、(2003 年 9 月、東京)

3. Supaart Sirikantaramas, Futoshi Taura Satoshi Morimoto, Yukihiro Shoyama, Heterologous expression and characterization of THCA synthase, The 6th joint seminar of recent advances of natural medicine research, (Dec. 2003, Thailand)

4. 石川由、田浦太志、森元聡、正山征洋、THCA 合成酵素による CBCA の生成、日本薬学会第 124 年会(2004 年 3 月、大阪)

研究協力報告書

新規麻薬指定成分のケミカルドラッグのマウス行動量に及ぼす作用

研究協力者 小島 尚 神奈川県衛生研究所理化学部 主任研究員

研究要旨 平成15年10月、麻薬指定されたBZPやTFMPPなどのピペラジン系化合物(BZP、TFMPP、3CPP及び4MPP)、いわゆる“ケミカルドラッグ”のマウス行動量に及ぼす作用を検討した。急性経口毒性試験法(TG423)に準じマウスを用い試験した結果、LD50クラスは200~300mg/kgであった。マウス行動量に及ぼす作用を自発運動解析装置により測定した。BZPでは10mg/kgから濃度依存的に行動量が増加し、100mg/kgで最大となったが、200mg/kgで2/3個体が死亡した。同じく、麻薬指定されたTFMPPでは200mg/kgまで行動量はほとんど変化しなかった。一方、麻薬指定成分ではない3CPPでは、TFMPP同様に行動量はほとんど変化しなかったが、100mg/kgから死亡する個体が見られ、200mg/kgでは全数死亡し、BZPより毒性が強いことが示唆された。4MPPは行動抑制作用が見られた。また、BZPと3CPPの同時投与により、BZP単独より行動亢進作用は減少したが、毒性作用は強かった。以上の結果から、麻薬指定成分のBZPは中枢作用に指標とした行動亢進作用が強いことが示され、LD50クラスは同じでも3CPPは致死作用が強く、BZPと3CPP併用により致死濃度が低下することが示された。今後、中枢作用や毒性作用のメカニズムの解明を行い、ケミカルドラッグの危険性を明らかにしたい。

A. 研究目的

インターネットの普及により海外の情報がリアルタイムで入手できるようになり、また、同時に、いわゆる合法ドラッグが国境を越えて流通するようになった。それらの中で、化学実験試薬と称して販売されている、いわゆる“ケミカルドラッグ”がある。しかし、医薬品成分等とは異なり、その安全性や生体影響はほとんど不明である。また、ヒトが摂取することを考えると、それらの安全性や健康への被害の可能性についてのデータを蓄積し、危険性を周知する必要がある。そこで、“ケミカルドラッグ”が精神作用を目的に使用されることから、中枢作用の

指標として行動量に及ぼす作用を、マウス自発運動で検討した。

B. 研究方法

1. ケミカルドラッグの種類

下記4種類のピペラジン系化合物を用いた。

BZP:1-benzyl-piperazine,

TFMPP:1-(3-trifluoro-methoxyphenyl)-piperazine,

3CPP:1-(3-chlorophenyl)piperazine,

4MPP:1-(4-methoxyphenyl)piperazine.

2. 動物実験

1) TG423 に準じたマウス急性経口毒性試験

TG423 を参考に準じ、マウスを用い試験した。ddy 系雌マウスを 1 週間の予備飼育後(9~10 週齢)を用いた。3 匹に 300mg/kg を経口投与し、2/3 以上死亡した場合は 3 匹に 50mg/kg を、0~1/3 では再度投与した。その結果から、LD50 クラスを分類した。

2) マウス行動量に及ぼす作用

ddy 系雄マウスを予備飼育した後(8~13 週齢)、3 日間、水を経口投与し、行動観察装置に入れ、被検薬投与と同様に行動観察を行い馴化し、行動が定常状態に至ったことを確認した。マウスに、被検薬を 4 日目に投与し試験を行った。行動観察は光センサーによる行動量を測定する小動物行動量解析装置(メルクエスト製、scanetSV-20)を用い、投与直後から一定時間(180 分)、プラチックケージ(215×320×140mm)内の 3 次元行動を記録し、1 分間の行動量として表した。

3) 投与方法

前日より絶食した各投与量 6~9 匹のマウスに、被検薬を水溶液とし、強制経口投与した(対照群は全例 35 匹を平均)。対照群には水を同量投与した(投与量: 1mL/100g)。

C. 研究結果

1. TG423 に準じたマウス急性経口毒性試験

各 300mg/kg 投与では、BZP と 3CPP において 2 匹が投与後 30 分以内に死亡し、1 匹は観察期間中生存した。4MPP は 1 匹のみが死亡したことから、再度 300mg/kg 投与したところ、全 3 匹が死亡した。また、TFMPP は 3 匹とも 1 時間以内に死亡した。いずれの成分も 300mg/kg では 2/3 以上の死亡したことから、50mg/kg を投与した。4 成分はいずれも

表 1.300mg/kg 投与による死亡個体数

成分	死亡個体(匹)
BZP	2/3
TFMPP	3/3
3CPP	2/3
4MPP	4/6

観察期間中に死亡する個体はなかった。しかし、BZP では落ち着きなく、動き回り、群居しなかった。BZP 以外の成分では動き回ることなく、正常な動物と同様であった。以上の結果から TG423 に準じた方法では、マウスの LD50 クラスは 200~300mg/kg に属する成分と分類された。

2. マウス行動量に及ぼす作用

1) BZP

10、25、50、100、200mg/kg 投与したところ、200mg/kg 投与群は 6 匹中 4 匹が死亡した。しかし、100mg/kg 以下では死亡する個体は見られなかった。図 1 は観察 3 時間における 3 次元自発行動の総量を示している。10mg/kg から有意に行動累計量が増加し、100mg/kg でもっとも強かった。200mg/kg では観察した 6 匹中 4 匹が観察開始から 30 分以内に死亡した。症状観察では、投与後 5 分過ぎから飛び跳ねるように動き回り、横向きになり前後肢をばたつかせ、動かなくなり、呼吸減弱し、死亡した。また、100mg/kg でも 8 匹中

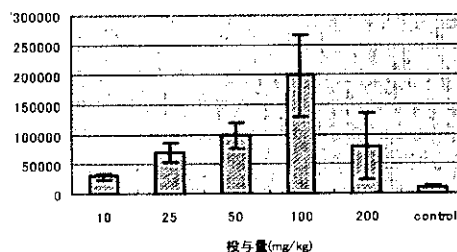


図 1 BZP のマウス行動総量に及ぼす作用

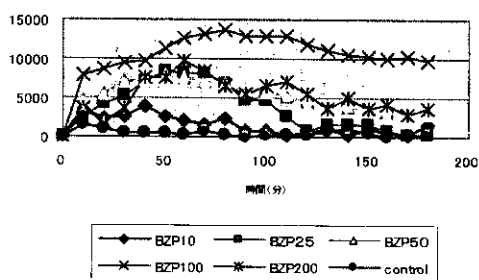


図2 BZPのマウス行動量の時間推移に及ぼす作用

1匹が死亡した。生存した個体及び100mg/kg以下の投与量では作用の強弱はあるが、落ち着きなく活発に動き回った。図2に示すように、投与時間が経過するとともに行動量が増加し、10と25mg/kgでは2時間過ぎから減少した。3時間の観察が終了した後も、投与群では興奮状態続いた。

2) TMFPP

10、25、50、100及び200mg/kg投与したところ、観察時間中に200mg/kgでは9匹中1匹が死亡したが、他の8匹は生存した。図3は観察3時間における3次元自発行動の総量を示している。いずれの投与群においても行動量に変化はなかった。また、図4に示すように、観察時間中の行動量の時間変化にも対照群と差異は認められなかった。

3) 3CPP

25、50、100及び200mg/kg投与したところ、200mg/kg投与群では投与した7匹すべてが死亡し、100mg/kgでも6匹中1匹が死亡した。しかし、総行動量に有意な変動は認められなかった。また、観察時間中の行動量の時間変化にも対照群と差異は認められなかった。

4) 4MPP

25、50、100及び200mg/kg投与したとこ

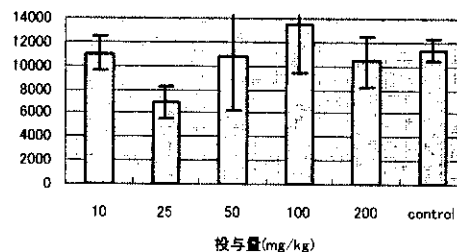


図3 TMFPPのマウス行動総量に及ぼす作用

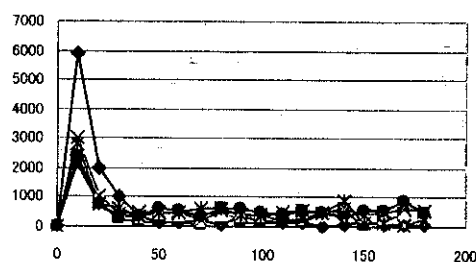


図4 TMFPPのマウス行動量の時間推移に及ぼす作用

ろ、200mg/kgでは6匹中4匹が死亡した。総行動量は対照群に比べ、今回投与した25~200mg/kgではいずれも行動量が減少した。しかし、投与後の経時変化による行動量推移に対照群と差異はなかった。

5) BZPと3CPPとの同時投与による作用

BZPと3CPPの4種類の組み合わせによる同時投与による作用を検討した。BZPと3CPPを2:1の比率で同時に経口投与した。表2に示すように、BZP単独投与に比べ、10~50mg/kgでは行動量が約40~70%程度に減少した。しかし、100mg/kgでは6匹中4匹が死亡し、単独の場合より死亡数が増加した。

D. 考察

昨年度の脱法ドラッグ実態調査において、各種のピペラジン系やトリプタミン系化合物等がケミカルドラッグとして販

表2 BZP と 3CPP の相互作用

投 与 量 (mg/kg)	対 BZP 単独 (%)
B 10, C 10	53.4
B 25, C 12.5	70.2
B 50, C 25	43.9
B100, C 50	17.7

B: BZP, C: 3CPP

売されていた。その中に、昨年10月から麻薬成分に指定されたBZP及びTFMPPが含まれていた。今回の検討では、実態調査で販売が確認された4種類のピペラジン系化合物についてマウス行動量に及ぼす影響を検討した。その結果、BZPは中枢亢進作用が強く、生体影響も強いことが示された。同じく、麻薬に指定されたTFMPPは行動に及ぼす作用が小さく、また、行動量の観察期間中に死亡する個体も少なかった。一方、3CPPはTFMPPと同様に行動量に及ぼす作用はほとんど見られなかったが、200mg/kgでは投与した全数が死亡した。また、4MPPには行動量を抑制することが示され、200mg/kgでも死亡した個体が少なかった。LD50と行動量測定との致死数に差異が見られたが、その一因にTG423ではメスを使用するため、雌雄の差による可能性が考えられた。数種類の成分を含むケミカルドラッグの存在、また、インターネットの書き込みにも同時使用の報告があった。そこで、代表的なBZPと3CPPとでモデル実験を行ったが、BZP単独に比べ、行動量は減少したが、死亡数が増加した。今回の結果、麻薬指定成分でもBZPとTFMPPは行動への作用が異なり、また、一方、麻薬指定成分ではない3CPPは死

亡例が多く、毒性作用が強かった。4MPPは行動抑制作用が見られた。ピペラジン系化合物でも置換基により作用が異なり、健康被害の可能性も異なることが明らかになった。今後、“ケミカルドラッグ”の不正流通を防止するため、生命への危険性や安全性に問題のあることを実験的に明らかにし、実験結果や収集された情報を公開することにより、健康危害の可能性が大きいことを周知する必要がある。そのため、マーケットリサーチを行い、流通あるいは今後利用される化学物質の情報を収集すること、また、中枢作用のメカニズムの解明のみならず、健康被害の可能性から呼吸や循環などの作用も考慮し、生体影響を検討する必要があることが考えられた。

E. 学会発表

1. 脱法ドラッグの調査結果について、
全国衛生化学技術協議会関東甲信静支部
理化学部会、小島 尚、宮澤真紀、土井佳代
(横浜、平成16年1月)
2. いわゆるケミカルドラッグ(ピペラジン化合物)のマウス行動に及ぼす作用 第
124 年会日本薬学会 小島 尚、宮澤真紀、
土井佳代、関田節子(大阪、平成16年3
月)

F. 論文発表

1. エフェドラアルカロイドを含む健康食
品に含まれる医薬品成分の検討
小島 尚、関田節子 医薬品研究 35,
22-28 (2004).
2. いわゆる“ケミカルドラッグ”の実態
調査の結果 小島 尚、宮澤真紀、石川哲也、
高柳栄郎、浅谷秀行、土井佳代 中毒研究
17, 71-72 (2004).

分担研究報告書

幻覚性キノコの DNA 解析等による鑑定法確立に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

研究要旨 幻覚性キノコの高感度鑑定法の確立に関する研究として、DNA 解析をベースとした手法の開発並びに、ELISA 法の構築を行っている。前者では、昨年度報告した従来法の欠点を改良し、非幻覚性の *Psilocybe* 属キノコについて陰性となるより精度の高い鑑定法を確立した。また、国内に自生するキノコ類について本法の適用範囲を調査し、陽性反応を示した 4 種について LC/MS によるサイロシン類の分析を行なった。後者では、サイロシンをモチーフとしたハプテン 3 種を新たに合成し、2 種のハプテンをキャリアタンパク質に結合させて免疫源としてマウスに免疫を行い、マウス脾臓の細胞融合による抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニングを検討した。また、サイロシン、サイロシビンの生体内代謝物である、サイロシシングルクロナイドの合成も検討した。

研究協力者

代田 修 国立医薬品食品衛生研究所生薬部主任研究官
丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部研究員

A. 研究目的

幻覚性キノコ、いわゆるマジックマッシュルームの同定には、通常、植物形態学的手法が用いられるが、これらのキノコ類は、*Psilocybe* 属、*Panaeolus* 属を中心に 50 種以上が知られており、その分類には、高い専門性が要求される。さらに、マジックマッシュルームは、市場において粉末やカプセル剤として流通する場合も多いため、形態学的手法では同定が困難な場合がある。他方、化学的同定法としては、シロシン類を、ガスクロマトグラフ-質量分析(GC-MS)法または高

速液体クロマトグラフィー(HPLC)法および高速液体クロマトグラフ-質量分析(LC-MS)法で確認する方法が一般的である。法的には、シロシン、シロシビンが検出されると麻薬原料植物として取り扱われる。しかし裁判化学的には、化学的な同定だけでなく複数の検出方法で、マジックマッシュルームを確認することが望ましい。本研究では、このような背景を鑑み、DNA 解析をベースとした鑑定法の開発並びに、ELISA 法の構築を行っている。昨年度、我々は、形態学的手法によらない同定法として DNA の塩基配列の違いを利用した TaqMan PCR 法による鑑定法を構築した。マジックマッシュルームの代表的な一群である *Psilocybe* (シビレタケ) 属キノコには、サイロシン類を含むものと含まないものがあるが、昨年度、構築した鑑定法では、

これらを区別することは、不可能であった。そこで、今年度、サイロシン類不含の *Psilocybe* 属キノコの DNA データを解析し、これらを区別できるよう鑑定法を改良し、本法を国内の野生キノコに適用し、その有用性を調べた。また別に、シロシン類を極微量で簡便に検出可能とする ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)の開発のため、シロシンをモチーフとしたハプテンを合成し、ウサギ及びマウスに対する免疫を検討した。さらに、サイロシン、サイロシビンの生体内代謝物である、サイロシグルクロナイドの合成も検討したので報告する。

B. 研究方法

1. DNA 解析と TaqMan PCR

試料として昨年度のものに加え、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門より分譲を受けた 6 種の菌株 (*Panaeolus cambodginiensis* (I1)、*Pa. retirugis* (I2)、*Psilocybe coprophila* (I3)、*Ps. fasciata* (I4)、*Ps. merdaria* (I5)、*Ps. subcaerulipes* (I6))、国内で採集された野生キノコ 30 種 (F1-F30) 及び テングタケ (*Amanita pantherina*)、ベニテングタケ (*A. muscaria*) を用いた。TaqMan PCR は、酵素系を NIPPON GENE 社の TaqNT を用いた他は、昨年度のものと同様の条件で行なった。

2. LC/MS 分析

装置に JEOL 社 JMS-T100LC Accu TOF spectrometer を用いた。カラムには、GL Science 社の Inertsil ODS-3 (4.6 x 30 mm, 5.0 μ m) を、移動相には、acetonitrile (ACN)-10 mM ammonium formate buffer (pH3.0) の系を流速 0.5 ml/min、下記のグラジエント条件で使用した：10-20%

ACN (0-15 min)、20-10%15 (min)ile-10 mM ammonium formate buffer (pH3.0)の系を流速 0.5 ml/min、下記のグラジエント条件で使用した。10-20% ACN (15-20 min)。MS におけるイオン化は、ESI の positive mode で行なった。検出限界は、サイロシンが 1 ng、サイロシビンが 10 ng であった。

3. サイロシンをモチーフとした新規ハプテンの合成と抗原の調製

昨年度の研究では、スペーサーの長さを一般的と考えられた 4 炭素長のハプテンを合成し、その抗原を用いてマウスおよびウサギに免疫を行った。しかし、得られた抗血清はスペーサー部分も認識してしまい、特異性という点において満足できるものではなかった。今年度は、種々のスペーサーを持つハプテンを合成し、特異性の上昇を試みることにした。まず、末端にチオール基を有するハプテンを考えた。これは、マレインイミドで修飾したキャリアタンパク質に容易に反応するので抗原を調製することができ、ペプチドに対する抗体を作成する時に度々用いられるものである。また、スペーサーの長さを単純に短くしたハプテンも考案した。さらに、スペーサー内にアミド結合を有するハプテンも合成することとした。

4. マウスへの免疫および抗体価測定

免疫するマウスは BALB/c 系統を用いた。前回と同様に抗原の PBS 溶液(3 mg/mL)とその 2 倍量の Freund's Complete Adjuvant とをソニケーターを用いて乳化させたものを免疫源とした。免疫は 2 週間おきに行い、免疫源 0.05 mL を足蹠へ 2 回に分けての投与と、背中皮下へ数回に分けての投与を交互に行った。

採血は2回目以降の各免疫の一週間後に眼窩より行った。また、血清の抗体価は、それぞれのサイロシンハプテンを OVA に結合させたものを固相抗原として用い、二次抗体には horseradish peroxidase(HPR) が結合した抗マウス IgG 抗体を、その酵素基質として過酸化水素水、呈色反応試薬として ABTS { 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt} を用い、414 nm にて吸光度を測定する系により求めた。

5. 細胞融合および抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニング

マウスに計4回の免疫を行った後、血清の抗体価が高いマウスを選び、最終免疫として腹腔内に抗原の PBS 溶液(250 μ g/mL)を 0.2 mL 投与した。最終免疫から3日後(中2日間)に脾臓を取り出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞(NS-1)とを 50%ポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。細胞融合後、24 well プレートに蒔いて培養を行い、HAT 培地によりハイブリドーマを選別した。次に抗体価が高い well のハイブリドーマを3段階希釈により BriClone(約 10%)を含む HT 培地に 3 cell/mL の細胞懸濁液とし、96 well プレート(100 μ L/well)にて培養することによりクローニングを行うこととした。

6. サイロシングルクロナイドの合成

Brown らによるモルヒネグルクロナイドの合成手法(Tetrahedron, 56, 7591-7594, 2000)を参考にして、サイロシン-O- β グルクロナイドの合成を検討した。

C. 研究結果・考察

1. 幻覚性キノコの DNA 解析による鑑定法確立

I1-I6 の rRNA 遺伝子の内部転写スペーサー (ITS) 及び大サブユニット (LSU) 領域の DNA 配列を解析した結果、I1 は、*Pa. cyanescens* のものと、I6 は *Ps. argentipes* のものと一致した。また、I3、I5 では、データベース中の対応する配列と 3 塩基程度の違いが見られ、昨年度の調査同様、種内変異の存在が確認された。今回の LSU 領域の解析結果をデータベースのものと比較することにより、*Psilocybe* 属キノコにおけるサイロシン類含有種と非含有種とを区別可能な配列を見出したことから、この領域を利用し、昨年度構築した TaqMan PCR による鑑定法を改良した。本法をマジックマッシュルーム標品およびシイタケ、エノキなどの食用キノコ類に適用したところ、幻覚性キノコ類と、非幻覚性の *Psilocybe* 属キノコや食用キノコ類を良好に区別することが可能であった。一方、国内で採集された野生キノコ 30 種では、*Kuehneromyces mutabilis* (F2)、*Macrolepiota neomastoidea* (F9)、*Calvatia craniiformis* (F17)、*Chlorophyllum molybdites* (F30) の 4 種が陽性(幻覚性)と判断された。これらについて、サイロシン類の有無を LC/MS 分析により調べたところ、いずれの試料からもサイロシン類は検出されなかった。

I1 の ITS 及び LSU の DNA 配列が *Pa. cyanescens* のものと一致したことから、昨年度、rRNA 遺伝子の塩基配列を基に行った国内市場品の分類調査において *Pa. cyanescens* (MM-2) であると推定された 15 品目の中には、*Pa. cambodginiensis* が含まれている可能性がある。また、テングタケ、ベニテングタケの DNA 配列解析を行なった結果、

昨年度の調査で国内市場品に見出された *Amanita* 属キノコは、テングタケであると推定された。最近、マジックマッシュルームの後継としてベニテングタケが流通しているが、今回の結果から、サイロシン類含有キノコが麻薬原料植物に指定される前からテングタケ類が既に流通していたことが明らかとなった。

以上、今回改良を加えた鑑定法により、より高い精度で幻覚性キノコを鑑定できることが明らかになった。適用例において少数の例外が認められたが、これらは成分分析法と組みあわせることにより除外することが出来、本方法は、幻覚性キノコの鑑定の一次スクリーニング法として有用であると考えられる。

2. サイロシンをモチーフとした新規ハプテンの合成と抗原の調製

サイロシンの4位フェノール性水酸基にスペーサー部分を昨年と同様の手法によりエーテル結合させることにした。まず、末端にチオール基を有する炭素数2および3のスペーサー誘導体を調製することを試みた。しかし、離脱基としてトシル基を有する炭素数2のスペーサー部分は合成することができなかった。炭素数3のスペーサーは定法によりサイロシンに結合させて、脱保護により炭素数3のチオール基を末端に有するハプテンを与えた。次に、炭素数2および3のカルボン酸スペーサーを有するハプテンの合成を試みた。まず、炭素数2のカルボン酸末端ハプテンは定法により合成することができた。しかし、炭素数3のカルボン酸末端を有するハプテンは、定法では合成できなかった。次に、スペーサー内にペプチド結合を有するハプテンを合成した。さらに得られたハプテンの内、2

種についてキャリアタンパク質に結合させて抗原を調製した。次に、マウスへの免疫および抗体価測定を行った。その結果、免疫源に対する血清中の抗体価が十分に上がったことが明らかとなった。次にサイロシンに対する特異性を調べるため、これらの49日目に採取した血清のサイロシンによる競合阻害試験を行った。その結果、前回とほぼ同様にサイロシンに対する特異性はあまり強くないことが明らかとなった。現在、細胞融合および抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニングを実施しており、ハイブリドーマを確立すると共に、モノクローナル抗体の精製、さらにその抗体を用いたサイロシン検査に用いる誘導体を検討したいと考えている。

今回新たに設計したサイロシンのハプテンは、抗体価は上がったものの、やはりサイロシンによる競合的阻害は弱いものであった。化合物の安定性を考えて、サイロシンの4位水酸基にスペーサーをエーテル結合によりつなげ、キャリアタンパク質と結合させる方法で抗原を作製してきたが、この4位水酸基がフリーであることがサイロシンを認識させることにおいて重要であるのかもしれない。

3. サイロシングルクロナイドの合成

Brown らによる、2,3,4-トリ-O-イソブチルリル-1-O-トリクロロアセトイミドイル- α -D-グルコピランウロネートを用いて、サイロシンのグルクロン酸誘導体合成を試みた。しかし、サイロシンとのカップリングの収率が低く、C-グルクロニドを含むいくつもの副生成物が生じた。反応条件の検討も行ったが、劇的な変化は全く見られなかった。また精製には、HPLCによる分取しか方法がなかった。

D. 研究発表

論文発表

1. O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda, Concise large-scale synthesis of psilocin and psilocybin, principal hallucinogenic constituents of "Magic mushroom", *J. Nat. Prod.*, **66**, 885-887 (2003).
2. T. Maruyama, N. Kawahara, K. Yokoyama, Y. Makino, T. Fukiharu, Y. Goda, *Forensic Sci. Int.*, Submitted.

学会発表

1. 丸山卓郎、合田幸広、横山和正、牧野由紀子、TaqMan PCR 法を用いた幻覚性キノコの鑑定 (2)、日本食品衛生学会第 86 回学術講演会、2003 年 10 月、盛岡。
2. 代田 修、菊池 裕、合田幸広、幻覚性キノコ(いわゆるマジックマッシュルーム)の高感度検知法の開発(1)-サイロシンハプテンの合成と免疫、抗体作成-、日本生薬学会第 50 回年会、2003 年 9 月、東京。

分担研究報告書

幻覚性キノコの DNA 解析による鑑定法確立

分担研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長
協力研究者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

研究要旨 前年度、各種幻覚性キノコの標品の rRNA 遺伝子 (internal transcribed spacer、ITS : large subunit、LSU) の塩基配列解析を行い、その結果を基に、本領域を利用した TaqMan PCR による鑑定法の構築を行った。本年度、新たに入手したキノコの標品 6 種の塩基配列解析を行い、その結果を基に、従来の方法では不可能であった非幻覚性の *Psilocybe* 属キノコを陰性とするより精度の高い鑑定法へと、従来法を改良した。また、国内に自生するキノコ類について本法の適用範囲を調査し、陽性反応を示した 4 種について LC/MS によるサイロシン類の分析を行なった。他に、テングタケ、ベニテングタケの DNA 配列解析を行い、昨年度の調査において不明であった 2 検体の基原種を推定した。

A. 研究目的

平成 14 年 6 月より麻薬原料植物に指定されたサイロシン、サイロシビン含有キノコ類(いわゆるマジックマッシュルーム)について、DNA 配列の違いを利用した鑑定法の開発を目的とした。昨年度、各種幻覚性キノコの DNA 配列の解析を行い、TaqMan PCR 法を利用した簡易鑑定法を開発したことから、今年度は、より精度の高い鑑定法の確立を目指し、さらに幻覚性キノコ及びその近縁種について DNA 配列の解析を継続して行い、DNA 情報の蓄積を行なった。また、その結果に基づき、昨年度開発した鑑定法をより精度の高いものへ改良するとともに、国内に自生する野生のキノコに本法を適用し、その有用性を調べた。さらに、昨年度の調査において見出された *Amanita* 属キノコについて、近縁種の標品の DNA 配列を解析することにより、

基原種を推定した。

B. 研究方法

1. DNA 配列解析と TaqMan assay

独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門より分譲を受けた Table 1 に示す 6 種のキノコ (I1-I6) の菌株を PDA 培地 (Potato-Dextrose-Agar) 及び PD 液体培地 (Potato-Dextrose) にて培養し、その菌糸体より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA の抽出、精製を行なった。別に、テングタケ (*Amanita pantherina*)、ベニテングタケ (*A. muscaria*) の乾燥子実体及び千葉県立中央博物館から恵与された野生キノコ 30 種 (F1-F30) から同じキットを用いて DNA 溶液を調製した。これらの DNA を鋳型として PCR を行なうことにより、rRNA 遺伝子の内部転写スペーサー領域 (internal transcribed spacer; ITS) の部分配

Table 1 本年度新たに調査した幻覚性キノコとその近縁種

	標本番号	学名	和名	備考
I1	NBRC-30222	<i>Panaeolus cambodginiensis</i>	なし	
I2	NBRC-31867	<i>Pa.retirugis</i>	サイギョウガサ	
I3	NBRC-30190	<i>Psilocybe coprophila</i>	トフンタケ	非幻覚性
I4	NBRC-30189	<i>Ps.fasciata</i>	アイセンボンタケ	
I5	NBRC-31869	<i>Ps.merdaria</i>	カワリコシワツバタケ	非幻覚性
I6	NBRC-30568	<i>Ps.subcaerulipes</i>	アイゾメシバフタケ	

列及び大サブユニット領域(large subunit; LSU) の部分配列を増幅し、塩基配列解析を行なった。I1-I6 の解析結果をデータベース (DDBJ、EMBL、GenBank) 中の *Panaeolus* 属、*Psilocybe* 属のものと比較することにより、LSU 領域の中に幻覚性キノコと非幻覚性の *Psilocybe* 属キノコとを区別可能な領域を見出した。この領域を利用し、昨年度、構築した TaqMan PCR による鑑定法をより高精度なものへと改良した。TaqMan PCR は、酵素系に NIPPON GENE 社の TaqNT を使用したほかは、昨年度のものと同じ条件によった。本法を国内に自生する野生のキノコ類に適用し、その有用性を調べた。

2. LC/MS 分析

乾燥試料 100 mg を粉碎し、75% MeOH 10 ml を加え、振盪機 SR-2W (Taitec) により攪拌した。このものを遠心分離した後、上清 1 ml を GL クロマトディスク (non-aqueous、0.45 μ m; GL Sciences) を用いてフィルターろ過し、試料溶液とした。

LC/MS 分析は、装置に JEOL 社 JMS-T100LC AccuTOF spectrometer を用いた。カラムには、Inertsil ODS-3 (4.6 x 250 mm, 5.0 μ m) を、移動相には、acetonitrile (ACN)-10 mM ammonium formate buffer (pH3.0) の系を流速 0.5

ml/min、下記のグラジエント条件で使用した：10-20% ACN (0-15 min)、20-10% ACN (15-20 min)。MS におけるイオン化は、ESI の positive mode で行なった。検出限界は、サイロシンが 1 ng、サイロシピンが 10 ng であった。

C. 結果と考察

I1-I6 の rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、I1 は、LSU 領域の配列が、*Pa.cyanescens* (Acc.No.AF261526) のものと一致した。このことから、昨年度、rRNA 遺伝子の塩基配列を基に行った国内市場品の分類調査において *Pa.cyanescens* (MM-2) であると推定された 15 品目の中には、*Pa.cambodginiensis* が含まれている可能性がある。一方、I2 は、*Pa.sphinctrinus* と LSU 領域 (Acc.No.AB104646) の配列が一致したが、ITS 領域 (Acc.No.AY152728) にはわずかな違いが見られた。I3 及び I5 は、いずれもデータベース中の対応する配列 (Acc.No.AF139971, AF261613) と 3 塩基程度の違いが見られ、昨年度の報告書においても指摘した通り、種内変異の存在が確認された。また、I6 は、*Ps.argentipes* と、ITS, LSU 領域 (Acc.No.AB092792, AB104648) どちらの配列も一致した。今回の LSU 配列の解析結果に、データ

ベース中の *Psilocybe* 属及び *Panaeolus* 属の配列を加え、分子系統樹を作成したところ Fig.1 に示すような結果が得られた。昨年度の報告書においても指摘した通り、*Psilocybe* 属のキノコは、系統樹においてサイロシン類を含有するもの (Group B) と含まないもの (Group A) とで、個別のクラスターを形成した。このことから、LSU 領域中に、幻覚性と非幻覚性の *Psilocybe* 属を区別できる配列があるのではないかと考え、この点に着目して LSU 領域を調べたところ、Fig.2 の probe 2 に示す位置にそのような配列が見出された。そこで、より精度の高い鑑定法の確立を目指し、従来の方法に改良を加えることとした。図の配列は、昨年度構築した鑑定法に利用した領域内に位

置していたため、probe 2 を図の位置に設計し直すことにより容易に改良が可能であった。

改良した鑑定法を各種幻覚性キノコ、食用キノコ及び国内に自生するキノコ類に適用した結果を Table 2 に示した。表中影付きはサイロシン類の含有が示されているものである。*Panaeolus* 属、*Psilocybe* 属のキノコ類及び食用キノコ類については良好な結果を示したが、国内に自生するキノコ類では Table 中太字で示した 4 種類が陽性となった。これらについて、LC/MS 分析により、サイロシン類の有無を調べたところ、いずれの試料からもサイロシン類は、検出されなかった。測定結果の代表例として *Psilocybe cubensis* 標品及び F9 の各クロ

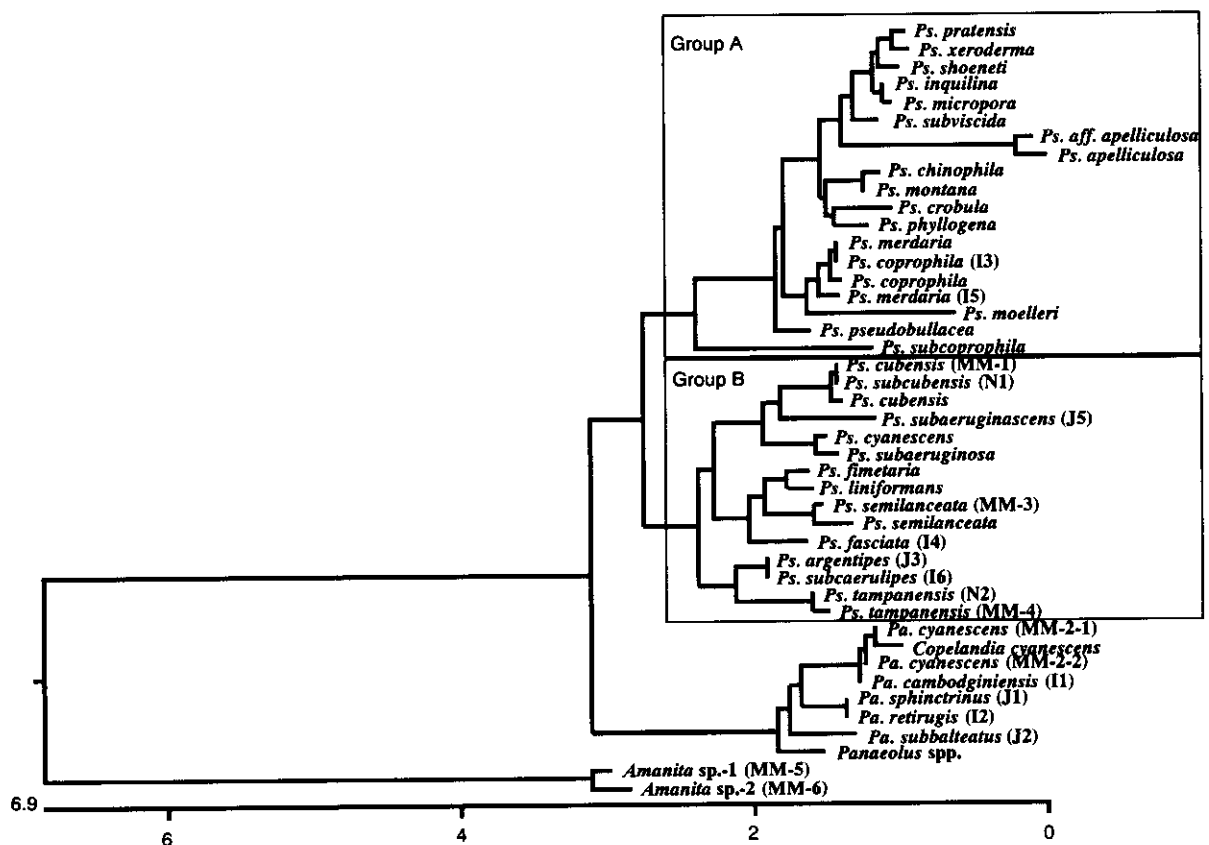


Fig. 1 rRNA 遺伝子の LSU 配列を基にした各種幻覚性キノコ類の分子系統樹

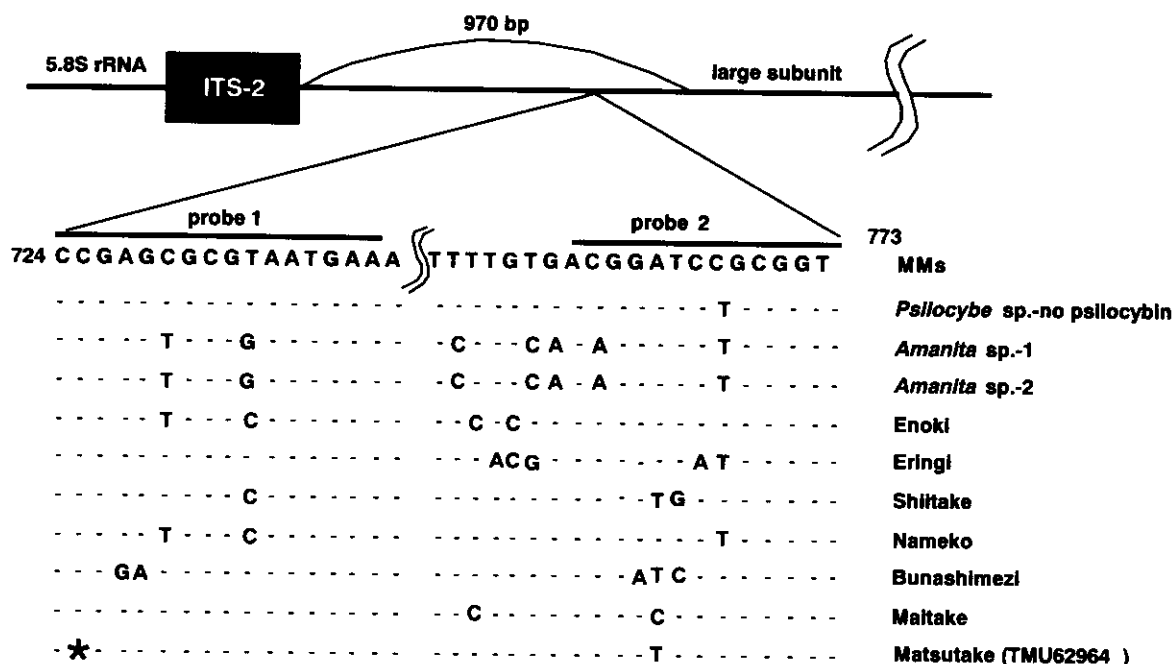


Fig. 2 各種幻覚性キノコと食用キノコ類の塩基配列の比較

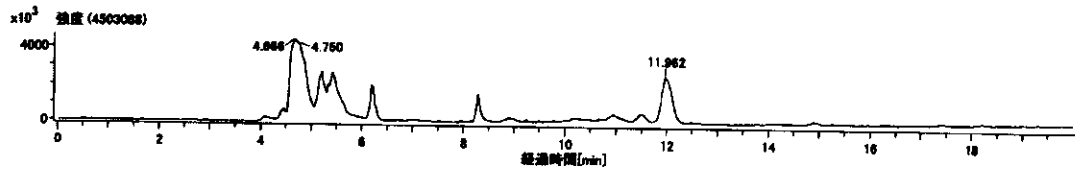
Table 2 本実験に使用したキノコとTaqMan PCR による鑑定の結果

No.	Japanese Name	Scientific Name	Voucher No.	probe		
				Positive	1	2
MM-1	ミナミシビレタケ	<i>Psilocybe cubensis</i>	KY7156	+	+	+
MM-2-1	アイノメヒカゲタケ	<i>Pa. cyanescens</i>	-	+	+	+
MM-2-2	アイノメヒカゲタケ	<i>Pa. cyanescens</i>	-	+	+	+
MM-3	なし	<i>Ps. semilanceata</i>	-	+	+	+
MM-4	なし	<i>Ps. tampanensis</i>	-	+	+	+
MM-5	-	<i>Amanita</i> sp.-1	-	+	-	-
MM-6	-	<i>Amanita</i> sp.-2	-	+	-	-
J1	ヒカゲタケ	<i>Pa. sphinctrinus</i>	KY7130	+	+	+
J2	センボンサイギョウガサ	<i>Pa. subbalteanus</i>	KY4155	+	+	+
J3	ヒカゲシビレタケ	<i>Ps. argentipes</i>	KY3573	+	+	+
J4	オオシビレタケ	<i>Ps. subaeruginascens</i>	KY4097	+	+	+
N1	なし	<i>Ps. subcubensis</i>	KY7054	+	+	+
N2	なし	<i>Ps. tampanensis</i>	KY7134	+	+	+
I1	なし	<i>Pa. cambodgiensis</i>	NBRC30222	+	+	+
I2	サイギョウガサ	<i>Pa. retirugis</i>	NBRC31867	+	+	+
I3	トフンタケ	<i>Ps. coprophila</i>	NBRC31869	+	+	-
I4	アイセンボンタケ	<i>Ps. fasciata</i>	NBRC30190	+	+	+
I5	カワリコシワツバタケ	<i>Ps. merdaria</i>	NBRC30568	+	+	-

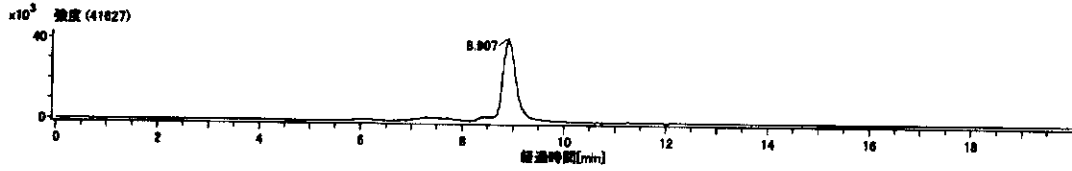
№	アイソメンバフタケ	<i>Ps. subcaerulipes</i>	NBRC30189	+	+	+
E1	エノキタケ	<i>Flammulina velutipes</i>	TM001	+	-	+
E2	エリンギ	<i>Pleurotus eryngii</i>	TM002	+	+	-
E3	シイタケ	<i>Lentinus edodes</i>	TM003	+	-	-
E4	ナメコ	<i>Pholiota nameko</i>	TM004	+	-	-
E5	ブナシメジ	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	TM005	+	-	-
E6	マイタケ	<i>Grifola frondosa</i>	TM006	+	+	-
F1	コタマゴテングタケ	<i>Amanita citrina</i> var. <i>citrina</i>	FB-31832	+	-	-
F2	センボンイチメガサ	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	FB-31833	+	+	+
F3	ヘビキノコモドキ	<i>Amanita spissacea</i>	FB-31919	+	-	-
F4	オオツルタケ	<i>Amanita vaginata</i> var. <i>punctata</i>	FB-31924	+	-	-
F5	ツチグリ	<i>Astraeus hygrometricus</i>	FB-31927	+	-	-
F6	キタマゴタケ	<i>Amanita javanica</i>	FB-32703	+	-	-
F7	シロテングタケ	<i>Amanita neoovoidea</i>	FB-32704	+	-	-
F8	チチアワタケ	<i>Suillus granulatus</i>	FB-32705	+	+	-
F9	ドクカラカサタケ	<i>Macrolepiota neomastoidea</i>	FB-32706	+	+	+
F10	ミヤマタマゴタケ	<i>Amanita imazekii</i>	FB-32707	+	-	-
F11	タマゴタケ	<i>Amanita hemibapha</i>	FB-32708	+	-	-
F12	ミドリニガイグチ	<i>Tylopilus virens</i>	FB-32709	+	-	-
F13	スッポントケ	<i>Phallus impudicus</i>	FB-32710	+	+	-
F14	キイロイグチ	<i>Pulveroboletus ravenelii</i>	FB-32711	+	-	-
F15	ヒメコナカブリツルタケ	<i>Amanita farinosa</i>	FB-32712	+	-	-
F16	コテングタケモドキ	<i>Amanita pseudoporphyria</i>	FB-32713	+	-	-
F17	ノウタケ	<i>Calvatia craniiformis</i>	FB-32714	+	+	+
F18	ドウシントケ	<i>Amanita esculenta</i>	FB-32715	+	-	-
F19	ウスキテングタケ	<i>Amanita gemmata</i>	FB-32716	+	-	-
F20	テングツルタケ	<i>Amanita ceciliae</i>	FB-32717	+	-	-
F21	テングタケ	<i>Amanita pantherina</i>	FB-32718	+	-	-
F22	ムラサキヤマドリタケ	<i>Boletus violaceofuscus</i>	FB-32719	+	-	-
F23	シロオニタケ	<i>Amanita virgineoides</i>	FB-32720	+	-	-
F24	ドクツルタケ	<i>Amanita virosa</i>	FB-32721	+	-	-
F25	ヘビキノコモドキ	<i>Amanita spissacea</i>	FB-32722	+	-	-
F26	ウラグロニガイグチ	<i>Tylopilus eximius</i>	FB-32723	+	-	-
F27	ガンタケ	<i>Amanita rubescens</i>	FB-32724	+	-	-
F28	ニガイグチモドキ	<i>Tylopilus neofelleus</i>	FB-32725	+	-	-
F29	ツルタケ	<i>Amanita vaginata</i>	FB-32726	+	-	-
F30	オオシロカラカサタケ	<i>Chlorophyllum molybdies</i>	FB-32727	+	+	+

全イオンクロマトグラム

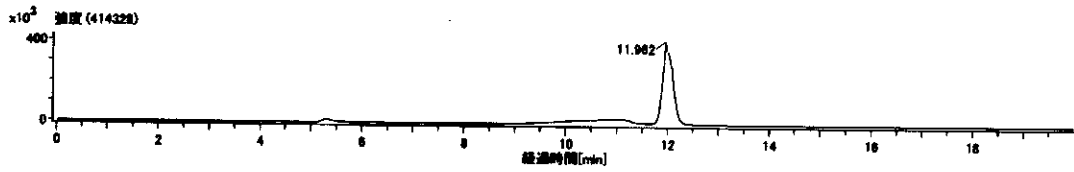
Psilocybe cubensis 標品



マスクロマトグラム (m/z: 284.5-285.5)

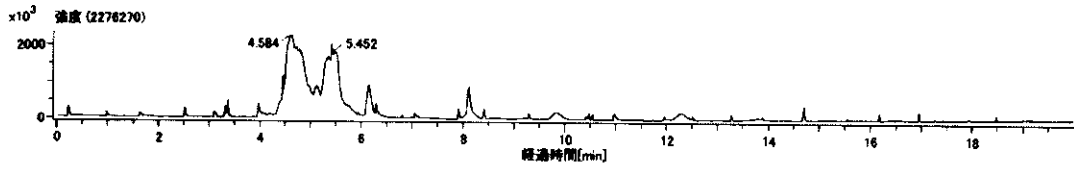


マスクロマトグラム (m/z: 204.5-205.5)

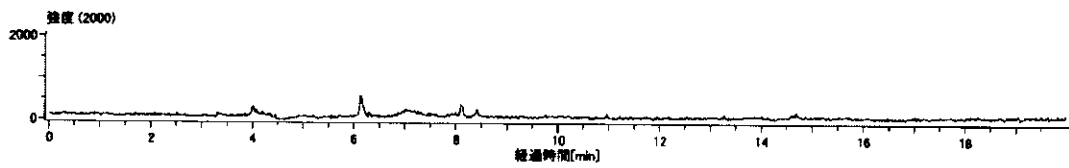


全イオンクロマトグラム

F9



マスクロマトグラム (m/z: 284.5-285.5)



マスクロマトグラム (m/z: 204.5-205.5)

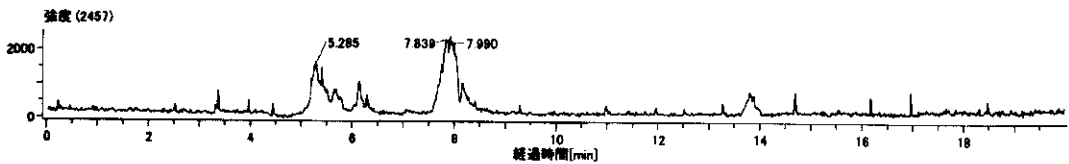


Fig. 3 *Psilocybe cubensis* 標品及び F9 の LC/MS クロマトグラム

マトグラムを Fig.3 に示した。これらのうち、F30 は、以前、サイロシン類の含有が報告されており、今回の結果は生

環境による違いあるいは、検出限界以下の含有量であったと考えている。

Amanita 属キノコの DNA 配列解析で

は、テングタケの ITS1 領域 (250 bp) が MM-5 のものと、2 塩基を除き一致した。また、MM-5 の配列は、昨年度末、京都大学の Oda らによりデータベースに公開されたテングタケの配列 (Acc. No. AB080974-080977) とともに 1 塩基を除き一致した。一方、MM-6 の配列も、データベース中の別のテングタケの配列 (Acc.no.AB080774) と 6 塩基の違いであり、その他にもテングタケの配列が相同性検索の上位を占めた。テングタケの種内変異の頻度の高さを考慮に入れると、MM-5、MM-6 とともに基原種は、テングタケであると推定される。

D. 結論

今回改良を加えた鑑定法により、より高い精度で幻覚性キノコを鑑定できることが明らかになった。適用例において少数の例外が認められたが、これらは成分分析法と組みあわせることにより除外することが出来た。従って、本方法は、幻覚性キノコの鑑定の一次スクリーニング法として有用であると考えられる。また、*Amanita* 属キノコの DNA 配列解析及びデータベース検索の結果から、昨年度の調査において基原種不明であった MM-5、MM-6 の基原種をテングタケであると推定することが出来た。現在、マジックマッシュルームの後継としてベニテングタケが流通しているが、今回の結果から、サイロシン類含有キノコが麻薬原料植物に指定される前からテングタケ類が既に流通していたことが明らかとなった。

E. 危機情報

今回の研究で流通が確認された

Amanita 属キノコの中には、ドクツルタケ等致死率の高いものも存在し、これらの流通には、注意をすべきものと考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. T.Maruyama, N.Kawahara, K.Yokoyama, Y.Makino, T.Fukiharu, Y.Goda, *Forensic Sci. Int.*, Submitted.

学会発表等

1. 丸山卓郎、合田幸広、横山和正、牧野由紀子、TaqMan PCR 法を用いた幻覚性キノコの鑑定 (2)、日本食品衛生学会第 86 回学術講演会、2003 年 10 月、盛岡。

研究協力報告書

幻覚性キノコ(いわゆるマジックマッシュルーム)の高感度検知法の開発

研究協力者 代田 修 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨 幻覚性キノコ(マジックマッシュルーム)に含有される幻覚性成分であるサイロシビン類を極微量で検出可能とする ELISA の開発を目指して、サイロシンをモチーフとしたハプテン3種を新たに合成した。2種のハプテンをキャリアタンパク質に結合させて免疫源としてマウスに免疫を行い、マウス脾臓の細胞融合による抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニングを検討した。また、サイロシン、サイロシビンの生体内代謝物である、サイロシングルクロナイドの合成も検討した。

A. 研究目的

いわゆるマジックマッシュルームと呼ばれる幻覚性キノコには「麻薬及び向精神薬取締法」により麻薬成分に指定されているサイロシンおよびサイロシビンが含まれている。近年、この幻覚性キノコの乱用が社会問題化したため、平成 14 年 6 月 6 日より、サイロシン(1)又はサイロシビン(2)を含有するキノコ類を麻薬原料植物として規制されている。このマジックマッシュルームの同定には、通常、植物学的手法が用いられるが高い専門性が必要となる。化学的同定法としては、サイロシビン類をガスクロマトグラフ-質量分析(GC/MS)法または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法および高速液体クロマトグラフ-質量分析(LC/MS)

法で確認する方法が一般的である。しかし、幻覚性キノコの押収現場においてサイロシビン類含有の有無を確認するには、免疫化学的手法を用いた簡便な検査方法の導入が最適と思われる。

本研究では、サイロシビン類を特異的に極微量で検出可能とする ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)の開発を目指し、サイロシンをモチーフとしたハプテンを新たに合成してマウスに免疫を行い、マウス脾臓の細胞融合による抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニングを検討した。また、サイロシン(1)、サイロシビン(2)の生体内代謝物である、サイロシングルクロナイド(3)の合成も検討した(図 1)。

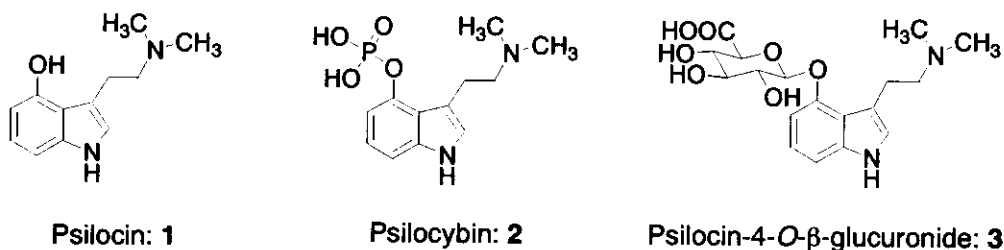


図 1. サイロシン類の構造

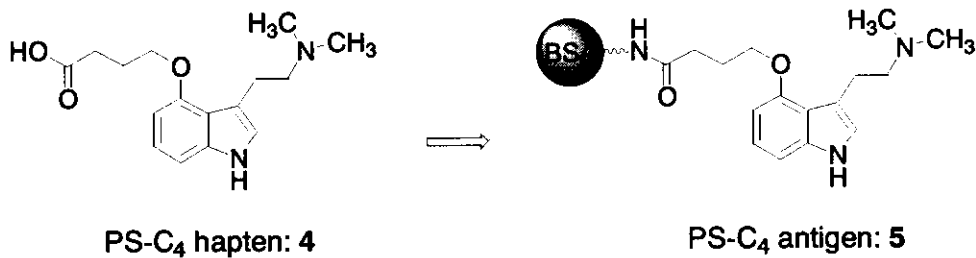


図2. C₄ スペーサーハプテンと抗原

B. 研究方法

1. サイロシンをモチーフとした新規ハプテンの合成と抗原の調製

一般的に低分子化合物はそのままでは免疫反応を誘起する抗原には成り難い。そこでサイロシビン類を認識する抗体を得るためには、サイロシビン類をモチーフとしたハプテン-タンパク質複合体を抗原として調製する必要がある。サイロシビン(2)は生体内において脱リン酸化されてサイロシン(1)となる。さらに生体内で代謝されてサイロシニングルクロニド(3)となる。そこでハプテンとしてはこれらの共通構造でもあるサイロシン(1)を念頭に置いた。また、スペーサーを介してキャリアタンパク質に結合させる部位としては、サイロシンの側鎖上のアミン、インドール骨格上の窒素、および4位フェノール性水酸基が考えられるが、化合物の安定性を考慮して、4位フェノール性水酸基にエーテル結合させることとした。そのハプテンは適切なスペーサーを持って BSA などのキャリアタンパク質に結合した構造でなければなら

い。昨年度の研究では、スペーサーの長さを一般的と考えられた4炭素長のハプテン(4)を合成し、その抗原(5)を用いてマウスおよびウサギに免疫を行った(図2)。しかし、得られた抗血清はスペーサー部分も認識してしまい、特異性という点において満足できるものではなかった。今年度は、種々のスペーサーを持つハプテンを合成し、特異性の上昇を試みることにした。まず、末端にチオール基を有するハプテンを考えた(図3)。これは、マレインイミドで修飾したキャリアタンパク質に容易に反応するので抗原を調製することができ、ペプチドに対する抗体を作成する時に度々用いられるものである。また、スペーサーの長さを単純に短くしたハプテンも考案した。さらに、スペーサー内にアミド結合を有するハプテンも合成することとした。

2. マウスへの免疫および抗体価測定

免疫するマウスは BALB/c 系統を用いた。今回はモノクローナル抗体の調製を目標としているので、ウサギへの免疫は行わなかった。前回と同様に抗原の PBS

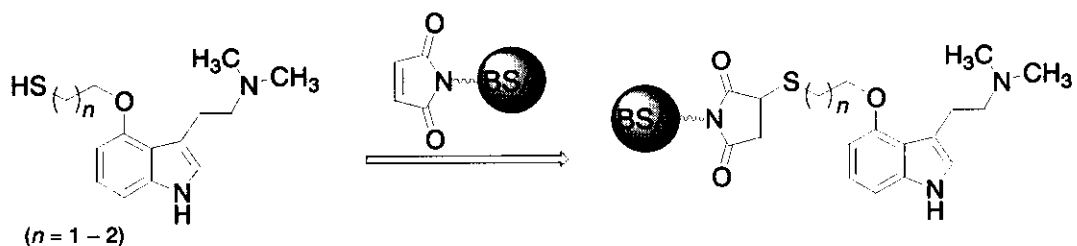


図3. チオールハプテンと抗原