

# 猛毒リシンの超高感度検出技術

## 致死量の1万分の1をわずか10分で判定可能に

リシンは、バイオテロに使用されたこともある猛毒のタンパク質性毒素である。われわれは、リシンが細胞表面の糖鎖に結合して生体に感染する事実に着目し、この感染機構を材料工学的に模倣することで、リシンを検知するシステムを開発した。すなわち、毒素と結合しやすい人工糖鎖を独自に設計・合成し、この糖鎖を固定化した毒素検知用糖鎖チップを開発した。この糖鎖チップを表面プラズモン共鳴法と組み合わせることで、致死量の1万分の1のリシンを10分で検知することができた。この検知方法は、猛毒リシンの判定法として広く公的機関に配備され、安心・安全な社会の構築に大きく貢献すると期待される。

*Ricinus communis* toxins are highly poisonous proteins once used illegally in the past. Against such bioterrorisms using toxins and pathogenic microbes in the form of the "white powders", we have to be prepared with facile detection and medical treatment methods. Recently, we developed an SPR (surface plasmon resonance) detection system applying synthetic carbohydrates as the toxin probes, which allows us a facile and highly sensitive detection within 10 min even at protein concentration of less than 1/10,000 of LD<sub>50</sub> value. The present analytical method may offer one of the highly effective methods against the bioterrorism.

### リシン検出法の必要性

リシンは、1978年に、ブルガリア人ジャーナリストの暗殺に使用された。また、2003～04年には、米国のホワイトハウスや上院に白い粉のリシンが郵送される事件が起きている。リシンは、ヒマ、あるいは、トウゴマの種子（写真1）から精製され、致死量(LD<sub>50</sub>、吸入)は3～5μg/kg（体重50kgの人の場合、150μg）である。青酸カリと比べて500～1000倍も毒性が強いため、生物化学兵器として最も使用され得る毒素であり、バイオテロへの使用が懸念されている。米国ナノテク国家戦略においても、バイオハザードセンサーの重要性が謳われているが、これまでのところ必ずしも十分な成果は得られておらず、国家レベルの研究が急務であった。

現在使われている代表的なリシン検出方法には遺伝子診断法や抗原抗体法などがある。しかし、専門家による判定が不可欠であり、また、検出感度や時間、操作性などに問題がある。抗原抗体法の場合、抗体は海外から輸入されるが、低温での保管、管理が必要であり、室温保管が可能であっても保証有効期限が短いなど問題がある。

### 糖鎖を利用した検出技術

これまでわれわれは、大腸菌O-157が生産するペロ毒素を糖鎖によって検出する技術を開発してきた。ペロ毒素は腎臓細胞表面の糖鎖に結合して感染するが、この糖鎖を模倣した「人工糖鎖」を独自に開発し、これにペロ毒素を結合させ、その微量の質量変化を水晶振動子によって測定することで、1時間以内に致死量以下のペロ毒素を検出する



写真1 トウゴマ (ヒマ種子: *Ricinus communis*)  
大きさ 約 1cm × 2cm

ことができた<sup>1~5)</sup>。

これらの研究開発で培ってきた「糖鎖の合成技術」<sup>6~8)</sup>と「糖鎖を利用した毒素検出技術」を活用し、リシン検出技術の開発に取り組むこととした<sup>9, 10)</sup>。

### リシンの感染機構と検知原理

タンパク質リシンは、分子量32,000のA-サブユニット(A-鎖)と分子量34,000のB-サブユニット(B-鎖)がジスルフィド(S-S)結合で結合したものである。A-サブユニットは、リボヌクレアーゼ活性(細胞内のリボ核酸(RNA)を分解する力)を持ち、B-サブユニットは、細胞表面にある糖鎖と結合してA-サブユニットを細胞内へ侵入させる。この細胞表面の糖鎖は、末端にガラクトース、N-アセチルガラクトサミンを持ったものである。

図1に感染機構を示した。リシンが細胞表面に近づくと、

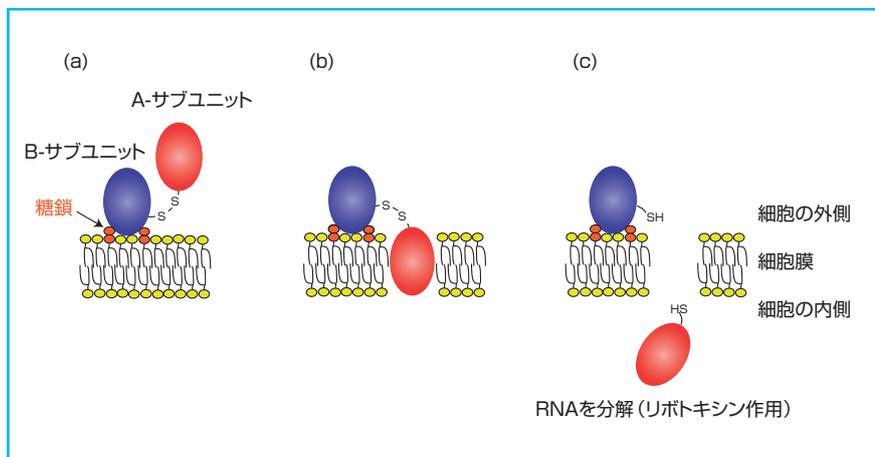


図1 リシンが細胞表層に結合するメカニズム  
(a) B-サブユニットが細胞表層の糖鎖に結合。  
(b) A-サブユニットが細胞膜に貫通。  
(c) 両サブユニット間のジスルフィド結合が切断されてA-サブユニットが細胞内に侵入後、RNAを分解。

表層の糖鎖にB-サブユニットが結合する(図1a)。つづいて、A-サブユニットが細胞膜を貫通する(図1b)。ここで両サブユニット間を結合していたジスルフィド(S-S)結合が切断されて、A-サブユニットだけが細胞内へ侵入する(図1c)。A-サブユニットは、リボヌクレアーゼ活性を持っており、細胞のタンパク質合成装置であるリボソームのRNA(リボ核酸)を加水分解し、細胞に必要なタンパク質の生合成をできなくする。その結果、生体は、致死性のダメージを受ける。

われわれは、上記の感染機構を材料工学的に模倣したリシン検知法を考案した。つまり、リシンが細胞表層の糖鎖に結合するメカニズムを検知原理に用いて、毒素と結合しやすい糖鎖を化学的に設計・合成してその毒素を感度よく検知するシステムである。図2には、センサーチップの写真およびリシン検知の原理を示した。センサーチップの中央には、金薄膜が蒸着してある。この部分を拡大したものが、図2の右側である。7mm四方の金薄膜の表面に、アンカー分子を介して糖鎖が固定化してある。リシンは、センサー基板の糖鎖をあたかも細胞表層の糖鎖と見込み、その金薄膜表面に結合する。タンパク質であるリシン分子が結合すると質量がごく微量増加するので、その変化を、表面プラズモン共鳴(SPR)によりリアルタイムに測定すれば、毒素の有無や、毒素の量がわかる。

### 糖鎖の分子設計・合成とリシン毒素検知用チップ

感染機構の項目でも述べたように、リシンはガラクトースなどを末端にもつ糖鎖と結合することが知られている。そこでわれわれは、10種類の新しい人工糖鎖を独自に設計・合成し、リシン検知に有効な糖鎖の探索を行った。また、糖鎖を金薄膜へ固定する方法が異なると、目的とする

毒素検知の感度が大きく低下してしまうことを見出している。糖鎖による毒素検出技術の開発において糖鎖の固定化法の選定は、糖鎖自体の設計・合成と同じくらい重要な課題である。したがって、これら2つの課題がそろってはじめて十分な検知感度を持つ毒素検知方法として利用できることになる。

まず、2種類のアンカー分子を用いた固定化法について検討した。芳香族アンカーを介してガラクトースを固定化する方法と脂肪族アンカーを介してガラクトースを金基板に固定化する方法である。アンカー分子を介して糖鎖を金基板に固定化後、基板の糖鎖密度をX線光電子分光法(XPS)により評価した。その結果、脂肪族型のアンカーは、芳香族型アンカーよりも高密度に固定化されていることがわかった。脂肪族型のアンカー分子を用いる固定化法は、芳香族型のアンカーによる固定化よりも、高感度検知には有利であると考えられる。

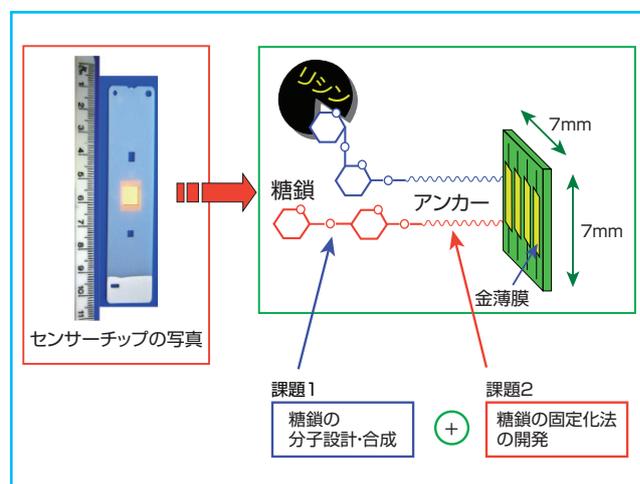


図2 リシン検知用チップの模式図

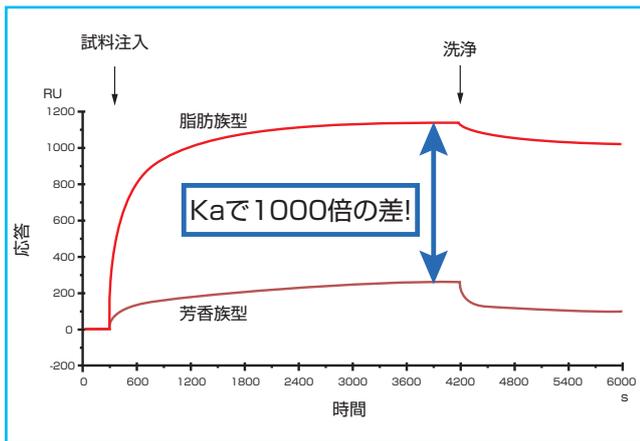


図3 ガラクトースを用いたときのリシン凝集素 [RCA120] に対する SPR レスポンス  
固定化法により、結合定数に大きな差が生じた。

### 効果の検証

リシンそのものは産総研内で取り扱うことは出来ないの  
で、モデルタンパク質としてリシン凝集素 (RCA<sub>120</sub>: リシン  
が2つ結合したもの。リシンとほぼ同じ構造を持つため  
モデルとして使えるが、毒性はほとんどない。) を用いて、  
上記2つの固定化法によってガラクトースを固定化したセン  
サーチップについて、SPR解析を行なった。図3に示す  
ように、両者の結合定数の差は1000倍にも達する。つまり、  
脂肪族型アンカーを用いることで、より高感度に対象のタ  
ンパク質 (RCA<sub>120</sub>) を検知できた。このことから、脂肪族型  
アンカーを用いれば、猛毒リシンの高感度検知が達成でき  
ると予想された。

そこで、科学警察研究所において実際のリシンを用い、  
高感度検知に有効な糖鎖構造を探索した。解析の結果、分  
子設計した10種類の合成糖鎖のうち、脂肪族をアンカー  
に有する「合成2糖」のみがリシンの高感度検知に有効であ  
ることが明らかとなった (図4)。同じ糖鎖を用いても、固  
定化法が異なると十分な感度が得られないこともわかった  
(図4)。また、図4に示すように明らかにガラクトース単  
独ではリシン検知の目的には適していない。このように、  
糖鎖の設計と固定化法が、リシンの高感度検知に重要であ  
る。合成2糖を用いると、SPRにより致死量の1万分の1の  
リシンを10分で検知できた (図5)。

さらに、先に述べたようにガラクトース単独の糖鎖は、  
リシン毒素とは結合しないが、毒性のほとんどないリシン  
凝集素と結合するので、この凝集素の検出に利用できるこ  
とがわかった。すなわち、ガラクトースと合成2糖の2種  
類の糖鎖を組み合わせて用いることで、猛毒のリシンと毒  
性の低いリシン凝集素両方の識別が可能になった。

次に、リシン以外のさまざまな妨害タンパク質を上記で  
作成した糖鎖チップに作用させたときに、正確な判定結果  
が得られるかどうかを検討した。血清アルブミン、免疫グ

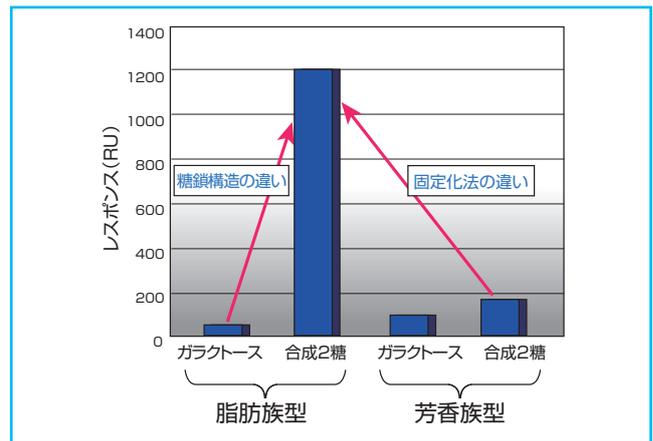


図4 糖鎖構造と固定化法の違いによる SPR レスポンス  
リシンを 50ng 注入した後の SPR レスポンスを示す

ロブリン、いくつかのマメ科植物由来のレクチン (糖鎖結  
合性タンパク質) などについて検討したところ (図6)、先の  
合成2糖には結合せず、いずれの妨害タンパク質にも反応  
することはなかった。このことは、ここで調べた妨害タン  
パク質が混在していても、偽陽性を示すことはなく、リシ  
ンのみを特異的に検知できることを意味している。つまり  
この方法は、リシンに対して特異性が高く、また、信頼性  
の高い検知技術であることが明らかとなった。

### 実用化と社会貢献

この糖鎖法は、一般の抗原抗体法の感度に比べて、40～  
4000程度も高感度であり、分析に要する時間も10分程度  
である。現行の抗体法などは、検出限界や判定時間、操作  
性などにおいて問題のある方法である。たとえば、抗体は  
低温での管理が必要であり、また、室温保管が可能であ  
っても保証有効期間が短いなどの課題がある。ここで紹介  
した糖鎖法は、研究室に設置してある SPR 装置を用いて判定

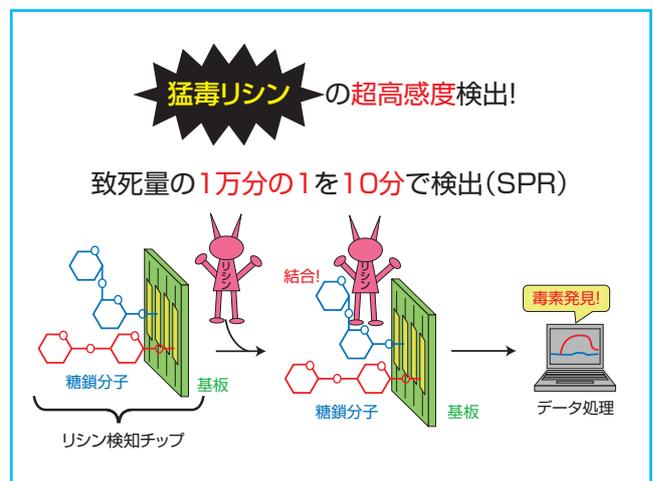


図5 本糖鎖法の検知原理と検出限界

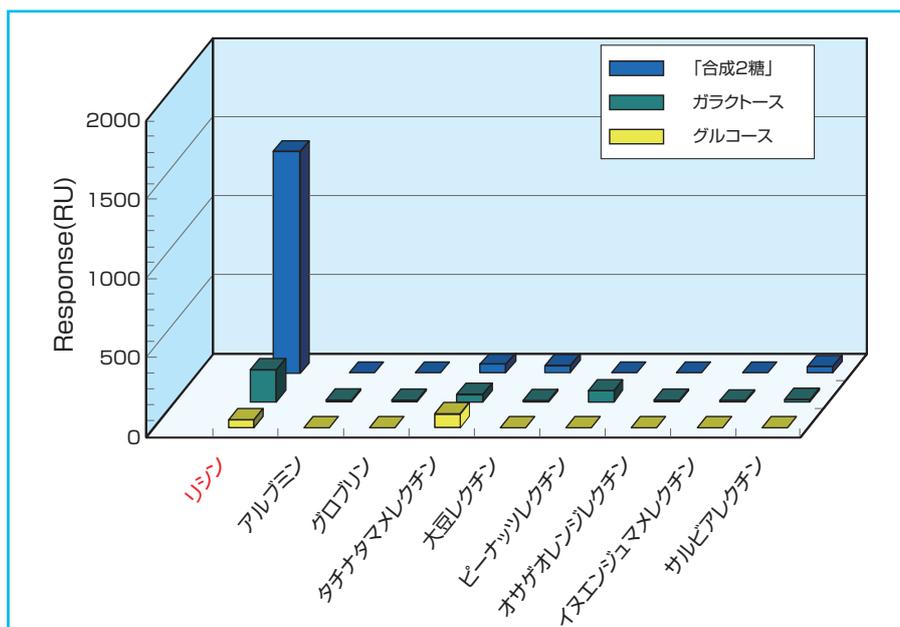


図6 さまざまなタンパク質に対するSPRレスポンス  
合成2糖は、リシンにのみ高い特異性を示す。

する「ラボ向き」の検知法ではあるが、毒素検知の鍵となる糖鎖は、熱的、化学的に安定であり、常温で長期保存可能であることから、取り扱いやすい検出方法といえる。

一方、糖鎖法は劣悪な環境でも機能することから、われわれは、高温、高湿度といった過酷な現場での使用が可能な「簡易検出法」について予備的に検討した。詳細は省略するが、先述の合成2糖をナノ金粒子に固定化したところ、致死量の1/3程度の毒素をわずか10分で目視検知できた。この方法は、いつでも、どこでも、簡便で迅速にリシンを判定できるので、「現場向き」の判定方法として期待できる。

ここで紹介した検知技術は、白い粉がリシンかどうかを高感度に迅速に判定する技術であり、1次スクリーニング法としての利用が期待される。高感度で簡便であるだけでなく、さまざまな妨害タンパク質とは反応せず、リシンのみを選択的に検知できるメリットを持っているので、最終的な確定検査を行うコストを大幅に節約できる。警察、消防、機動隊などの公的機関に配備されることになれば、安心・安全な社会の構築に大きく貢献できるものと確信している。

#### 謝辞

本研究は、ハイテクものづくりプロジェクト「糖鎖を活用した有害蛋白質検出技術の実証」（平成15～16年度）、および、科学技術振興調整費「化学剤・生物毒素の一斉現場検知法の開発」（平成17～19年度）による成果を含んでいる。

なお、リシンは、毒性が高いため、化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律において特定物質に指定されており、その製造、所持、使用は禁止されている。本研究は、警察庁 科学警察研究所 瀬戸康雄室長との共同研究の成果である。本研究で実際のリシンを用いる実験は、科学警察研究所において十分な管理下で行われた。また、本研究は、当所の箕浦憲彦博士、大賀幸二博士とともに行ったものである。

#### ・関連情報

- 1) プレス発表 2001年7月3日：[http://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2001/pr20010703/pr20010703.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2001/pr20010703/pr20010703.html)
- 2) 朝日新聞、読売新聞、毎日新聞、日本経済新聞、NHK ニュースで報道 (H13.7.4).
- 3) 鷗沢浩隆、AIST Today 9, 8 (2001).
- 4) H. Uzawa, et al., Biomacromolecules, 3, 411-414 (2002).
- 5) H. Uzawa, et al., Tetrahedron, 61, 5895-5905 (2005).
- 6) H. Uzawa, et al., Carbohydr. Res., 339, 1597-1602 (2004).
- 7) H. Uzawa, et al., Chem. Comm., 100-101 (2003).
- 8) H. Uzawa, et al., ChemBioChem - A European Journal of Chemical Biology, 4, 640-647 (2003).
- 9) プレス発表 2005年9月28日：[http://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2005/pr20050928/pr20050928.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2005/pr20050928/pr20050928.html)
- 10) 日本経済新聞、東京新聞、茨城新聞、日刊工業新聞（以上H17.9.29）、読売新聞（H17.10.25）、科学新聞（H17.10.14）等で報道。

#### ● 問い合わせ先

独立行政法人 産業技術総合研究所

バイオニクス研究センター 糖鎖系情報分子チーム

研究チーム長 鷗沢 浩隆

E-mail: h.uzawa@aist.go.jp

〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第5