

有機リン系農薬曝露に対する新規評価法の開発 ～ コイアセチルコリンエステラーゼ遺伝子のクローニング ～

環境生物化学研究室 松本 徹
指導教官 山田 良平、解良 芳夫、高橋 祥司

[はじめに]

国内における農薬の使用量は減少傾向にあるものの、依然大量に使用されている。農薬の中で有機リン系化合物は、有機塩素系化合物と比較して環境中で容易に代謝分解されるため、近年、殺虫剤、殺菌剤又は除草剤として広く使用されている。また、有機リン化合物は壁材・電気用品・衣類・カーペット・カーテンなどに添加される難燃剤・可塑剤、あるいは油圧液や潤滑材などとしても広汎に大量使用され続けている。有機リン系殺虫剤の利用について、米英では Diazinon や Diazinon oxon, Dimethyl 4-nitro-m-tolylphosphorothionate (MEP), Parathion-methyl などの有機リン系殺虫剤の基準値の見直しや使用廃止など、子供の脳や神経の発達に与える影響も考慮して規制が強められている。それに対し日本ではその毒性があまり重視されず規制面で立ち遅れている。

アセチルコリンエステラーゼ (EC 3.1.1.7、以下、AChE) は、シナプス間隙において神経伝達物質アセチルコリンを加水分解する酵素である。殺虫剤の重要なグループである有機リン系殺虫剤は、AChE の触媒部位に存在するセリン残基との間に安定な共有結合性の複合体を形成することにより、AChE を阻害することが知られている。AChE が阻害されるとアセチルコリン受容体付近でアセチルコリンが増加し、受容体への刺激が増強される。その結果、縮瞳、けいれん、呼吸困難、意識消失などの症状を引き起こし、死に至る場合もある。

水環境中のこれらの有機リン系農薬の影響評価に、魚類の脳、筋組織および血清における AChE の比活性の減少が、有用なバイオマーカーとなると考えられ、多くの野外調査で様々な魚類 { コイ (*Cyprinus carpio* : コイ目 コイ科 コイ亜科) やファットヘッドミノウ (*Pimephales promelas*) } の AChE の酵素活性が調べられている。一方、酵素学的な諸特性が明らかにされている魚類の AChE は、シビレエイや電気ウナギの発電器官とカレイ筋組織の AChE だけであった。そこで当研究室では、AChE の比活性

の減少をバイオマーカーとして用いた影響を正確に評価するためには、野外調査によく用いられる魚類の AChE の酵素的特性を把握することが不可欠であると考え、コイの AChE を精製し、その酵素学的諸特性を明らかにした。

しかしながら酵素学的諸特性の把握だけでは、有機リン系曝露に対する影響評価を正確に行うことができない。その原因の一つとして、現在の評価法は、比較する比活性の算出を、各組織もしくは血清 (g もしくは ml)あたりの AChE 活性で求めていることが挙げられる。この方法では、性別、大きさなどの各個体間での個体差により基準となる値が異なることが問題となる。これを解決するために、組織の AChE の含有量を正確に測定する方法の開発が必要となる。その方法として、抗体抗原反応を用いた免疫学的手法が挙げられる。この方法では、AChE に特異的に結合する抗体を用いることにより、組織中の AChE だけを検出することが可能となる。

そこで本研究では、コイ筋組織から AChE の精製を行い、それを用いてコイ AChE に対する抗体の作製を試みたが、抗体が得られなかった。この原因が、抗体作製に用いた AChE 精製標品の量が少ないと考えたことから、コイ AChE 遺伝子のクローニングを行い、多細胞で大量の組換え酵素として発現させることとした。その第一歩として、副題に示したコイ AChE 遺伝子のクローニングを行った。

【 結果および考察 】

コイ AChE の精製は、筋組織 2750 g を用いて行い、Buffer での可溶化およびアフィニティーカラムによる精製で、比活性 $10,783 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ を有する 1 mg のコイ AChE 精製標品が得られた。また、本酵素の形状は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により、77.9 kDa の触媒部位とコラーゲンを有するコラーゲンテイルであることが示唆された。抗体の作製は、ウサギにコイ AChE を免疫することにより作製を行った。しかしながら、ウサギ内に AChE に対する抗体は確認されなかった。

本酵素の全長 cDNA は、2368 bp であり、634 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードする 1902 bp を含んでいた。推定アミノ酸配列から算出した分子質量は、72.0 kDa であり、コイ筋組織由来の AChE の触媒部位の分子質量と近い値を示した。本酵素の推定アミノ酸配列と他の魚類由来の AChE の相同性解析の結果、ゼブラフィッシュと 87 %、電気ウナギと 78 %、シビレイと 62 % と高い相同性を示した。また、得られた cDNA には、コラーゲンテイル型特有の配列が見られたことから、コイ筋組織由来の AChE 精製標品と同様の形状をコードしていることが示唆された。