

3 研究内容

研究課題名：

酵母発現した野生動物 CYP2B 分子種の代謝能の評価

共同研究者名：

岩田久人（愛媛大学沿岸環境科学研究センター・教授）

研究目的：

バイカルアザラシやホッキョクグマなど各生態系の頂点に位置する高次捕食者はポリ塩化ビフェニル (PCBs) を高蓄積している。これら PCBs は異物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) 分子種による酸化反応を通じて水酸化 PCBs (OH-PCBs) へと代謝されるが、各 CYP 分子種による PCBs 代謝能の差異は十分に明らかにされていない。また、ホッキョクグマは血中 PCBs に対する OH-PCBs 体内残留割合が他生物種と比較して高いことから、PCBs 代謝能が高いことが予測されているものの、種差を規定する要因についても明らかではない。

これまで異物代謝に関する研究では、肝ミクロソームを用いた PCBs 代謝の解析が主であるが、代謝経路は総体として解析され、入手する肝由来の CYP 分子種の発現に依存しており、どの CYP 分子種がどのように関与するかはさらなる解析を必要とする。また、ホッキョクグマのような試料入手が困難な動物では、酵素活性を維持した状態での肝組織を得ることは難しい。従って、PCBs 代謝機構を解明するためには、異種発現による組換えタンパク質合成ツールを構築し、CYP 分子種それぞれについての機能解析が不可欠である。また、げっ歯類を用いた研究では、主に CYP2B が PCBs の代謝に関与することが報告されていることから、各 CYP2 分子種の酵素特性を明らかにすることは PCBs 代謝の機序解明において極めて重要である。

そこで本研究では、CYP2 分子種の代謝能を解析するツールとして酵母をプラットフォームとした酵母発現系を構築し、組換えタンパク質を用いて酵素特性を解析することで、PCBs 代謝能への寄与を明らかにすることを目的とする。

研究内容：

本研究では、酵母発現系を用いることにより、PCBs 代謝に大きく関与する CYP2 分子種の酵素機能解析を行うことを目的としている。しかしながら、活性を保持した CYP2 分子種の酵母発現系の成功例は少なく、原因としては、1) 電子伝達効率、および 2) プロテアソームによる分解、の 2 つが考えられている。そこで、安定した CYP2B 分子種の発現および酵素特性を調べるため、CYP 還元酵素（オキシドレダクターゼ；OR）との共発現系を構築する計画を立てた。また、酵母 OR から動物 CYP への電子伝達効率は低いことが報告されていることから、ヒト OR（hOR）を発現する酵母株の作製を目指し、hOR プラスミドを作製した。

研究成果：

CYP2 分子種と hOR を共発現する酵母株を作製するため、hOR プラスミドの構築を行った。まず、Table 1 に示す制限酵素サイトおよび酵母コンセンサス配列を付加したプライマーを用いて、RT-PCR により hOR 全長を増幅した。POR-F および POR-R にそれぞれ Hind III および Kpn I の制限酵素サイトを付加した。鋳型には pCMV-XL4-hPOR（No. SC100401, OriGene 社）を用いた。また、RT-PCR には PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼを用いた。

Table 1. Sequence of primer pairs used in the RT-PCR experiments.

Primer name	Primer Sequence (5'→3')	Size
POR-F	CCCAAGCTTGGGAAAAAATGGGAGACTCC	30
POR-R	GGGGTACCCCCTAGCTCCACACGTCC	26

Italic letters indicate the restriction enzyme sites.

増幅した PCR 産物は、Hind III および Kpn I で制限酵素処理した。また、hOR を挿入する酵母用発現ベクターは pYES3/CT を使い、これについても同様に Hind III および Kpn I で制限酵素処理した。

これら制限酵素処理した PCR 産物とベクターのモル比を最適化し、T4 DNA リガーゼを用いてライゲーションした。ライゲーション反応後、大腸菌に導入し、形質転換させた。一晚培養後、コロニーが得られていることを確認した。尚、hOR の挿

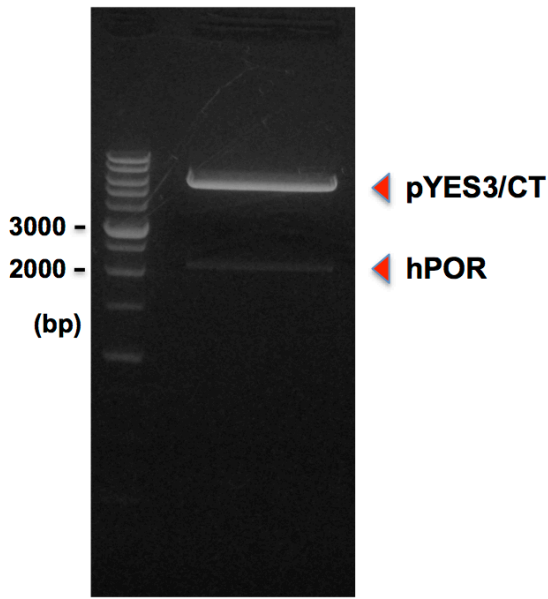


Fig. 1. Digestion of the pYES3-hOR plasmid using the restriction enzyme Hind III and Kpn I.

入は、コロニーPCRによって確認した。挿入が確認できたコロニーを大量培養し、プラスミドを精製した。

hORの挿入は、制限酵素処理とシーケンス解析の実験で確認した。まず、精製したプラスミドを用いて Hind III および Kpn I で制限酵素処理し、切断することで挿入を確認した (Fig. 1)。

また、シーケンス用プライマー Gal1 および CYC1 を用いてシーケンス解析を行った。シーケンス解析の結果から、翻訳に変異のないクローンであることを確認した (Fig. 2)。以上のことから、pYES3-hOR を構築できた。

NM_000941_CDS.seq	1	-----ATGATCAACATGGGAGACTCCACGCTGGACACCAGCTCCACCCTGTGCCGA	50
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	1	TCGGACTACTAGCAGCTGTATACGACTCACTATAGGGARATATTAGCTTGGGAAAAAATGGGAGACTCCACGCTGGACACCAGCTCCACCCTGTGCCGA	100
hPOR-CYC1-Comp.seq	1	1
NM_000941_CDS.seq	51	GGCGGTGGCCGAGGAGTATCTCTTTTCAGCATGACGGACATGATTCTGTTTTCGCTCATCGTGGGCTCCTARCCCTACTGGTTCTCTCAGAAAGAAA	150
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	101	GGCGGTGGCCGAGGAGTATCTCTTTTCAGCATGACGGACATGATTCTGTTTTCGCTCATCGTGGGCTCCTARCCCTACTGGTTCTCTCAGAAAGAAA	200
hPOR-CYC1-Comp.seq	1	1
NM_000941_CDS.seq	151	AAAGAGGAGTCCCGAGTTCACCAAAATTCAGACATTGACCTCCTCTGTGAGAGAGGAGCCTTTTGTGAAAAGATGAGAAACGGGGAGGACATCA	250
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	201	AAAGAGGAGTCCCGAGTTCACCAAAATTCAGACATTGACCTCCTCTGTGAGAGAGGAGCCTTTTGTGAAAAGATGAGAAACGGGGAGGACATCA	300
hPOR-CYC1-Comp.seq	1	1
NM_000941_CDS.seq	251	TCGTGTTTACGGCTCCAGACGGGACTGCAGAGGATTTGCCAACCCTGTCCAGGACGCCACCCTACGGGATGCAGGACATGTACGGGACCC	350
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	301	TCGTGTTTACGGCTCCAGACGGGACTGCAGAGGATTTGCCAACCCTGTCCAGGACGCCACCCTACGGGATGCAGGACATGTACGGGACCC	400
hPOR-CYC1-Comp.seq	1	1
NM_000941_CDS.seq	351	TGAGGAGTATGACCTGGCCGACCTGAGCAGCCTGCCAGATGCACACGCCCTGGTGGTTTTTCGATGGCCACCTACGGTGAAGGAGACCCACCAGC	450
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	401	TGAGGAGTATGACCTGGCCGACCTGAGCAGCCTGCCAGATGCACACGCCCTGGTGGTTTTTCGATGGCCACCTACGGTGAAGGAGACCCACCAGC	500
hPOR-CYC1-Comp.seq	1	1
NM_000941_CDS.seq	1650	GGCCTGGCTGCACAGCAGGGCAGGAGGTGGGGAGACGCTGCTGTACTACGGCTGCCGCCCTCGGATGAGGACTACCTGTACCGGAGGAGCTGGCG	1749
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	829	-----	828
hPOR-CYC1-Comp.seq	240	GGCCTGGCTGCACAGCAGGGCAGGAGGTGGGGAGACGCTGCTGTACTACGGCTGCCGCCCTCGGATGAGGACTACCTGTACCGGAGGAGCTGGCG	339
NM_000941_CDS.seq	1750	CA6TTCACAGGGACGGTGGCTCACCCAGCTCAACGTGCCCTTCTCCCGGAGCAGTCCCACAGGCTCACGTCCAGCACCTGCTAAGCGAGACCCGAG	1849
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	829	-----	828
hPOR-CYC1-Comp.seq	340	CA6TTCACAGGGACGGTGGCTCACCCAGCTCAACGTGCCCTTCTCCCGGAGCAGTCCCACAGGCTCACGTCCAGCACCTGCTAAGCGAGACCCGAG	439
NM_000941_CDS.seq	1850	AGCACCTGTGGAGTTGATCGAAGGCGGTGCCACATCTACGCTGTGGGATGCACGGACATGGCCAGGATGTGCAGACACCTTCTACGACATCGT	1949
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	829	-----	828
hPOR-CYC1-Comp.seq	440	AGCACCTGTGGAGTTGATCGAAGGCGGTGCCACATCTACGCTGTGGGATGCACGGACATGGCCAGGATGTGCAGACACCTTCTACGACATCGT	539
NM_000941_CDS.seq	1950	GGCTGAGCTCGGGCCATGGAGCACGCGAGCGGTGGACTACATCAGAAACTGATGACCAAGGGCCGCTACTCCCTGGACGTGTGGAGCTAG-----	2043
hPOR-GAL1-PREMI1X.fasta	829	-----	828
hPOR-CYC1-Comp.seq	540	GGCTGAGCTCGGGCCATGGAGCACGCGAGCGGTGGACTACATCAGAAACTGATGACCAAGGGCCGCTACTCCCTGGACGTGTGGAGCTAGGGGGTA	639

Fig. 2. Sequencing analysis of the pYES3-hOR plasmid.

今後の課題：

本年度は、pYES3-hOR プラスミドを構築することができたため、今後は pYES3-hOR プラスミドで形質転換した OR 発現酵母株を作製する。酢酸リチウム法によって酵母を形質転換し、栄養要求性マーカー (*TRP1*) で組換え株を選択する。次いで、pYES2-pbCYP2B プラスミドを用いて同様に形質転換し、*TRP1* および *URA3* で pbCYP2B-hOR 共発現株を選択する。また、バイカルアザラシ CYP2 分子種 (bsCYP2s) クローンも得られていることから、上記と同様の方法で発現株の構築を試みる。

これらを大量培養し、マイクロソーム画分を調整した後、CO 差還元スペクトル法とウエスタンブロッティング法による CYP タンパク質の発現と活性保持の確認を行う。

最終的には、CYP 依存酵素活性 (AROD 活性)、すなわち EROD、MROD、PROD、BROD 活性をカイネティクス解析し、CYP2B 分子種の酵素活性や基質特異性を調べる。さらに、ホッキョクグマやバイカルアザラシにおける PCBs の蓄積特性および *in silico* 解析した結果を基に代謝実験に使用する PCB を選択し、PCBs 代謝実験を行い、CYP2B 分子種の PCBs 代謝への寄与、酵素活性の差、また種差を規定する要因を明らかにする予定である。

成果発表リスト：

- 1) Nguyen, H.T., Tsuchiya, M.C., Yoo, J., Iida, M., Agusa, T., **Hirano, M.**, Kim, E.Y., Miyazaki, T., Nose, M. and Iwata, H. (2016) Strain differences in the proteome of dioxin-sensitive and dioxin-resistant mice treated with 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin., Arch. Toxicol., in press.
- 2) Uchida, M.*, **Hirano, M.***, Ishibashi, H., Kobayashi, J., Kagami, Y., Koyanagi, A., Kusano, T., Koga, M. and Arizono, K. (2016) Transcriptional response of mysid crustacean, *Americamysis bahia*, is affected by subchronic exposure to nonylphenol., Ecotoxicol. Environ. Saf., **133**, 360-365. (*, Contributed equally)
- 3) Iida, M., Fujii, S., Uchida, M., Nakamura, H., Kagami, Y., Agusa, T., **Hirano, M.**, Bak, S.M., Kim, E.Y. and Iwata, H. (2016) Identification of aryl hydrocarbon receptor signaling pathways altered

in TCDD-treated red seabream embryos by transcriptome analysis., *Aquat. Toxicol.*, **177**, 156-170.

4) Hwang, J.H., Park, J.Y., Park, H.J., Bak, S.M., **Hirano, M.**, Iwata, H., Park, Y.S. and Kim, E.Y. (2016) Ecological factors drive natural selection pressure of avian aryl hydrocarbon receptor 1 genotypes., *Sci. Rep.* 27526.

5) Kim, I.S., Hwang, J.H., **Hirano, M.**, Iwata, H. and Kim, E.Y. (2016) *In vitro* and *in silico* evaluation of transactivation potencies of avian AHR1 and AHR2 by endogenous ligands: implications for the physiological role of avian AHR2, *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **187**, 1-9.