

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成30年 2月 27日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 熊本高等専門学校生物化学システム工学科

職 講師

氏名 平野 将司

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

野生動物 CYP2B 分子種の *in vitro* 発現系の構築と環境汚染物質代謝能の評価

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
平野将司	熊本高等専門学校	講師	
岩田久人	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	教授	

3 研究内容（別紙）

3 研究内容

研究課題名：

野生動物 CYP2B 分子種の *in vitro* 発現系の構築と環境汚染物質代謝能の評価

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。

申請者が希望する共同研究先では既にバイカルアザラシ・ホッキョクグマ CYP2 分子種の cDNA クローンを得ていることから、異種発現による組換えタンパク質の合成が可能である。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。作製したプラスミドで形質転換し、目的タンパク質を発現する酵母の作製を試みた。

研究成果：

平成28年度 LaMer プロジェクトにおいて hOR を酵母発現用ベクターに組み込むことで、pYES3-hOR 発現プラスミドの構築に成功していたため、大量培養によるプラスミドの精製から進めた。また、同様にホッキョクグマ CYP2B の酵母用発現プラスミド pYES2-pbCYP2B も大量培養し、精製した。その結果、pYES3-hOR は 1,134 ng/μl (純度 260/280 : 1.92)、pYES2-pbCYP2B は 2,444 ng/μl (純度 260/280 : 1.88) の濃度で精製することができた。

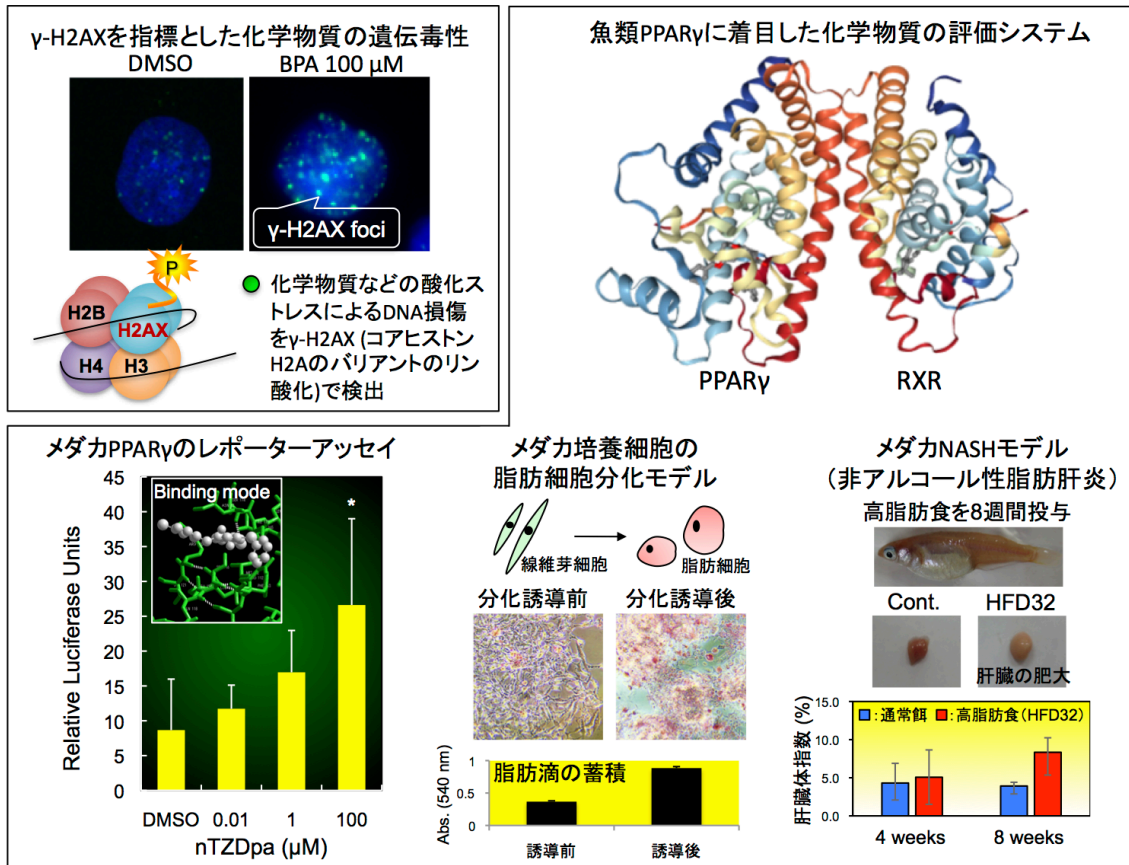
酵母発現 CYP の電子伝達効率を上げるため、先ず pYES3-hOR プラスミドで形質転換した OR 発現酵母株の作成を試みた。栄養要求性マーカーで選択するため、アミノ酸を欠損した SC-W 培地 (Trp 欠損)、SC-U/W 培地 (Ura および Trp 欠損) を作製した。酢酸リチウム法によって酵母を SC-W 培地で形質転換し、栄養要求性マーカー (*TRP1*) で組換え株を選択した。次いで、選択した酵母株に pYES2-pbCYP2B プラスミドを用いて同様に SC-U/W 培地で形質転換し、*TRP1* および *URA3* で pbCYP2B-hOR 共発現株を選択した。以上より、発現株を構築することができた。しかしながら、グルコース含有培地を用いた本培養によるタンパク質発現には至らなかった。

今後の課題：

発現株を本培養してタンパク質を発現させ、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。

その他の成果：

本研究費で購入した試薬類を活用し、化学物質の評価システムを構築する以下の成果を得ることができた。



γ-H2AXを指標とした腸管上皮細胞における化学物質のDNA損傷評価

紫外線や化学物質による物理的・化学的ストレスは、細胞内における酸化ストレスとしてDNA損傷などを引き起こす。DNA二本鎖切断 (DSBs) の誘導は、ヒストンH2AのバリエーションであるヒストンH2AXのSer139のリン酸化 (γ-H2AX) を引き起こすことが知られており、γ-H2AXを指標として腸管上皮細胞に対する化学物質の損傷を評価した。ビスフェノールA (BPA) 100 μMを24時間処理した細胞では、核内において顕著なドット状のDNA損傷部位の集積、すなわちγ-H2AX foci (フォーカス形成) が見られた。

小型魚類 (メダカ) PPARγに着目した化学物質の評価システム

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は核内受容体スーパーファミリーに属し、糖・脂質代謝に関与する種々の標的遺伝子を調節する転写因子である。PPARは3つのサブタイプ (α, β/δ, γ) が存在し、PPARγは脂肪細胞分化の促進、脂肪蓄積、インスリン感受性

増加に関与する遺伝子群の転写を制御している。これらに対する化学物質の影響を評価するため、メダカ *Oryzias latipes* を用いた評価システムの構築を行った。

分子レベルでの評価システムとして、メダカ PPAR γ リガンド結合領域を用いた two-hybrid アッセイを基盤としたレポーター遺伝子アッセイを構築し、また、細胞レベルでの評価系として、メダカ培養細胞を用いた脂肪細胞分化モデルを構築した。さらに、個体影響を調べる目的で非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルを構築した。以上のような分子 (*in silico*・*in vitro*)、細胞、個体レベルでの評価システムを用いて、化学物質と生活習慣病との関わりを調べる予定である。