

令和元年6月11日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K12354

研究課題名(和文) ヒト薬物代謝酵素を用いたマイコトキシン汚染食品の浄化技術に関する研究

研究課題名(英文) Study of purification technology of mycotoxin contaminated food using human drug metabolizing enzyme

研究代表者

今石 浩正 (Imaishi, Hiromasa)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：50223318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトの薬物代謝酵素を利用することでAFB1を解毒する手法の開発を試みた。ヒトCYP3A4は、生体内において、AFB1を高い発がん性を持つアフラトキシンB1-8,9-エポキシド(AFB0)へと変換する主酵素である。一方、AFB0は非常に不安定な反応中間体であることから、生体外では約5秒でAFB1-8,9-ジヒドロジオールへと自然分解され、すみやかに変異原性を消失することが知られている。本研究では、ヒトCYP3A4を発現した大腸菌を用い、AFB1を生体外で一過的に高毒性のAFB0へと変換させることで、AFB1による食中毒を防止することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アフラトキシンB1(AFB1)は、主にAspergillus flavus (A.flavus)により産生されるマイコトキシンの一種で、極めて高い変異原性、発がん性を持つことが知られている。これまで、放射線照射や酸処理などを用いた汚染食品中のアフラトキシン分解法が試みられてきた。しかしながら、これらの方法では食品成分に対する損傷が大きいことから、いずれも有効なAFB1の減毒法とはなっていない。そこで本研究では、ヒトの薬物代謝酵素を利用することで、常温・常圧下でAFB1を解毒する手法を開発した。これら一連の結果は、将来のカビ毒による被害を著しく低減できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Aflatoxin B1 (AFB1) is a kind of mycotoxin mainly produced by Aspergillus flavus (A. flavus), and is known to have extremely high mutagenicity and carcinogenicity. In this study, we tried to develop a method to detoxify AFB1 under normal temperature and pressure by using human drug metabolizing enzyme. Human CYP3A4 is the main enzyme that converts AFB1 into aflatoxin B1-8,9-epoxide (AFB0) with high carcinogenicity in vivo. On the other hand, since AFB0 is a very unstable reaction intermediate, it is known that AFB0 is spontaneously decomposed into AFB1-8,9-dihydrodiol in about 5 seconds in vitro and loses mutagenicity promptly. In this study, we succeeded in preventing food poisoning caused by AFB1 by transiently converting AFB1 into highly toxic AFB0 in vitro using E. coli that expresses human CYP3A4.

研究分野：生化学

キーワード：アフラトキシン P450 CYP3A4

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

アフラトキシン B1 (AFB1) は、主に *Aspergillus flavus* により産生されるカビ毒の一種で、変異原性、発がん性を持つことが知られている。また、AFB1 汚染により、全世界で約 10% の食品が廃棄されているとの報告もある。現在まで、AFB1 の分解や減毒を目指した様々な試みがされてきたが、AFB1 を分解・減毒化する有効な方法は確立されていない。そこで本研究では、薬物代謝酵素であるシトクロム P450 の一種である CYP3A4 を利用することで、AFB1 汚染食品を浄化する新たな手法の開発を試みた。

生体内において CYP3A4 は、AFB1 を主として低毒性・低変異原性の AFQ1 へと変換する。しかし、約 11% はアフラトキシン B1-8,9-エポキシド (AFBO) へと変換される。AFBO は非常に不安定な反応中間体であることから、生体内にて直ちに DNA やタンパク質と非特異的に共有結合し、変異原性や発がん性を生じさせる要因となる。一方、AFBO の半減期は約 5 秒間程度と短く、再度 CYP3A4 により毒性化されないことも確認されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト CYP3A4 を発現させた大腸菌を用い、生体外にて AFB1 を解毒する反応系の構築を目指す事とした。さらに、常温で長期保存可能な CYP3A4 発現大腸菌を作製することで、AFB1 による食中毒を防止する方法を確立することを目的とした。

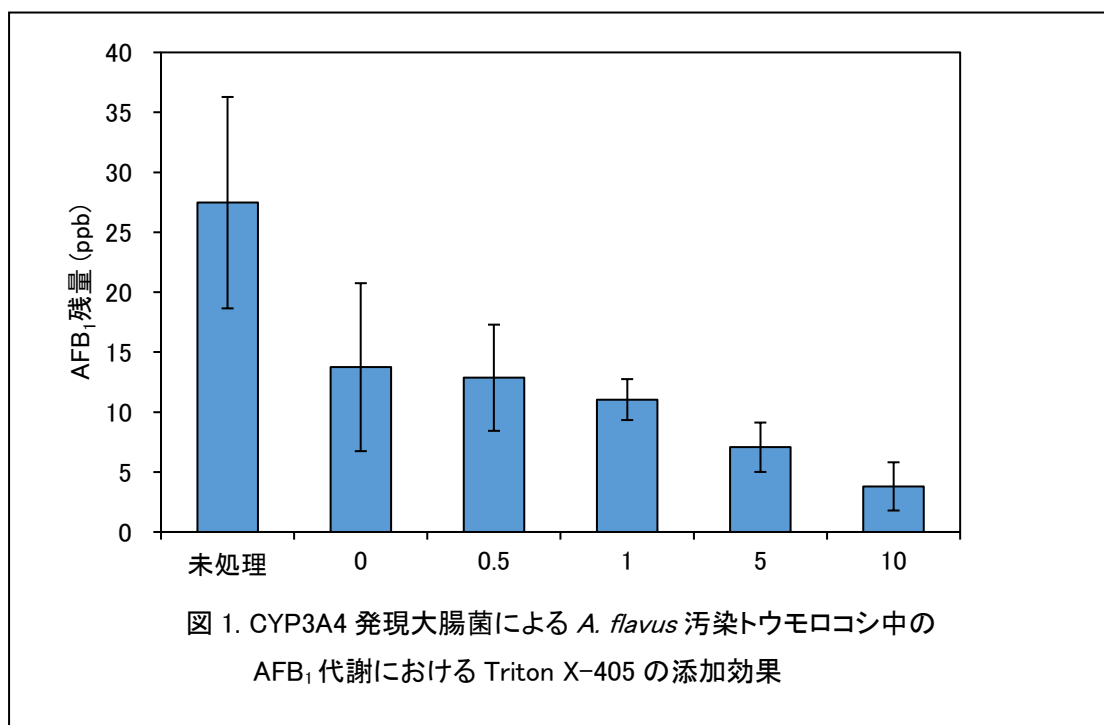
3. 研究の方法

1. トウモロコシに *A. flavus* を感染させ、AFB1 汚染トウモロコシを作製した。CYP3A4 発現大腸菌液と、界面活性剤の一種である TritonX-405 を汚染トウモロコシに添加し、25°C、24 時間振盪反応を行った。反応後のトウモロコシ、溶液、大腸菌体について AFB1 残量を測定した。

2. CYP3A4 発現大腸菌を培養し、凍結乾燥保護剤として 100 mM トレハロース、100 mM スクロース、滅菌水に懸濁した。常温で各種期間保存後、AFB1 を 25°C で 24 時間代謝させた。酢酸エチルにより抽出後、HPLC 分析により AFB1 残量を測定した。

4. 研究成果

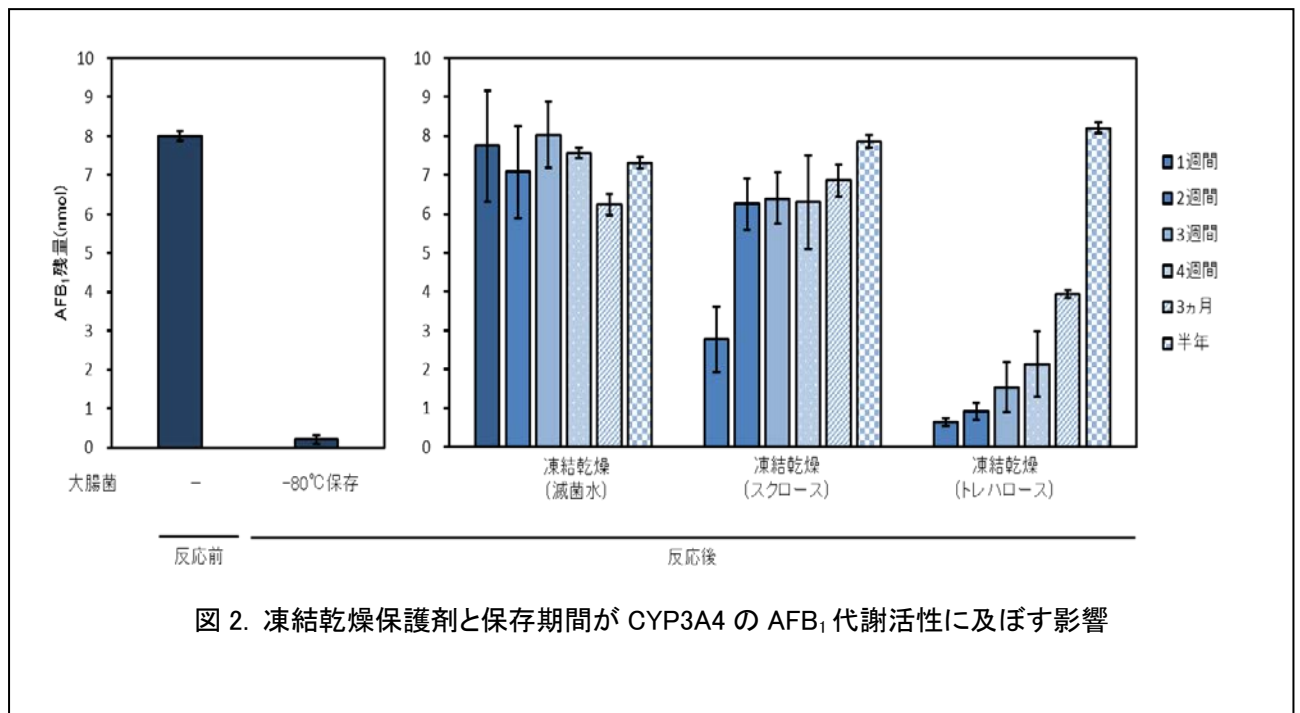
1. 汚染トウモロコシ中の AFB1 代謝実験を行ったところ、TritonX-405 の添加において AFB1 残量が有意に減少した。本結果より、TritonX-405 の添加により AFB1 の溶液中への放出が促進されたことが示唆された。代謝後の溶液中の AFB1 残量については、大腸菌添加サンプルにおいて、水添加サンプルと比較して AFB1 残量が 56%~70% 減少していた。よって、溶液中に放出された AFB1 は大腸菌体へと結合または吸収される事が示唆された (図 1)。



代謝後の大腸菌結合 AFB1 量については、CYP3A4 発現大腸菌添加サンプルにおいて、pCW を導入

した大腸菌添加サンプルと比較して AFB1 残量が約 8%減少していた。本結果より、大腸菌に結合した AFB1 の CYP3A4 による代謝が示唆された。

2. 凍結乾燥保護剤としてトレハロースを用いたサンプルが、最も長期間 CYP3A4 の AFB1 代謝活性を保持できた。これはトレハロースの添加より、大腸菌の膜構造やタンパク質が安定化されたことによると考えられる (図 2)。



A. *flavus* 汚染トウモロコシ中の AFB1 は、TritonX-405 の添加により、溶液中へと放出された。放出された一部の AFB1 は、大腸菌に結合・吸収され、CYP3A4 により解毒的に代謝された。また、トレハロースを添加して、凍結乾燥を行うことで、CYP3A4 の AFB1 代謝活性を常温で約 3 ヶ月間維持できることを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Uno T, Nakano R, Kitagawa R, Okada M, Kanamaru K, Takenaka S, Uno Y, Imaishi H. (2018,8) Metabolism of steroids by cytochrome P450 2C9 variants, *Biopharm Drug Dispos.*, 査読あり 39, 371-377
2. Tamaki S, Yagi M., Nishihata, Y., Yamaji, H., Shigeri, Y., Uno, T., Imaishi, H. (2018.3) Modification of N-terminal amino acids of fungal benzoate hydroxylase (CYP53A15) for the production of p-hydroxybenzoate and optimization of bioproduction conditions in *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotech.* 査読あり 28(3), 439-447
3. Hiromasa Imaishi, Tatsushi Goto (2018.1) Effect of genetic polymorphism of human CYP2B6 on the metabolic activation of chlorpyrifos, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 査読あり 144, 42-48
4. Uno T, Nakano R, Kanamaru K, Takenaka S, Uno Y, Imaishi H. (2017.11) Metabolism of 7-ethoxycoumarin, flavanone and steroids by cytochrome P450 2C9 variants. *Biopharm Drug Dispos.* 査読あり 38(8), 486-493
5. Uno T, Yanase T, Imaishi H (2017.5) Functional characterization of CYP52G3 from *Aspergillus oryzae* and its application for bioconversion and synthesis of hydroxyl flavanone and steroids *Biotechnol. Appl. Biochem.* 査読あり 64(3), 385-391
6. Uno, T., Ogura, C., Izumi, C., Nakamura, M., Yanase, T., Yamazaki, H., Ashida, H., Kanamaru, K., Yamagata, H., Imaishi, H. (2015.7) Point mutation of cytochrome P450 2A6 (a polymorphic allele CYP2A6.25) confers new substrate specificity towards flavonoids *Biopharm. Drug Dispos.* 査読あり 36(8), 552-563
7. Uno, T., Izumi, C., Takenaka, S., Yanase, T., Imaishi, H., Kanamaru, K.,

Yamagata, H., Kaminishi Y., Itakura, T. (2015.9)
Functional Characterization of CYP1A9 and CYP1C1 from *Anguilla japonica*
Environmen. Toxicol. Pharmacol. 査読あり 40(2),360-8

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) 山本耀介, 渡邊みのり, 今石浩正「真核生物の CYP2A6 酵素活性を制御する新規蛋白質の機能解析」第 41 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜
- 2) 渡邊みのり, 山本耀介, 今石浩正、「CYP1A1 酵素活性変化に関与する新規タンパク性因子のスクリーニングと機能解析に関する研究」第 41 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜
- 3) Yosuke Yamamoto, Hiromasa Imaishi, 「Molecular screening and functional analysis of novel genes controlling P450 activities in HepG2 cells」第 33 回薬物動態学会年会 (MDO International Symposium との合同大会) 石川県立音楽堂
- 4) 山田真理恵, 今石浩正「ヒト CYP3A4 酵素を利用したアフラトキシン B1 解毒法の開発」2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会) 神戸国際展示場
- 5) 山本 耀介, 原 茅乃, 今石浩正「真核生物の P450 活性を制御する新規遺伝子の探索と機能解析」2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会)
- 6) 玉木 峻, 今石浩正「大腸菌における安息香酸水酸化酵素の異種発現と生物生産システムへの応用」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会) 神戸国際展示場
- 7) Hiroyuki WATANABE, Koji HATSUTA, Hiromasa IMAISHI 「Reduction of aflatoxin B1 toxicity by using food compounds and CYP3A4 gene in human」 ISMYCO 2016(マイコトキシン学会) 東京大学弥生講堂
- 8) 河合佑樹, 原茅乃, 今石浩正, ポスター発表「真核生物の P450 活性を制御する新規遺伝子の探索と解析」第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜
- 9) 原茅乃, 河合佑樹, 今石浩正, ポスター発表「真核生物の P450 活性を制御する新規遺伝子の探索と利用」第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜
- 10) 河合佑樹, 原茅乃, 今石浩正(2015) 「真核生物の P450 活性を制御する新規遺伝子の探索と利用」BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場
- 11) 河合佑樹, 原茅乃, 今石浩正(2015) 「真核生物の P450 活性を制御する新規遺伝子の探索と利用」BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場
- 12) 初田浩志, 今石浩正(2015)「CYP3A4 を用いたマイコトキシン汚染食品浄化技術の開発」BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸国際会議場、神戸国際展示場
- 13) 池田直樹, 今石浩正(2015)「P450 発現のエピジェネティック制御に対する非変異原性化学物質の影響に関する研究」BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸国際展示場
- 14) 渡辺浩行, 室井康平, 今石浩正(2015)「食品成分によるマイコトキシンの毒性抑制に対するヒト遺伝子多型の影響」BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸国際展示場
- 15) 原茅乃, 河合佑樹, 今石浩正(2015)「CYP2A6 酵素活性変化に関与する新規タンパク性因子のスクリーニングと機能解析に関する研究」BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸国際展示場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/rceg-nowstone/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。