

平成23年3月3日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590121  
 研究課題名（和文）化学物質の個別化危険度評価を目指した異物代謝能の個人差発現の解明  
 研究課題名（英文）Analysis for individual difference in xenobiotic metabolism  
 研究代表者  
 埴岡 伸光（HANIOKA NOBUMITSU）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：70228518

研究成果の概要（和文）：異物代謝能の個人差に基づいた環境化学物質の安全性・毒性評価法確立を目的とした。その一環として、ヒト *CYP2E1* の遺伝子多型の環境化学物質（ベンゼン及びトルエン）の代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、*in vitro* 系において *CYP2E1.2*、*CYP2E1.3* 及び *CYP2E1.4* におけるアミノ酸置換は *CYP2E1* 酵素のトルエン及びベンゼンに対する代謝能に顕著な影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify whether the genetic polymorphism of *CYP2E1* affect the metabolism of environmental chemicals. The findings obtained may mean that the polymorphic alleles of *CYP2E1* causing amino acid substitutions are not directly associated with the metabolic activation of benzene and toluene.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：衛生薬学，薬物代謝学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：環境化学物質，異物代謝酵素，シトクロム P450（CYP），UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT），遺伝子多型，個別化危険度評価

## 1. 研究開始当初の背景

近年、「テーラーメイド（個別化）薬物療法」を目指した異物代謝酵素の遺伝子多型研究が精力的に行われており、医薬品の代謝に関与するシトクロムP450（CYP）やUDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）の変異型の同定及び

機能解明が進展しつつある。一方、農薬や工業製品の原料等に用いられている化学物質の安全性・毒性評価は実験動物を用いた安全性・毒性試験や代謝試験に基づいて行われているのが現状であり、ヒトに対するこれら化

学物質の生物学的活性の科学的根拠はない。

## 2. 研究の目的

生活環境中の化学物質により疾病が惹起される内分泌攪乱化学物質及びシックハウス症候群問題に着目し、化学物質の毒性発現における個人差を異物代謝酵素の分子レベルで解析し、各個人の体質を考慮した環境化学物質の安全性・毒性評価に資することを目的とした。本研究では、野生型及び3種類のアミノ酸置換を伴う変異型CYP2E1酵素 [CYP2E1.2 (Arg76His)、CYP2E1.3 (Val398Ile) 及びCYP2E1.4 (Val179Ile)] を酵母細胞に発現させ、トルエン及びベンゼンに対するそれら酵素の酸化代謝活性について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 野生型及び変異型CYP2E1発現プラスミドの作製

野生型CYP2E1 (CYP2E1\*1) cDNAは、ヒト肝臓total RNAを鋳型にして、PCRで増幅し、pGEM-Tベクターにクローニングした。変異型CYP2E1 (CYP2E1\*2、CYP2E1\*3及びCYP2E1\*4) cDNAは、pGEM-Tに挿入したCYP2E1\*1を鋳型にして、QuikChange Site-Directed Mutagenesis kitを用いて部位特異的変異導入法により作製した。さらに、CYP2E1 cDNAが組み込まれたプラスミドの挿入DNA断片をHindIIIで切断し、pYES2/CTベクターにサブクローニングした。

### (2) 野生型及び変異型CYP2E1酵素の発現

野生型及び変異型CYP2E1 cDNAが挿入された発現プラスミドは、pYES3/CT/fp<sub>2</sub>プラスミドが導入された酵母細胞 *S.cerevisiae* INVSc1の安定株に酢酸リチウム法にてトランスフェクションした。形質転換体の選択は、TRP1及びURA3栄養要求マーカーを用いた。CYP2E1酵素タンパク質を得るため、まず2%

グルコースを含む選択培地200 mLで酵母細胞が4.0 OD<sub>600</sub>になるまで30°Cで振盪培養した。次に、2%ガラクトースおよび1%ラフィノースを含む誘導培地 (pH 6.0) 2000 mLに、酵母細胞が0.4 OD<sub>600</sub> になるように添加し、タンパク質を誘導させた。30°Cで24時間培養後、酵母細胞のマイクロゾーム画分を調製した。CYP2E1の酵素タンパク質 (野生型: CYP2E1.1; 変異型: CYP2E1.2, CYP2E1.3, CYP2E1.4) の発現はウェスタンブロットイングおよび還元型CO差スペクトルにより確認した。

### (3) ベンゼン及びトルエンの水酸化活性の測定

酵素源は野生型及び変異型CYP2E1発現酵母細胞マイクロゾームを用いた。NADPHを除く反応溶液 (500 µL) を37°Cで1分間予備反応した後、NADPHの添加によって反応を開始した。37°Cで10分間反応した後、飽和水酸化バリウム及び15%硫酸亜鉛を50 µLずつ添加して反応を停止した。内標準物質として*p*-メチルベンジルアルコール (2 nmol) を添加した後、反応溶液を4°C、12,000gで10分間遠心分離し、その上清をpolytetrafluoroethylene (PTFE) 膜で濾過した。その50 µLをHPLCに付し、ベンゼン水酸化活性は、フェノールを、トルエンの水酸化活性はベンジルアルコールの生成量を内部標準法にて算出した。HPLC条件は下記のように設定した。Mobile phase, 25% acetonitrile; flow rate, 1.0 mL/min; column, Inertsil ODS-80A (5 µm, 4.6 mm i.d. × 150 mm), detection, UV 200 nm; column temperature, 40°C; Injection volume, 50 µL。

### (4) データ解析

トルエン及びベンゼン水酸化反応の速度論的解析はPrism v5.0を用いてMichaelis-Mentenプロットを作成し、K<sub>m</sub>及びV<sub>max</sub>値を算出した。

*In vitro*クリアランス値は $V_{\max}/K_m$ とした。いずれの値も3回の実験の平均値 $\pm$ S.D.とした。有意差検定はDunnett's *post-hoc* testを行い、有意差の有無は危険率5%を基準とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 野生型及び変異型CYP2E1酵素の発現

まず、野生型及び変異型CYP2E1酵素の酵母細胞発現マイクロゾーム画分のウェスタンブロット分析を行った。mockを除く野生型及び変異型のいずれのCYP2E1酵母細胞発現マイクロゾームにおいても抗ヒトCYP2E1抗体と交差するバンドが検出され、野生型酵素に対するCYP2E1.2、CYP2E1.3及びCYP2E1.4の野生型酵素に対する検出された相対的バンド強度はそれぞれ85、112及び123%であった。また、野生型及び変異型CYP2E1発現酵母細胞マイクロゾームの還元型CO差スペクトルによるCYP含量の測定を行った。野生型及び変異型CYP2E1のいずれにおいても450 nm付近に吸収極大を示すスペクトルが認められ、野生型CYP2E1の機能性CYP含量は61.7 pmol/mg proteinであった。変異型CYP2E1のCYP含量は、CYP2E1.3及びCYP2E1.4では野生型と同程度であったのに対し、CYP2E1.2では野生型の43%であった。

##### (2) ベンゼン水酸化反応

野生型及び変異型CYP2E1によるベンゼン水酸化反応の速度論的解析を行った。そのMichaelis-Mentenプロットから得られた速度論的パラメーターを表1に示す。野生型CYP2E1の $K_m$ 値は10.1 mMであり、CYP2E1.2、CYP2E1.3及びCYP2E1.4のそれらは野生型CYP2E1と同程度であった。野生型CYP2E1の $V_{\max}$ 値及び $CL_{int}$ 値は、それぞれ9.38 pmol/min/pmol CYP及び0.99 nL/pmol CYPであり、いずれの変異型CYP2E1も野生型CYP2E1

との間に有意な差は認められなかった。

表1 ベンゼン水酸化反応の速度論的パラメーター

	$K_m^a$	$V_{\max}^b$	$CL_{int}^c$
CYP2E1.1	10.1 $\pm$ 2.1	9.38 $\pm$ 2.15	0.99 $\pm$ 0.47
CYP2E1.2	10.2 $\pm$ 2.2	9.13 $\pm$ 2.47	0.95 $\pm$ 0.31
CYP2E1.3	13.6 $\pm$ 2.6	6.97 $\pm$ 2.80	0.56 $\pm$ 0.34
CYP2E1.4	13.6 $\pm$ 2.5	5.37 $\pm$ 1.70	0.40 $\pm$ 0.09

<sup>a</sup>mM. <sup>b</sup>pmol/min/pmol CYP. <sup>c</sup>nL/min/pmol CYP.

##### (3) トルエン水酸化反応

野生型及び変異型CYP2E1によるトルエン水酸化反応の速度論的解析を行った。そのMichaelis-Mentenプロットから得られた速度論的パラメーターを表2に示す。野生型CYP2E1の $K_m$ 値は3.93 mMであり、CYP2E1.2、CYP2E1.3及びCYP2E1.4のそれらは野生型CYP2E1と同程度であった。野生型CYP2E1の $V_{\max}$ 値及び $V_{\max}/K_m$ 値は、それぞれ19.9 pmol/min/pmol CYP及び5.26 nL/min/pmol CYPであった。変異型CYP2E1の $V_{\max}$ 値及び $V_{\max}/K_m$ 値はそれぞれ野生型CYP2E1の57-130%及び88-151%であり、いずれの変異型CYP2E1も野生型酵素との間に有意な差は認められなかった。

表2 トルエン水酸化反応の速度論的パラメーター

	$K_m^a$	$V_{\max}^b$	$CL_{int}^c$
CYP2E1.1	3.97 $\pm$ 1.02	19.9 $\pm$ 6.2	5.26 $\pm$ 2.12
CYP2E1.2	3.81 $\pm$ 1.41	25.9 $\pm$ 6.0	7.92 $\pm$ 4.42
CYP2E1.3	3.26 $\pm$ 1.39	15.3 $\pm$ 5.2	5.39 $\pm$ 2.92
CYP2E1.4	2.54 $\pm$ 0.43	11.6 $\pm$ 3.1	4.77 $\pm$ 2.06

<sup>a</sup>mM. <sup>b</sup>pmol/min/pmol CYP. <sup>c</sup>nL/min/pmol CYP.

##### (4) 考察及び結論

本研究では、CYP2E1の翻訳領域における一塩基多型による環境化学物質に対する代謝能の変化を検証するために酵母細胞に野生型及び3種類のアミノ酸置換を伴う変異型CYP2E1酵素(CYP2E1.2、CYP2E1.3及びCYP2E1.4)を発現させ、それら酵素によるトルエン及びベンゼン水酸化反応について検討した。ウェスタンブロット分析において、野生型及び変

異型CYP2E1発現酵母細胞マイクロゾームのいずれにおいても抗ヒトCYP2E1抗体と免疫交差するバンドが認められ、これら変異型CYP2E1の検出されたバンド強度は野生型酵素と同程度であった。また、CYP2E1発現酵母細胞マイクロゾームの還元型CO差スペクトルを測定し、野生型及び変異型いずれにおいても450 nm付近に吸収極大を示すことを確認した。CYP2E1.3及びCYP2E1.4の機能性CYP含量は野生型酵素と同程度であったが、CYP2E1.2では野生型酵素より低かった。COS-1細胞発現系を用いた*in vitro*研究においてもmRNA発現レベルは野生型と変異型CYP2E1では同程度であるが、CYP2E1.2のタンパク質発現レベルは野生型CYP2E1の29-37%であることが報告されている。本研究の結果はこれらの知見を支持するものであり、CYP2E1.2タンパク質の発現量低下は、低転写効率よりむしろタンパク質の立体構造の不安定さに起因しているものと考えられた。これらのことからArg76がヘム酵素タンパク質としてのCYP2E1の発現に重要な役割を担っているアミノ酸残基であることが示唆された。

3種類の変異型CYP2E1の環境化学物質に対する代謝能を検討するため、野生型及び変異型CYP2E1発現酵母細胞マイクロゾームによるベンゼン及びトルエン水酸化反応の速度論的解析を行った。ベンゼン及びトルエン水酸化反応の速度論的パラメーター値は、いずれの変異型CYP2E1においても野生型CYP2E1との間に有意な差は認められなかった。従って、CYP2E1.2、CYP2E1.3及びCYP2E1.4におけるアミノ酸置換はCYP2E1酵素の環境化学物質（トルエン及びベンゼン）に対する代謝能に顕著な影響を与えないことが明らかとなった。これらの知見は環境化学物質の毒性発現の機序及び個人差を分子レベルから解明するための重要な基礎的情報になるものと考えら

れる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件)

- ① Hanioka N, Yamamoto M, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Narimatsu S. Functional characterization of human cytochrome P450 2E1 allelic variants: *in vitro* metabolism of benzene and toluene by recombinant enzymes expressed in yeast cells. Arch Toxicol, 84, 363–371 (2010).
- ② Nonaka Y, Saito K, Hanioka N, Narimatsu S, Kataoka H. Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A, 1216, 4416–4422 (2009).
- ③ Hanioka N, Takeda Y, Tanaka-Kagawa T, Hayashi K, Jinno H, Narimatsu S. Interaction of bisphenol A with human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 enzyme. Environ Toxicol, 23, 407–412 (2008).

[学会発表] (計39件)

- ① 高原佑輔, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 神野透人, 成松鎮雄: フタル酸ジエステル類のヒト肝マイクロゾームにおける加水分解反応. フォーラム2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 東京, 2010年9月9日.
- ② 中西涼子, 埴岡伸光, 齋藤啓太, 片岡洋行, 成松鎮雄: 有機フッ素化合物PFOSの毒性発現と代謝の関連性. 日本薬物動態学会第24回年会, 京都, 2009年11月28日.
- ③ 埴岡伸光, 山本真紀, 成松鎮雄: ベンゼン及びトルエン代謝に及ぼすヒトCYP2E1の遺伝子多型の影響. フォーラム2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 熊本, 2008年10月18日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

埴岡 伸光 (HANIOKA NOBUMITSU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 70228518

### (2) 研究分担者

成松 鎮雄 (NARIMATSU SHIZUO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 20113037