

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年8月27日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710042

研究課題名（和文）加水分解酵素による殺虫剤の解毒代謝を解明してヒトと実験動物との種差を検証する

研究課題名（英文）Elucidation of insecticide detoxification by hydrolases and evaluation of species difference between humans and experimental animals

研究代表者

西 甲介（NISHI KOSUKE）

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号：80578097

研究成果の概要（和文）：ヒトの肝臓で発現する種々の加水分解酵素の遺伝子組換えタンパク質を、バキュロウイルス-昆虫培養細胞発現系を用いて作製し、ライブラリー化した。ピレスロイド系殺虫剤および蛍光色素を含むピレスロイド系殺虫剤誘導体を用いてスクリーニングした結果、新規のピレスロイド系殺虫剤加水分解酵素を発見した。当該酵素について生化学的解析を行った。

研究成果の概要（英文）：A library of recombinant hydrolases expressed in human liver was generated using the baculovirus expression system. When the library was screened with pyrethroids and their derivatives containing a fluorochrome, novel enzymes that hydrolyze the insecticides were discovered. Biochemical characteristics of the enzymes was analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学／環境影響評価・環境政策

キーワード：健康影響評価、エステラーゼ、殺虫剤、ピレスロイド

1. 研究開始当初の背景

殺虫剤は農産物生産の向上や労働力の低減のため、世界中で幅広く使用されている。また、家庭においても衛生害虫の駆除等に用いられている。このように、ヒトは日常生活で様々な殺虫剤に暴露されやすい状況にある。

構造中にエステル結合やアミド結合を含む殺虫剤は体内の加水分解酵素によって加水分解され、ほとんどの場合毒性が著しく低減する。この加水分解酵素はコードされる遺伝子数や発現パターン、生体内における局在性が実験動物とヒトとの間で異なる部分が多く、種差が大きいことが知られている。そのため、殺虫剤の加水分解的代謝様式が実験動物とヒトで大きく異なる可能性が考えら

れる。従って、殺虫剤のヒトでの安全性をより正確に評価するためには、ヒトの代謝酵素に由来するデータが重要である。

2. 研究の目的

エステル結合やアミド結合を構造中に含む殺虫剤は体内で加水分解されて解毒される場合が多い。しかし、殺虫剤の毒性評価に用いる実験動物とヒトでは加水分解酵素の種数や組織分布が大きく異なっており、各々の酵素に関しても代謝活性や構造選択性が異なる可能性がある。そこで、ヒトでの安全性をより正確に評価するために、遺伝子組換えヒト加水分解酵素を用いて殺虫剤の加水分解的解毒に関わっている酵素を同定し、酵素機能を評価してヒトと実験動物における

種差を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトの肝臓で発現しているエステラーゼおよびアミダーゼ遺伝子を単離し、バキュロウイルス発現系を用いて遺伝子組換え酵素を調製した。各酵素をピレスロイド系殺虫剤やその誘導体を反応させて、殺虫剤の加水分解的代謝酵素を同定した。同定した酵素については金属アフィニティークロマトグラフィー、等電点フォーカシング、陰イオン交換クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿等を用いて精製し、酵素機能を詳細に調査した。

4. 研究成果

ヒトの肝臓においてピレスロイド系殺虫剤を代謝する加水分解酵素として、カルボキシルエステラーゼがこれまで主に知られている。このカルボキシルエステラーゼは膜結合型タンパク質であるが、本研究の結果、ヒトの肝臓には膜結合型タンパク質だけでなく、サイトゾル（可溶性）タンパク質の中にもピレスロイド系殺虫剤を加水分解する酵素が存在することを発見した。

当該酵素に対して、シペルメトリンを含む種々のピレスロイド系殺虫剤と、蛍光色素を含むシペルメトリン誘導体（図1）を用いて当該酵素の機能解析を行った。結果、当該酵素は供試した数種のピレスロイド系殺虫剤を加水分解することが判明した。また、蛍光色素を含むシペルメトリン誘導体は3つの不斉炭素原子を持ち、8種の立体構造異性体が存在する。それらを用いて当該酵素の立体選択性を評価した。その結果、当該酵素の基質に対する立体選択性は最大で100倍以上であった（図2）。図2の④と⑧はともに1*S-trans*体であり、この立体配置を持つ基質を特に効率よく加水分解することが判明した。一方、 α 炭素の立体配置は酵素活性にあまり影響を及ぼさないことが判明した。

現在、当該酵素のより詳細な酵素機能解析を行っている。

また、可溶性タンパク質であるブチリルコ

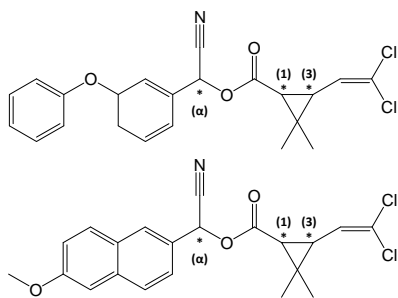


図1. シペルメトリン（上）とその誘導体（下）
アスタリスクは不斉炭素原子を示す

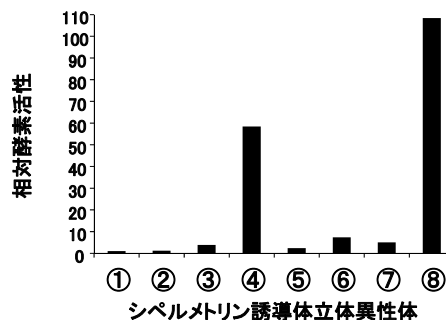


図2. シペルメトリン誘導体の各種立体異性体に対する相対酵素活性（①に対する活性を1とする）

リンエステラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼにはピレスロイド系殺虫剤の加水分解能を持たないことを確認した。このことは既に報告されており、それらの結果を追認することができた。

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20件）

- ① Kumalasari ID, Nishi K, Harmayani E, Raharjo S, Sugahara T. Immunomodulatory activity of Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) fiber extract in vitro and in vivo. *Cytotechnology* in press 査読有.
- ② Nakata Y, Nishi K, Nishimoto S, Sugahara T. Phenylhydroquinone induces loss of thymocytes through cell cycle arrest and apoptosis elevation in p53-dependent pathway. *J Toxicol Sci* 38, 325-335 (2013) 査読有.
- ③ Kumalasari ID, Nishi K, Harmayani E, Raharjo S, Sugahara T. Effect of bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) fiber extract on murine macrophage-like J774.1 cells and mouse peritoneal macrophages. *J Funct Foods* 5, 582-589 (2013) 査読有.
- ④ Ishida M, Nishi K, Watanabe H, Sugahara T. Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells. *Food Chem* 136, 322-327 (2013) 査読有.
- ⑤ Park S-Y, Lee H-J, Song J-M, Sun J, Hwang H-J, Nishi K, Kim J-S. Structural characterization of a modification subunit of a putative type I restriction enzyme from *Vibrio vulnificus* YJ016. *Acta Crystallogr Sect D* 68, 1570-1577 (2012) 査読有.
- ⑥ Daifuku M, Nishi K, Okamoto T, Nishimoto S, Sugahara T. Immunomodulatory effects of lactate dehydrogenase in vitro and in

- vivo. *J Funct Foods* 4, 972-978 (2012) 査読有.
- ⑦ Nishimoto S, Muranaka A, **Nishi K**, Kadota A, Sugahara T. Immunomodulatory effects of citrus fruit auraptene in vitro and in vivo. *J Funct Foods* 4, 883-890 (2012) 査読有.
- ⑧ Kim I-H, **Nishi K**, Kasagami T, Morisseau C, Liu J-Y, Tsai H-J, Hammock BD. Biologically active ester derivatives as potent inhibitors of the soluble epoxide hydrolase. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 5889-5892 (2012) 査読有.
- ⑨ Kanda K, **Nishi K**, Kadota A, Nishimoto S, Liu M-C, Sugahara T. Nobiletin suppresses adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by an insulin and IBMX mixture induction. *Biochim Biophys Acta* 1820, 461-468 (2012) 査読有.
- ⑩ **Nishi K**, Muranaka A, Nishimoto S, Kadota A, Sugahara T. Immunostimulatory effect of β -cryptoxanthin in vitro and in vivo. *J Funct Foods* 4, 618-625 (2012) 査読有.
- ⑪ Putra ABN, Morishige H, Nishimoto S, **Nishi K**, Shiraishi R, Doi M, Sugahara T. Effect of collagens from jellyfish and bovine Achilles tendon on the activity of J774.1 and mouse peritoneal macrophage cells. *J Funct Foods* 4, 504-512 (2012) 査読有.
- ⑫ **Nishi K**, Kim I-H, Itai T, Sugahara T, Takeyama H, Ohkawa H. Immunochromatographic assay of cadmium levels in oysters. *Talanta* 97, 262-266 (2012).
- ⑬ Kumalasari ID, Harmayani E, Lestari LA, Raharjo S, Asmara W, **Nishi K**, Sugahara T. Evaluation of immunostimulatory effect of the arrowroot (*Maranta arundinacea*. L) in vitro and in vivo. *Cytotechnology* 64, 131-137 (2012) 査読有.
- ⑭ Inui H, Takeuchi T, Uesugi A, Doi F, Takai M, **Nishi K**, Miyake S, Ohkawa H. Enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and single-chain variable fragment antibodies selective to coplanar polychlorinated biphenyls. *J Agric Food Chem* 60, 1605-1612 (2012) 査読有.
- ⑮ Tominaga S, **Nishi K**, Nishimoto S, Akiyama K, Yamauchi S, Sugahara T. (-)-Secoisolariciresinol attenuates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Food Funct* 3, 76-82 (2012) 査読有.
- ⑯ Daifuku M, **Nishi K**, Okamoto T, Nakano H, Nishimoto S, Sugahara T. Immunostimulatory effects of water extract from bulbous arteriosus in tuna in vitro. *J Funct Foods* 4, 263-270 (2012) 査読有.
- ⑰ Yamawaki M, **Nishi K**, Nishimoto S, Yamauchi S, Akiyama K, Kishida T, Maruyama M, Nishiwaki H, Sugahara T. Immunomodulatory effect of (-)-matairesinol in vivo and ex vivo. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 859-863 (2011) 査読有.
- ⑱ Daifuku M, Yaguchi Y, **Nishi K**, Okamoto T, Nakano H, Nishimoto S, Nishikawa S, Yamashita H, Takimoto S, Sugahara T. Immunostimulation effects of yellowtail heart extracts in vitro and in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 638-645 (2011) 査読有.
- ⑲ Kim I-H, Park Y-K, Hammock BD, **Nishi K**. Structure-activity relationships of cycloalkylamide derivatives as inhibitors of the soluble epoxide hydrolase. *J Med Chem* 54, 1752-1761 (2011) 査読有.
- ⑳ **Nishi K**, Kondo A, Okamoto T, Nakano H, Daifuku M, Nishimoto S, Ochi K, Takaoka T, Sugahara T. Immunostimulatory in vitro and in vivo effects of a water-soluble extract from kale. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 40-46 (2011) 査読有.
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Wukirasari T, Nishiwaki H, **Nishi K**, Sugahara T, Akiyama K, Kishida T, Yamauchi S. Cytotoxic activity of stereoisomers of 1,7-seco-2,7'-cyclolignane, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 24-27 日, 仙台
- ② Putra ABN, Morishige H, Nishimoto S, **Nishi K**, Shiraishi R, Doi M, Sugahara T. Studies on the immunostimulatory effects of jellyfish collagen on macrophage, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2012), November 27-30, 2012, Nagoya
- ③ Ishida M, **Nishi K**, Watanabe H, Sugahara T. Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2012), November 27-30, 2012,

- Nagoya
- ④ Kumalasari ID, Nishi K, Harmayani E, Raharjo S, Sugahara T. Immunostimulatory activity of bengkoang (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) fiber extracts on lymphocytes and macrophages, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), November 27-30, 2012, Nagoya
 - ⑤ Sugahara T, Nakata Y, Nishi K, Nishimoto S. Studies on immunotoxicity of o-phenylphenol (OPP) and metabolite, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), November 27-30, 2012, Nagoya
 - ⑥ 安永翔, 西本壮吾, 西甲介, 菅原卓也. メトキシクロロのアレルギー惹起に関する研究, 日本農芸化学会中四国支部第 33 回講演会, 2012 年 6 月 2 日, 松山
 - ⑦ 大福美帆, 西甲介, 岡本威明, 菅原卓也. 乳酸脱水素酵素のマクロファーグ活性化機構に関する研究, 日本農芸化学会中四国支部第 33 回講演会, 2012 年 6 月 2 日, 松山
 - ⑧ 大田美和, 西甲介, 門田歩, 菅原卓也. ノビレチンの脂肪細胞分化抑制効果と脂質代謝に与える影響, 日本農芸化学会中四国支部第 33 回講演会, 2012 年 6 月 2 日, 松山
 - ⑨ 石田萌子, 西甲介, 渡辺久, 菅原卓也. ホウレンソウ抽出物の脱顆粒抑制効果に関する研究, 日本農芸化学会中四国支部第 33 回講演会, 2012 年 6 月 2 日, 松山
 - ⑩ 西甲介, 金仁恵, 板井啓明, 菅原卓也, 竹山春子, 大川秀郎. イムノクロマト法による牡蠣中カドミウムの測定, 日本農芸化学会中四国支部第 33 回講演会, 2012 年 6 月 2 日, 松山
 - ⑪ Sugahara T, Tominaga S, Yamauchi S, Nishimoto S, Nishi K. Effect of flaxseed lignan on lipid accumulation in adipocytes, International Conference on Food Factors (ICoFF) 2011, Nov. 20-23, 2011, Taipei, Taiwan
 - ⑫ Kumalasari ID, Nishi K, Harmayani E, Lestari LA, Raharjo S, Asmara W, Sugahara T. Immunoglobulin production-stimulating activity of the starch extracts from Indonesian arrowroot (*Marantha arundinacea*. L), International Conference on Food Factors (ICoFF) 2011, Nov. 20-23, 2011, Taipei, Taiwan
 - ⑬ Daifuku M, Nishi K, Okamoto T, Nakano H,

- Nishimoto S, Nishikawa S, Yamashita H, Takimoto S, Sugahara T. Immunostimulating effect of yellowtail heart extracts, International Conference on Food Factors (ICoFF) 2011, Nov. 20-23, 2011, Taipei, Taiwan
- ⑭ 富山千聖, 西脇寿, 西甲介, 菅原卓也, 山内聡. ブタノール型セコシクロリグナンの合成と培養細胞に対する活性, 2011 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 2011 年 9 月 16-17 日, 宮崎
 - ⑮ 大西紗与, 村中理子, 西甲介, 門田歩, 菅原卓也. 温州ミカン果皮抽出物の免疫促進活性に関する研究, 2011 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 2011 年 9 月 16-17 日, 宮崎
 - ⑯ 大福美帆, 西甲介, 菅原卓也, 岡本威明, 中野裕之, 西本壮吾, 西川智, 山下浩史, 滝本真一. ハマチ心臓中に含まれる免疫促進物質に関する研究, 2011 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 2011 年 9 月 16-17 日, 宮崎
 - ⑰ 大福美帆, 西甲介, 岡本威明, 中野博之, 西本壮吾, 菅原卓也. マグロ動脈球抽出物の免疫促進活性に関する研究, 2011 年度生物機能研究会, 2011 年 7 月 2 日, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 甲 介 (NISHI KOSUKE)

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号：80578097