

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659064  
 研究課題名（和文）固定化ポーチュラカ PPO による実用的フェノール系内分泌攪乱物質処理システムの開発  
 研究課題名（英文）Development of detoxification system of phenolic endocrine disrupters using immobilized *Portulaca* PPO  
 研究代表者  
 平田 収正 (HIRATA KAZUMASA)  
 大阪大学・薬学研究科・教授  
 研究者番号：30199062

研究成果の概要（和文）：本研究では優れたフェノール系内分泌攪乱物質の酸化活性を持つポーチュラカポリフェノールオキシダーゼ(PoPPO)を用いた排出源処理に応用できる新規システム構築をめざし、PoPPO 遺伝子の同定、PoPPO 固定化方法の検討を行った。PoPPO 遺伝子の同定に関しては、ポーチュラカ根より 5 種類の遺伝子クローンを獲得し、これらの遺伝子を導入したタバコ培養細胞 BY-2 により当該遺伝子が内分泌攪乱物質代謝活性を有することを確認した。さらに未修飾ガラスビーズを出発材料としたポーチュラカ根粗酵素固定化材料の調製に成功し、pH、熱に対する安定性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To develop a novel detoxification system of phenolic endocrine disrupters in wastewater by using *Portulaca's* polyphenol oxidase (PoPPO), we i) identified PoPPO genes and ii) studied protocols to prepare PoPPO-immobilized materials. i) We obtained 5 PPO homologues from *Portulaca's* root. Tobacco cultured cells transformed with PoPPOs showed metabolic activities of endocrine disrupters. ii) We succeeded to prepare glass beads immobilized with enzymes from *Portulaca's* root, and showed its high stabilities against wide range of pH and temperature.

## 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	3,000,000	900000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：内分泌かく乱物質、生体機能利用、環境、水質汚濁・土壌汚染防止・浄化、酵素

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフェノール A (BPA) などのフェノール系内分泌攪乱物質は、河川や湖沼などで高頻度に検出されている。しかし、環境基準が未制定なことや既存の物理化学的処理は高コストを要することから積極的な除去が行われていない場合が多い。しかし、生物濃縮による生態系への悪影響、ひいてはヒトに対する健康被害が予想され、排出源における高効率かつ低コストで除去可能な技術の確立が望まれる。申請者は多くの植物を対象にした

探索から、優れたフェノール系内分泌攪乱物質代謝能を持つ数種の植物を発見した。特にスベリヒユ科ポーチュラカの根には、ヒトへの被害が懸念される BPA や 17β-エストラジオール (E2) を速やかに酸化し、内分泌かく乱活性を消失させる酵素が存在した。種々の解析から本酵素はポリフェノールオキシダーゼ (PPO) であり、さらに既知の PPO やチロシナーゼとは異なりモノフェノールからオルトジフェノール、さらにオルトキノンに至る反応を酸素のみの存在下で触媒する可能性が

示唆されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は優れたフェノール系内分泌攪乱物質の酸化活性を持つポーチュラカ PPO (PoPPO) を用いた排出源処理に応用できる新規システムの構築を最終目標として以下の基礎研究および基盤技術の開発を行う事を目的とした。

- (1) PoPPO 遺伝子の同定
- (2) 組換え技術を用いた PoPPO の大量調製系の確立
- (3) 効率的なフェノール系内分泌攪乱物質処理が可能な PoPPO 固定化技術の確立
- (4) 実用化に向けた固定化 PoPPO のフェノール系内分泌攪乱物質処理能力の評価

## 3. 研究の方法

### (1) PoPPO 遺伝子の同定

これまで数種の高等植物で同定されている PPO 遺伝子の保存領域から作成した遺伝子特異的プライマーを用いて、ポーチュラカの根から調製した RNA を鋳型とした 3' RACE を行い、続いて、5' RACE を行うことにより全長 PPO をコードする遺伝子の cDNA を取得する。また、モデル植物であるタバコ培養細胞 BY-2 に当該遺伝子を導入、形質転換を行い、得られた細胞の内分泌攪乱物質代謝活性を評価する。

### (2) 組換え技術を用いた PoPPO の大量調製法の確立

クローニングした遺伝子を大腸菌を宿主とする数種の既存の大量発現系を用いて、発現タンパク質量とその PPO としての活性を指標に、本酵素の大量発現に最適な方法を探索した。

### (3) 効率的なフェノール系内分泌攪乱物質処理が可能な PoPPO 固定化技術の確立

酵素の固定化方法としては、担体結合法、架橋法、包括法、複合法があるが、ユニット化して大量処理に応用するためには、担体結合法が最も適していると考えられるので、現在開発されている様々な材料について、単位容積あるいは単位面積当たりの活性と、様々な環境条件での安定性を指標に、最適な固定化条件を決定する。

酵素と担体の結合としては共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法、生化学的得意結合法があるが、物理化学的因子が絶えず変化する実環境での応用を目指す場合、酵素が担体に比較的強固に結合し、酵素の安定性も高まることが知られている共有結合法を中心に検討を行った。本法の場合、固定化操作の際に酵素が失活する可能性も高いので、実施にあたりこれを十分配慮した。

## (4) 実用化に向けた固定化 PoPPO のフェノール系内分泌攪乱物質処理能力の評価

得られた固定化材料について BPA をモデル対象物質として、処理時の経時変化や代謝物の解析を行った。また、活性と安定性に対する、実環境で使用した際に曝される温度変化や pH 変化、光照射といった物理的因子の影響を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) PoPPO 遺伝子の同定

PPO は他の微生物、植物から多数クローニングされており、それらの保存配列をもとにポーチュラカ由来の当該遺伝子候補配列をクローニングした。その結果、5 種類の相同遺伝子配列を獲得した (Fig. 1)。

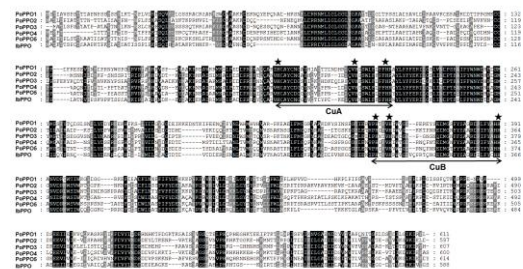


Fig. 1 獲得した PoPPO 遺伝子のアミノ酸配列とそのアライメント解析結果

(Kaneda et. al. (2012) Plant Biotechnology より転載)

続いて獲得した遺伝子をモデル植物であるタバコ培養細胞 BY-2 に導入した結果、PoPPO2, 4, 5 を導入した形質転換細胞の作出に成功した (Fig. 2)。調製した粗酵素抽出液に BPA を添加したところ、代謝活性が確認され (Fig. 3)、BPA の代謝産物も確認された。さらに E2、ノニルフェノール、オクチルフェノールなどの他のフェノール系内分泌攪乱物質の代謝活性も確認された (Fig. 4)。以上より PoPPO が内分泌攪乱物質代謝活性を有することが示された。

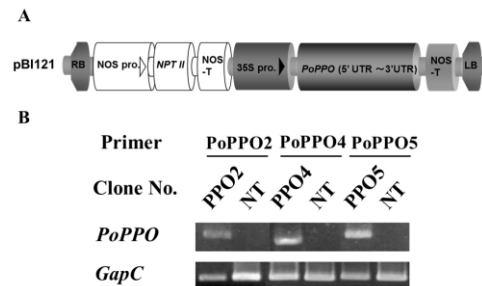


Fig. 2 BY-2 細胞形質転換に用いた PoPPO 遺伝子ベクターコンストラクトおよび獲得した形質転換細胞の逆転写 PCR の結果

(Kaneda et. al. (2012) Plant Biotechnology より転載)

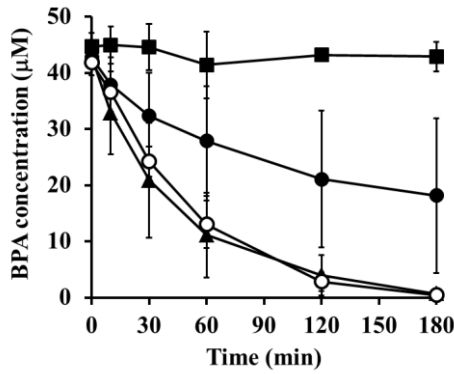


Fig. 3 PoPP02 (▲), 4 (●), 5 (○) 導入 BY-2 粗酵素抽出液の BPA 代謝活性. ■ は空ベクター導入細胞 (Kaneda et. al. (2012) Plant Biotechnology より転載)

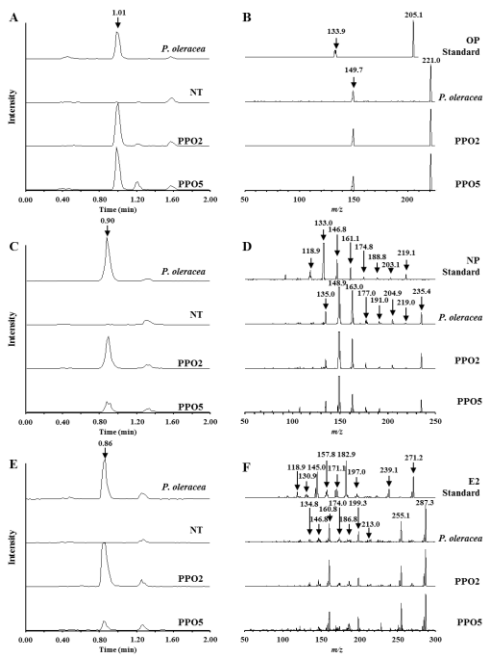


Fig. 4 PoPP02, 5 導入 BY-2 細胞粗酵素抽出物により処理したオクチルフェノール (A, B), ノニルフェノール (C, D), E2 (E, F) の LC/PDA/MS/MS 解析結果 (Kaneda et. al. (2012) Plant Biotechnology より転載)

## (2) 組換え技術を用いた PoPP0 の大量調製法の確立

タバコ培養細胞 BY-2 に形質転換した際に特に顕著な PPO 活性を示した PoPP02 について大腸菌を用いた組換え酵素の大量発現系の確立を目指した。様々な発現ベクター、大腸菌株を試したものの、活性を有する組換え酵素を獲得することは現在のところできていない。

## (3) 効率的なフェノール系内分泌攪乱物質処理が可能な PoPP0 固定化技術の確立

共有結合型固定化酵素の作出の為、市販さ

れているアミノプロピル基が導入されたガラスビーズを用い、これにグルタルアルデヒドを架橋剤として処理した後、ポーチュラカ根粗酵素液を固定化したところ、PPO の活性を維持したまま固定化することに成功した。この固定化ビーズは BPA 代謝活性も維持できていることを確認した (Fig. 5)

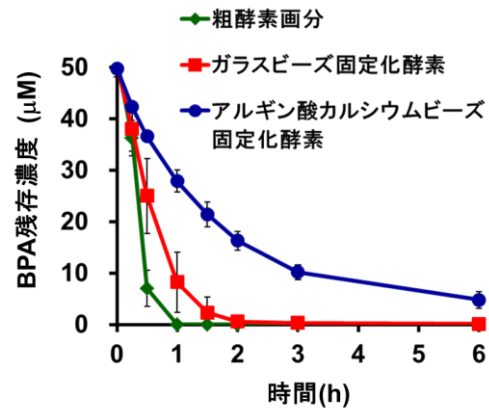


Fig. 5 アミノプロピル基修飾されたガラスビーズにポーチュラカ根粗酵素を固定化し、50 μM BPA 溶液を処理した際の BPA 濃度の経時変化. 比較対象として固定化前の粗酵素および包括法であるアルギン酸ビーズを用いた結果も示す。

続いて、PoPP0 固定化ガラスビーズ大量調製法の確立を志向し、未修飾のガラスビーズを出発材料とした調製法の検討を行った。ガラスビーズ表面をアルカリで活性化後、トルエン中でのシランカップリング剤処理、グルタルアルデヒドによる架橋導入、ポーチュラカ粗酵素の固定の順で反応を行い、固定化ビーズを調製した。当該手法により調製したビーズにおいても BPA 代謝活性が検出された (Fig. 6)。

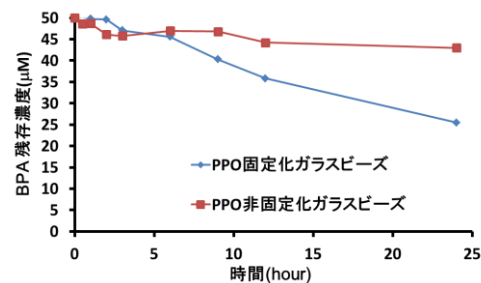


Fig. 6 未修飾ガラスビーズにシランカップリング剤処理、グルタルアルデヒド架橋処理を行った後、ポーチュラカ根粗酵素を固定化し、50 μM BPA 溶液を処理した際の BPA 濃度の経時変化。

## (4) 実用化に向けた固定化 PoPP0 のフェノール系内分泌攪乱物質処理能力の評価

得られたポーチュラカ粗酵素固定化ガラスビーズについて、50 μM BPA 溶液を 24 時間

処理するサイクルを繰り返し行ったところ、7回まで80%以上のBPAを代謝することが可能であった (Fig. 7)。これは粗酵素を用いた処理システムでは不可能な特定である。

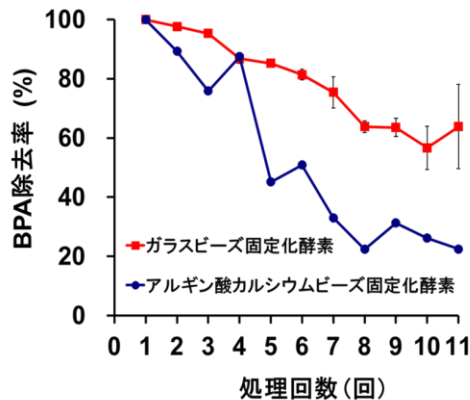


Fig. 7 ポーチュラカ根粗酵素固定化ガラスビーズの繰り返し利用性 50  $\mu$ M BPA 溶液を24時間処理し、ビーズを回収、洗浄、新しい50  $\mu$ M BPA 溶液に浸潤させ処理する、という操作を繰り返した際のBPA除去率を示す。

さらに、固定化ビーズが有するBPA代謝生成のpH、熱に対する安定性を評価したところ、pH 5-9、15-35 $^{\circ}$ Cの範囲であれば80%以上の活性が維持されることが判明した。

以上の結果から、当該酵素固定化ビーズは保存安定性に優れ、処理溶液から回収、繰り返し処理が可能であるなど、実用性に優れた性質を有していることが明らかになった。

現段階ではポーチュラカの粗酵素をそのまま固定化に用いているが、PoPPOのみを大量に調製し、固定化することが可能となれば、現状に比べ極めて高い活性を有するビーズを調製することが可能になると期待される。

## 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3件)

① Kaneda H, Matsui T, Tomiyasu R, Kuroda Y, Higashimoto Y, Oda T, Miyasaka H, Okuhata H, Tanaka S, Harada K, Matsuura H, Nakayama H, Kato K, Hirata K. : Isolation of polyphenol oxidase genes from *Portulaca oleracea* and evaluation of their ability to metabolize endocrine-disrupting chemicals. *Plant Biotechnol.*, 査読あり, 29, (2012), 351-357.

② Watanabe, I., Harada, K., Matsui, T.,

Miyasaka, H., Okuhata, H., Tanaka, S., Nakayama, H., Kato, K., Bamba, T., Hirata, K. : Characterization of bisphenol A metabolites produced by *Portulaca oleracea* cv. using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読あり, 76, (2012), 1015-1017.

③ Matsui, T., Nomura, Y., Takano, M., Imai, S., Nakayama, H., Miyasaka, H., Okuhara, H., Tanaka, S., Matsuura, H., Harada, K., Bamba, T., Hirata, K., Kato, K. : Molecular cloning and partial characterization of a peroxidase gene expressed in the roots of *Portulaca oleracea* cv., One potentially useful in the remediation of phenolic pollutants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読あり, 75, (2011), 882-890

[学会発表] (計2件)

① 金田洋和, 松井健史, 黒田友佳子, 東本祐佳, 奥畑博史, 田中聡, 松浦秀幸, 原田和生, 宮坂均, 加藤晃, 平田收正. 園芸植物 *Portulaca oleracea* による内分泌攪乱物質代謝機構の解明, 第14回環境ホルモン学会, (2011), 東京大学山上会館.

② 金田洋和, 松井健史, 黒田友佳子, 東本祐佳, 奥畑博史, 田中聡, 松浦秀幸, 原田和生, 宮坂均, 加藤晃, 平田收正. 園芸植物 *Portulaca oleracea* 由来ポリフェノールオキシダーゼの内分泌攪乱物質代謝能の解析, 第29回日本植物細胞分子生物学会, (2011), 九州大学箱崎キャンパス.

[図書] (計1件)

① 松浦秀幸, 原田和生, 宮坂均, 平田收正. シーエムシー出版. 環境浄化:植物による環境ホルモン分解と排水処理への応用 (植物機能のポテンシャルを生かした環境保全・浄化技術-地球を救う超環境適合・自然調和型システム-), (2011), 31-37.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 收正 (HIRATA KAZUMASA)

研究者番号 : 30199062