

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550064

研究課題名(和文)ポリ塩化ビフェニルの代謝効率向上を目指したP450酵素変異体の創製と局在性改変

研究課題名(英文)Creation of novel P450 enzymes with high metabolizing activities toward polychlorinated biphenyls and modification of its intracellular localization

研究代表者

乾 秀之(Inui, Hideyuki)

神戸大学・遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：90314509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ポリ塩化ビフェニル(PCB)は、脂溶性・難分解性が高いため、生物濃縮され、発がんなどの毒性を発現する。PCBの環境浄化を目指して、これらを代謝する薬物代謝酵素P450モノオキシゲナーゼの同定、代謝効率の高い酵素の創製、細胞内局在性の改変を試みた。PCBの一種CB118はヒトCYP2B6により水酸化代謝物に代謝され、これにはCB118とP450の活性中心の距離が重要であった。P450変異体はPCBの毒性低下に貢献し、P450を細胞膜に局在させることに成功した。以上の結果から、代謝活性の高いP450を、脂溶性の高いPCBなどの汚染物質が局在する細胞膜で効率よく代謝させるための基盤技術が確立できた。

研究成果の概要(英文)：Polychlorinated biphenyls (PCBs) show toxicity such as carcinogenicity through bioaccumulation because of its high lipophilicity and persistency. Identification of P450 monooxygenases metabolizing PCBs, creation of novel P450s with high metabolizing activities, and modification of intracellular localization of P450s were attempted to achieve remediation of PCBs in the environment. One of PCB congeners, CB118 was metabolized by human CYP2B6 to hydroxylated metabolites due to proximity of the active center of P450s and CB118. Furthermore, P450 mutants contributed decrease of PCB toxicity, and P450s were localized in a plasma membrane. These results showed that we established basic technologies on high metabolism of PCBs by creation of P450s with high metabolizing activities and localization of P450s.

研究分野：環境学

キーワード：ポリ塩化ビフェニル P450 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質 (Persistent organic pollutants, POPs) は脂溶性・難分解性であり、水系の底質や土壌に蓄積し、食物連鎖を介してヒトを含む最上位の生物種に高濃度に生物濃縮され、発がんなどの毒性を発現する。現在、これに分類されるダイオキシン類や有機塩素系殺虫剤について、製造や使用の規制、汚染実態の把握や効率的な汚染除去方法の開発が世界的に行われているものの、日本ではダイオキシン類、特に、コプラナーPCB (Co-PCBs) や過去に使用した殺虫剤ディルドリンによる作物残留が社会問題化している。また、東日本大震災による津波により被害を受けた産業施設において、保管していた PCB 使用機器の紛失が環境省により報告されており、三陸沿岸から採取された二枚貝には震災前より高濃度の PCB が蓄積していることが報告されている。従って、PCB による環境汚染の浄化に係わる技術開発は、食の安全の確保や被災地の復興を助けるうえで極めて重要な課題である。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに Co-PCBs の中でも最もダイオキシン毒性の高い CB126 (3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) や CB77 (3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl) を代謝可能な哺乳類由来の薬物代謝酵素 P450 モノオキシゲナーゼを同定した。これら酵素は CB126 や CB77 を体外に排泄しやすい水酸化代謝物に代謝することから、その毒性を軽減すると考えられる。しかしながら、環境を汚染する PCB の浄化に利用するためにはこれら P450 の代謝活性は低く、その活性を向上させる必要がある。本研究では、次に挙げる 3 点について達成することを目標とした。(1) Co-PCBs のうち、毒性が高く環境を最も高濃度に汚染している CB118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) について、これを代謝可能な哺乳類由来の P450 分子種を同定し、その代謝物の構造を決定する。(2) 既に報告されている P450 分子種の 3 次元構造とのホモロジーモデリングから PCB を代謝する P450 分子種の 3 次元構造をモデリングし、これと CB118 のドッキングモデルを構築する。これにより、推定された代謝反応に重要なアミノ酸を変異させることにより、より代謝活性の高い P450 分子種を創製する。(3) 通常小胞体膜に局在し、その活性を発現する P450 の局在性を PCB 等の高脂溶性物質が局在する細胞膜に改変し、その代謝効率の向上を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) P450 分子種による CB118 代謝活性の測定と代謝物の同定  
CB118 を基質としてラット CYP1A1、ラット CYP2B1、ヒト CYP2B6 を用いて代謝試験を行

った。電子供与体の NADPH の添加により反応を開始し、37℃で2時間反応させた。代謝物をヘキサソールにより抽出し、誘導体化後、代謝物の構造を高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを用いて同定した。

(2) P450 分子種の分子モデリングと CB118 とのドッキングモデルの構築

過去に報告されているヒト CYP2B6 の結晶構造をもとに、SYBYL Biopolymer (Tripos, St Louis, MO) を用いてラット CYP2B1 のホモロジーモデルを構築した。さらに SYBYL Biopolymer (Surflex Dock) を用いて、ヒト CYP2B6、ラット CYP2B1、過去に報告されているラット CYP1A1 の 3D モデルと CB118 によるドッキング解析を行った。また CB77 とラット CYP1A1 によるドッキングモデルにより、脱塩素水酸化活性の高い変異体のモデルを構築した。

(3) ラット CYP1A1 変異体の作製と CB77 代謝

ラット CYP1A1 の 382 番目のアミノ酸 (バリン) を 7 種のアミノ酸に変異させた変異体を、変異を導入した DNA プライマーを用いた PCR を行なうことにより構築した。変異の導入をシーケンス解析により確認し、酵母発現用ベクターに挿入した。これらを酵母に導入し、P450 が機能的に発現しているかどうか還元型 CO 差スペクトラムを測定することにより確認した。

変異体による CB77 の代謝を項目 (1) の方法と同様に測定した。ラット CYP1A1 による 2 種の水酸化代謝物 (4-Hydroxy-3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, 4-Hydroxy-3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl) を定量した。

(4) 細胞膜局在性ラット CYP1A1 の作製

細胞膜局在性タンパク質 Pmalp のシグナル配列 (m, MTDTSSSSSSSSASSVSAHQPTQEKPAKTY) をコードする塩基配列を酵母から PCR により取得した。さらに、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、酵母由来 P450 還元酵素 (YR)、N 末端シグナル配列を除去したラット CYP1A1 (r1A1) を融合した m/r1A1/YR/GFP を作製した。本融合酵素遺伝子を発現する組換え酵母を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、スクロース密度勾配遠心分離法により細胞膜画分を抽出し、SDS-PAGE 後、抗 GFP 抗体により融合酵素を検出した。

## 4. 研究成果

(1) P450 分子種による CB118 代謝活性の測定と代謝物の同定

CB118 はヒト CYP2B6 により 2 種の水酸化代謝物 (3-Hydroxy-2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, 3-OH-CB118; 5-Hydroxy-2,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl,

5-OH-CB66) に代謝された。一方、ラット CYP2B1 は 3-OH-CB118 の一種の水酸化代謝物のみ同定された。ラット CYP1A1 は 3 種の水酸化代謝物 ( 4-Hydroxy-2, 3, 3', 4', 5-pentachlorobiphenyl, 4-OH-CB107; 4-Hydroxy-2, 3', 4', 5-tetrachlorobiphenyl, 4-OH-CB70; 5-OH-CB66) を生成した ( 図 1 )。これら 3 種の P450 分子種のうち、ヒト CYP2B6 が CB118 の代謝活性が最も高かった。

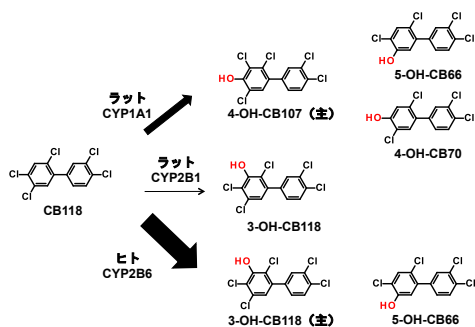


図 1 CB118 の推定代謝経路

## (2) P450 分子種の分子モデリングと CB118 とのドッキングモデルの構築

ヒト CYP2B6 とラット CYP2B1 はアミノ酸配列の相同性が 75% と高いにも関わらず、CB118 に対する代謝活性は大きく異なっていた。この原因を解明するため、これら P450 分子種と CB118 とのドッキングモデルを構築した。そして、基質の代謝活性に重要な 2 点 ( 基質結合キャビティーにおける基質の結合安定性、P450 ヘム鉄に対する基質の距離) について調べた。基質結合キャビティーとは P450 の活性中心であるヘム鉄に隣接する、基質が結合する空間である。この空間において基質が安定して結合することが高活性には重要である。

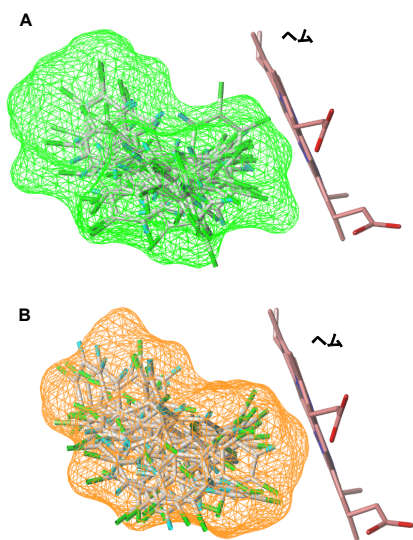


図 2 ヒト CYP2B6 (A) とラット CYP2B1 (B) の基質結合キャビティーにおける CB118 の配座

基質の結合安定性の指標として基質結合キャビティー内での基質の配座数があり、この数が大きいと安定して結合できないことから代謝活性は低下する。この数をヒト CYP2B6 とラット CYP2B1 とで比較したところ、大きな違いは見られなかった ( 図 2 )。このことから CB118 の代謝活性の違いは基質結合キャビティーでの配座数の違いでは説明できないと考えられた。次に、この基質結合キャビティー内における CB118 とヘム鉄との距離を調べた。5Å 以内の距離に基質が近づくことにより基質は代謝されることが知られていることから、CB118 についても同様にその距離を調べた。その結果、ヒト CYP2B6 では CB118 の 3 位炭素が 3.6Å に、ラット CYP2B1 では 5.8Å に近づくことが判明した。この距離の違いがヒト CYP2B6 とラット CYP2B1 の CB118 に対する代謝活性の違いに現れているものと考えられた。

## (3) ラット CYP1A1 変異体の作製と CB77 代謝

これまでに、CB77 はラット CYP1A1 により代謝され、2 種の水酸化代謝物に代謝されることを報告している。そのうち、脱塩素水酸化代謝物は CB77 のダイオキシン毒性を著しく低下させるものと考えられることから、この代謝物をより多く生成させる変異体を作製することを試みた。そこで、ラット CYP1A1 の基質結合キャビティーを構成するアミノ酸のうち、代謝活性に重要と思われる 382 番目のバリンに注目した。これをアミノ酸の大きさやプロトドナーになりうるかどうかを考え、7 種のアミノ酸に変異させた。その結果、アラニンに変異させた変異型ラット CYP1A1 は CB77 の脱塩素水酸化代謝物の量を多く生成することが判明した。このような変異は PCB の毒性低減に重要であると考えられる。

## (4) 細胞膜局在性ラット CYP1A1 の作製

酵母由来の細胞膜局在性タンパク質 Pma1p のシグナル配列を持つ m/r1A1/YR/GFP はシグナル配列を持たない r1A1/YR/GFP に比べ、細胞膜での蛍光強度が強かった ( 図 3 )。また、組換え酵母の細胞膜をスクロース密度勾配遠心分離法により分画し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロット分析に供したところ、m/r1A1/YR/GFP を持つ組換え酵母は細胞膜局在性タンパク質が存在する画分 ( フラクション番号 1, 2 ) においてそのタンパク質が検出された ( 図 4 )。これらの結果から、P450 分子種にシグナル配列を付加させることにより、細胞膜に局在させることに成功した。

以上の結果から、PCB の毒性低減に向けて P450 による PCB の代謝活性を向上させることができるアミノ酸を同定することができた。さらに、P450 を酵母の細胞膜に局在さ

せることに成功したことから、代謝活性の高いP450を脂溶性の高いPCBなどの汚染物質が局在する細胞膜で効率よく代謝させるための基盤技術が確立できたと考えられる。

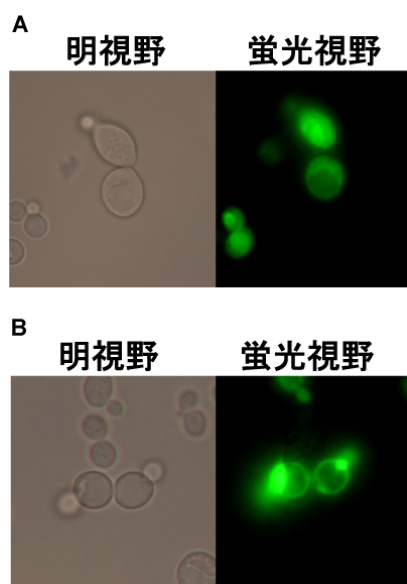


図3 細胞膜局在性シグナルを持つP450融合酵素を導入した組換え酵母の蛍光

- (A) r1A1/YR/GFP  
(B) m/r1A1/YR/GFP

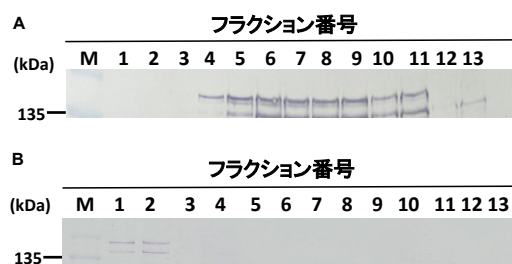


図4 細胞膜局在性シグナルを持つP450融合酵素の分画と抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット分析

- (A) r1A1/YR/GFP  
(B) m/r1A1/YR/GFP

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Hideyuki Inui, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto, Shin-ichi Ikushiro, Toshiyuki Sakaki, Mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls, *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14044-14057, 2014, doi:10.3390/ijms150814044、査読有

〔学会発表〕(計8件)

- ① Hideyuki Inui, Structural Basis of Species Differences between Rat and

Human CYP1A1s in Metabolism of Polychlorinated Biphenyls, 22<sup>nd</sup> Symposium on Environmental Chemistry, Mini-symposium, Tokyo University of Agriculture and Technology (Tokyo), 2013(2 August), 2013

- ② 見世慎太郎、羽賀雄紀、藪未来、伊藤俊将、山本恵子、鶴川正寛、松村千里、中野武、榊利之、乾秀之、ラットおよびヒト由来シトクロムP450モノオキシゲナーゼによるCB118の代謝と3次元構造の比較、第22回環境化学討論会、東京農工大学(東京)、2013年8月2日

- ③ Hideyuki Inui, Kiyoshi Yamazaki, Miku Yabu, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto, Motoharu Suzuki, Yuuki Haga, Shintarou Mise, Masahiro Tsurukawa, Chisato Matsumura, Takeshi Nakano, Toshiyuki Sakaki, Amino acid variations in mammalian cytochrome P450 monooxygenases responsible for decrease of dioxin-like toxicity of polychlorinated biphenyls, 33<sup>rd</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Daegu (Korea), 2013(28, 29 August)

- ④ Hideyuki Inui, Structural Basis of Species Differences between Rat and Human CYP1A1s in Metabolism of Polychlorinated Biphenyls, e-symposium, Osaka Prefectural Institute of Public Health (Osaka), 2014(14 February)

- ⑤ Hideyuki Inui, Structural Basis of Species Differences in Metabolism of Polychlorinated Biphenyls, 23<sup>rd</sup> Symposium on Environmental Chemistry, Night meeting, Kyoto University (Kyoto), 2014(14 May)

- ⑥ Hideyuki Inui, Shintarou Mise, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto, Shin-Ichi Ikushiro, and Toshiyuki Sakaki, Mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls, and application to bioremediation. The 12<sup>th</sup> International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, Kyoto City International Foundation (Kyoto), 2014(26 September)

- ⑦ Shintarou Mise, Yuuki Haga, Miku Yabu, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto, Chisato Matsumura, Takeshi Nakano, Toshiyuki Sakaki, Hideyuki Inui, Structural basis of metabolism of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, International Conference of Asian Environmental Chemistry 2014, Bangkok (Thailand),

2014(24 November)

⑧Hideyuki Inui, Structural basis of species differences on metabolism and toxicity of polychlorinated biphenyls among mammals, Seminar at University of Belgrade, Belgrade (Serbia), 2015(8 June)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

乾 秀之 (Inui, Hideyuki)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：90314509