

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29年 4月 5日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 産業技術総合研究所・健康工学研究部門  
 職 名 総括研究主幹  
 研究代表者名 茂里康

下記のとおり平成 28 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281011)

1. 共同利用研究 課題名	薬物代謝酵素を用いた有用化合物の生物生産と酵素蛋白質の標準化に関する研究			
2. 共同利用研究 目的	化成品の多くは石油精製品を出発物質として化学合成により生産されている。本研究では、有限資源である石油を使用しない生物生産系の確立を目的として、植物抽出化合物に対して薬物代謝酵素を反応させることで、有用な化合物の合成を行う為の反応系の確立を目指すと共に、薬物代謝酵素量定量の標準化を推進する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 茂里 康	健康工学研究部門	総括研究主幹	研究総括・質量分析	
(分担研究者) 達 吉郎	健康工学研究部門	部門長	蛋白質同定・定量的解析法確立	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答・環境 物質応答	氏 名	今石 浩正

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:281011)

#### 6. 共同利用研究計画

①安息香酸のpara位水酸化が明らかとなっている P450 分子種、CYP53A15cDNA を、大腸菌発現用 tac プロモーター下流に連結させた発現用プラスミドを作製する。

②CYP53A15 発現大腸菌へと、安息香酸を直接添加し、HPLC および質量分析によりpara水酸化安息香酸の生成を確認する。

③CYP53A15 発現大腸菌から、超遠心分画およびカラムクロマトを行うことで CYP53A15 酵素蛋白質を精製する。次に、本精製酵素の蛋白質同定をマスペクトル解析することで、精製酵素量を正確に算出する。この結果を用い、本生物変換系に用いた P450 分子種の酵素比活性を正確に求める手法を開発する。

#### 7. 共同利用研究の成果

①CYP53A15 をコードする cDNA を完全遺伝子合成により取得出来た。また、この CYP53A15cDNA を大腸菌発現用プラスミド pCWori の tac プロモーター下流に連結させた発現用プラスミドを作製した。

②CYP53A15 発現用プラスミドを大腸菌 JM109 株へと導入し、安息香酸を直接添加後に HPLC 分析を行った。その結果、para水酸化安息香酸の生成が確認できた。また、CYP3A4 酵素発現についても同様の方法を用いた。

③4℃の氷冷下に CYP53A15 発現大腸菌を静置した後、超音波破碎法を用いて破碎処理を行った。超音波破碎処理は 20W で 3 回行った。次に、破碎処理が完成していることを確認するために、還元型 CO 差スペクトルを用いて総 P450 酵素量を評価した。その結果、破碎処理が成功したことが確認出来た。更に、超遠心分画により CYP53A15 酵素蛋白質画分を含む大腸菌膜画分を粗精製する事に成功した。

#### 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

##### 国際学会発表:

Reduction of aflatoxin B1 toxicity by using food compounds and CYP3A4 gene in human, H.Watanabe, K. Hatsuta, H.Imaishi Tokyo, Japan (ISMYCO 2016)

##### 国内学会発表:

真核生物の P450 活性を制御する新規遺伝子の探索と解析

原 茅乃,河合 佑樹,今石 浩正 第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜

真核生物の P450 活性を制御する新規遺伝子の探索と利用

河合 佑樹, 原 茅乃, 今石 浩正 第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。