

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3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 兵庫県環境研究センター・水環境科
 職 名 主任研究員
 研究代表者名 羽賀 雄紀

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:282003)

1. 共同利用研究 課題名	環境汚染物質の体内動態と環境動態の解明			
2. 共同利用研究 目的	環境汚染物質、特にポリ塩化ビフェニル(PCB)と有機フッ素化合物(PFC)の生体内、環境における代謝経路並びに毒性発現・解毒メカニズムを解明する。			
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) 羽賀 雄紀	兵庫県環境研究センター	主任研究員	PCB 代謝物分析	
(分担研究者) 吉識 亮介 松村 千里	兵庫県環境研究センター 兵庫県環境研究センター	研究員 首席研究員	PFC 定量分析 PCB・PFC 分析業務の統括	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答研究部 門・環境物質応答研究分 野	氏 名	乾 秀之

※ 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:282003)

6. 共同利用研究計画

1) 哺乳類 P450 による PCB の代謝 (担当:神戸大・乾)

毒性の高い、もしくは毒性が不明な PCB (CB126, CB77, CB118, CB183 など) を基質として選択する。使用する P450 遺伝子はデータベースの配列を基にプライマーを合成し、cDNA ライブラリーをテンプレートに PCR によりクローニングする。DNA シークエンサーにより P450 遺伝子の配列を決定する。P450 遺伝子を酵母発現プラスミドに挿入し、組換え酵母において P450 遺伝子を発現させる。超遠心分離機を用いて調製したマイクロソーム画分 (P450 が含まれる) と PCB を反応させる。

2) PCB 代謝活性の測定と代謝物の同定 (担当:環境研・羽賀、松村)

反応液から PCB 代謝物を抽出後、GC/MS による分析のために代謝物の誘導体化を行い、高分解能 GC/MS により代謝物の定量・同定を行う。同定した代謝物情報を基に、PCB の代謝経路を推定する。

3) PFC 分解微生物のスクリーニング (担当:神戸大・乾)

PFC 長期汚染河川底質を PFOS 添加液体培地において集積培養することにより、PFC 分解菌を含むと考えられる微生物叢を調製する。PFOS 添加寒天培地により PFOS 分解菌をスクリーニングし、単離する。単離した分解菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子の配列を解析することにより微生物を同定する。PFOS 分解菌を PFOS 添加液体培地で培養し、培地中に残存する PFOS を定量し、分解菌の可能性を検討する。

4) PFC 濃度の測定 (担当:環境研・吉識、松村)

培地中の PFOS の分解 (減少) を確認するために、PFC 測定用前処理カラムを用いて培養液から PFC を濃縮・精製する。PFC 含有サンプルを高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) に供し、PFC 濃度を定量する。

7. 共同利用研究の成果

1) 哺乳類 P450 による PCB の代謝

ヒト CYP1A1、ヒト CYP2B6、ラット CYP2B1 を用いて CB77 並びに CB183 の代謝実験を行った。これら P450 遺伝子と P450 への電子伝達を目的として還元酵素遺伝子を発現するためのプラスミドを構築した。組換え酵母における P450 遺伝子の発現を、還元型 CO 差スペクトルの測定により確認後、マイクロソーム画分を抽出し、各 PCB と反応させた。P450 による PCB 代謝物をヘキサンにより抽出した。

2) PCB 代謝活性の測定と代謝物の同定

GC/MS 分析のために代謝物の誘導体化を行った後、高分解能 GC/MS により代謝物の定量・同定を試みたところ、ヒト CYP1A1 により CB77 が、ヒト CYP2B6 により CB183 がそれぞれ2種の水酸化代謝物に代謝されることが明らかとなった。さらに、これら水酸化代謝物は標準品との保持時間の比較等によりその構造を同定できた。

3) PFC 分解微生物のスクリーニング

PFC 長期汚染河川底質4種を用いて PFOS/PFOA 添加液体培地において集積培養し、PFC 分解菌を含むと考えられる微生物叢を得た。さらに、これを PFOS/PFOA 添加寒天培地に播種し、単一のコロニーとして生育可能な菌を複数得た。

4) PFC 濃度の測定

PFOS/PFOA 添加液体培地においてコロニーを培養後、PFC 測定用前処理カラムを用いて培養液から PFC を抽出した。これを LC/MS/MS に供し、PFC 濃度を定量したところ、PFOS/PFOA 濃度を減少させる菌が存在することが判明した。

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。)

- Mise, S., Haga, Y., Itoh, T., Kato, A., Fukuda, I., Goto, E., Yamamoto, K., Yabu, M., Matsumura, C., Nakano, T., Sakaki, T., and Inui, H., Structural determinants for the position of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) hydroxylation by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, *Toxicological Sciences*, 152(2), 340-348, 2016, Selected for the cover page
- 後藤絵里香、羽賀雄紀、久保惇、伊藤俊将、笠井千枝、荘司長三、山本恵子、松村千里、中野武、乾秀之、デコイ分子を用いた *Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる CB118 の代謝とその構造基盤、第 25 回環境化学討論会、新潟、2016(6)
- Inui, H., Miwa, M., Mise, S., Goto, E., Haga, Y., Matsumura, C., Nakano, T., Sakaki, T., Enantioselective metabolism of chiral polychlorinated biphenyls by rat and human cytochrome P450 monooxygenases, The 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, Vancouver, Canada, 2016(7)
- Goto, E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., Inui, H., Structural basis of CB118 metabolism by cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium* with decoy molecules, The 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, Vancouver, Canada, 2016(7)
- Inui, H., Haga, Y., Itoh, T., Goto, E., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., Sakaki, T., Structural determinants of species differences on metabolism of dioxin-like polychlorinated biphenyls by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, The 9th International PCB Workshop, Kobe, 2016(10)
- Goto, E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., Inui, H., Metabolic fates of CB118 by cytochrome P450 monooxygenase from soil bacterium under complex pollution and its structural basis, The 9th International PCB Workshop, Kobe, 2016(10)

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。

なし