

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30年4月12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29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29年 4月 1日 ~ 平成30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 主席研究員	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 によるキラル PCB の代謝 (担当: 神戸大・乾)

各鏡像異性体の毒性が不明なキラル PCB (CB45, CB91, CB135, 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) とキラル PCB を反応させる。

### 2) P450 によるキラル PCB の代謝活性の測定と代謝物の同定 (担当: 環境研・羽賀、松村)

反応液からキラル 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、キラル 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 並びに PFOA 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・PFOA 添加寒天培地により分解菌をスクリーニングし、単離する。単離した菌の 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。同定した菌を PFOS・PFOA 添加液体培地で培養し、培地中に残存する PFOS・PFOA 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・PFOA 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 CYP2B6、ラット CYP2B1、*Bacillus megaterium* 由来 P450BM3 に、基質として CB183、CB118 を添加し、反応後、それぞれの代謝物をヘキササンにより抽出した。

### 2) P450 によるキラル PCB の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 CYP2B6 により CB183 が、P450BM3 により CB118 が複数の水酸化代謝物に代謝され、一部の代謝物の構造を決定した。

### 3) PFC 分解微生物のスクリーニング

PFC 長期汚染河川底質を用いて PFOS/PFOA 添加液体培地において集積培養し、PFOS/PFOA 存在下で生育可能な単一のコロニーを複数得た。また、これら細菌の 16S rRNA 配列を解読することにより同定した。

### 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 濃度を低下させる菌であることが判明した。

## 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。)

1. Beškoski, P.V., Yamamoto, K., Yamamoto, A., Okamura, H., Hayashi, M., Nakano, T., Matsumura, C., Fukushi, K., Wada, S., and Inui, H., Distribution of perfluoroalkyl compounds in Osaka Bay and coastal waters of Western Japan, *Chemosphere*, 170, 260-265, 2017
2. Navrátilová, V., Paloncýová, M., Berka, K., Mise, S., Haga, Y., Matsumura, C., Sakaki, T., Inui, H., Otyepka, M., Molecular insights into the role of a distal F240A mutation that alters CYP1A1 activity towards persistent organic pollutants, *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1861, 2852-2860, 2017
3. 乾秀之、山本勝也、山本敦史、岡村秀雄、林美鶴、中野武、松村千里、福士恵一、和田真平、Vladimir P. Beškoski、大阪湾から西日本の沿岸海域に拡がるペルフルオロアルキル酸、第26回環境化学討論会、静岡、2017(6)
4. 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 bacterial cytochrome P450 monooxygenase and its mutants with perfluorocarboxylic acids, 37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Vancouver, Canada, 2017(8)
5. Ito, T., Miwa, C., Haga, Y., Goto, E., Itoh, T., Yamamoto, K., Mise, S., Matsumura, C., Nakano, T., Inui, H., Metabolism of chiral polychlorinated biphenyls by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, 37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Vancouver, Canada, 2017(8)
6. Goto, E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., Inui, H., Possible metabolic fates of polychlorinated biphenyls by soil bacterium under complex pollution and its structural basis, The 14<sup>th</sup> International Symposium on Persistent Toxic Substances, Nagoya, 2017(9)
7. 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、*Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる 2,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (CB118) の代謝とその構造基盤、2018年度日本農芸化学会、名古屋、2018(3)

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