

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 31 年 4 月 9 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 研究部門長
 研究代表者名 達 吉郎

下記のとおり平成 30 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:301010)

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の CYP53A15 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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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) 達 吉郎	健康工学研究部門	部門長	研究総括・定量的解析法確立	
(分担研究者) 茂里 康	健康工学研究部門	総括研究主幹	蛋白質同定・質量分析	
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。

6. 共同利用研究計画

①先の研究により、安息香酸のパラ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高発現用プラスミドを利用した生物変換系を確立する。

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パラ水酸化安息香酸の生成量とその際に生じる副生産物を確認する。

③最終年度は、CYP53A15 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 の N 末端配列を改変させることにより、還元型 CO 差スペクトルを示す組換え大腸菌を作製する事に成功すると共に、酵素発現が確認出来た。

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、少量のパラ水酸化安息香酸の生成が確認できたと共に副生成物も確認できた。次

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、超遠心操作を行った。その結果、酵素精製が成功したことが確認出来た。一方、完全な純化酵素は得られなかった事から、P450 分子種の酵素比活性は決定できなかった。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

研究論文発表

1) Yamamoto R., Muroi K., Imaishi H.

Serum derived from ulcerative colitis mouse changes the metabolism of the fluorescent substrate by P450 depending on the degree of disease progression, *Chem Biol Interact.*, 290, 88-98 (2018)

2) Uno T, Nakano R, Kitagawa R, Okada M, Kanamaru K, Takenaka S, Uno Y, Imaishi H.

Defluorination of perfluoroalkyl acids is followed by production of monofluorinated fatty acids, *Science of the Total Environment*, 636, 355-35 (2018)

3) Tamaki S, Kato S, Shinomura T, Ishikawa T, Imaishi H.

Physiological role of β -carotene monohydroxylase (CYP97H1) in carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*, *Plant Sci.*, 278, 80-87 (2019)

4) 玉木峻、今石浩正

真核光合成生物におけるシトクロム P450 型カロテン水酸化酵素 (CYP97) の機能解析

BSJ-review 9, 80-89(2019)

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。