

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

2020年4月1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 公益財団法人 ひょうご環境創造協会 兵庫県環境研究センター
 職 名 主任研究員
 研究代表者名 羽賀雄紀

下記のとおり2019年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:192004)

1. 共同利用研究 課題名	シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる環境残留性の高い汚染物質の代謝メカニズムの解明			
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)、ポリ塩化ナフタレン(PCN)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	2019年7月1日 ～ 2020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、PCN の代謝物分析	
(分担研究者) 松村 千里	兵庫県環境研究センター	主席研究員	PCB、PCN、PFC 分析と業務統括	
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6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:192004)

<p>6. 共同利用研究計画</p> <p>1) 哺乳類 P450 によるキラル PCB、PCN、PFC の代謝(担当:神戸大・乾)</p> <p>哺乳類 P450 遺伝子を組換え酵母において発現させる。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 (CB45、CB91、CB135、CB183 など)、PCN をそれぞれ反応させる。一方、細菌由来の P450BM3 を組換え大腸菌から精製し、各種 PFC と反応させる。</p> <p>2) P450 によるキラル PCB、PCN、PFC の代謝活性の測定と代謝物の同定(担当:環境研・羽賀、松村)</p> <p>反応液からキラル PCB、PCN 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、PCN の代謝経路を推定する。一方、反応液から PFC 測定用前処理カラムを用いて PFC を抽出、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)により定量することにより、P450BM3 による PFC の代謝・分解の可能性を検討する。</p> <p>3) PFC 分解微生物のスクリーニング(担当:神戸大・乾)</p> <p>PFC 長期汚染河川底質から単離した細菌について、16S リボゾーム 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 添加液体培地で数週間培養する。</p> <p>4) PFC 濃度の測定(担当:環境研・羽賀、松村)</p> <p>培地中の PFOS・PFOA の分解(減少)を確認するために、前述の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 LC-MS/MS に供し、PFC 濃度を定量する。</p>
<p>7. 共同利用研究の成果</p> <p>1) 哺乳類 P450 によるキラル PCB、PCN、PFC の代謝活性の測定と代謝物の同定</p> <p>PCN とヒト由来薬物代謝酵素 CYP1A1、CYP2B6、ラット由来 CYP1A1、CYP2B1 を反応させ、反応生成物を GC-MS により分析したところ、PFC は複数の水酸化代謝物に代謝された。PCN の水酸化代謝物の標準品が市販されていないことから、代謝物の構造の同定はできなかった。しかし、水酸化代謝物の生成量は動物間、薬物代謝酵素の種類の間で大きく異なっていた。これは、PCN が体内に取り込まれた時に異なる代謝経路を経て代謝され、排泄されることを意味し、それぞれの動物に対する PCN の毒性を考える上で重要な知見となった。</p> <p>2) PFC 分解微生物のスクリーニングと PFC 濃度の測定</p> <p>PFC のうち、ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)の濃度を減少させる細菌を 3 種、PFC 汚染した河川の底質から単離した。培養液に添加した PFOS のうち 30-40%の濃度を 5 週間で低下させることを LC-MS/MS により定量した。これら細菌の最適培養条件を決定した。さらに、PFOS を炭素源として増殖する 3 種の菌を単離し、これらも 20-30%の PFOS を 5 週間で減少させた。ここで単離した細菌は PFOS のバイオレメディエーションのために利用できる細菌として有望である。</p>
<p>8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況</p> <ol style="list-style-type: none">1. 伊藤輝志、羽賀雄紀、久保惇、伊藤俊将、山本恵子、松村千里、中野武、乾秀之、哺乳動物シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによるキラルポリ塩化ビフェニルの代謝とその構造基盤、第 28 回環境化学討論会、埼玉、2019(6)2. H. Inui, T. Ito, Y. Haga, M. Kubo, T. Itoh, K. Yamamoto, C. Matsumura, T. Nakano, Structural basis of metabolism of chiral polychlorinated biphenyls by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Kyoto, Japan, 2019(8)3. H. Inui, Bioaccumulation and metabolism of persistent organic pollutants: from the environment to mammals, Seminar at New York State Department of Health, Albany, USA, 2019(10)4. 石田裕子、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、<i>Bacillus megaterium</i> 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ P450BM3 変異体による CB118 の代謝とその構造基盤、第 28 回環境化学討論会、埼玉、2019(6)5. 都築治延、伊藤輝志、羽賀雄紀、松村千里、中野武、乾秀之、哺乳動物シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによるポリ塩化ナフタレンの代謝、第 28 回環境化学討論会、埼玉、2019(6)6. 小林豊、吉識亮介、櫻間晴子、山本敦史、松村千里、中野武、乾秀之、河川底質におけるペルフルオロアルキル酸分解菌の探索、第 28 回環境化学討論会、埼玉、2019(6)7. Y. Ishida, E. Goto, Y. Haga, M. Kubo, T. Itoh, C. Kasai, O. Shoji, K. Yamamoto, C. Matsumura, T. Nakano, H. Inui, Structural basis of CB118 metabolism by cytochrome P450 monooxygenase (P450BM3) mutants from <i>Bacillus megaterium</i>, 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Kyoto, Japan, 2019(8)8. H. Tsudzuki, T. Ito, Y. Haga, C. Matsumura, T. Nakano, H. Inui, Metabolism of polychlorinated naphthalenes by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Kyoto, Japan, 2019(8)9. V. Beškoski, A. Žeradjanin, G. Gojgić-Cvijović, S. Miletić, J. Avdalović, H. Inui, Y. Haga, C. Matsumura, T. Nakano, Biodegradation of selected PCBs by microorganisms isolated from PCBs polluted environment, 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Kyoto, Japan, 2019(8)
<p>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。特になし</p>