

氏 名	しん きょう らく 新 京 楽
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1538 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Structure-function analysis of mammalian cytochromes P450 involved in metabolism of dioxins (ダイオキシンの代謝に関わる哺乳動物シトクロム P450 の構造と機能の解 析) (主 査)
論文調査委員	教 授 井 上 國 世 教 授 吉 川 正 明 教 授 村 田 幸 作

論 文 内 容 の 要 旨

ダイオキシン類の中でも 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン (TCDD) は、人工の化合物の中で最強の発がん性、催奇形性物質として知られており、TCDD などのダイオキシン類による環境汚染が大きな問題になっている。これまでに、環境中からダイオキシン代謝能を示す微生物を探索する試みは数多くなされてきたが、現在までに報告されているダイオキシン代謝微生物はいずれも実用化に十分な活性を有しているとはいえない。そういったことから、TCDD 代謝酵素を人工的に創製し、その発現微生物を用いて環境浄化を試みることも有効な手段の一つであると考えられる。一方、哺乳動物へのダイオキシン類の投与実験の結果から、生体内におけるダイオキシン類の代謝にはシトクロム P450 (P450) の関与の可能性が示唆されてきた。

本論文は、ダイオキシン代謝能の高い哺乳動物由来 P450 の改変による TCDD 代謝酵素の創製および TCDD 代謝酵素発現微生物の環境浄化への応用に関する知見を示したものであり、4 章から成っている。その主な内容は以下のとおりである。

1. ヒトおよびラットの肝臓に発現している 16 種類の P450 を酵母において発現させ、そこからミクロソーム画分を調製した。それらを用いてダイオキシン類に対する活性を測定したところ、いずれの P450 も TCDD に対しては活性を示さなかったが、毒性の低いダイオキシン類に対しては活性を示した。ヒトの P450 に注目すると、ダイオキシン類に対して高い活性を示したのはヒト CYP1A1, 1A2, 1B1 の 3 分子種であったが、ヒト肝臓における発現量が高いのは CYP1A2 であることから、実際に重要な働きをしているのは CYP1A2 であると推測された。そのことを確認するために、ヒト肝臓ミクロソームを用いて、ダイオキシン類に対する活性を調べ、さらに CYP1A2 の特異的な基質であるフェナセチンに対する活性を調べた。その結果、両者は良い相関を示し、ヒト肝臓におけるダイオキシンの代謝において重要な働きをしているのはヒト CYP1A2 であることが確認された。一方、ヒトおよびラットの P450 の中でダイオキシン類に対して最も高い活性を示したのはラット CYP1A1 であった。

2. ラット CYP1A1 によるダイオキシン類の代謝反応について調べたところ、水酸化反応の他に、脱塩素反応を伴う水酸化、塩素原子の転位反応を伴う水酸化および環の開裂反応が確認された。特に脱塩素反応を伴う水酸化および環の開裂反応はダイオキシンの無毒化において重要な反応と考えられる。また、これらの反応は動物実験において確認された反応と一致しており、CYP1 ファミリーが *in vivo* においてもダイオキシンの代謝に重要な働きをしていることが確認された。

3. ラット CYP1A1 は TCDD に対しては活性を示さないものの TCDD と結合しうることが明らかになった。そこで、ラット CYP1A1 の基質認識領域に変異を導入し、それらの領域を空間的に拡大することにより、基質の結合様式に変化を与え、TCDD に対して活性を示す変異体の作製を試みた。その結果、Phe240 をアラニンに置換した変異体、F240A は TCDD に対して活性を示した。F240A による TCDD の代謝産物を HPLC および GC-MS により分析したところ、この代謝産物は 8 位の塩素原子が脱離して、そこに水酸基が付加した 8-ヒドロキシ-2,3,7-トリクロロジベンゾパラダイオキシンであることが明らかになった。また、この代謝産物の毒性は TCDD と比較して 1 万分の 1 以下に低下していることが

確認され、この反応がダイオキシンの無毒化において重要な反応であることが示された。

4. 環境浄化への応用の際には、TCDD代謝酵素の発現微生物の利用を考えている。そこで、まず、F240AのN末端領域を削除したものを大腸菌において発現させ、その発現大腸菌体を用いて2,3,7-トリクロロジベンゾパラダイオキシン(2,3,7-TriCDD)の代謝を試みた。その結果、培養開始8時間後には90%以上の2,3,7-TriCDDの分解に成功した。このことから、原核微生物を宿主としてTCDD代謝酵素を発現させ、その発現微生物を用いて環境中のダイオキシン類を除去できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ダイオキシン類の中でも2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン(TCDD)は、人工の化合物の中で最強の発がん性、催奇形性物質として知られており、TCDDなどのダイオキシン類による汚染土壌の浄化技術の確立が急務である。

これまでに、動物実験などの結果から、ダイオキシン類に対する代謝反応としては水酸化反応などが確認されており、これらの反応にシトクロムP450(P450)が関与している可能性が示唆されてきた。本論文は、哺乳動物由来のP450のダイオキシン代謝能に注目し、ダイオキシン代謝能の高いP450の改変によりTCDD代謝酵素を創製するとともに、TCDD代謝酵素発現微生物の環境浄化への応用の可能性を示したものであり、成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. ヒトおよびラットの肝臓に発現している16種類のP450のダイオキシン代謝能を調べ、ヒト肝臓におけるダイオキシンの代謝において重要な働きをしているP450がヒトCYP1A2であることを明らかにした。また、ヒトおよびラットのP450の中で、ラットCYP1A1がダイオキシン類に対して最も高い活性を示すことを明らかにした。

2. ラットCYP1A1のダイオキシン類に対する代謝反応を詳細に解析し、ラットCYP1A1がダイオキシン類に対して水酸化反応の他に、ダイオキシンの無毒化において重要な反応である、脱塩素反応を伴う水酸化反応や環の開裂反応を行うことを明らかにした。

3. ラットCYP1A1の基質認識領域を空間的に拡大することを目的に、部位特異的変異導入を行い、TCDDに対して活性を示す変異体、F240Aの創製に成功した。このF240Aは、TCDD代謝酵素として初めて報告された酵素である。また、F240AによるTCDDの代謝産物の毒性がTCDDと比較して1万分の1以下に低下していることを確認し、この代謝反応がダイオキシンの無毒化において重要な反応であることを確認した。

4. F240Aを大腸菌において発現させ、その発現大腸菌体を用いて2,3,7-トリクロロジベンゾパラダイオキシン(2,3,7-TriCDD)の代謝に成功した。このことは、本研究で確立した原核微生物を宿主とするTCDD代謝酵素の発現系を用いて、実際の汚染土壌の浄化を行い得る可能性を示している。

以上のように本論文は、ダイオキシンの代謝に関わる哺乳動物シトクロムP450の構造と機能に関する多くの重要な知見を得たものであり、酵素化学、環境生化学、および薬物代謝化学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年1月19日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。