

## 多機能薬物代謝酵素の導入による環境浄化植物の創製

東京理科大学基礎工学部 助教授 島田 浩章  
三浦 成敏

はじめに

シトクロム P450c17 は副腎皮質及び生殖腺の小胞体分画に局在する膜タンパク質であり、副腎皮質においてミネラルコルチコイドやグルココルチコイド、生殖腺ではアンドロゲンやエストロゲンのステロイドホルモン合成に係わる水酸化酵素である。シトクロム P450c17 は単独で、17 $\alpha$  位水酸化反応と、C17-C20 間の切断反応の2つの反応を触媒することが出来る。プレグネノロンやプロゲステロンから 17OH-プレグネノロン、17OH-プロゲステロンを生じる水酸化反応、それに続く切断反応で 17OH-プレグネノロン、17OH-プロゲステロンからデヒドロアンドロステロンやアンドロステンジオンを合成する。また、後者のデヒドロアンドロステロンやアンドロステンジオンはテストステロンやエストラジオール等の性ステロイドホルモン合成の出発物質になる。このようにシトクロム P450c17 は性ステロイドホルモン合成の初発段階をコントロールする Key Enzyme である (図-1)。

一方、最近、植物界にもシトクロム P450 が分布することが明らかになってきた。植物にも多様なステロイド様生理活性物質が存在し、これらが植物の形態形成や環境応答などに重要な役割を果たすことが明らかとなっている。また、植物にシトクロム P450 を導入することにより、環境中に散布された農薬を解毒する能力を獲得した例がある。しかしながら、植物のシトクロム P450 については研究の緒にばかりであり、この生理機能の詳細はわかっていない。<br>ところで、環境に放出された残留性有機汚染化学物質はそれらの残留性の高さのために生物環境に重大な問題を引き起こしている。特に最近では内分泌物質攪乱物質 (環境ホルモン) として性ステロイドホルモン様作用を持つ残留性有機汚染化学物質がその生物環境に及ぼす影響の大きさから注目を浴びている。これらの汚染化学物質は非常に安定で脂溶性を持つことより、環境に極微量しか存在しなくても食物連鎖によって濃縮され蓄積する。環境に低濃度であるが広範囲にばらまかれた汚染化学物質を有効かつ安全で低コストに分解し、生物環境にたいする影響を緩和させる手段として生物自身の分解能力を用いたバイオレメディエーションが有効であると考えられている。

生物自身の毒物分解能力の殆どはシトクロム P450 によって担われている。シトクロム P450 は広範な基質スペクトルを有する多機能酵素であるが、必ずしも有機汚染化学物質に対して高い基質特異性や活性を持つ訳ではない。遺伝子工学による基質分解活性の改良や新規活性の創出が不可欠である。

このような背景のもと、本研究では性ステロイドホルモン合成に係わるシトクロム P450c17 遺伝子を発現するトランスジェニック植物の作製と環境汚染物質の分解への応用をめざし、シトクロム P450c17 の遺伝子改変及びイネへのシトクロム P450c17 遺伝子の導入を行った。また、植物から新たなシトクロム P450 遺伝子の単離を試みた。

### (1) シトクロムP450c17の酵素活性測定

シトクロム P450c17 遺伝子はウシ副腎皮 cDNA ライブラリーよりクローニングした。大腸菌発現ベクター pCWori にシトクロム P450c17 遺伝子を組み込み発現ベクターを作製した。発現させたシトクロムP450c17 はヒスチジンタグを目印として Ni-NTA Sepharose カラムを用いて精製した。水酸化及び C17-C20 間の切断活性は DLPC (リン脂質) 存在下で P450 還元酵素、100mM NADPH、20mM 基質を加えて 37°C 10 分間反応させた。反応生成物は塩化メチレンで抽出後、濃縮乾固し、HPLC を用いて分離定量した。5D ステロイドはコレステロールオキシダーゼを用いて 3 $\beta$ -OH 基を脱水素後定量した (図-2)。

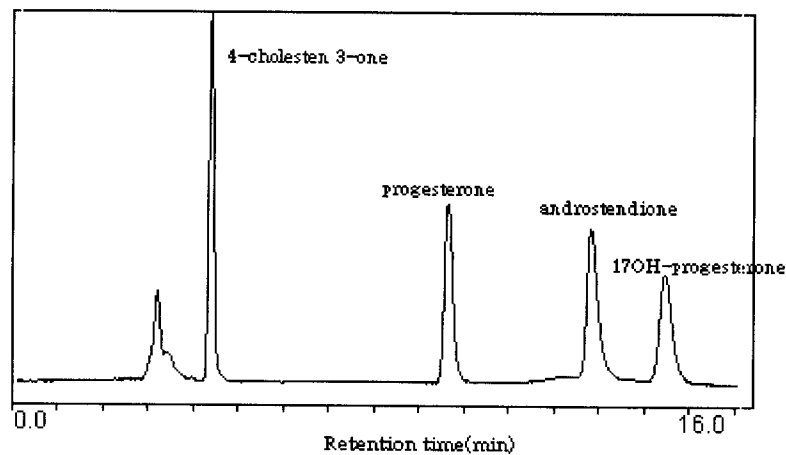


図-2. HPLCでのシトクロムP450c17反応生成物の分離。分離はシリカ順相カラムを用い、溶離液は20%THF/Hexaneを用いた。4-cholesten 3-oneを内部標準物質として用い面積比より定量を行った。縦軸は240nmの吸収を示す。

R346H, R346A, R357Q, R357A 及び I343F の5種のアミノ酸変異を導入したシトクロム P450c17 変異体を作製し発現させた。位置特異的変異は PCR 法を用いて導入した。それぞれの変異体の酵素活性は (1) と同様な方法で測定した。

### (2) シャトルベクターpCAMBIA 1301 へのシトクロムP450c17 遺伝子の組換えとイネへの遺伝子導入。

CaMV の 35S プロモーターによりシトクロム P450c17 遺伝子の発現がドライブされるプラスミド (pCAM170H) を作成した。これをアグロバクテリウムを介する方法により、イネ (日本晴) に導入した。遺伝子導入は、プラスミドにコードされているハイグロマイシン耐性遺伝子により検定した。その結果、多数のハイグロマイシン耐性カルスを得た。さらに数個体の再分化個体が得られた。今後、これらの再分化個体についてシトクロムP450c17 の産生および活性を解析する予定である。

### (3) 新規な植物シトクロムP450 遺伝子の単離と解析

前述したように、植物にも多数のシトクロム P450 遺伝子が存在することが知られている。新たに植物由来のシトクロムP450 を単離するために、イネゲノムをスクリーニングした。これまでにイネのさまざまな組織から得られている EST クローンを検索し、これらにシトクロム P450 と同一性を示す3つの cDNA クローンが含まれていることを見いだした。そこで、これら3つのクローンをプローブとしてイネゲノム遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、新たに3つのシトクロム P450 遺伝子と考えられるクローンの単離に成功した。

おわりに

ウシ副腎皮シトクロム P450 遺伝子を改変し、17位水酸化活性および C17-C20 切断活性の高いものの取得を試みた。また、シトクロム P450c17 遺伝子の植物（イネ）への導入を試み、再分化個体を得た。今後は部位特異性の高いプロモーターを用いた、形質転換個体の取得も試みたい。

一方、イネから新たなシトクロム P450 遺伝子の単離を試み、3個のクローンの取得に成功した。現在のところ、植物が保有するシトクロム P450 の機能についてはほとんどわかっておらず、今回得られたシトクロム P450 が植物体内でどのような生理的機能を有しているか興味を持たれる。今後は、得られたクローンの構造解析と、植物内での生理的機能の解析をおこないたい。これらの結果は、シトクロム P450 を利用した環境浄化植物の作成のための基礎的な知見となるものと考えられる。

研究概要：

環境に放出された残留性有機汚染化学物質は生物環境に重大な問題を引き起こしている。特に内分泌物質攪乱物質（環境ホルモン）として性ステロイドホルモン様作用を持つ残留性有機汚染化学物質がその生物環境に及ぼす影響の大きさから注目を浴びている。これらの汚染化学物質は非常に安定で、環境に極微量しか存在しなくても食物連鎖によって濃縮され蓄積される。環境に低濃度であるが広範囲にばらまかれた汚染化学物質を有効かつ安全で低コストに分解し、生物環境に対する影響を緩和させる手段として生物自身の分解能力を用いたバイオレメディエーションが有効である。

シトクロム P450 はミネラルコルチコイドやグルココルチコイド、ステロイドホルモン生合成などに係わる水酸化酵素であり、性ステロイドホルモン生合成の初発段階をコントロールする Key Enzyme である。一方、植物にもシトクロム P450 が関与するステロイド様生理活性物質が多数存在し、これらが植物の形態形成や環境応答などに重要な役割を果たすことが明らかとなっている。生物自身の毒物分解能力の殆どはシトクロム P450 によって担われている。シトクロム P450 は広範な基質スペクトルを有する多機能酵素であるが、必ずしも有機汚染化学物質に対して高い基質特異性や活性を持つ訳ではない。遺伝子工学による基質分解活性の改良や新規活性の創出が不可欠である。

このような背景のもと、本研究ではシトクロム P450 遺伝子を発現する形質転換植物の作製と環境汚染物質の分解への応用をめざし、シトクロム P450c17 の遺伝子改変及びイネへのシトクロム P450c17 遺伝子の導入を行った。また、植物から新たなシトクロム P450 遺伝子の単離を試みた。まず、ウシ副腎皮シトクロム P450 遺伝子を改変し、切断活性の高いものの取得を試みた。また、シトクロム P450c17 遺伝子の植物（イネ）への導入を試み、多数の形質転換カルスを得、少数ではあるが再分化個体の取得に成功した。一方、イネから新たなシトクロム P450 遺伝子の単離成功した。現在のところ、植物が保有するシトクロム P450 の機能についてはほとんどわかっておらず、今回得られたシトクロム P450 が植物体内でどのような生理的機能を有しているか興味を持たれる。これらの結果は、シトクロム P450 を利用した環境浄化植物の作成のための基礎的な知見となるものと考えられる。

# Pathway of Steroid Hormone Biosynthesis

