

学位論文題名

アスコルビン酸欠乏によるモルモット肝チトクローム
P450の分子種特異的変動に関する研究

学位論文内容の要旨

体内に取り込まれた薬物を含む外来性化合物は、主に肝臓において解毒化される。しかし中には代謝され、より毒性の強い物質に変化する場合もある。従って、肝臓における外来性化合物の代謝は、薬効や毒性を決定する重要な因子の一つである。これらの代謝に関与する中心的な酵素としてチトクローム P450 (以下 P450) が挙げられる。ヒトをはじめとして各種動物の肝には複数の P450 分子種が存在し、対応するアミノ酸配列の相同性によりいくつかのファミリーおよびサブファミリーに分類され、「CYP」として系統的に表記されている。

P450 の発現は薬物等の外来物質やステロイドホルモン等の内因物質ばかりでなく様々な栄養状態によっても変動する。著者はこれらの要因の中でも極めて身近かに存在する栄養素の一つであるアスコルビン酸 (AsA) を取り上げ、その欠乏が P450 の発現におよぼす影響について研究を進めた。

研究にはモデル動物としてヒトと同様に AsA 合成能を欠損しているモルモットを用いた。これまでの研究では AsA 欠乏による肝薬物代謝酵素活性や総 P450 量の低下という現象面の変化にのみ焦点を絞ったものにすぎなかった。そこで、本研究ではこのような現象の分子論的な基盤、すなわち、P450 の低下の詳細や個々の P450 分子種の含量の変動について検討し、以下のような結果を得た。

1) AsA 欠乏により全ての P450 分子種の含量が一様に低下するのではなく、P450 の分子種ごとに異なった変動パターンを示すことを明らか

にした。すなわち、CYP2B および CYP3A の含量は AsA 欠乏の影響を受けなかったのに対し、CYP1A1 および CYP1A2 の含量は AsA 欠乏により顕著な低下を示すことを明らかにした。

2) AsA 欠乏による CYP1A 分子種 (CYP1A1、CYP1A2) の含量の低下の原因は小胞体膜の脂質の過酸化を介した CYP1A 分子種の分解によるものでないことを明らかにした。

3) AsA 欠乏により CYP1A1 および CYP1A2 の mRNA 量は明らかに低下し、CYP2B の mRNA 量は変化しなかった。これらの結果は、対応する蛋白質の含量の変化と良く一致した。すなわち、AsA 欠乏による各 P450 分子種の変動は mRNA レベルですでに決定されていることが明らかとなった。また、異なる 4 種のモルモット CYP3A の cDNA クローン (CYP3A14、CYP3A15、CYP3A17、GP-14) を単離、解析することにより、モルモット肝ミクロゾーム中には複数の CYP3A 分子種が存在することを明らかにした。さらに、個々の mRNA 量の変動を検討したところ、CYP3A14 および GP-14 の mRNA 量は AsA 欠乏の影響を受けなかったのに対し、CYP3A15 および CYP3A17 の mRNA 量は顕著な低下を示し、同じ CYP3A サブファミリーに属していても AsA 欠乏によって個々の分子種が異なった量的な変動を示すことを明らかにした。

このように AsA 欠乏による P450 量の低下という漠然とした現象は、全ての P450 分子種の含量が一様に低下するという単純なものではなく、同じサブファミリーに属する個々の分子種でさえ異なった変動パターンを示し、複雑に変化すること、すなわち、AsA 欠乏によって代謝の全体像というものは、複雑に変化し、代謝に影響を受ける薬物と受けない薬物があることを分子レベルで検討することにより初めて明らかにした。

近年、ヒトの栄養状態は改善したといわれるが、正常な機能を保つには十分でない潜在性 AsA 欠乏症のヒトがかなり存在するといわれている。本研究で得られた結果が種を越えて当てはまるとするならば、AsA の潜在的欠乏状態のヒトでも代謝の全体像というものは、複雑に変化し、薬物の薬効、毒性に大きな影響を与えることが予想される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也
副 査 教 授 長 沢 滋 治
副 査 助 教 授 横 井 毅
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

アスコルビン酸欠乏によるモルモット肝チトクローム P 450の分子種特異的変動に関する研究

申請者は、潜在性ビタミン欠乏症の中でも最もその状態にあるヒトが多いと考えられているアスコルビン酸を取り挙げ、アスコルビン酸欠乏が薬物の薬効や毒性に深く関わるチトクローム P 450 (以下 P 450 または CYP) の発現におよぼす影響について研究を進めた。P 450 は肝ミクロゾームに存在し、薬物や毒物の解毒を行うが、がん原性物質の活性化を行い発癌との関係で注目を集めている酵素である。したがって、本酵素の量的な変動は薬物などの解毒能だけでなく、がん原物質に対する発癌リスクにも影響をあたえる。従来の研究ではアスコルビン酸欠乏によって総 P450 含量ならびに肝薬物代謝酵素活性が低下するという現象面の変化しか判明していなかった。本研究では、分子レベルでのアプローチ、すなわちアスコルビン酸欠乏による P450 含量の低下の詳細や個々の P450 分子種の含量の変動について検討した。以下に詳述するように、今までの研究から数段高度な研究成果を示し、極めて高い研究成果であると評価される。

1) アスコルビン酸欠乏による薬物代謝酵素活性の低下の原因

先ず、アスコルビン酸欠乏による薬物代謝酵素活性の低下は、電子伝達酵素である NADPH-チトクローム P450 還元酵素の活性の低下によるものではないことを明らかにした。さらにイムノプロット分析や酵素活性の測定を行なった結果、アスコルビン酸欠乏により各 P450 分子種の含量は分子種ごとに異なった変化を示すことを明らかにした。すなわち、CYP2B および CYP3A の含量は、アスコルビン酸欠乏の影響をほとんど受けなかったのに対し、CYP1A1 および CYP1A2 の含量はアスコルビン酸欠乏により明らかに

低下することを示した。肝ミクロゾームにおける P 4 5 0 含量の低下と共に薬物代謝酵素活性の低下も認められたが、その低下の程度は用いた基質によって異なっていた。

2) アスコルビン酸欠乏時における薬物代謝酵素活性の低下と脂質過酸化

アスコルビン酸欠乏状態にあるモルモットの肝において脂質過酸化が顕著に上昇していること、また NADPH 依存的なラット肝ミクロゾームの脂質過酸化を誘発させると特異的な P450 分子種の含量のみが減少することに着目し、アスコルビン酸欠乏による CYP1A 分子種の含量の低下が小胞体膜の脂質過酸化に起因する CYP1A 分子種の分解によるか否か、*in vitro* および *in vivo* の両面から検討した。その結果、アスコルビン酸欠乏による CYP1A 分子種の含量の低下の原因は脂質過酸化を介した CYP1A 分子種の分解によるものでないことを明らかにした。すなわち、*in vitro*において脂質過酸化を促進すると CYP1A の含量の低下が認められたが、モルモットにアスコルビン酸欠乏食とともに脂質過酸化阻害物質であるトコフェロールを投与しても CYP1A 含量の低下が認められた。

3) アスコルビン酸欠乏による P 4 5 0 の変動の mRNA レベルでの検討

アスコルビン酸欠乏による各 P450 分子種の量的な変動が、蛋白質発現までのどの過程で調節を受けているのかを知ることはアスコルビン酸欠乏による P 4 5 0 の減少を説明するうえで極めて重要である。そこでアスコルビン酸欠乏時における各種 P 4 5 0 分子種の発現の mRNA レベルでの検討をノーザンブロット分析により検討した。

アスコルビン酸欠乏により CYP1A1 および CYP1A2 の mRNA 量は明らかに低下し、CYP2B の mRNA 量は変化しなかった。これらの結果は、対応する蛋白質の含量の変化と良く一致した。すなわち、アスコルビン酸欠乏による各 P450 分子種の変動は mRNA レベルですでに決定されていることが明らかとなった。

4) モルモット CYP3A の分子種特異的変動

4 種類の抗ヒト CYP3A 抗体を用いたイムノブロット分析の結果、他の動物種と同様にモルモット肝ミクロゾーム中には複数の CYP3A 分子種が存在し、同じ CYP3A サブファミリーに属していてもアスコルビン酸欠乏によってそれぞれが異なった量的な変動を示すことが示唆された。そこでモルモット肝 cDNA ライブラリーより、CYP3A ファミリーに属する 4 種の cDNA クロンを単離した (GP-24、GP-21、GP-11 および GP-14)。この中で GP-24、GP-21 および GP-11 は国際命名委員会によってそれぞれ CYP3A14、CYP3A15 および CYP3A17 と命名された。CYP3A14、CYP3A15、CYP3A17

および GP-14 のアミノ酸配列の相同性は 92.4 - 99.6% と極めて高い値を示した。一つの動物種における CYP3A 分子種のアミノ酸配列の相同性が 90% 以上である例はモルモットが最初である。このようなことから塩基配列やアミノ酸配列の違いだけから本研究で単離した 4 つの CYP3A 分子種が、各々異なる CYP3A 分子種であると断定することは難しいと考え、CYP3A 分子種の誘導剤である Dex の投与や成長に伴う発現量の変化を検討した。その結果、極めて高い相同性を示した 4 つの CYP3A 分子種は、モルモットの肝に常在し、それぞれが異なった発現様式を示す P450 分子種であることが分かった。

次にこれら 4 種の CYP3A 分子種の mRNA 量がアスコルビン酸欠乏によりどのような変化を示すかについて、S1 マッピング法により検討した。その結果、CYP3A14 および CYP3A18 の mRNA 量はアスコルビン酸欠乏の影響を受けなかったが、CYP3A15 および CYP3A17 の mRNA 量は明らかに減少した。このように同じ CYP3A サブファミリーに属していながらそれぞれの分子種の発現はアスコルビン酸欠乏により異なる変動を示すことを明らかにした。

近年、ヒトの栄養状態は改善し、ビタミン欠乏症を呈するヒトの数は減少している。しかし、潜在性ビタミン欠乏状態にあるヒトがかなり存在するといわれている。喫煙者は非喫煙者に比べ血漿中のアスコルビン酸濃度が明らかに低くなり、喫煙者の半分以上が潜在的欠乏状態になっていることが知られている。また、健康な人においても加齢・老化に伴って、体内のアスコルビン酸濃度は次第に低下する。特に病院食中に含まれるアスコルビン酸含量が低いことから老人の長期入院患者の体内アスコルビン酸濃度は著しく低く潜在的欠乏状態に陥っていることが問題となっている。現段階では、アスコルビン酸欠乏に関して動物実験で得られた結果を直接ヒトに当てはめることやヒトにおけるデータの蓄積がないためヒトでの予測をすることは困難であるが、高齢者に対する薬物療法が問題になっているなど臨床上大きな問題がある以上さらなる研究が期待される。

以上、本研究ではアスコルビン酸欠乏によるチトクローム P450 の変動に関して高度な研究を展開し、大きな成果をおさめた。本論文「アスコルビン酸欠乏によるモルモット肝チトクローム P450 の分子種特異的変動に関する研究」に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。