

学 位 論 文 題 名

Biological defense system against xenobiotics in meat-producing animals

(外来性の化学物質に対する食肉用動物の生体防御システム)

学位論文内容の要旨

有蹄類をはじめとする食肉用動物は、植物由来の化学物質の他、飼料添加物、動物用医薬品、環境汚染物質など、多くの外来化学物質に曝露される。しかしながら、これらの種では、生体に取り込まれた外来化学物質に対する生体防御機構については知られていない。外来性化学物質を代謝する異物代謝酵素に関して、哺乳類では、第I相反応においてシトクロムP450(P450、CYP)、第II相反応ではグルクロン酸転移酵素(UGT)などの抱合酵素が化学物質に対する生体防御の主要な機構として働いている。一方でこれらの酵素群は外来化学物質を代謝的に毒性化することがあり、特にP450の分子種のひとつ、CYP1Aはがん原物質の90%以上の活性化に関与していることが報告されている。また、第I相、第II相反応には大きな種差が存在することも報告されている。そこで本研究では、食肉用動物において、シトクロムP450を中心に様々な外来化学物質を代謝する生体防御の機構を明らかにすることを目的とした。

第1章ではウシの各臓器(肝臓、乳腺、肺、脾臓、腎臓、心臓、筋肉、舌)に外来化学物質代謝のためにどのような異物代謝酵素が発現しているのかをmRNAレベルで明らかにした。CYP1A1様分子種は肝臓を中心に殆どの臓器に発現しており、これまでP450発現の報告がなかった舌においてもCYP1Aの比較的高い発現が認められた。CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1、CYP3A4に関しては肝臓での発現が検出されたが、他の哺乳類同様、それ以外の臓器では発現レベルが低いかあるいは検出限界以下であった。興味深いことにCYP2B6様分子種は肝臓と、特に肺で高い発現レベルを示した。グルクロン酸転移酵素の分子種のひとつUGT1A1およびグルタチオン転移酵素(GST)A1については、殆どの臓器で発現しており、これまでに報告されているラットやマウスの抱合酵素とは異なる発現分布を示すことが分かった。

第2章では食肉用動物としてウシに加えてウマ及びシカのCYP1Aを中心にその酵素学的特徴を同定した。ウシ、シカ、ウマ、および対照動物としてのラットから肝臓ミクロソームを調製し実験に用いた。CYP1A1依存のエトキシレゾルフィンO脱エチル化活性(EROD)、およびCYP1A2依存のメトキシレゾルフィン(MROD)について、代謝活性を測定したところ、ウシやウマでは顕著に高いEROD活性を示した。特にウマ肝臓のERODは高いV_{max}を示すことから、ラット、シカ、ウシに比べて有意に高い酵素効率V_{max}/K_m値を示した。またいずれの動物種においてもERODおよびMRODはCYP1A依存の代謝活性であることが、抗体および阻害剤添加後の

代謝活性測定実験により明らかとなった。また、Lineweaver-Burkプロットにより、ウマではCYP1AがEROD反応に主要に寄与しているが、1種類の酵素ではなく、基質親和性の高い酵素と低い酵素の2種類の酵素がこの反応に関わっている可能性も示された。

第3章ではこれらの動物種における変異原物質の代謝的活性化および解毒の機能について明らかにした。遺伝子毒性を持つベンゾ[a]ピレンはCYP1A1によって代謝的に活性化される。そこで、ベンゾ[a]ピレンを基質として、ウシ、シカ、ウマおよびラットの肝臓酵素画分を用いて復帰突然変異原性試験(Ames試験)を実施した。CYP1A依存の代謝活性の高いウマでは、Ames試験においても、他の動物種に比べてベンゾ[a]ピレンの高い代謝的活性化能を示した。しかし、Ames試験の系に補酵素(グルクロン酸およびグルタチオン)を加えるとこれらの変異原性は減少し、補酵素添加による変異原性の抑制の程度もウマで最も顕著であることが分かった。従ってウマでは、高いCYP1A依存活性によって外来化学物質を代謝的に活性化するが、第II相抱合酵素による解毒機構も顕著に高いことが明らかとなった。

第4章ではウマなどでCYP1A依存の活性が高い原因を明らかにすることを目的として実験を行った。まずウマやウシ、シカおよびその対象動物としてラットの肝臓から化学物質の抽出を行い、肝臓に含まれるCYP1Aを誘導する化学物質の分析を行った。CYP1Aを誘導する多環芳香族類はいずれの食肉用動物の肝臓においても検出されたが、その濃度は極めて低く、またCYP1Aの発現や活性との相関は認められなかった。そこで、草食性動物に蓄積が高いカロテノイド類について分析を行ったところ、各動物のCYP1A発現およびその代謝活性と β カロテン蓄積量が高い相関を示すことが分かった。次に各動物の肝臓から抽出したカロテノイドをラットの肝がん由来の肝細胞H4IIE細胞に曝露したところ、ウマ肝臓から抽出したカロテノイド類がmRNAレベルで最も高いCYP1A1誘導能を示した。ウマ肝臓から抽出したカロテノイド分画に曝露した細胞ではCYP1A依存の活性も高く、たんぱく質発現量も上昇した。各種動物の肝臓中のカロテノイド濃度とin vitroで曝露したH4IIE細胞のCYP1A発現量が相関を示すことから、これらの有蹄類、特にウマ肝臓で示されたCYP1Aの高い発現や高活性はカロテノイドによる誘導が原因の一つであることが初めて明らかとなった。

第5章ではエジプトで重要な食肉用動物であるラクダに関して、CYP1A1をクローニングし、その臓器の発現分布を明らかにした。興味深いことに、ラクダではウシ同様、肝臓や肺以外に舌においても顕著に高いCYP1A1発現を示した。

以上の結果から、1) 様々な変異原物質やがん原物質の代謝的活性化を行うCYP1Aは、ラットに比べてウマやウシで顕著にその発現や代謝活性が高い、2) これらの動物種では変異原物質の解毒の代謝経路となっている第II相反応によって、変異原物質の高い代謝的活性化能による遺伝毒性はキャンセルされている、3) CYP1Aの発現およびその代謝活性が高いのはカロテノイド、特に β カロテンの蓄積が原因の一つであることが示唆される、4) エジプトの重要な食肉動物の一つであるラクダでも、他の有蹄類と同じく、肝臓や肺以外に、舌においても高いCYP1A発現が認められる、ことが明らかとなった。従って、本研究によって、有蹄類である食肉用動物ではP450の臓器分布の発現様式がラットなどの実験動物とは異なること、また食肉用動物の中でもウマは高いCYP1A発現および代謝活性を示し、その原因の一つがカロテノイドの高濃度の蓄積であることが初めて明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 塚 真由美
副 査 教 授 木 村 和 弘
副 査 教 授 坪 田 敏 男
副 査 准教授 乙 黒 兼 一

学 位 論 文 題 名

Biological defense system against xenobiotics in meat-producing animals

(外来性の化学物質に対する食肉用動物の生体防御システム)

有蹄類をはじめとする食肉用動物は多くの外来化学物質に曝露される。しかしながら、これらの種では、化学物質に対する生体防御機構については知られていない。外来性化学物質を代謝する異物代謝酵素は、第I相反応においてシトクロムP450(P450、CYP)、第II相反応ではグルクロン酸転移酵素(UGT)などの抱合酵素が化学物質に対する生体防御の主要な機構として働いている。一方でこれらの酵素群は外来化学物質を代謝的に毒性化することがあり、特にP450分子種CYP1Aはがん原物質の90%以上の活性化に関与していることが報告されている。そこで本研究では、食肉用動物において、シトクロムP450を中心に様々な外来化学物質を代謝する生体防御の機構を明らかにすることを目的とした。

第1章ではウシの各臓器（肝臓、乳腺、肺、脾臓、腎臓、心臓、筋肉、舌）に外来化学物質代謝のためにどのような異物代謝酵素が発現しているのかをmRNAレベルで明らかにした。CYP1A1様分子種は肝臓を中心に殆どの臓器に発現しており、これまでP450発現の報告がなかった舌においてもCYP1Aの比較的高い発現が認められた。UGT1A1およびグルタチオン転移酵素(GST)A1については、殆どの臓器で発現しており、これまでに報告されているラットやマウスの抱合酵素とは異なる発現分布を示すことが分かった。

第2章では食肉用動物としてウシに加えてウマ及びシカのCYP1Aを中心にその酵素学的特徴を同定した。ウシ、シカ、ウマ、および対照動物としてのラットから肝臓ミクロソームを調製し実験に用いた。CYP1A1依存のエトキシレゾルフィンO脱エチル化活性(EROD)について、代謝活性を測定したところ、特にウマ肝臓では高い V_{max} を示し、ラット、シカ、ウシに比べて有意に高い酵素効率 V_{max}/K_m 値を示した。またいずれの動物種においてもERODはCYP1A依存の代謝活性であることが明らかとなった。また、Lineweaver-Burkプロットにより、ウマではCYP1AがEROD反応に主要に寄与しているが、基質親和性の高い酵素と

低い酵素の2種類の酵素がこの反応に関わっている可能性も示された。

第3章ではこれらの動物種における変異原物質の代謝的活性化および解毒の機能について明らかにした。遺伝子毒性を持つベンゾ[a]ピレン (B[a]P) はCYP1A1によって代謝的に活性化される。そこで、B[a]Pを基質として、ウシ、シカ、ウマおよびラットの肝臓酵素画分を用いて復帰突然変異原性試験 (Ames試験) を実施した。CYP1A依存の代謝活性の高いウマでは、他の動物種に比べてB[a]Pの高い代謝的活性化能を示した。しかし、Ames試験の系にグルクロン酸およびグルタチオンを加えるとこれらの変異原性は減少し、これらの添加による変異原性の抑制の程度もウマで最も顕著であることが分かった。

第4章では有蹄類のCYP1A依存の活性が高い原因を明らかにすることを目的として、ウマやウシ、シカおよびその対象動物としてラットの肝臓から化学物質の抽出を行い、肝臓に含まれるCYP1Aを誘導する化学物質の分析を行った。しかし、CYP1Aを誘導する多環芳香族類の蓄積濃度は極めて低く、またCYP1Aの発現や活性との相関は認められなかった。そこで、草食性動物に蓄積が高いカロテノイド類について分析を行ったところ、各動物のCYP1A発現およびその代謝活性と β カロテン蓄積量が高い相関を示すことが分かった。次に各動物の肝臓から抽出したカロテノイドをラットの肝がん由来の肝細胞H4IIE細胞に曝露したところ、ウマ肝臓から抽出したカロテノイド類が最も高いCYP1A1誘導能を示した。各種動物の肝臓中のカロテノイド濃度と*in vitro*で曝露したH4IIE細胞のCYP1A発現量が相関を示すことから、有蹄類CYP1Aの高い発現や高活性はカロテノイドによる誘導が原因の一つであることが初めて明らかとなった。

第5章ではエジプトで重要な食肉用動物であるラクダに関して、CYP1A1をクローニングし、その臓器の発現分布を明らかにした。興味深いことに、ラクダではウシ同様、肝臓や肺以外に舌においても顕著に高いCYP1A1発現を示した。

以上の結果から、有蹄類である食肉用動物ではP450の臓器分布の発現様式がラットなどの実験動物とは異なること、また食肉用動物の中でもウマは高いCYP1A発現および代謝活性を示し、その原因の一つがカロテノイドの高濃度の蓄積であることを初めて明らかにした。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者Wageh Sobhy Abdelrahem Abdallah Darwish氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。