

Title	Molecular cloning and structural analysis of cDNAs encoding cytochrome P-450s from phenobarbital-treated rabbit liver microsomes
Author(s)	小森, 雅之
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2514
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【5】

氏名・(本籍)	小 森 雅 之
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 7372 号
学位授与の日付	昭和61年6月21日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	フェノバルビタール処理したウサギ肝マイクロゾームのチトクローム P-450のcDNAのクローニングとその構造解析
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤 了 (副査) 教授 松原 央 教授 二井 将光

論 文 内 容 の 要 旨

我々はウサギ肝マイクロゾームより10種以上のチトクロームP-450を精製し、その分子多様性を蛋白レベルで明らかにしてきた。最近ではDNAレベルでもその分子多様性が証明され、フェノバルビタール(PB)処理ラット肝ではその主成分P-450にmicroheterogeneityが存在することが明らかとなった。本研究ではPB処理ウサギ肝において、その分子多様性及びmicroheterogeneityの存在の有無をDNAレベルで解明するためにその分子クローニングを行った。

まず、PB処理ウサギ肝マイクロゾーム画分よりRNAを抽出し、オリゴ(dT)セルロース、ショ糖密度勾配遠心により部分精製した。得られた18-21SmRNAに対するcDNAを修復系を用いて合成し、大腸菌を形質転換した。ラットP-450b(PB主成分)に対するcDNAをプローブに用いてスクリーニングしたところ、8個(うち3個は完全長を含む)の異なるcDNAクローニンが得られた。クローンpHP-1, pHP-2, pHP-3はそれぞれ491, 490, 490残基より成るポリペプチドをコードしており、pHP-2のみポリ(A)配列を含んでいた。pHP-2とpHP-3はpHP-1に比べCysとAsnを2-3倍多く含んでいた。これらの間の一次構造のホモロジーが50%程度にもかかわらず、そのヒドロパシーは互いに非常に類似したパターンを示した。MO46, B14, 及びB52の3個のクローンはpHP-1と97%のホモロジーを示し、ウサギにもラット同様にmicroheterogeneityが存在することが明らかとなった。また、B14がP-450₁(PBウサギ主成分)に対応することがわかった。しかし、そのアミノ酸置換のパターンはラットと異なり分子全体に分散していた。クローンM12はウサギプロテゲステロンの21-ヒドロキシラーゼと91%ものホモロジーを示した。クローンb43は他のどのP-450とも似ておらず、Northernプロット分析よりPBよりもむしろ3-メチルコラントレン、 β -

ナフトフラボン、及びイソサフロールで誘導されることがわかった。本研究及び他グループの研究によりその構造が明らかとなったP-450間のホモロジーを比較すると、ウサギ肝には少なくとも5つのグループより成るP-450群が存在し、各グループ内には程度の差はあるがさらにmicroheterogeneityが存在することが示唆された。実際にSouthernブロット分析よりpHP-1及びpHP-2を含むグループはそれぞれ異なるmultigene familyに属することがわかった。また、この大きなP-450群の一次構造の比較により共通したアミノ酸がよく保存されている個所がいくつも見出され、これらの領域がP-450全般に共通した機能に関与していると考えられる。

論文の審査結果の要旨

肝細胞マイクロゾームには多種類のチトクロームP-450が存在するが、この分子多様性の生物学的意義は不明である。これを解明するためには、できるだけ多種類のP-450の一次構造を比較することが重要である。小森君の研究はこの目的のために、フェノバルビタール(PB)を投与してP-450を誘導させたウサギ肝のmRNAからP-450にコードするP-450のcDNAをクローニングし、その構造解析を行ったものである。

PBを投与したウサギ肝から抽出したRNAからP-450mRNAを部分精製し、これからcDNAを含むベクターを合成し、大腸菌を形質転換した。ラット肝のPB誘導性のP-450bに対応するcDNAをプローブとすることによって、完全長のもの3個を含む8個のcDNAクローンを単離することができた。これら8個のcDNAのヌクレオチド配列のすべてを決定したところ、完全長のクローンは490または491アミノ酸残基から成るポリペプチドをコードしており、それぞれ異なるクローンであることがわかった。完全長および非完全長のcDNAの構造解析とすでに一次構造の明らかになっているPB誘導性のウサギ肝マイクロゾームのP-450分子種との比較からPBを投与したウサギの肝マイクロゾームには少なくとも4群のP-450が存在すること、また各群にはさまざまな程度のmicroheterogeneityが見られることが明らかになった。事実、ウサギのゲノムDNAのSouthernブロット分析により少なくとも2群のP-450をコードする遺伝子はそれぞれかなり多数存在することが明らかとなった。

これらの結果は肝マイクロゾームのP-450の分子多様性の意義について重要な示唆を与えるものであって、この論文は理学博士の学位に十分価値のあるものと認められる。