



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	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2514">https://hdl.handle.net/11094/2514</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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ミ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 將光

## 論文内容の要旨

我々はウサギ肝ミクロゾームより 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 (P B) 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 P B 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、P B 処理ウサギ肝ミ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 18-21S mRNA 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-450 b (P B 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 クローニングが得られた。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、そのハイドロ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-450<sub>1</sub> (P B 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-ハイドロキシラーゼと 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 P B 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プロット分析より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

肝細胞ミ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-450 mRNA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-450 b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誘導性のウサギ肝ミクロゾームのP-450分子種との比較からPBを投与したウサギの肝ミ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プ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。

これらの結果は肝ミクロゾームの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。