The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	慢性エタノール摂取により誘導されるチトクローム P450 アイソザイムーP450 II E1- の誘導機序の検討
Author(s)	柏尾, 真司
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37549
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【126】

氏名・（本籍）	柏（かし） 尾（お） 真（しん） 司（じ）
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9480 号
学位授与の日付	平成3年2月4日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**慢性エタノール摂取により誘導されるチトクロームP450アイソザイムーP450ⅡE1ーの誘導機序の検討**
論文審査委員	（主査）教授 鎌田 武信 （副査）教授 田川 邦夫 教授 岡本 光弘

論文内容の要旨

【目　的】

慢性エタノール摂取により肝ミクロゾームのチトクロームP450が誘導され,P450を介するエタノール酸化が亢進することが知られている。P 450は多種の分子種より構成され，エタノールにより誘導されるP 450アイソザイムとしてP 450 IIE1が，実験動物ならびにヒトの肝より分離精製されている。P450 IIE1は他のP450分子種に比べ極めて高いエタノール酸化活性を有し,その誘導はアセトアルデヒド産出を亢進させるため，肝P450 IIE1の誘導はアルコール性肝障害発症の一因と考えられる。しかしながら慢性アルコール摂取時の肝P450 IIE1誘導の分子生物学的機序は未だ明らかでない。本研究の目的は，P450 IIE1をコードするmRNA量をエタノール投与ハムスター肝において検討することにより，エタノール投与による肝P450 IIE1の誘導機序を明らかにすることにある。

【方　法】

雄性ハムスター（体重80～100ｇ）に，10%エタノール含有飲料水を自由摂取法にて10日間投与しエタノール投与群（n=4）とした。エタノール投与は実験直前まで行い，無処置ハムスターを対照群（n=4）とした。肝より超遠心法にてミクロゾームおよびポリゾームを，さらに後者よりpoly A+RNAを分画し，P450IIE1ならびにP450IIE1 mRNAの解析に供した。抗P450IIE1抗体は精製P450IIE1を家兎に免疫し作製した。P450IIE1 cDNAは，λgt11ヒト肝cDNAライブラリーより抗ヒトP450IIE1抗体陽性ファージを分離して作製した。作製したcDNAがヒトP450IIE1 cDNAと一致することは，制限酵素地図ならびにDNAシークエンス解析により確認した。PCR法にて増幅したcDNA（1.1kb）をフォトビオチン標識し，これをプローブとするハイブリダイゼーション法によりP450IIE1 mRNA 量を検

討した。また，in vitro translation法にてpoly A+ RNAを介して生成されるP450IIE1量を35S-メチオニンの取り込みより求めた。肝ミクロゾームを用い，SDS-PAGEおよび抗ヒトP450IIE1抗体によるイムノブロットからP450IIE1蛋白量を検討するとともに，ethanol oxidation をガスクロマトグラフィー法，p-nitrophenol hydroxylationおよびbenzphetamine N-demethylation を比色法にて測定した。

【成　績】

① エタノール投与後の肝総P450量は対照群に比し有意の増加を示した。SDS-PAGE上，54kd の蛋白として認められるP450IIE1蛋白に一致する蛋白バンドの増強が，エタノール投与後に認められた。抗P450IIE1抗体によりP450IIE1蛋白は単一の蛋白バンドとして検出され，エタノール投与後のP450IIE1蛋白バンドの明らかな増強が観察された。エタノール投与後の肝P450IIE1量は，対照群に比べ約2倍に有意に増加していた。ミクロゾーム分画でのethanol oxidation及びp-nitrophenol hydroxylation活性は，エタノール投与群において対照群に比しそれぞれ210％及び270％と有意の増加を示し，肝P450IIE1の誘導を反映していた。これに対し，P450IIE1非依存性のbenzphetamine N-demethylation活性には差を認めなかった。

② ハムスター肝ポリゾームpoly A+ RNA分画において，ヒトP450IIE1 cDNAの60％に相当するcDNAにより1.9kbの単一mRNAバンドが検出された。エタノール投与後に，このP450IIE1 mRNAバンドの明らかな増加が認められ，エタノール投与後のP450IIE1 mRNAレベルは対照群に比し2倍の有意の増加を示した。エタノール投与後，poly A+ RNA分画でのP450IIE1生成量も対照群の220％に有意の増加しており，エタノール投与後の肝P450IIE1 mRNAの増加を反映していた。

③ ハイブリダイゼーション法ならびにin vitro translation法による検討にて得られたエタノール投与後の肝P450IIE1 mRNA量の増加は，免疫化学的ならびに酵素活性の検討より得られた肝P450IIE1誘導とよく一致していた。

【総　括】

アルコール性肝障害発症の一因と考えられる肝P450IIE1の誘導機序をヒトP450IIE1 cDNA及び抗ヒトP450IIE1抗体を用いて検討し，ハムスター肝ではエタノール投与によりP450IIE1生成をコードするmRNAの増加を介して肝P450IIE1が誘導され，エタノール酸化能の亢進に関与することを明らかにした。このことより，慢性アルコール摂取時の肝P450IIE1の誘導にはP450IIE1 mRNAの合成の促進あるいは分解の抑制が関与していると考えられた。今後ヒトP450IIE1 cDNAを応用してヒト肝におけるP450IIE1誘導の機序を解明することにより，アルコール性肝障害の遺伝素因子としてのP450IIE1誘導を遺伝子レベルで解析することが可能になると期待される。

論文審査の結果の要旨

近年のアルコール消費量の増大にともない，アルコール性肝障害の頻度は増加しており，その機序の解明は臨床医学上重大な課題となっている。慢性飲酒時のエタノール代謝には肝ミクロゾームでのエタノール酸化が重要であり，その誘導にともなうエタノール代謝の亢進はアセトアルデヒド産出を増加させるため，アルコール性肝障害発症の一因と考えられる。

本研究は，エタノール投与により誘導され，かつ極めて高いエタノール酸化活性を有するP450アイソザイムであるP450IIE1の誘導機序をmRNAレベルで検討したものであり，エタノール投与によりP450IIE1をコードするmRNAの増加を介してP450IIE1が誘導され，ミクロゾームでのエタノール酸化能が亢進することを明らかにした。

本研究の成果は，アルコール性肝障害の病態解明に新たな知見をもたらすものであり，よって本研究は学位に値すると考える。