



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-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）	かし 柏	お 尾	しん 真	じ 司
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 4 8 0	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-P450 II E1-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。P450 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 P450 アイソザイムとして P450 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 80～100 g）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、P450 IIE1 ならびに P450 IIE1 mRNA の解析に供した。抗 P450 IIE1 抗体は精製 P450 IIE1 を家兎に免疫し作製した。P450 IIE1 cDNA は、 λ gt11 ヒト肝 cDNA ライブラリーより抗ヒト P450 IIE1 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 P450 IIE1 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（1.1 kb）をフオートビオチン標識し、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 P450 IIE1 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 1.9 kb 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思える。