

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37549">https://hdl.handle.net/11094/37549</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【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、 $\lambda$ 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考える。