

Title	Molecular Characterization and Biological Functions of Cytochrome P450s in CYP4A and CYP4B Subfamilies
Author(s)	今岡, 進
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/996">https://hdl.handle.net/11094/996</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	いま 今	おか 岡	すすむ 進
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)		
学位記番号	第 1 6 4 6 0 号		
学位授与年月日	平成13年6月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文名	Molecular Characterization and Biological Functions of Cytochrome P450s in CYP4A and CYP4B Subfamilies (CYP4A 及び CYP4B サブファミリーに属するチトクローム P450の蛋白質化学的性質と生理機能の解明)		
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 俊治		
	(副査) 教授 倉光 成紀 教授 河村 悟 教授 嶋本 典夫		

### 論 文 内 容 の 要 旨

チトクローム P450 (P450) はヘムを有するモノオキシゲナーゼで、現在知られている蛋白質の中では最も大きなスーパーファミリーを形成している。現在明らかになっている機能としては、肝臓における薬物などの外来異物代謝、副腎におけるステロイドホルモンの生合成、そのほかコレステロール代謝、ビタミン D<sub>3</sub> の活性化、レチノール代謝とその働きは多岐にわたる。本論文は、肝臓について P450 の含量の高い臓器でありながら、その蛋白質化学的性質や機能が明らかでなかった腎臓の P450 について、酵素精製からはじめて、発現調節メカニズム解析、cDNA クローニング、トランスジェニックマウス作製による生理機能解析まで行った研究をまとめたものである。

1. ラットの腎ミクロゾームから3種類 (CYP2C23、CYP4A2、CYP4A8)、ヒトの腎ミクロゾームから1種類の P450 分子種 (CYP4A11) をそれぞれ新規 P450 を精製した。CYP4A2 はラットの腎臓では主たる分子種で、ヒト CYP4A11 と N-末端のアミノ酸配列に相同性が見られた。CYP4A2、CYP4A11 はラウリン酸やアラキドン酸の末端の炭素の水酸化 ( $\omega$ -水酸化) をした。後に、アラキドン酸の  $\omega$ -水酸化体が強い血管収縮作用を示すこと、そして高血圧で CYP4A2 の発現が高まっていることが明らかにされた。
2. 腎臓における CYP4A2 の発現は、雄ラットが雌の約5倍高いことを見いだした (雌には類似の CYP4A3 が存在)。そして、その発現は脳下垂体から分泌される成長ホルモン及びアンドロジェンによって調節されていることを明らかにした。
3. CYP4A2 は糖尿病で誘導され、そのメカニズムとして甲状腺ホルモンによる発現抑制を明らかにした。
4. ラット CYP4A3 cDNA をプローブにして、ヒト腎臓 cDNA ライブラリーから新規 P450 cDNA を単離した。DNA 配列から推測されるアミノ酸配列は、以前精製した CYP4A11 と一致し、これがヒトの腎臓において主たる P450 であることが明らかになった。昆虫細胞を用いて蛋白質を発現させたところ、その酵素としての性質は、ヒト腎臓から精製したものと一致した。
5. マウス腎臓において、3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼン (3-MeO-AAB) を変異原物質に活性化する P450 を精製した。この P450 は cDNA クローニングし、DNA 配列を決定した結果、CYP4B1 という新規の P450 であった。
6. ラットから精製した CYP4B1 はマウスのものと同様に、2-ナフチルアミンやベンチジンのような膀胱癌誘発物質を活性化した。また、免疫染色によって膀胱粘膜に発現が確認された。この、結果は CYP4B1 が膀胱癌発症

に関与する可能性を示唆するものである。

7. 一般にヒトや実験動物において、膀胱癌発症には性差が見られ、雄性が顕著に高い。ラット膀胱において CYP4B1 は雄に高く発現し、テストステロンによる発現調節を受けていた。この結果は、膀胱癌発症における性差が CYP4B1 の発現量の差で説明できる可能性を示している。
8. CYP4B1 の高感度検出法を確立し、ヒトの膀胱における発現量を検討した。その結果、他の癌患者に比べて、膀胱癌患者には顕著に高い発現が見られた。このことは、CYP4B1 の発現が膀胱癌発症のリスクファクターになる可能性を示唆している。
9. ヒト CYP4B1 は不安定でこれまでその酵素活性は明らかでなかった。ヒト CYP4B1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出することにより活性測定に成功した。発現した CYP4B1 は癌原性芳香族アミンを強く活性化した。

以上の知見から、CYP4A 分子種がアラキドン酸代謝による腎機能調節や血圧調節の生理機能を有していること、そして CYP4B 分子種が癌原性芳香族アミン活性化による発癌に関与していることを明らかにできた。

### 論文審査の結果の要旨

今岡 進先生は、高等動物の腎臓の P450 分子ファミリーについて、精製酵素による蛋白質化学的解析、cDNA のクローニングと遺伝子発現調節機構の解析、及びトランスジェニックマウスを用いた生理機能の解析を広範に行い、以下の知見を得た。

- 1) ラット、ヒトの腎臓ミクロソームから 4 種の新規 P450 を単離し、アラキドン酸等の  $\omega$  水酸化活性を持つことを示し、特定の分子種 (CYP4A2) の発現が雄で高く、成長ホルモンやアンドロジェンにより制御されていることを明らかにした。また、その発現が高血圧や糖尿病との病態と関連していることも示した。
- 2) マウスやラット腎臓から変異源物質を活性化する P450 を精製し、新規の分子種 CYP4B1 を同定した。ベンジジンのような膀胱癌誘発物質の活性化を通して、癌発症に関与する可能性、及び発現がテストステロンで調節されることから性差による癌発症と関連することを指摘した。さらに、CYP4B1 の高感度検出法を確立し、この発現量が癌発症のリスクファクターであることを示した。
- 3) ヒト CYP4B1 のトランスジェニックマウスを作出し、*in vivo* での活性測定に成功し、癌原性芳香族アミンの活性化が起こることを証明した。

これらの業績は、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。