



|              |  |
|--------------|--|
| 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         |  |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 今岡<br>いまおか<br>すすむ  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(理学)   |
| 学位記番号      | 第16460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<br>(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)<br>教授 長谷俊治  |
|            | (副査)<br>教授 倉光成紀 教授 河村悟 教授 鳴本典夫   |

### 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。

- 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(ω-水酸化)をした。後に、アラキドン酸のω-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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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ω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エ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。