

別 紙

論 文 の 内 容 の 要 旨

獣医学 専 攻

平成20年度博士課程 入学

氏 名 上田 直也

指導教員名 久和 茂

論文題目 The characterization of bat xenobiotic metabolizing  
enzymes

(コウモリの外来異物代謝酵素の特性)

コウモリは、哺乳類の中で唯一飛翔能力を有する。それに加えて、コウモリは他の哺乳類と比べてエネルギー消費が大きいにも関わらず、同じ大きさの他の哺乳類と比較して、平均寿命が長い。このようにコウモリは、独特な生態を持つ動物であるが、超音波に関する知見を除けば、その生理学的特性は、あまり知られていない。本研究では、コウモリが外界からどのように物質を取り込み、代謝していくのかを明らかにするため、コウモリの外来異物代謝系に注目し研究を行った。

哺乳類の外来異物代謝において最も重要な臓器は肝臓である。経口摂取された化合物の多くは、腸管から吸収されたのち、全身の血液循環に入る前に肝臓を通過する。その際、多くの化合物は肝臓に発現する代謝酵素により代謝を受ける。これを初回通過効果といい、外来異物の解毒ならびに排出において極めて重要な

作用である。哺乳類の肝臓において、外来異物代謝は主に第 1 相酵素と呼ばれるチトクローム P450 (以下、CYP) ならびに第 2 相酵素と呼ばれるグルクロンサン抱合酵素 (以下、UGT) などにより代謝を受けることが知られている。本研究では、コウモリにおいて外来異物代謝の特性を解明すべく、その主体を担う CYP ならびに UGT を対象にして研究を行った。

## 第 1 章 コウモリの肝臓に発現する外来異物代謝酵素の酵素活性について

コウモリの肝臓における CYP の酵素活性の特性を調べるために、フィリピンで捕獲した 10 種のコウモリを用いて検索を行い、ヒトおよび薬物代謝研究に頻繁に用いられるラットとの種差を検討するとともに、コウモリ種間においても比較検討を行った。本研究では、ヒトの肝臓に発現の高い CYP1A、CYP2A、CYP2B、CYP2C、CYP2D、CYP2E ならびに CYP3A の 7 つのサブファミリーを認識する 8 つの酵素反応を指標に実験を行った。コウモリの肝臓から CYP や UGT を多く含むミクロソーム分画を抽出し、各 CYP アイソフォームに特異的な基質と反応させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生成物の量を測定した。その結果、コウモリ種間でばらつきはみられるものの、CYP1A、CYP2B および CYP2D に対する特異的な酵素反応系においてヒトの活性よりも高い種が多い傾向にあった。このうち CYP1A は、ヒトの肝ミクロソームにおいても比較的発現が高いことが知られており、コウモリの肝臓では相対的に重要な位置を占めていると推察された。特にココウモリでは、オオコウモリに比べて総じて高い活性を示す傾向がみられた。一方で、ヒトの肝臓において発現が高い CYP3A および CYP2C9 は、総じてコウモリにおいては活性が低く、これらの酵素に対する依存度はヒトと比べて低いと考えられた。ヒトの CYP2C19 に選択的である *S*-メフェニトイン水酸化活性やヒトの CYP2A6 選択的であるクマリン水酸化活性は、コウモリの肝ミクロソームで検出できないか、極めて低い活性であった。

さらに、CYP と外来異物との相互関係をより詳細に検討するために、コウモリの肝ミクロソームと反応性が高かった 4 つの測定系を用いて、反応速度パラメータであるミカエリス定数 ( $K_m$ ) ならびに最大反応速度 ( $V_{max}$ ) を求め、酵素反応の評価を行った。本学で飼養しているデマレルーセットオオコウモリならびに和歌山県で捕獲したユピナガコウモリを実験に用いた。デマレルーセットオオコウモリ 5 匹およびユピナガコウモリ 5 匹の肝臓を用いて pooled microsome を作成し、様々な濃度の基質と反応させ HPLC により生成物の定量を行った。CYP1A 特異的なエトキシレゾルフィン脱アルキル化活性 (EROD) では、フィリピンのコウモリでみられた傾向と同様、ココウモリであるユピナガコウモリが他種と比較して

$V_{max}$  が大きく、コウモリの肝臓では CYP1A が高い活性を持つことが示唆された。一方、テストステロン 6 $\beta$ 水酸化反応(CYP3A)およびクロロゾキサゾン水酸化活性(CYP2E)は、いずれもイヌやヒトと比べて  $V_{max}$  が小さかった。また、コウモリでは、 $V_{max}$  が小さいにもかかわらず  $K_m$  値が高く、イヌやヒトの CYP2E1 とは酵素活性の異なる酵素がこの反応の担い手である可能性が示唆された。コウモリ間では、デマレルーセットオオコウモリは、ユビナガコウモリより顕著に酵素活性が高いことも、pooled microsome および個別のミクロソームの両者で明らかになった。CYP2D によるブフラロール水酸化活性では、デマレルーセットオオコウモリはイヌやヒト同様  $K_m$  値が大きかったのに対し、ユビナガコウモリは既報のラットやブタ同様  $K_m$  値が小さかった。

また、UGT の選択的基質を用いて、コウモリの肝ミクロソームにおける UGT の酵素活性の検索を行った。本研究では、UGT1A による代謝が行われるスコポレチンならびに UGT2B7 の選択的基質として知られるアジトチミジンを用いた。スコポレチングルクロン酸抱合活性は、ユビナガコウモリで顕著に低い値を示した。一方で、またアジトチミジンの抱合活性もヒトに比べ著しく低いことが明らかになった。

## 第 2 章 コウモリに発現する代謝酵素の同定ならびにその臓器別発現の解析

コウモリの肝臓に発現する外来異物代謝酵素を同定し、主要臓器における発現を明らかにすべく、デマレルーセットオオコウモリおよびユビナガコウモリの肝臓から cDNA ライブラリを作成した。GenBank のデータを基に動物種間で相対性の高い部位に各アイソフォーム特異的プライマーを作成し、RT-PCR により目的の遺伝子断片を増幅した。増幅した断片のシーケンス解析を行い、得られた塩基配列をもとに推定アミノ酸配列を決定した。さらに、GenBank に登録されている他の哺乳動物と系統解析を行った。本研究では、CYP1A、CYP3A、CYP2D ならびに UGT1A の塩基配列の決定を試み、タンパク質コード領域の全長あるいは大部分を明らかにした。

## 第 3 章 コウモリ CYP1A の転写調節因子に関する研究

第 1 章で述べたように、コウモリの肝臓では CYP1A の酵素活性が他の動物種と比べて大きく、相対的に重要なアイソフォームであることが示唆された。CYP1A は外来異物の中でも TCDD を筆頭にするダイオキシン類や PCB などの環境汚染物質の代謝に関与し、それらによる発がんや免疫異常の発症に深く関わっている。環境汚染物質による生態へのこのような作用の多くは、ダイオキシンの

レセプターであり、CYP1A の直接的な制御因子でもある AhR を介することが知られている。そこで、本章ではコウモリに発現する AhR ならびにその補助因子である ARNT の同定を試みた。さらに、コウモリにおける AhR の発現を検索したところ、肝臓において発現が高いものの、腸管、腎臓、肺、脾臓でも一様に発現が確認された。CYP1A はダイオキシン類などの環境汚染物質に暴露されると、AhR の活性化を通じて転写誘導がおきることが知られており、CYP1A の発現ならびに酵素活性は、ダイオキシン類のバイオマーカーとして用いられることが報告されている。コウモリにおける酵素誘導を評価するために、合成フラボノイドである  $\beta$ -naphthoflavon (BNF) の投与を行った。実験に用いたエジプトルーセットオオコウモリでは、BNF 濃度依存的に酵素活性が増加し、肝臓における CYP1A のタンパク質発現ならびに mRNA 発現がみられた。

本研究を通じて、コウモリの外来異物代謝の特性の一端が明らかになった。コウモリは、主要な CYP アイソフォームの中で、他の哺乳類と比べて CYP1A への依存度が高く、一方でヒトにおいて発現の多い CYP3A および 2C などの酵素の活性は低かった。また、UGT の活性は、検索を範囲ではいずれも低かった。今後、コウモリの外来異物代謝活性を担う分子機構が明らかになっていけば、哺乳類の中にあって異質な生態を維持できる秘密を、分子生物学的に説明できることが可能になるかもしれない。