

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 上田 直也

コウモリは哺乳類の中で唯一飛翔能力を有する。また、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理・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する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。

外来異物代謝において最も重要な臓器は肝臓であり、チトクローム P450(以下、CYP) などの第1相酵素およびグルクロン酸抱合酵素(以下、UGT)などの第2相酵素により代謝を受ける。そのような背景から、CYP および UGT を主な研究対象としてコウモリの外来異物代謝系の特性を解析した。

第1章では、フィリピンで捕獲した10種のコウモリを用いて、ヒトの肝臓において発現の高い 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コウモリの CYP の検索を行った。その結果、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コウモリ種が多かった。このうち CYP1A は、コウモリ、特にココウモリの肝臓では主要な酵素の1つであろうと推察された。一方で、CYP3A および CYP2C9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。

コウモリの CYP の特性をさらに詳細に検討するために、ミカエリス定数(K_m)ならびに最大反応速度(V_{max})を求めた。本実験ではデマレルーセットオオコウモリおよびユピナガコウモリの肝臓を用いた。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、ユピナガコウモリが他種と比較して V_{max} が大きく、コ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6B 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。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、ユピナガコウモリはラットやブタ同様 K_m 値が小さかった。

第2章では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、コウモリの肝臓に発現する外来異物代謝酵素遺伝子を同定した。動物種間で相同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 法により目的の遺伝子断片を増幅した。常法に従い、各遺伝子の塩基配列の解析を行い、それをもとに推定アミノ酸配列を決定した。さらに、他の哺乳動物と系統解析を行った。本研究で CYP1A、CYP3A、CYP2D ならびに UGT1A の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。

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体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アリルヒドロカーボン受容体 (AhR) を介することが知られている。第3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 AhR 核移送体 (ARNT) の同定を試みた。その結果、コウモリの AhR は特徴的な遺伝子構造をしていることが明らかになった。また、コウモリの肝臓において AhR の高い発現が確認され、腸管、腎臓、肺、脾臓でも一様に発現が確認された。コウモリにおける CYP1A の酵素誘導を評価するために、合成フラボノイドである β -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 BNF 濃度依存的に CYP1A 酵素活性が増加し、CYP1A のタンパク質ならびに mRNA の発現が誘導され、コウモリにおいても CYP1A の発現誘導が起こることが示された。CYP1A 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が、コウモリはその候補であると考えられる。

以上の結果より、コウモリは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いなど、独特の外来異物代謝酵素の発現パターンを示すことが明らかとなった。これらの研究成果は獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値のあるものと認めた。