

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660102

研究課題名(和文) アスコルビン酸による肝臓シトクロムP-450維持機構の新規仮説の証明

研究課題名(英文) Functions and mechanisms of ascorbic acid in maintaining hepatic cytochrome P-450

研究代表者

堀尾 文彦 (Horio, Fumihiko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20165591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンCであるアスコルビン酸(AsA)の欠乏時には肝臓のヘムタンパク質であるシトクロムP-450(CYP)が減少し、薬物代謝能が低下する。しかし、このAsAの作用機構は明らかではなかった。本研究の結果、AsA生合成不能のODSラットのAsA欠乏時には肝臓のヘム分解の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の発現上昇が起こることを見出し、それに続いてCYP量の減少することを証明された。そして、AsA摂取下でもHO-1誘導剤投与が肝CYP量の減少させることを見出した。本研究により、AsA欠乏によりヘム分解が亢進して肝CYP量の減少をもたらすというAsAの新規な生理機能を提唱できた。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms underlying the decrease in hepatic cytochrome P-450 (CYP) content in ascorbic acid deficiency was investigated in scurvy-prone ODS rats. Firstly, ascorbic acid deficiency decreased hepatic microsomal total CYP content, CYP2B1/2B2 protein, and mitochondrial cytochrome oxidase (COX) complex IV subunit I protein, and simultaneously increased heme oxygenase-1 protein in microsomes and mitochondria. Next, heme oxygenase-1 inducers, that is lipopolysaccharide and hemin, were administered to phenobarbital-treated ODS rats fed sufficient ascorbic acid. The administration of these inducers decreased hepatic microsomal total CYP content, CYP2B1/2B2 protein, and mitochondrial COX complex IV subunit I protein. These results suggested that the stimulation of hepatic heme oxygenase-1 expression by ascorbic acid deficiency caused the decrease in CYP content in liver.

研究分野：栄養生化学

キーワード：アスコルビン酸 アスコルビン酸欠乏 シトクロムP-450 ヘム分解 ヘムオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

1970年代から、ビタミンCであるアスコルビン酸(AsA)生合成不能のサル、モルモット、ODSラットでAsA欠乏時には肝臓のシトクロムP-450(CYP)量の減少により薬物代謝能が低下するという、極めて重要なビタミンCの生理作用が見出された。CYPはヘム分子がアポタンパク質に結合したヘムタンパク質であるが、アポタンパク質の種類は極めて多く、すなわちCYPには極めて多く種類が存在する。CYPは酵素でありその機能は高等動物の生命の維持に必要なものから、生体には存在しない生体異物・薬物の代謝にいたるまで多岐にわたる。前者に含まれる機能としては、性ホルモン(男性ホルモン、女性ホルモン)の生合成、その他のステロイドホルモンの生合成、胆汁酸合成などが含まれ、後者には薬物代謝の第 相反応(酸化反応)が含まれる。それぞれの酵素反応を行うCYPが存在し、それらの発現の組織特異性もそれぞれの種類で異なる。AsA欠乏時には少なくとも、薬物代謝の第 相反応を触媒する肝臓のCYPが減少すると考えられた。そして実際にODSラットにおいて、薬物代謝酵素であるCYPの中で、特定の分子種のCYPがAsA欠乏によって減少することが報告された。( *Carcinogenesis*, 14, 2471(1993) )。この報告に加えて、我々はAsA生合成不能のODSラットにおいてAsA欠乏により薬物代謝酵素であるCYP2B1/2B2の減少することを見出している。このAsA欠乏による肝臓のCYPの減少機構については、モルモットを用いて、1975年から1985年にかけてヘムの生合成の低下の可能性、ヘム分解の亢進の可能性について検討がなされている。しかし、当時のヘム代謝に関する情報と解析技術においては、この減少機構を説明できる結果は得られていない。我々はこの減少機構を説明するために、仮説を立て実証しようと考えた。この仮説を立てるために背景となった実験結果を以下に示す。我々は、ODSラットのAsA欠乏の肝臓では炎症様変化と酸化的ストレスとが起こることを報告し( *J. Nutr.*, 128, 832(1998) )、酸化的ストレスにより活性化される転写因子(Nrf2、NFκB)もAsA欠乏により活性化されている結果を得た。このNrf2とNFκBの応答配列を持つヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の発現が肝臓で上昇することも見出した( *ビタミン*, 86, 247(2012) )。HO-1は、肝臓のヘム分解の律速酵素である。よって、AsA欠乏により肝臓でのヘム分解が亢進する可能性が考えられる。一方、肝臓でのHO-1発現の誘導が特定のヘムタンパク質(cytochrome c oxidase complex subunit, 略号:COX)を減少させる結果が報告され( *FASEB J.*, 20, E482(2006) )、さらに我々は、AsA欠乏でも肝臓のCOXが減少することを最近、確認した。これらの背景から、本研究の仮説である、AsA欠乏時には肝臓のHO-1の発現上昇が起こり、ヘム分解が亢

進し、特定のCYP(CYP2B1/2B2)とその他のヘムタンパク質の減少が起こるといふ仮説を提唱するに至った。本研究では、今までに実証されていないこの仮説の実証に挑戦し、AsAの新規な生理作用の発信に繋げることを目指した。

## 2. 研究の目的

抗酸化能を持つビタミンであるAsAの欠乏時には肝臓のヘムタンパク質であるCYP量が減少し、薬物代謝能が低下する。この機能はAsAの抗酸化能以外の注目すべき機能として知られている。しかし、このCYP減少の機構は明らかにされていない。本研究ではこの機構解明のために新規な仮説の証明に挑戦し、AsAの生理機能研究にブレークスルーをもたらすことを目的とした。

具体的には、遺伝的にAsA生合成不能のODSラットを用いて、第一に、AsA欠乏により肝臓のどのタイプのCYPが減少するかを明らかにする。そして、そのCYPの減少に先立ってヘム分解の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の発現上昇が起こることを証明し、それによるヘム分解亢進をもたらす細胞内遊離ヘムの減少がCYP(CYP2B1など)レベルを低下させるという仮説を証明する。

## 3. 研究の方法

(1)AsA欠乏の進行に従って、肝臓でHO-1発現上昇、細胞内遊離ヘムの減少、ヘムタンパク質であるCYPとCOXの減少、が連続して起こることの証明

6週齢、雄のODSラットにAsA無添加飼料を与える欠乏群においては10日目ではAsA欠乏症状も肝臓CYPの低下も見られないが、14日目には肝臓CYP量が明確に減少する。この10日目から14日目までの5日間において、毎日(計5点)欠乏群と対照群のラットの肝臓を採取した。

そして、肝臓のHO-1 mRNAレベルおよびタンパク質レベル、小胞体画分およびミトコンドリア画分の遊離ヘム量、小胞体の総CYP量とCYP2B1タンパク質レベル、CYP2C11タンパク質レベル、ミトコンドリアのCOXタンパク質レベルを測定した。

対照群にはAsA添加(300 mg/kg)飼料を与えて、飼料摂取量は欠乏群の摂取量と同一になるように合わせた。CYP2B1は生体異物であるフェノバルビタール(略号:PB)の投与で誘導されるCYPであることから、上記と同じ実験をPB添加(300 mg/kg)飼料を摂取させる条件下でも行った。

(2)HO-1誘導剤をAsA摂取ODSラットに投与した場合に、肝臓の総CYP量とAsA欠乏で減少する種類のCYP量とが減少することを証明し、同時にCOXが減少することを証明する。

6週齢、雄の ODS ラットに AsA 添加 (300 mg/kg) 飼料を与えて 10 日間飼育し、HO-1 誘導剤であるヘミン (50 mg/kg 体重) あるいはリポ多糖 (LPS, 2 mg/kg 体重) を腹腔内注射した。

それぞれの対照群には、誘導剤を溶かした溶媒のみを腹腔内注射した。注射後 48 時間で肝臓を採取し、HO-1 mRNA レベルおよびタンパク質レベルの上昇を確認し、小胞体画分およびミトコンドリア画分の遊離ヘム量、小胞体の総 CYP 量と CYP2B1/2B2 タンパク質レベル、ミトコンドリアの COX タンパク質レベルを測定した。

#### 4. 研究成果

(1) AsA 欠乏の進行に従って、肝臓で HO-1 発現上昇、細胞内遊離ヘムの減少、ヘムタンパク質である CYP と COX の減少、が連続して起こることの証明

PB を摂取しない場合および摂取した場合の両方において、以下に示す肝臓における時間的に連続した結果が得られた。12 日目以降の欠乏群では、HO-1 mRNA レベルとタンパク質レベルの有意な上昇が観察された。14 日目の欠乏群において初めて、肝臓のミトコンドリアと小胞体画分の遊離ヘム量の低下が起こり、小胞体画分の総 CYP 量と CYP2B1/2B2 タンパク質量およびミトコンドリアの COX タンパク質量の減少が見られた。これらの各パラメータの AsA 欠乏群での経時的変化は、我々の仮説に合致するものであった。なお、AsA 欠乏 14 日目においても肝臓の CYP2C11 タンパク質レベルは対照群に比べて変化が観察されず、AsA 欠乏により減少するタイプの CYP と影響を受けない CYP があることが明らかとなった。

(2) HO-1 誘導剤を AsA 摂取 ODS ラットに投与した場合に、肝臓の総 CYP 量と AsA 欠乏で減少する種類の CYP 量とが減少することを証明し、同時に COX が減少することを証明する。

#### HO-1 誘導剤であるヘミン投与実験

6 週齢の ODS ラットに AsA 添加 (300 mg/kg) 飼料を与えて 10 日間飼育し、この健康な ODS ラットに HO-1 誘導剤であるヘミン (50 mg/kg 体重) を腹腔内注射した。ヘミンの注射後 48 時間で肝臓の HO-1 mRNA レベルおよびタンパク質レベルの上昇を確認した。小胞体画分における CYP 総量と CYP2B1/2B2 タンパク質量がヘミン投与によって AsA 欠乏時と同様に減少した。さらに、ミトコンドリアの COX タンパク質レベルもヘミン投与によって減少した。一方、小胞体の CYP2C11 タンパク質レベルはヘミン投与によって変化がなかった。ヘミン投与により引き起こされたこれらの変化は、AsA 欠乏時に見られる変化と一致していた。

#### HO-1 誘導剤である LPS 投与実験

6 週齢の ODS ラットに AsA 添加 (300

mg/kg) 飼料を与えて 10 日間飼育し、この健康な ODS ラットに HO-1 誘導剤である LPS (2 mg/kg 体重) を腹腔内注射した。LPS の注射後 24 時間および 48 時間において、肝臓の HO-1 mRNA レベルおよびタンパク質レベルの上昇を確認した。小胞体画分における CYP 総量と CYP2B1/2B2 タンパク質量が LPS 投与によって AsA 欠乏時と同様に減少した。さらに、ミトコンドリアの COX タンパク質レベルも LPS 投与によって減少した。一方、小胞体の CYP2C11 タンパク質レベルは LPS 投与によって変化がなかった。LPS 投与により引き起こされたこれらの変化は、AsA 欠乏時に見られる変化と一致していた。

構造的に全く関連性のない HO-1 誘導剤であるヘミンと LPS が共通して肝臓の HO-1 発現を誘導し、遊離ヘム量を減少させ、CYP の中でも選択的に CYP2B1/2B2 量を選択的に減少させることが明らかとなった。CYP2B1/2B2 は遊離ヘムの減少に対して感受性高くその量を減少させる CYP であると考えられた。AsA 欠乏時と、ヘミンあるいは LPS 投与時の両方において、CYP2B1/2B2 mRNA レベルは低下していたことから、肝臓の遊離ヘム量の低下は CYP2B1/2B2 の mRNA レベルを低下させることによりこの CYP タンパク質の産生量を低下させているものと推定された。

#### (結論)

本研究では、今まで不明であった AsA 欠乏時の肝臓の CYP の減少機構を明らかにすることを目的とした。そこで、AsA 欠乏時には肝臓での HO-1 の誘導によりヘム分解が亢進して、ヘムプールの減少をもたらす、このヘムの減少に対して感受性の高い CYP 量の減少が起こるという新規な仮説を立て、その証明に挑戦した。

本研究の結果、ODS ラットにおいて、AsA 欠乏の初期から、肝臓ではこの ~ の現象が順番に起こることが証明された。また、全ての CYP ではなく、CYP2B1/2B2 を含む数種の CYP が選択的に AsA 欠乏により減少することも明らかとなった。そして、CYP2C11 のように AsA 欠乏により量的変化を示さない CYP が存在することも明らかとなった。また、CYP は小胞体に存在するが、CYP 以外のヘムタンパク質であるミトコンドリアに存在する COX も AsA 欠乏により減少することを本研究により初めて示すことができた。この COX は HO-1 誘導剤投与によるヘムプールの減少により低下するタンパク質であることが報告されている (FASEB J., 20, E482(2006))。そこで我々は、HO-1 誘導剤を充分量の AsA を摂取している ODS ラットに投与したところ、AsA 欠乏時と同様の分子種の CYP が減少することと COX の減少が起こることを初めて見出すことができた。

1980 年代において、AsA 欠乏による肝臓の

CYP 量の減少が AsA 生合成不能のモルモットにおいて報告され、AsA の代表的な生理作用の一つとして注目された。そして、CYP がヘムタンパク質であることから、AsA 欠乏が肝臓内の遊離ヘム量の低下をもたらして CYP 量を減少させるという仮説が考えられ、実験的証明が試みられた。我々も当時、その証明に挑戦した。当時は、モルモットでの様々なタイプの CYP に対する特異的抗体が存在しなかったことや、それら CYP の遺伝子情報も皆無であった。ヘムオキシゲナーゼについても総活性が測定できるのみで、この酵素に複数のタイプがあることも明らかではなかった。これらの限られた研究情報の中で、AsA 欠乏による肝臓の CYP 減少機構の解析は中断していた。その後、ゲノム情報や CYP 関連の生化学的ツールの極めて豊富な実験動物であるラットにおいて、突然変異により AsA 生合成不能の ODS ラットが 1985 年に確立されたことは AsA 生理機能研究に新たな道を開いた。また、1990 年代にはヘムオキシゲナーゼには構成型 (HO-2) と誘導型 (HO-1) の複数のタイプが存在し、それぞれの遺伝子情報も明らかとなった。我々は、AsA 摂取と HO-1 および HO-2 の発現の関係について解析を進めてきた。そして、長く中断されていた AsA 欠乏による肝臓 CYP 減少機構について、長く考えられていた仕組みを現在のツールを活用して解析することに挑戦した。

本研究の結果は、我々の立てた仮説を強く支持するものであり、AsA の肝臓 CYP 量ならびに薬物代謝能の維持作用の機構解明に新たな情報を与えるものである。そして、AsA の新規な生理機能の一面を提唱できたと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Kobayashi, M., Hoshinaga, Y., Miura, N., Tokuda, Y., Shigeoka, S., Murai, A. and Horio, F.:  
Ascorbic acid deficiency decreases hepatic cytochrome P-450, especially CYP2B1/2B2, and simultaneously induces heme oxygenase-1 gene expression in scurvy-prone ODS rats.  
Biosci.Biotechnol.Biochem.,  
78(6),1060-1066 (2014)
- (2) Tokuda, Y., Miura, N., Kobayashi, M., Hoshinaga, Y., Murai, A., Aoyama, H., Ito, H., Morita, T. and Horio, F.:  
Ascorbic acid deficiency increases endotoxin influx to portal blood and liver inflammatory gene expressions in ODS rats.  
Nutrition, 31,373-379(2015)

- (3) 堀尾文彦  
ビタミン C の生合成制御と生体防御・疾患に関わる生理機能の解析  
ビタミン、89,528-536(2015)

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 徳田優希、川出野絵、村井篤嗣、小林美里、堀尾文彦  
アスコルビン酸欠乏における肝臓の酸化ストレス防御系と炎症関連因子の経時的発現解析  
第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (名古屋)  
2013.5.25
- (2) 徳田優希、川出野絵、小林美里、村井篤嗣、後藤 廉、吉村和也、堀尾文彦  
ODS ラットのアスコルビン酸欠乏初期における肝臓の酸化ストレス状態とその防御系の変動  
日本ビタミン学会第 65 回大会 (東京)2013.6.17
- (3) 川出野絵、徳田優希、辻野祥伍、小林美里、村井篤嗣、重岡 成、堀尾文彦  
アスコルビン酸欠乏による肝臓の転写因子 STAT3 の活性化とその制御下遺伝子の発現解析  
第 68 回日本栄養・食糧学会大会 (札幌・江別)  
2014.5.31
- (4) 川出野絵、徳田優希、辻野祥伍、村井篤嗣、小林美里、堀尾文彦  
アスコルビン酸欠乏時の肝臓での IL-6、IL-1 シグナル系因子の発現上昇と炎症用変化  
日本ビタミン学会第 66 回大会 (姫路)2014.6.14
- (5) 辻野祥伍、徳田優希、川出野絵、村井篤嗣、小林美里、伊藤浩行、堀尾文彦  
アスコルビン酸摂取の LPS 誘発性炎症反応に対する防御効果  
日本ビタミン学会第 66 回大会 (姫路)2014.6.14
- (6) 川出野絵、徳田優希、辻野祥伍、小林美里、村井篤嗣、重岡成、堀尾文彦  
アスコルビン酸欠乏による肝臓の STAT3 の活性化とその制御下遺伝子の発現解析  
日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山)  
2015.3.26
- (7) 川出野絵、辻野祥伍、徳田優希、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦  
アスコルビン酸欠乏時の肝臓 STAT3 の活性化と炎症変化  
日本ビタミン学会第 67 回大会 (奈良)  
2015.6.6
- (8) 辻野祥伍、川出野絵、徳田優希、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦  
アスコルビン酸摂取の LPS 誘発性 TNF 産生に対する抑制作用  
日本ビタミン学会第 67 回大会 (奈良)  
2015.6.6
- (9) 辻野祥伍、川出野絵、徳田優希、小林美里、松田幹、村井篤嗣、堀尾文彦  
アスコルビン酸の LPS 誘発性炎症での救命作用の機構解析  
日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌)  
2016.3.28

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀尾文彦

(Horio Fumihiko)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：20165591

### (2) 研究分担者

なし

### (4) 連携研究者

村井篤嗣

(Murai Atsushi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・

准教授

研究者番号：10313975

小林美里

(Kobayashi Misato)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：20456586