

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590319

研究課題名（和文）脂質代謝におけるミトコンドリア型 CYP1A1 の作用メカニズム

研究課題名（英文）The function of mitochondrial CYP1A1 in the lipid metabolism.

研究代表者

宇野 茂之 (SHIGEYUKI UNO)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：90307851

研究成果の概要（和文）：

CYP1A1 は多環芳香族炭化水素 (PHA s) によってミクロソームおよびミトコンドリアにおいて発現が誘導されることから、ミクロソーム型、ミトコンドリア型の作用の違いを検討したところ、ミクロソーム型が PHA s の代謝に重要であることが分かった。また、食事由来の PHA s が脂質代謝の異常を誘導するが、PHA s の代謝遅延によるトランスポーターの発現異常が原因であった。ミトコンドリア型 CYP1A1 はミトコンドリア DNA の変異抑制に関与している可能性が推察される。

研究成果の概要（英文）：

To understand the physiological functions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) induced microsomal versus mitochondrial CYP1A1, it is the microsomal rather than mitochondrial CYP1A1 enzyme that protects against oral BaP toxicity. Because of metabolic delay of PHAs causes abnormal expression of transporter genes, PHAs is induced abnormal lipid metabolism. Our data support the likelihood that it is the microsomal rather than mitochondrial CYP1A1 enzyme that protects against PHAs induced mitochondrial dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学

1. 研究開始当初の背景

現在の社会的問題となっているメタボリックシンドロームは「不健康な生活習慣」の表れであり、喫煙、食習慣がその要因となる。喫煙者はHDL値が低下していることから、動脈硬化、高脂血症の非常に大きな

リスクに曝されている。また、喫煙とがんとの関係は以前から知られており、原因物質として喫煙の主成分である多環芳香族化合物(PAHs)が重要視されている。PAHsは自ら核内受容体のように転写を調節するダイオキシン受容体であるAhRを活性化し、CYP

1ファミリー(*Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*)および抱合酵素などの遺伝子を誘導することによって、自らが代謝を受け排泄される。また PAHs の代謝過程で生ずる中間代謝物(求電子化合物)が、細胞毒性、DNA 変異などを誘導(代謝活性化)することが報告されている。近年、PAHs は過熱調理食品であるハンバーガー、チーズの燻製などに含まれることが報告された。過熱肉 100g 中には PAHs の1つであるベンゾ(a)ピレン (BaP) がタバコ 4~20 本分相当含まれており、食事からの PAHs の暴露が生活習慣病のリスクファクターの1つかもしれない。そこで、我々はこれまでに食生活から摂取される PHAs に着目し、CYP 1ファミリーの役割を遺伝子欠損マウス(*Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* 遺伝子欠損マウス)によって検討した結果、肝臓と小腸において誘導される CYP1A1 が BaP の解毒に重要であり、PAHs の代謝活性化による毒性を増加させるのではなくむしろ抑制することを報告してきた。

これまでマイクロソームにのみ存在するとされてきた CYP1A1 がミトコンドリアにおいても PAHs によって誘導されることが報告された。この異なったオルガネラの発現誘導は何を意味しているか? 脂質代謝に関与する CYP はミトコンドリアに存在すること、低マグネシウム血症を伴うメタボリック症候群の大家系からミトコンドリア変異を見いだされ、ミトコンドリアゲノム変異が代謝的異常(肥満・高血圧・高コレステロール血症)の原因となる可能性が示された。PAHs の代謝活性化と DNA 変異との関連性、または、脂質代謝による酸化的 DNA 損傷と発がんとの関連性などから、ミトコンドリア型 CYP1A1 がミトコンドリア DNA の突然変異誘導およびミトコンドリアにおける脂質代謝系に関与しているかもしれない。

そこで本応募研究では生体異物代謝および脂質代謝両方向からアプローチし、体異物代謝以外の CYP1A1 の生体異物代謝以外の新たな役割を探究する。

2. 研究の目的

本応募研究ではマイクロソーム型およびミトコンドリア型 CYP1A1 ノックインマウスを用いて生体異物代謝および脂質代謝両方向からアプローチすることで未だ生体内で役割が分かっていないマイクロソーム型、ミトコンドリア型 CYP1A1 の生体異物代謝系における役割を明らかにする。さらに、マイクロソーム型およびミトコンドリア型 CYP1A1 が生体内代謝系に及ぼす影響について、特に脂質代

謝系への関与を明らかにする。

(1) 生体異物代謝におけるマイクロソーム型、ミトコンドリア型 CYP1A1 の機能解析①生体異物代謝においてマイクロソーム型、ミトコンドリア型の作用点は違うか? ②アポトーシス誘導、ミトコンドリア DNA 変異にマイクロソーム型、ミトコンドリア型は関与するのか?

(2) 脂質代謝におけるミトコンドリア型 CYP1A1 の役割①ミトコンドリア型 CYP1A1 が脂質代謝系に影響を与えるのか? ②エネルギー産生への関与があるのか? 以上の点に焦点を当て CYP1A1 の細胞内分布が代謝調節ネットワークに及ぼす影響、さらには疾患発症メカニズムとの関連性を探求することによって、現代人が直面している生活習慣病の分子病態機構を明らかにし、予防・治療へと発展させる。

食生活の欧米化に伴う生活習慣病は医療、福祉の面で重要な問題であり、これらの早期解決は必須事項である。ヒトの疾患の発症には個人差があり、1つの要因、1つの代謝系の異常では理解できないことから、代謝系のクロストークが考えられる。本応募研究のミトコンドリア型 CYP1A1 と脂質代謝系との関連性に焦点を当てた生活習慣病の発症メカニズムを解明することによって、これまでの疫学的証拠と分子レベルまたは細胞レベルで明らかになっていた科学的根拠とを有機的に結び付けることができ、予防・治療へと発展させることができる。更に、今後のメタボローム研究に貢献できるものとする。

3. 研究の方法

(1) 生体異物代謝におけるマイクロソーム型、ミトコンドリア型 CYP1A1 の機能解析
ミトコンドリア移行シグナルを変異させた CYP1A1 ノックインマウス(ミトコンドリア型 CYP1A1, ミクロソーム型 CYP1A1)を用いて CYP1A1 が代謝する代表的な化合物であるベンゾ(a)ピレン (BaP) を投与し、生体異物代謝において誘導される毒性について、血液パラメーター、各臓器への影響、BaP の代謝変動および BaP の DNA 付加体形成について検討を行った。

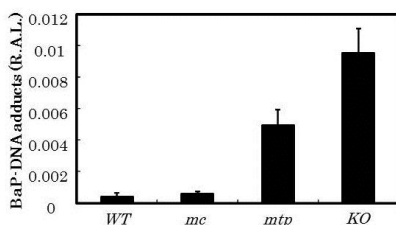
(2) 脂質代謝におけるミトコンドリア型およびマイクロソーム型 CYP1A1 の役割

マイクロソーム型 1A1、ミトコンドリア型 1A1 ノックインマウス、および *Cyp1a1* 遺伝子欠損マウスに高脂肪、高コレステロール、BaP を経口投与し、血液パラメーター、各臓器への影響、BaP の代謝変動および BaP の DNA 付加体形成について検討を行った。さらに、異常が見られた臓器において、これまで報告が

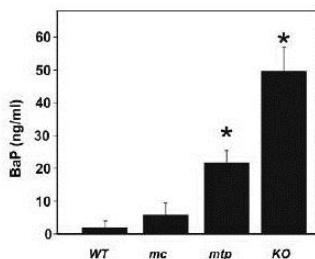
ある関連遺伝子についてリアルタイム PCR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 生体異物代謝におけるミクロソーム型、ミトコンドリア型 CYP1A1 の機能解析
ミクロソーム型、ミトコンドリア型 CYP1A1 の機能解析についてノックインマウスを用いて検討した。ミトコンドリア型 CYP1A1 はミクロソーム型 CYP1A1 にはない Erythromycin N-demethylase 活性を有するが、BaP hydroxylase 活性はミクロソーム型 CYP1A1 の 46% であったことからミトコンドリア型とミクロソーム型の CYP1A1 では基質特異性が異なることが示唆された。BaP によって *Cyp1a1* 遺伝子欠損マウスで誘導される脾臓および胸腺の委縮などの毒性は、ミトコンドリア型 CYP1A1 では誘導されたが、ミクロソーム型 CYP1A1 では誘導されなかった。ミクロソーム型 CYP1A1 は BaP を速やかに代謝しているが、ミトコンドリア型 CYP1A1 は BaP の代謝が遅延していた。さらにミトコンドリア型 CYP1A1 は *Cyp1a1* 遺伝子欠損マウス同様に BaP-DNA 付加体形成が増加していた。これらの結果から生体異物代謝にはミクロソーム型 CYP1A1 が重要であることが示唆された。このことはミトコンドリア型 CYP1A1 が生体異物代謝以外の関与の可能性を示唆しており、非常に興味深い。



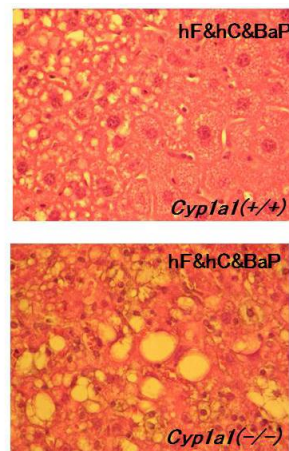
BaP-DNA adducts in spleen from *Cyp1a1*(+/+), mitochondrial, microsomal *Cyp1a1* and *Cyp1a1*(-/-) mice after oral BaP for 5 days.



Whole-blood BaP levels after continuous oral BaP. Whole blood was collected as described from mice receiving oral BaP 125 mg/kg/day for 5 days.

(2) 脂質代謝におけるミトコンドリア型およびミクロソーム型 CYP1A1 の役割

ミトコンドリア型 CYP1A1 の脂質代謝における関与を検討する目的で、CYP1A1 による生体異物代謝および脂質代謝カスケードの間クロストークの有無について *Cyp1a1* 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。PAHs および高脂肪・高コレステロール負荷により動脈硬化のリスクファクターが増加し、動脈硬化層の形成が促進していることを見出した。また、肝臓においてコレステロールおよび胆汁酸が蓄積することを見出した。このことは CYP1A1 がコレステロール及び胆汁酸代謝へ関与していることを示唆している。



Comparison of high cholesterol&fat and/or oral BaP for 15weeks.

また、食事由来の BaP が脂質代謝異常のリスクファクターになる可能性が示唆された。

BaP 暴露時におけるミトコンドリア型 CYP1A1 についても検討したところ、コレステロールおよび胆汁酸の血液および肝臓中での動態変化は、BaP の代謝遅延によって誘導されるトランスポーターの発現異常が要因であり、ミトコンドリア型よりもむしろミクロソーム型 CYP1A1 がコレステロール、胆汁酸代謝の正常化に重要であることが示唆された。このことからミトコンドリア型 CYP1A1 は脂質代謝にはあまり関与していないと考えられる。

次に、BaP のミトコンドリア DNA の付加体形成について検討したところ、ミトコンドリア型 CYP1A1 がミトコンドリア DNA の付加体形成を抑制することを示唆する結果が得られ、ミトコンドリア型 CYP1A1 は、生体異物によるミトコンドリアの機能障害の抑制に関与している可能性が推察された。現在、ミトコンドリア

アの代謝異常における防御機構にミトコンドリア型CYP1A1が関与しているかについての検討を継続しており、ミトコンドリア型CYP1A1の役割について早期に解明し、報告したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Dong H, Dalton TP, Miller ML, Chen Y, Uno S, Shi Z, Shertzer HG, Bansal S, Avadhani NG, Nebert DW. Knock-in mouse lines expressing either mitochondrial or microsomal CYP1A1: differing responses to dietary benzo[a]pyrene as proof of principle. *Molecular Pharmacology* 75(3): 555-567, 2009

[学会発表] (計1件)

宇野茂之、遠藤香織、榎島誠：生体異物代謝異常による動脈硬化発症メカニズム、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 (一般口演) (2010, 6)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 茂之 (SHIGEYUKI UNO)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：90307851

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：