

カロテノイドによる薬物代謝酵素シトクロム P450 誘導における分子基盤の形成

大野 円実

北海道大学大学院獣医学研究科 博士課程

緒言

カロテノイドはさまざまな植物由来食品に広く含まれる赤色もしくは黄色色素の総称であり、 β カロテンなどは体内でビタミン A に変換されることで、さまざまな活性を発揮する。特に、*in vivo* および *in vitro* の実験から、多くのカロテノイドが優れた抗酸化作用を示すことがすでに明らかになっている。そのため、カロテノイドが動物や人間の健康にとって有用であるとの見方が強く、サプリメントや飼料添加物として積極的に用いられている。しかし、2つの大規模なコホート研究により、 β カロテンが喫煙者やアスベスト被曝者において肺がんリスクを増大させる^{1,2)} という可能性が示された。さらに、近年になってアスタキサンチン (Ax) などのビタミン A に変換されないカロテノイドが薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) 1A の活性を非常に強く誘導するという予期せぬ作用が報告された³⁻⁵⁾。CYP1A は多くの発がん前駆物質の活性化を行うことが知られており、その酵素活性の誘導と肺がんや大腸がんリスクの増大に関連があるとされている^{6,7)}。しかしながら、カロテノイドの摂取による薬物代謝の変化やカロテノイドによる CYP の転写誘導機構についての研究は十分ではなく、ヒトを含めた動物におけるカロテノイドの CYP に対する影響は不明である。そこで本研究では、Ax などのカロテノイドが CYP の酵素活性に与える影響について転写レベルから酵素反応時における影響まで明らかにすることを目的とした。

方法

1. ラットにおける Ax 摂取による薬物代謝能の変化

一般に、体内に取り込まれた脂溶性物質は 2 段階の反応を経て水溶性が増し、体外へ排出される (図 1)。1 酸素付加反応が行われる第 I 相においては CYP が主に働き、続く第 II 相においては抱合酵素が水溶性の高い補酵素を添加することで水溶性をさらに増大させる。

Ax の薬物代謝への影響を調べるために、Ax の摂取により CYP および抱合酵素の代謝活性がどのように変化するか、ラットを用いて調べた。以下に具体的な方法を示す。

8 週齢の Wistar ラット (オス) に Ax 含有ココナツ油 (100mg/kg 体重 / 日) または対照としてココナツ油単独を 3 日間経口投与した。最後の投与から 24 時間後に安楽殺し、各種臓器を採取した。リアルタイム PCR 法を用いて臓器内での CYP1A1、グルタチオン抱合酵素 (GST)、グルクロン酸抱合酵素 (UGT) の mRNA 発現量を定量した。また、ウェスタンブロッティング法により CYP1A1 および NADPH シトクロム P450 還元酵素 (CPR) タンパク質発現量を測定した。さらに、肝臓酵素画分 (S9 およびマイクロソーム) を調整し、CYP1A1、GST、UGT、CPR 活性をそれぞれ測定した。

2. CYP1A1 転写誘導機構の検討

H4IIE (ラット肝癌由来細胞株) および HepG2 (ヒト肝癌由来細胞) に Ax を曝露し、CYP1A1 の mRNA 発現量を測定した。また、ヒト CYP1A1 転写調節領域を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを導入した H4IIE および HepG2 を用いて、Ax の転写活性化能を調べた。

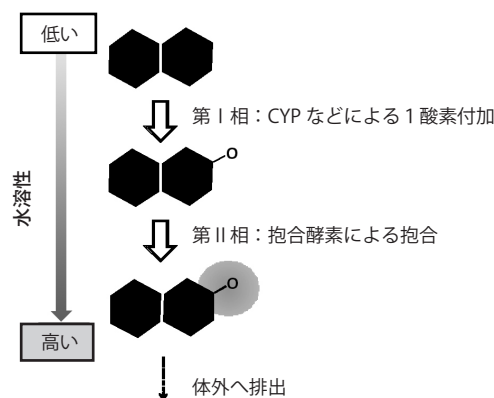


図 1 脂溶性物質の代謝の概略

結 果

1. ラットにおける Ax 摂取による薬物代謝能の変化

図 2、3 に示すように、対照群と比べて Ax 投与群では GST、UGT の mRNA 発現量とその酵素活性は変化しなかった。一方、CYP1A1 は mRNA 発現量が 5.5 倍、タンパク質発現量が 8.5 倍に増加していた(図 4)。また、CYP1A1 酵素活性は Ax 投与群で 2.5 倍増加していたが、タンパク質発現量から考えると予想したよりも低い活性であった。そこで、CYP の酵素反応における律速因子である CPR (CYP に電子を供給する酵素) のタンパク質発現量および酵素活性を測定した。すると、CPR タンパク質発現量は Ax 投与群で増加していたものの、その酵素活性は有意に減少していることがわかった (図 5)。さらに、遠心によりさまざまな濃度の Ax を無処置

ラットの肝ミクロソームに埋め込み、Ax 含有肝ミクロソームを作製した。Ax 含有肝ミクロソームの CPR 活性を同様に測定したところ、Ax は濃度依存性に CPR 活性を抑制した (図 6)。

2. CYP1A1 転写誘導機構の検討

培養細胞に Ax を曝露したところ、H4IIE (> 10 μ M)、HepG2 (> 50 μ M) の両方で CYP1A1 mRNA 発現量が有意に増加した (図 7)。H4IIE において、典型的 CYP1A1 誘導剤であるズダン III による CYP1A1 mRNA 発現量は曝露 12 時間後に最大となるが、Ax は曝露開始から 6 時間後にピークを迎えた (data not shown)。また、HepG2 よりも H4IIE のほうがズダン III による CYP1A1 誘導作用が鋭敏に観察されたが、Ax についても同様の傾向が観察された。さらに、レポーターアッセ

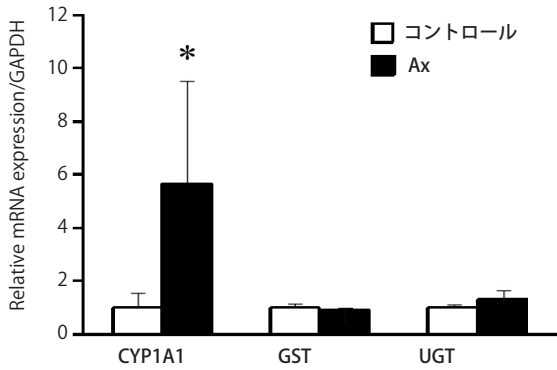


図 2 CYP1A1、GST、UGT の mRNA 発現量

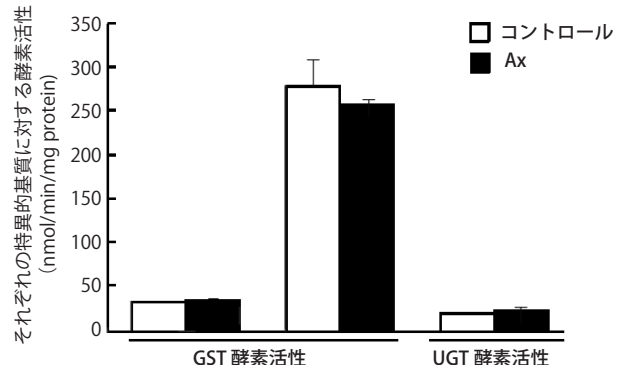


図 3 GST および UGT 抱合酵素の代謝活性

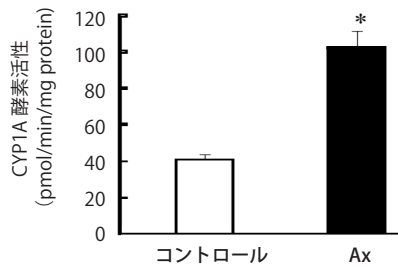
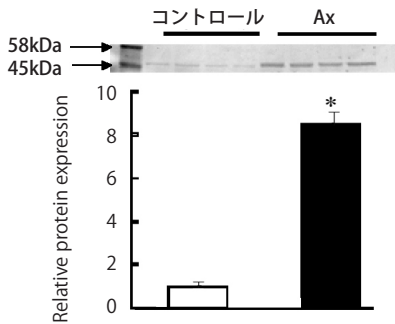


図 4 CYP1A のタンパク質発現量および酵素活性

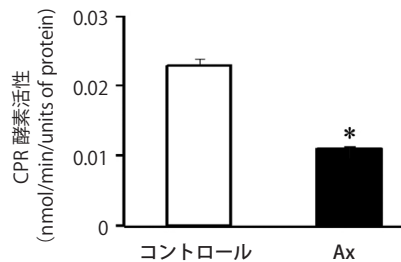
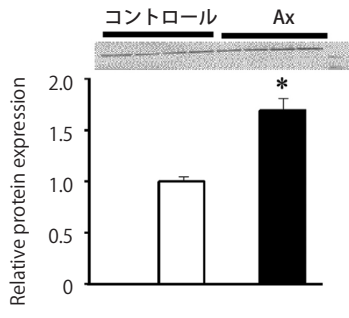


図 5 CPR のタンパク質発現量および代謝活性

この結果より、Ax がヒト CYP1A1 転写調節領域を活性化せる可能性が示唆された (data not shown)。

考 察

ラットでの投与実験から、CYP1A 酵素活性は Ax によって 2 つの異なる影響を受けることが明らかになった。第一に、Ax は CPR 活性を抑制、つまり CYP への電子供給を減少させることで CYP 酵素活性を間接的に抑制する。CPR 活性の抑制は、タンパク質の発現量の減少ではなく、Ax のもつ物理的作用であると考えられる。なぜならば、Ax 投与群の肝臓で CPR タンパク質発現量はむしろ増加していたことに加え、*in vitro* 実験系で、Ax は濃度依存性に CPR 活性を抑制したからである。Ax は脂溶性が高く、細胞内においては脂質で構成された膜系、特にミクロソームに局在すると報告されている⁸⁾。これらのことから、Ax 投与後のラット肝臓の細胞に取り込まれた Ax がミクロソーム膜上において CPR から CYP への電子伝達を阻害し、CYP1A 酵素活性を抑制したと考えられる。

第二に、Ax は CYP1A1 mRNA の転写を誘導し、タンパク質発現量を増加させることでその酵素活性を量的

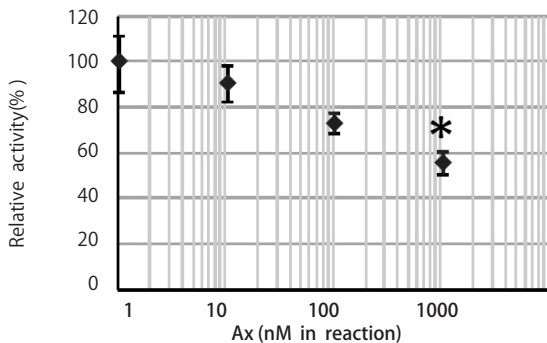
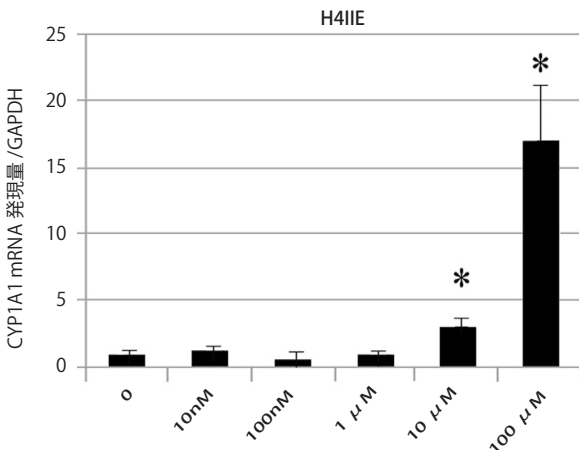


図 6 *in vitro* 実験系における CPR 活性



に増加させる。Ax が CYP1A1 の転写誘導能を有することは細胞実験においても明らかにされた。ヒトでは Ax の摂取により CYP1A 活性は変化しないと考えられていたが、ヒト肝癌由来細胞である HepG2 でも Ax により CYP1A1 mRNA が有意に増加したため、高濃度の Ax がヒトの薬物代謝能に影響を与える可能性が示唆された。CYP1A1 の一般的な誘導剤は転写調節因子アリル hidrocarbon 受容体 (AhR) のリガンドであり、リガンド結合 AhR が細胞質から核内へ移行し、外来異物反応領域 (CACGC) を活性化して下流の遺伝子の転写が開始することが知られている。AhR のリガンドはダイオキシン類をはじめ、疎水性で平面的な多環構造を持つ。しかしながら、カロテノイドはそれらとはかけ離れた構造をしており、AhR とは結合できないことが予想される。実際に、Ax と同様に CYP1A 酵素活性を誘導するカロテノイドである、カンタキサンチンはダイオキシン結合部位には作用しないことがすでに報告されている⁹⁾。

本研究は初めて Ax による CYP1A1 誘導を培養細胞実験において再現することに成功したものである。それによって、細胞内シグナルカスケードへカロテノイドが与える影響について詳細に検討することが可能となった。今後は Ax が標的とする転写調節配列や転写調節因子を明らかにしていく予定である。

要 約

Ax は CYP1A1 の転写を増加させ、その酵素活性を誘導する。しかし、肝臓ミクロソームに取り込まれた Ax は CPR 活性を阻害し、CYP への電子供給量を減少させることで CYP 活性を阻害するという 2 重の作用があることがわかった。また、細胞実験から Ax による

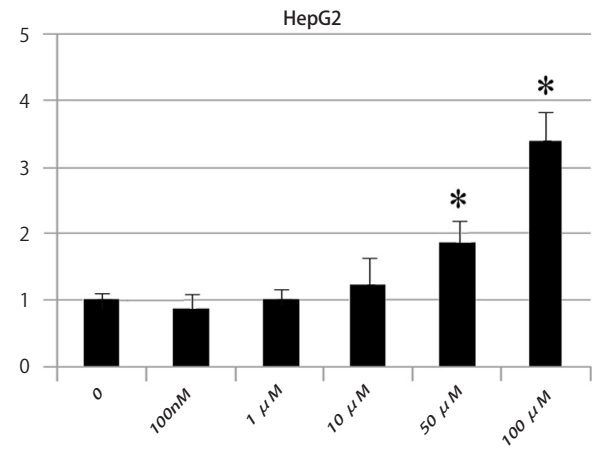


図 7 細胞における CYP1A1 mRNA 誘導

CYP1A1 の転写誘導が CYP1A1 上流に位置する転写調節領域の活性化による可能性が示された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、財団法人三島海雲記念財団から助成を賜りましたことに深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Albanes D. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1513-1515. 1996
- 2) Omenn G.S. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1550-1559. 1996
- 3) Wolz E. et al. *Drug. Metab. Dispos.* **27**, 456-462. 1999
- 4) Jewell C., O'Brien, N.M. *Br. J. Nutr.* **81**, 235-242. 1999
- 5) Gradelet S. et al. *Xenobiotica* **26**, 49-63. 1996
- 6) McLemore T.L. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1333-1339. 1990
- 7) Sivaraman L. et al. 1994. *Cancer Res.* **54**, 3692-3695. 1994
- 8) Petri D., Lundebye A.K. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **145**, 202-209. 2007
- 9) Gradelet S et al. *Biochem Pharmacol.* **54**, 307-15. 1997