

Cytochrome P-450 isozyme 間での機能的役割の差異

1986年

大 森 栄

目次

緒言	1
第1編 チトクロームP-450と脂質過酸化	5
第1章 ラット肝脂質過酸化におよぼすポリアミンの影響	7
1-1-1 四塩化炭素投与によるラット肝脂質過酸化、グルタチオンならびにポリアミン量の経時的変動	7
1-1-2 四塩化炭素投与ラットの肝脂質過酸化物の上昇におよぼすポリアミン同時投与の影響	10
1-1-3 スベルミン投与による正常ラットの脂質過酸化物の変動	11
第2章 ミクロゾームにおけるマクロサイクリックポリアミンの脂質過酸化阻害作用について	21
第3章 ラット肝ミクロゾームの脂質過酸化反応とチトクロームP-450	29
第4章 脂質過酸化反応へのチトクロームP-450の要求性	35
第5章 チトクロームP-450アイソザイムによる脂質過酸化に対する反応性の差異	39
第6章 考察	47
第2編 チトクロームP-450とNADPH-チトクローム c(P-450)還元酵素	49
第1章 アニリン水酸化反応のアセトン添加効果	51
第2章 ラット肝ミクロゾームのエチルモルヒネN-脱メチル化活性に見られる性差	58
第3章 NADPH-チトクローム c(P-450)還元酵素と親和性の異なるチトクロームP-450の分離・部分精製	65
第4章 考察	75

第3編	カニクイザルのチトクロームP-450とNADPH-チトクローム c (P-450)還元酵素の精製ならびにそれらを中心とした種差	77
第1章	薬物無処理カニクイザル肝ミクロゾームのチトクローム P-450の精製	79
第2章	精製したチトクロームP-450のスペクトル的特性ならびに 分子量の比較	87
第3章	チトクロームP-450アイソザイムの薬物代謝活性の比較	91
第4章	チトクロームP-450アイソザイムの免疫学的比較検討	98
第5章	チトクロームP-450の種差——カニクイザルチトクローム P-450を中心として	110
3-5-1	実験動物の薬物代謝酵素系の比較	111
3-5-2	チトクロームP-450の種差——カニクイザルチトクローム P-450を中心として	115
第6章	NADPH-チトクローム c(P-450)還元酵素の種差	123
3-6-1	カニクイザル、モルモット、およびラット肝ミクロゾーム のNADPH-チトクローム c(P-450)還元酵素の精製とその性質	123
3-6-2	NADPH-チトクローム c(P-450)還元酵素の種差	129
第7章	考察	137
	総括	140
	謝辞	142
	掲載雑誌目録	143
	引用文献	145

緒言

薬物代謝の酵素反応としての概念が1950年代前半に生じて以来、薬物代謝酵素に対する研究が開始された。1958年Brodieら¹⁾は、肝のミクロゾーム(Ms)画分中に薬物を代謝する酵素蛋白の存在を認めた。また同年、Klingenberg²⁾ならびにGarfinkel³⁾によって、肝Ms中にCO気相下でジチオナイトで還元を行うことにより450nm付近に吸収極大を示す物質が存在することを認め、“CO結合性色素”と呼んだ。この2つの一見無関係に見える事実が、現在の薬物代謝酵素研究の発端となったのである。OmuraとSatoは肝Ms中のヘム含量が、それまで存在が知られていたチトクローム b_5 (b_5)の含量だけでは説明できないことから、それを解明するために先に報告された異常なスペクトルを示すCO結合性色素に着目し、本物質がヘム蛋白であることを明らかにし、チトクローム P-450(P-450)と仮に名付けた⁴⁾。さらにCooperらは⁵⁾、副腎皮質Ms中にもP-450が存在していることを確認し、先に報告された 17α -ヒドロキシプロゲステロンの21-水酸化活性のCOによる阻害が白色光により解除され、その結果は肝Msを用いた場合にも同様に認められることを示し、さらにCOは酸素と競合的に作用することから、P-450が酸素を活性化することにより薬物へ酸素添加を行っている事を示し、P-450が薬物代謝酵素である事を明らかにした。

引き続きImaiとSato⁶⁾やSchenkmanら⁷⁾による基質差スペクトルの研究により、P-450は基質と直接的に作用すること、ErnsterとOrrenius⁸⁾やLuとCoon⁹⁾による、薬物代謝酵素ならびに活性の誘導、あるいは部分精製標品を用いた再構成系での詳細な検討の結果、NADPHからP-450への電子伝達は、NADPH-チトクローム c (P-450)還元酵素(Fp_2)を経て行われることが示された。さらに b_5 の本反応系への関与がHildebrandtとEstabrook¹⁰⁾によって報告され、現在のところ、さらにNADH-チトクローム b_5 還元酵素(NADH-フェリシアナイド還元酵素: Fp_1)を加えたFig. 0-1ならびにFig. 0-2に示す様なMsの電子伝達系とP-450の酸化・還元サイクルが提唱されている。

P-450の分子多様性については、酵素誘導等の結果からも長い間推察されていたが、それらの分離・精製は、P-450の不安定性のために困難を極めていた。しかし、IchikawaとYmano¹¹⁾により、P-450はグリセリンで安定化されることが報告され、

Fig. 0-1 Electron transport system in liver microsomes

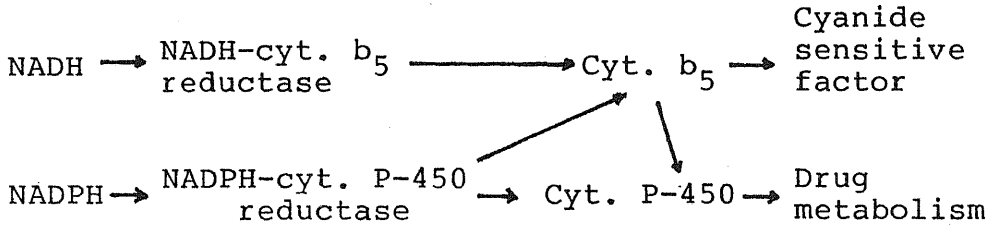
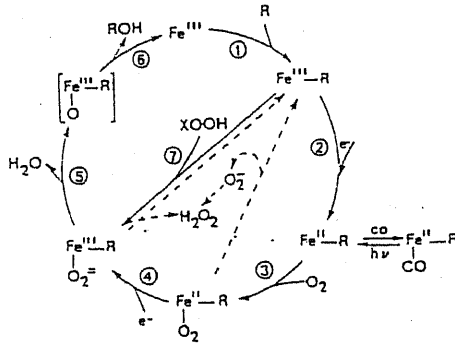


Fig. 0-2 Proposed pathway for hydroxylation of drugs by hepatic cytochrome P-450



精製が可能となった。1974年にImaiとSatoにより、フェノバルビタール(PB)前処理ウサギ肝MsからP-450が精製されて以来¹²⁾、現在までのところウサギの場合、Satoのグループにより13種¹³⁾の、Coonのグループにより6種の異なったP-450が精製されている^{14, 15, 16)}。ラットの場合、Levinのグループによって10種のP-450が精製されており^{17, 18, 19)}、マウス^{20, 21)}、モルモット²²⁾、ヒト^{23, 24)}、ヒト胎児²⁵⁾等からも種々のP-450が精製され、P-450の分子多様性が明らかとなっている。

薬物代謝においてラットで見られる性差はその代謝速度の違いによることが示され²⁶⁾、薬物代謝酵素の性差についてP-450と基質の親和性、P-450還元速度等についての比較検討の結果、性差発現にP-450の質的な違いが考えられてきた。さらに近年、雌雄で各々特有のP-450の存在が認められ、分離・精製されている^{27, 28)}が、これらの報告が性差の全てを説明し得るものではない。

ラット肝Ms中のP-450とFp₂の分子比は10~25:1であることから²⁹⁾、Msでの薬物

代謝反応における律速段階がP-450であるばかりでなく、反応によってはFp₂が律速酵素となっていることも推察され^{30, 31)}、P-450の各アイソザイムとFp₂の相互作用が反応を制御する因子となり得る可能性も考えられる。

肝Msの脂質過酸化反応は、薬物代謝酵素系に対して、大きく2つの観点から重要な反応と考えられる。1つは脂質過酸化に伴うP-450量の低下である。この低下については、P-450の脂質過酸化反応の関与も含めて、その変動は不明な点が多い。もう1つは、その結果として生じる代謝能の低下である。その生理的機能の低下は、P-450還元速度の低下によるものとも考えられている³²⁾。

医薬品の開発を行う際に、その化合物に対する薬効の有無・安全性・代謝・排出等について実験動物から得られた結果をヒトに外挿するのが現状であるが、実験動物種間でも得られる結果は異なっており、その解釈は困難である。ヒトを含めた霊長類の薬物代謝酵素系に対する検討は、未だ不十分であり、ゲッ歯類等で行われている様な生化学的アプローチに関する報告は少ない。これからの課題として、ヒトと繁用されている実験動物で示される違いを明らかにしつつ、実験動物で得られた結果に対し明確な考察を加えなければならないと考える。

以上の様に、P-450の分子多様性を考慮した時、P-450のアイソザイム間での機能の同異を明確にすることは極めて重要であると考えられる。そこで著者はP-450を中心とした以下の検討を行い、いくつかの新たな知見を得た。

- (1) Msで脂質過酸化反応を阻害するスペルミン(Spm)がin vivoにおいて同様な作用を示すか否か、またその時のP-450に対する作用について検討した。
- (2) 合成サイクリックポリアミン(CP)も、Spmと同様、脂質過酸化反応を阻害することからその作用機作をMsを用いて検討した。
- (3) Msの脂質過酸化反応に対するP-450の重要性を明確にすると共に、P450アイソザイムによる脂質過酸化反応への関与の差異についても、精製P-450を用い再構成系により検討した。
- (4) アニリン(AN)水酸化反応のアセトンによる活性化作用を、P-450の還元速度に及ぼす効果を中心に検討した。
- (5) ラット肝Msのエチルモルヒネ(EM)N-脱メチル化活性に見られる性差に関して、Fp₂との作用を中心に検討し、EMの代謝に関与するP-450は雌雄間でFp₂に対す

る親和性に差異があることを明らかにした。

(6) 肝Ms中にはFp₂に対する親和性が異なるP-450が存在することをFp₂-Sephrose 4B カラムを用いた分離法により明らかにした。

(7) 実験動物とヒトを結ぶ接点となることを考え、霊長類であるサル(カニクイザル) 肝MsからP-450ならびにFp₂を精製し、ラットの標品と比較した。

(8) カニクイザルのP-450、Fp₂を中心に種々の実験動物間の差異について、免疫学的手法を交えて比較検討した。

第1編 チトクロームP-450と 脂質過酸化

生体内での脂質過酸化は近年、白内障³³⁾、アテローム性動脈硬化症³⁴⁾、ハロゲン化アルキル等によって惹き起こされる肝障害³⁵⁾、アドリアマイシン等による心障害³⁶⁾を初めとするさまざまな疾患に関与することが知られる様になってきた。それに伴い生体内での脂質過酸化物の生成、ならびに消去系の重要性が指摘されてきている。脂質過酸化反応として一般的に知られるのは、開始・連鎖・停止の3つの反応からなるラジカル連鎖反応であるが、生体内ではさらに酸素の活性化も重要な因子と考えられており、アドリアマイシン³⁷⁾、パラコート³⁸⁾によって惹き起こされる脂質過酸化反応は、活性酸素の生成に依るものと報告されている。一方、生体内の過酸化物を低下させる因子として、グルタチオンパーオキシダーゼ(GSHpx)の様な消去系の酵素³⁹⁾や、種々の生体内抗酸化剤の存在が知られている。それゆえに、生体内の脂質過酸化物は、さまざまな因子の変動によって変化し、それに対する防御系も各器官により、同一ではないものと思われる。

著者は先ず、生体内での新たな過酸化脂質調節因子としてポリアミンに着目した。Spm、スペルミジン(Spd)およびプトレッシン(Put)は、動物のみならず細菌、ウイルス、植物等、広範囲に分布しており、最近、核酸代謝、細胞増殖、蛋白合成等に対する生理的機能が明らかにされて来ている⁴⁰⁾。ポリアミン類は、ラットの胸腺に最も多く分布し、ついで肝、小腸、脾、肺、大腸等に比較的多く分布している⁴¹⁾。Chapmann⁴²⁾はEM N-脱メチル化活性がSpm、Spd添加により上昇することを報告した。さらに、Kitadaらは^{43, 44)}、その活性の上昇は、Msの脂質過酸化阻害作用によりP-450を安定化させることによるものであることを示した。この *in vitro*での作用が、*in vivo*においても反映されるや否やは、ポリアミンの生理的機能の解明に重要であると考え、比較的ポリアミンが多量存在しかつ生体内での異物代謝の中心的地位を占める、肝の脂質過酸化に対するポリアミンの作用をP-450に対する作用を含めて検討した。加えて、合成ポリアミンに関して、Msでの脂質過酸化に対する作用について考察した。

Msは、リン脂質に富みその構成因子である不飽和脂肪酸は脂質過酸化の基質となりうることから⁴⁵⁾、脂質過酸化反応の重要な場の1つと考えられ、また薬物代謝能についても、Msの脂質過酸化に伴う薬物代謝活性、P-450量の低下が知られており⁴⁶⁾、その能力を評価する上でもMsの脂質過酸化の変動は重要なものであると考えられる。Msの脂質過酸化に対する薬物代謝酵素系の関与については、PedersonとAust⁴⁷⁾およびPederson⁴⁸⁾らは、プロメラインで可溶化したFp₂に、ADP-Fe³⁺等の鉄-キレート剤を添加することにより、NADPH-誘起脂質過酸化反応がおこることから、Fp₂の関与を明らかにした。また、精製したFp₁も同様の系で過酸化反応を示すが、その際にはEDTA-Fe³⁺が必須の因子であることが示されている⁴⁸⁾。またP-450の関与については、O'BrienとRahimtula⁴⁹⁾はクメンハイドロパーオキシド(CHP)-誘起脂質過酸化反応にP-450が関与すること、ExtromとIngerman-Sundberg⁵⁰⁾はNADPH-誘起脂質過酸化反応にはP-450が必要であることを各々再構成系を用いて報告している。一方、NADPH-誘起脂質過酸化反応にはP-450は関与しないという報告もある⁵¹⁾。以上のようにMs脂質過酸化反応へのP-450の関与については、P-450アイソザイム間での関与の差異、さらにその作用機作を含め不明瞭なままである。本論において著者は、Msまたは、精製Fp₂、複数のP-450およびリン脂質から成る再構成系により、上述の2点について検討した。

第1章 ラット肝脂質過酸化におよぼす ポリアミンの影響

1-1-1 四塩化炭素投与によるラット肝脂質過酸化物、グルタチオン ならびにポリアミン量の経時的変動

【実験方法】

1. 動物

Sprague Dawley(SD)系雄性ラット(体重150-190g)を $24 \pm 2^\circ\text{C}$ の恒温室にて明暗12時間サイクル下で飼育し、飼料(CE-2、日本クレア社)および水は自由に摂取させた。実験は、20時間絶食した動物を用いて行った。四塩化炭素(CCl_4)はcorn oilで50%(v/v)溶液とし、1ml/kgの用量で腹腔内投与した。

2. 脂質過酸化物の定量⁵²⁾

肝脂質過酸化物の定量は、肝を剥離し1.15%KCl溶液にて灌流後、同溶液にて20%ホモジネートを作成し、ガーゼでろ過したもの100 μl を試料とし、チオバルビツール酸法により、マロンジアルデヒド(MDA)として、テトラメトキシプロパンをスタンダードとして測定した。

3. グルタチオンの定量

還元型および酸化型グルタチオン(GSH、GSSG)を各々特異的にHissinとHilfの方法⁵³⁾により、20%ホモジネート2.0mlを試料として、蛍光法にて測定した。

4. ポリアミンの定量

肝内ポリアミンは、20%ホモジネートを0.2N 過塩素酸により抽出後、テトレンを内部標準物質として、Spm、Spd、PutをFujimotoらの方法⁵⁴⁾に準じ高速液体クロマトグラフィーにより分離し定量した。

【実験結果】

Fig.1-1に CCl_4 投与後の肝脂質過酸化物と、GSHおよびGSSG量の経時的変動を示

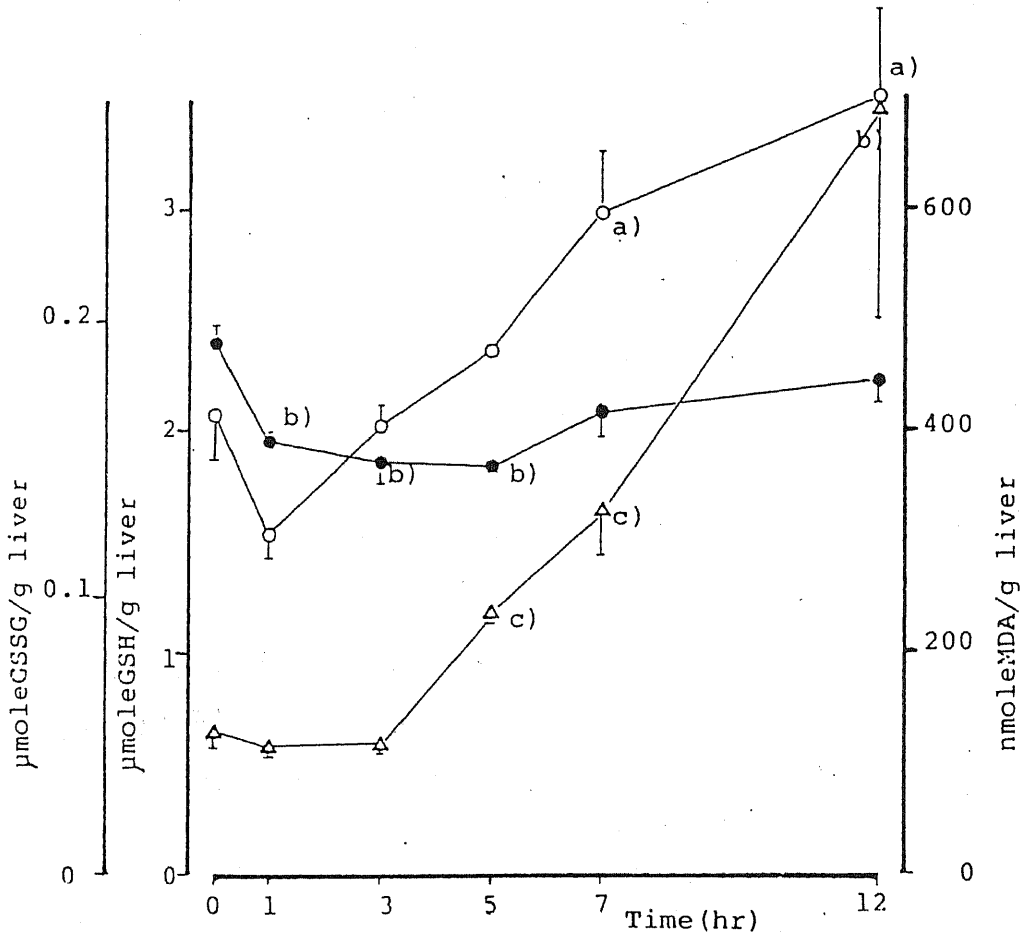


Fig. 1-1 Changes in hepatic lipid peroxide(Δ), reduced glutathione(O), and oxidized glutathione(\bullet) levels after treatment of carbon tetrachloride (1 ml/kg, i.p.)

Each value represents Mean \pm S.E. obtained from 4 animals.

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.001$ vs 0 time group

した。投与5時間後以降、 CCl_4 投与による脂質過酸化物の有意な増加が認められたが、絶食により低下したGSHの CCl_4 投与によるさらなる低下は認められなかった。一方、肝内ポリアミン類は、Fig.1-2に示すように CCl_4 により、短時間の間にSpm、Spd量の低下が認められ、脂質過酸化物との間に逆の相関関係が示された。

1-1-2 四塩化炭素投与ラットの肝脂質過酸化物の上昇におよぼす ポリアミン同時投与の影響

【実験動物】

1. 動物

SD系雄性ラット(体重150-180g)を用いた。 CCl_4 は corn oilで50%溶液(V/V)とし、1ml/kgの用量で皮下投与した。Spm四塩酸塩は20mg/kg、Spd三塩酸塩を14.6 mg/kg、Put二塩酸塩を9.3mg/kgの用量で腹腔内投与した。また全ての動物に、モノアミン酸化酵素阻害作用を有するイプロニアジドを5mg/kgの用量で腹腔内投与した。投与は犠殺24時間および12時間前の2回行い、動物は24時間絶食した。肝Msは1.15%KCl溶液にて灌流、ホモジナイズを行いKitadaらの方法⁵²⁾により調製した。

2. チトクローム P-450の定量ならびにNADPH-チトクローム c(P-450)還元酵素活性の測定

P-450は、20%グリセリンおよび0.2%エマルゲン-913(E-913)を含む0.1M Kpi (pH7.4)にてOmuraとSatoの方法⁴⁾により分子吸光係数 $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用い測定した。Fp₂の活性はPhillipsとLangdonの方法⁵⁵⁾により測定した。

3. グルタチオンパーオキシダーゼ、グルタチオンレダクターゼ活性の測定

GSHpx活性は、CHPを基質としてLawrenceとBurkの方法⁵⁶⁾により、グルタチオンレダクターゼ (GSHred)活性は MassayとWilliamsの方法⁵⁷⁾により測定した。

4. 蛋白の定量

蛋白は牛血清アルブミンをスタンダードとしてLowryらの方法⁵⁸⁾により測定し

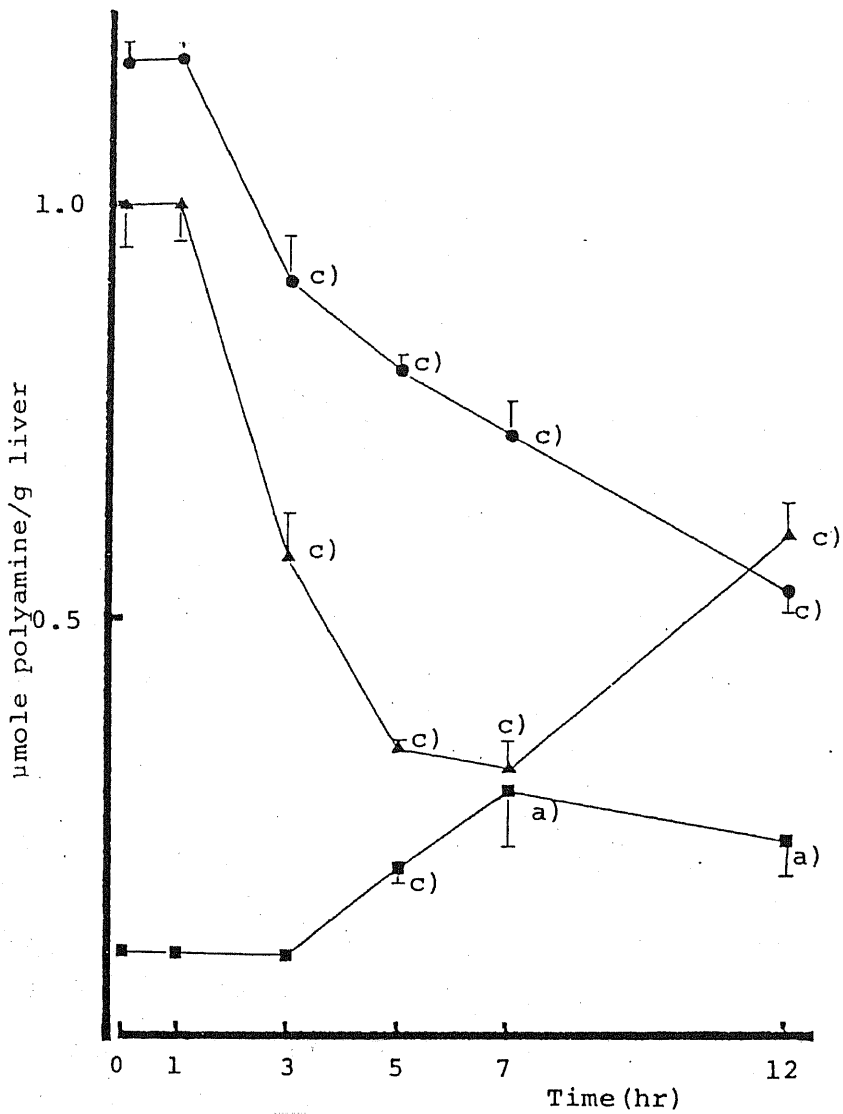


Fig. 1-2 Changes in hepatic spermine (●), spermidine (▲) and putrescine (■) levels after treatment of carbon tetrachloride to rats

Each value represents Mean \pm S.E. obtained from 4 animals.

a) $p < 0.05$, c) $p < 0.001$ vs 0 time group

た。

【実験結果】

CCl₄投与ラットにSpm、SpdまたはPutを同時投与することにより、全てのポリアミン投与群で、肝脂質過酸化物の低下が示されたが、Spm投与群で最も強く有意な低下が認められた(Fig.1-3)。これは、Kitadaら⁴⁹⁾のMsを用いたin vitroで、Spmが最も強い阻害を示したのと同様の結果であり、in vitroで示された脂質過酸化阻害作用が、in vivoにおいても見られることが明らかとなった。最も強い阻害を示したSpmをCCl₄と同時投与した時のP-450ならびにGSHpx、GSHred活性、GSH量の変動を調べた。SpmをCCl₄と同時投与することにより、脂質過酸化物は対照群のレベルまで低下していた(Fig.1-4)。この時、CCl₄投与によって低下したP-450量の回復は認められなかったと同時に、Fp₂はCCl₄投与、Spm併用によっても全く変化しなかった(Table 1-1)。また過酸化物の消去系と考えられるGSHpx活性、ならびにGSHred活性にもSpmは作用しなかった(Table 1-2)。さらに、Spmが肝内GSH量を増加させる事により脂質過酸化物を低下させている可能性が少ないことが推察された(Table 1-3)。Fig.1-5にこの時の肝内ポリアミン量を示した。Fig.1-1、Fig.1-4からも明らかのように、CCl₄を皮下投与した場合には、腹腔内投与の場合に比べ脂質過酸化物の上昇の程度は弱いけれども、この場合にもSpmの減少が示された。Spmを投与することにより、肝内Spm量は、対照群、CCl₄投与群に比べ有意に増加していた。

1-1-3 スペルミン投与による正常ラットの肝脂質過酸化物の変動

【実験方法】

1. 動物

ラットは1-1-2と同様の体重のものを用いた。Spm四塩酸塩は40mg/kgの用量で腹腔内投与した。Fp₂の精製はSD系雄性ラット(体重120-130g)を用い、PBを0.1%溶液にて1週間自由に摂取させた後、Msを調製し酵素源として用いた。

2. NADPH-チトクローム c(P-450)還元酵素の精製

本酵素の精製に関する詳細は3-6-1に示す。精製標品は蛋白としてほぼ単一で

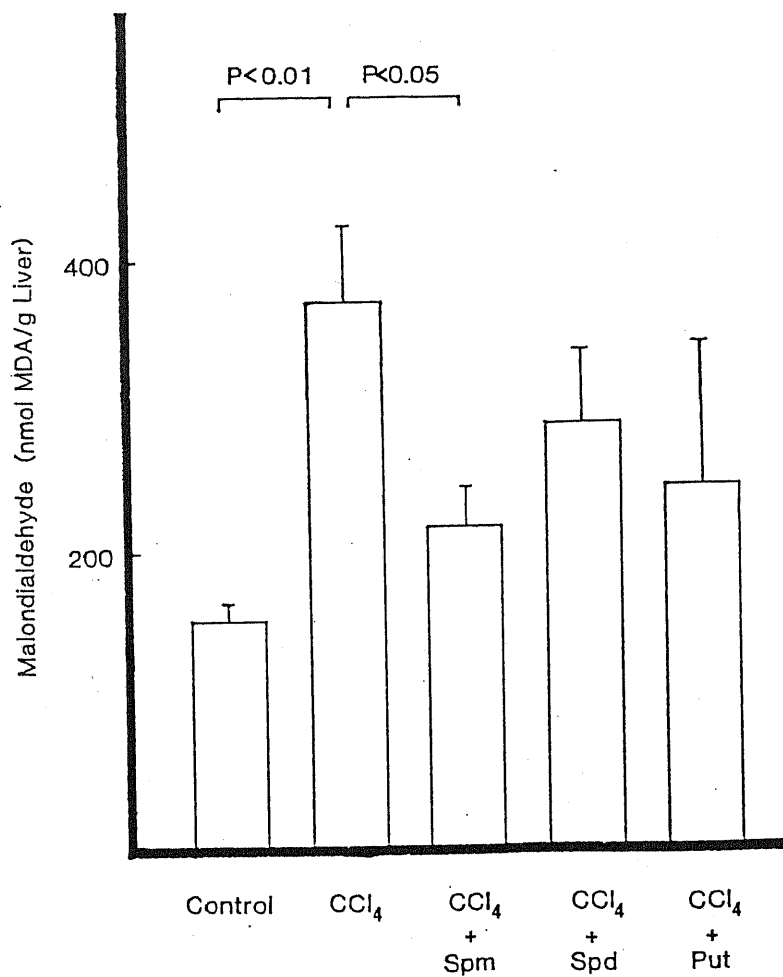


Fig. 1-3 Effect of spermine, spermidine or putrescine administration on hepatic lipid peroxide level in carbon tetrachloride treated rats

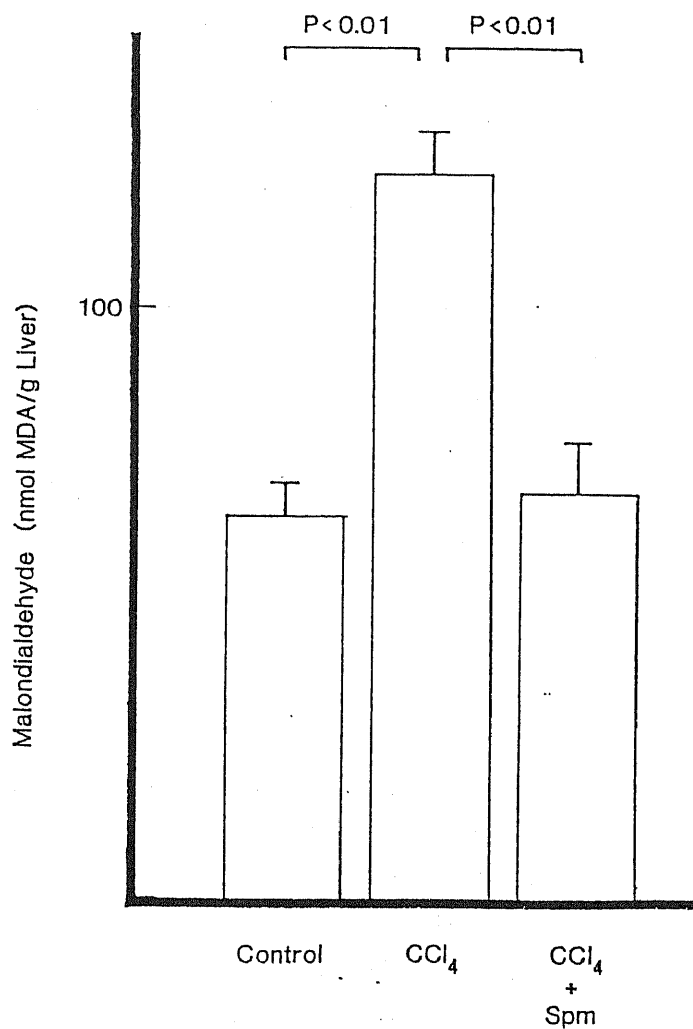


Fig. 1-4 Effect of spermine treatment on hepatic lipid peroxide level in carbon tetrachloride treated rats

Table 1-1 Effect of spermine treatment on hepatic microsomal cytochrome P-450 content and NADPH-cytochrome c reductase activity in carbon tetrachloride treated rats

Treatment	Cytochrome P-450		NADPH-Cytochrome <u>c</u> reductase	
	nmole/g L.	nmole/mg prot	unit/g L.	unit/mg prot
Control	17.2 ± 1.1	0.75 ± 0.04	2.54 ± 0.24	0.096 ± 0.004
CCl ₄	7.5 ± 0.8 ^{c)}	0.39 ± 0.02 ^{c)}	1.72 ± 0.18	0.091 ± 0.005
CCl ₄ + Spermine	8.7 ± 0.7 ^{c)}	0.40 ± 0.02 ^{c)}	1.92 ± 0.11	0.089 ± 0.003

Significant difference from control; c) p < 0.001

Table 1-2 Effect of spermine treatment on glutathione reductase and peroxidase activities in carbon tetrachloride treated rats

Treatment	Glutathione reductase	Glutathione peroxidase
	(unit/g liver)	(unit/g liver)
Control	4.91 ± 0.11	23.19 ± 0.44
CCl ₄	5.22 ± 0.36	21.02 ± 0.79 ^{a)}
CCl ₄ + Sperimine	4.92 ± 0.34	19.42 ± 2.05

Significant difference from control; a) p < 0.05

Table 1-3 Effect of spermine treatment on hepatic glutathione level in carbon tetrachloride treated rats

Treatment	Hepatic glutathione content			Ratio
	Reduced form ($\mu\text{moleGSH/g L.}$)	Oxidized form ($\mu\text{moleGSSG/g L.}$)	Total ($\text{GSH}+2\text{GSSG}$)	
Control	2.61 ± 0.08	0.216 ± 0.003	2.98 ± 0.05	0.086 ± 0.002
CCl_4	$4.17 \pm 0.21^{\text{c}}$	$0.302 \pm 0.007^{\text{c}}$	$4.77 \pm 0.07^{\text{c}}$	$0.070 \pm 0.002^{\text{c}}$
CCl_4 + Spermine	$3.94 \pm 0.23^{\text{c}}$	$0.312 \pm 0.015^{\text{c}}$	$4.56 \pm 0.24^{\text{c}}$	0.080 ± 0.005

Significant difference from control; c) $p < 0.001$

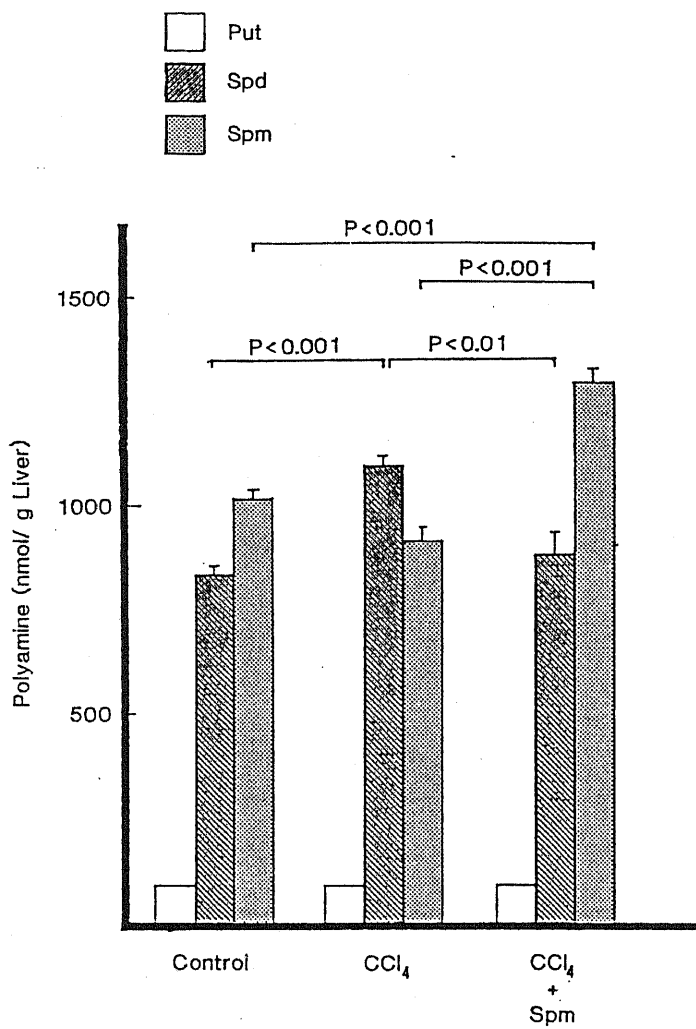


Fig. 1-5 Effect of spermine treatment on hepatic polyamines contents in carbon tetrachloride rats

あり、比活性は45unit/mgであった。

3. リン脂質の抽出と定量

ラット肝Msのリン脂質はFolchらの方法⁵⁹⁾により行った。リン脂質はBertletの方法⁶⁰⁾により、無機リンとして定量した。

4. in vitroにおける脂質過酸化反応

反応液

Na·Kpi(pH7.4)	80 mM
Phospholipid	Exp.1;0.05, Exp.2;0.1mM
Fe(NO ₃) ₃	0.22 mM
EDTA	0.1 mM
ADP	2 mM
Fp ₂	0.229unit
NADPH	0.2 mM

0.5 ml

上記の反応液をNADPHを添加することにより反応を開始し、37°Cで10分間反応後、BuegeとAustの方法⁶¹⁾により測定した。

【実験結果】

CCl₄投与による肝Spm量の減少に伴う肝脂質過酸化物の上昇に対し、Spmを投与しSpmの減少を補うことにより肝脂質過酸化物の上昇が抑制された。次に、このSpmの肝脂質過酸化物低下作用が、正常動物においても認められるかを検討した(Table 1-4)。表からも明らかなように、正常ラットにSpmを投与することにより、肝脂質過酸化物は低下し、この時もCCl₄投与ラットの場合と同様に肝内Spm量は増加していた。ここで得られたSpm量の増加とほぼ同じ条件下で Svingenら⁶²⁾のP-450を含まない脂質過酸化反応のモデル系でのSpmの効果を検討した(Table 1-5)。Spm 0.1 mM添加により、Exp. 1で約27%、Exp. 2 で約15%の阻害を示し、こ

Table 1-4 Changes in hepatic lipid peroxide and polyamine levels after treatment of spermine to rats

Time after administration (hr)	Lipid peroxide (n mole/g liver)	Polyamine content (n mole/g liver)		
		Spermine	Spermidine	Putrescine
0	231.0 ± 51.9	1046 ± 18	977 ± 27	93.8 ± 0.9
0.5	133.8 ± 13.4	1070 ± 44	909 ± 27	93.3 ± 1.7
1	137.8 ± 20.8	1222 ± 82	902 ± 23	89.0 ± 4.7
3	103.7 ± 12.7*	1293 ± 76*	888 ± 48	91.6 ± 0.4
5	158.1 ± 34.6	1247 ± 81	759 ± 53*	86.9 ± 0.6***
7	135.3 ± 23.0	1212 ± 30**	816 ± 42*	87.5 ± 0.9**

Each value represents Mean ± S.E. obtained from 4 animals.
 Significant difference from 0 time group; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Table 1-5 Inhibitory effect of spermine on NADPH-dependent lipid peroxidation by reconstituted system

Spermine (mM)	Malondialdehyde formation (n mole/ml/10min)	
Exp. 1		
0	3.60	
0.1	2.62	(27.3)
0.2	2.39	(33.7)
1.0	1.89	(47.6)
2.5	1.58	(56.1)
Exp. 2		
0	6.29	
0.1	5.31	(15.6)
0.2	4.79	(23.9)
1.0	3.62	(42.5)
2.0	3.37	(46.5)

Numbers in parentheses represent per cent inhibition

の様な低濃度のSpmによっても脂質過酸化阻害作用は明らかに認められ、また系に加えるリン脂質量を増加させた場合には、Spmの阻害作用が弱まることが判った。

第2章 ミクロゾームにおけるマクロサイクリックポリアミンの脂質過酸化阻害作用について

【実験方法】

1. in vitroにおける脂質過酸化反応

モデル系における反応液は以下のとおりである。

反応液

Tris·HCl(pH6.8)	250 mM
NaCl	250 mM
ADP	2 mM
EDTA	0.1 mM
Fe(NO ₃) ₃	0.2 mM
Phospholipid	1.0 mg
Fp ²	0.016unit
NADPH	0.1 mM
<hr/>	
	1.0 ml

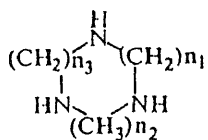
生成したマロンジアルデヒドは、チオバルビツール酸によって発色させ、分子吸光係数 $156\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

2. サイクリックポリアミン

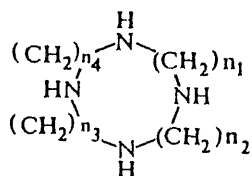
用いたCPをFig.1-6に示した。

【実験結果】

Fig.1-6に示したCPとSpm、SpdのMs脂質過酸化反応に対する作用をFig.1-7に示した。脂質過酸化阻害作用は、2,3,3,3-, 2,3,4,3-, 3,3,3,4-CPとSpmで強く認められ、その中でも2,3,3,3-CPで最も阻害が強かった。最も強い阻害を示した



- (1) $n_1 = n_2 = 3$
 $n_3 = 4$
 3,3,4 - cyclic polyamine



- (1) $n_1 = n_2 = n_3 = 3, n_4 = 4$
 3,3,3,4 - cyclic polyamine
 (2) $n_1 = 2, n_2 = n_3 = n_4 = 3$
 2,3,3,3 - cyclic polyamine
 (3) $n_1 = 2, n_2 = n_4 = 3, n_3 = 4$
 2,3,4,3 - cyclic polyamine

Fig 1-6 Illustration of cyclic polyamines

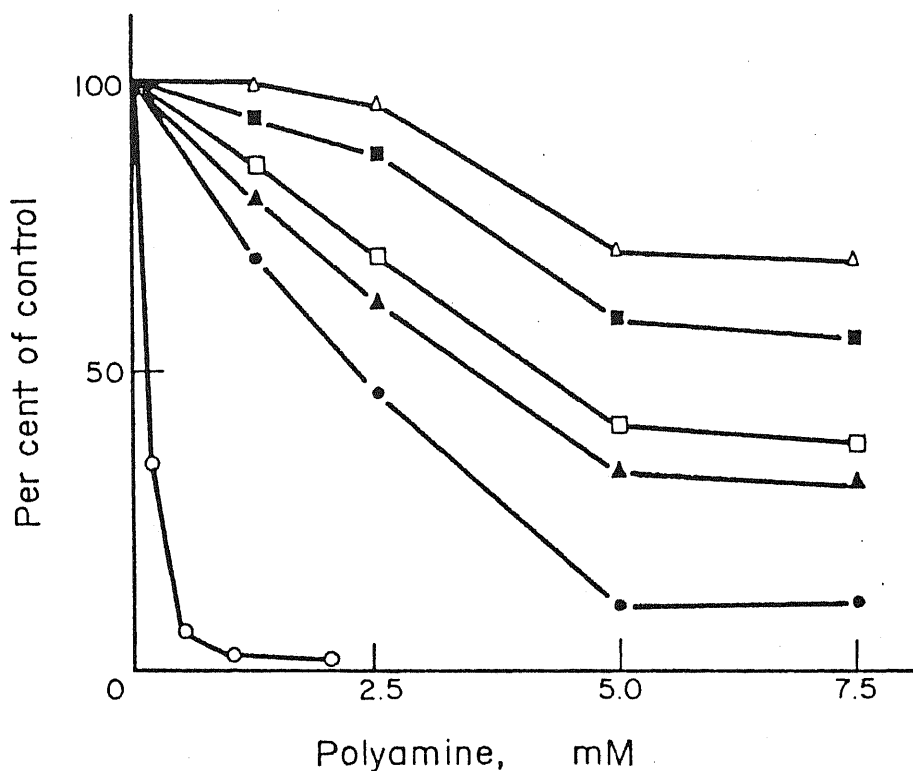


Fig. 1-7 Effects of macrocyclic polyamines on NADPH-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes

A standard mixture for microsomal lipid peroxidation contained 80 mM Na,K-phosphate (pH 7.4), 6 mM MgCl₂, 0.33 mM NADP, 8 mM Glucose-6-phosphate, 0.1 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase and microsomes (0.55 mg proteins). Incubation was carried out at 37°C for 10 min aerobically in the presence of spermine (▲), 3,3,4-cyclic polyamine (■), 3,3,3,4-cyclic polyamine (□), spermidine (Δ), 2,3,4,3-cyclic polyamine (●) and 2,3,3,3-cyclic polyamine (○).

2,3,3,3-CPを用いて、その阻害を経時的にみたのがFig.1-8である。ポリアミン添加濃度に依存した脂質過酸化阻害作用は、反応時間により変化することなく、2,3,3,3-CPによる阻害は、反応中に生成するラジカル生成物をトラップすることによるものではないものと考えられた。Table 1-6に示すように、2,3,3,3-CPは、MsのFp₂の活性を阻害することはなかった。かつ、CHP-誘起脂質過酸化反応も弱いながらその阻害が示され、Fp₂により触媒されるモデル系においても明らかな阻害作用を示した。CPの本作用発現機序として、Spm において報告されているリン脂質への相互作用⁴⁴⁾に依るものかを検討した。Msのリン脂質に対する作用を見るために、Msに抽出リン脂質を添加し、全リン脂質と脂質過酸化反応に対する両逆数プロットをとったのがFig.1-9である。2,3,3,3-CPの脂質過酸化阻害は、リン脂質に対する完全な競合的阻害を示していなかった。また、鉄を系に添加することにより、2,3,3,3-CPの阻害が著しく弱まり、鉄100 μM添加時の阻害はSpm とほぼ同程度であった(Fig.1-10)。

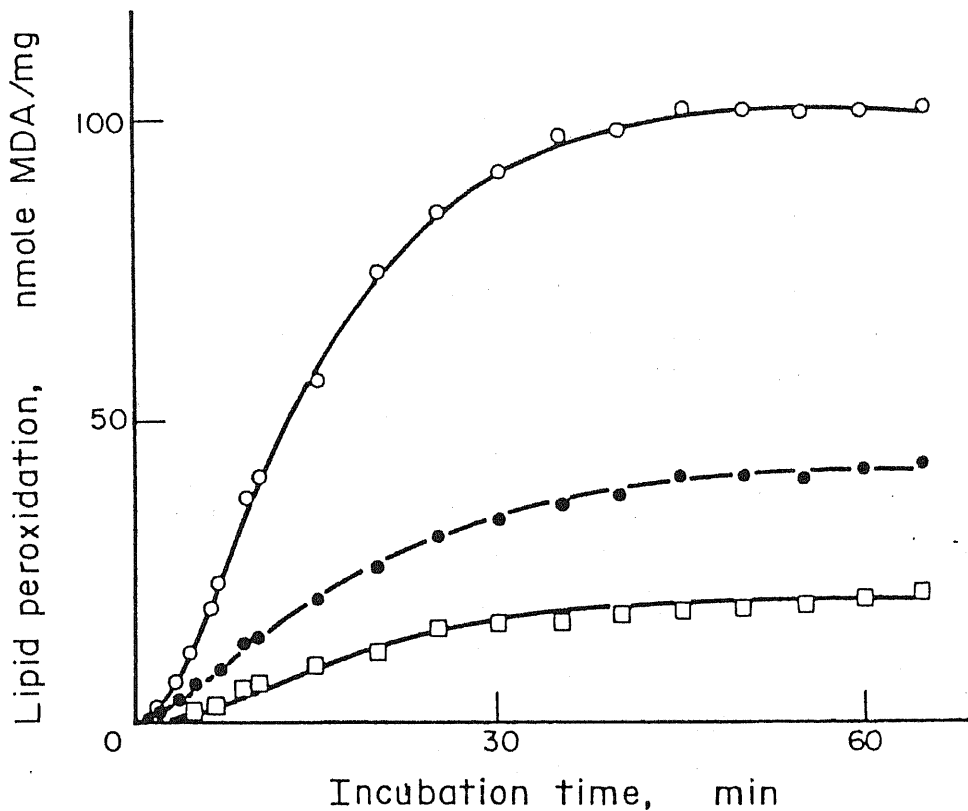


Fig 1-8 Effect of 2,3,3,3-cyclic polyamine on the time course of NADPH-induced lipid peroxidation. Malondialdehyde formed was measured in the presence (0.1 mM ●, 0.2 mM □) or absence (○) of 2,3,3,3-cyclic polyamine.

Table 1-6 Effects of 2,3,3,3-cyclic polyamine on NADPH-cytochrome c reductase activity, cumene hydroperoxide induced lipid peroxidation and NADPH-cytochrome c supported lipid peroxidation in reconstituted system*

Addition	NADPH-cytochrome c (P-450) reductase activity (unit/mg)	Cumene hydroperoxide induced lipid peroxidation (nmole MDA/mg/min)	NADPH-cytochrome c (P-450) reductase supported lipid peroxidation in reconstituted system (μ mole MDA/unit/min)
None	0.119 \pm 0.004	1.218 \pm 0.021	0.499 \pm 0.016
2,3,3,3-Cyclic polyamine (0.5 mM)	0.118 \pm 0.003	1.116 \pm 0.020	0.422 \pm 0.015
2,3,3,3-Cyclic polyamine (1.0 mM)	—	1.080 \pm 0.017	0.355 \pm 0.011
2,3,3,3-Cyclic polyamine (2.0 mM)	0.108 \pm 0.001	—	0.199 \pm 0.001

* The assay mixture (1 ml) for cumene hydroperoxide induced lipid peroxidation contained 80 mM Na,K-phosphate (pH 7.4), 0.55 mg of microsomal proteins and 0.1 mM cumene hydroperoxide.

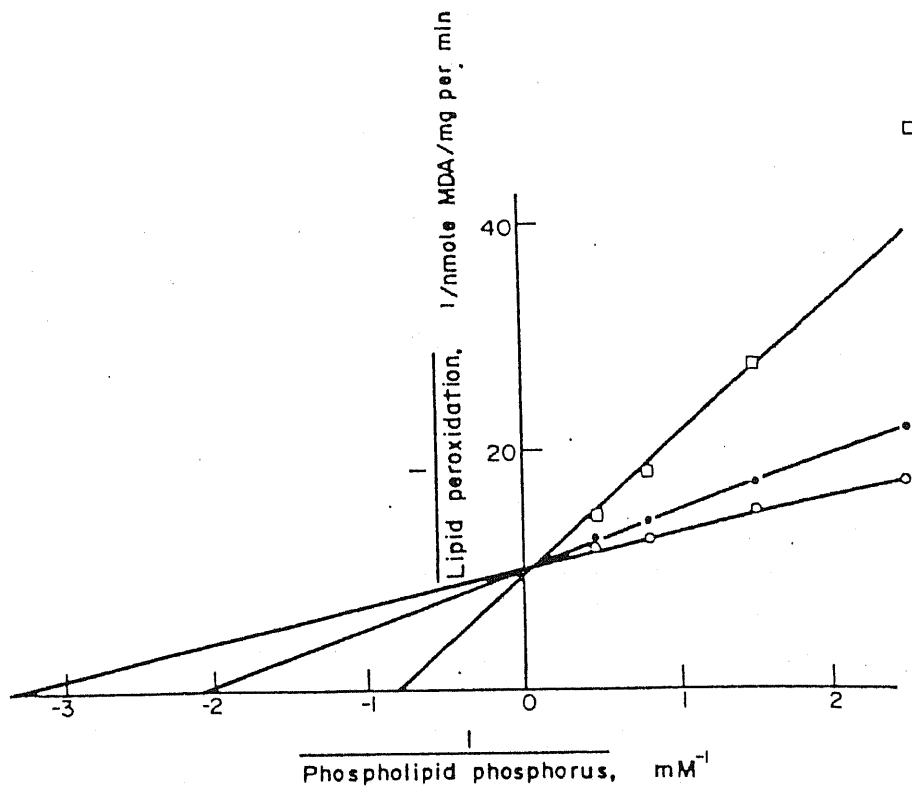


Fig. 1-9 Double reciprocal plots of microsomal lipid peroxidation against the concentration of phospholipids.. The formation of malondialdehyde was measured in the presence (0.1 mM ●, 0.5 mM □) or absence (○) of 2,3,3,3-cyclic polyamine.

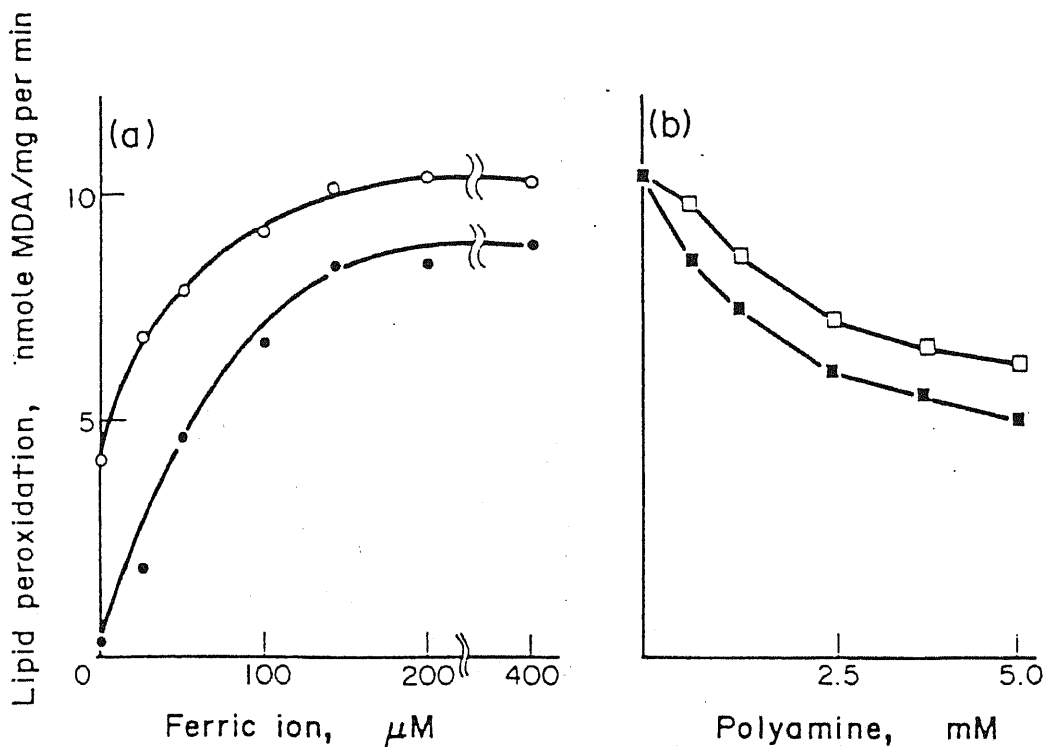


Fig. 1-10 Effect of ferric ion on the inhibition of microsomal lipis peroxidation by 2,3,3,3-cyclic polyamine.

(A) Lipid peroxidation was measured as described in Fig. 1-6 in the presence (●) or absence (○) of 0.5 mM 2,3,3,3-cyclic polyamine. (B) Lipid peroxidation was measured in the presence of 0.1 mM ferric ion. 2,3,3,3-Cyclic polyamine (■); spermine (□)

第3章 ラット肝ミクロゾームの 脂質過酸化反応とチトクローム P-450

【実験方法】

1. 動物

SD系雄性ラット(体重140-150g)を用い、PBは0.1%水溶液として1週間自由に摂取させ、3-メチルコランスレン(MC)は、Msを用いた実験の場合には25mg/kgの用量で7日間、P-450の精製の場合には40mg/kgの用量で1日おきに4回腹腔内投与した。

2. チトクロームP-450の精製および抗体の作成

用いたP-450の精製はKitadaらの方法⁶⁴⁾を若干改変し、PB前処理MsからPB P-450を、MC前処理からMC P-448₁、およびMC P-448₂を精製した。雌性日本白色ウサギ(2.5-3kg)を用い、1 nmoleのP-450をFreund's complete adjuvantと1:1で懸濁させ、foot padに1週間おきに2回感作し、抗体の生成を確認した後、3 nmoleのP-450を生理食塩水と1:1で混合し耳静脈内に投与し、投与4日後から1日おきに3回、耳静脈から採血後、全血を採取した。血液は37°Cで1時間処理を行い、4°Cにて一晚放置後、抗血清を調製した。IgGの分離はNoshiroとOmuraの方法⁶⁵⁾により、抗血清を25-50%飽和硫酸にて分画した後、DE-52カラムの素通り画分を集め、IgG分画とした。

3. TMPD-パーオキシダーゼ活性の測定

TMPD-パーオキシダーゼ活性は、HrycayとO'Brienの方法⁶⁶⁾により1.5mMCHP存在下にて測定した。

【実験結果】

Table 1-7、Table 1-8に、PBおよびMC前処理ラット肝Msの脂質過酸化反応に対するPB P-450、MC P-448₁、およびMC P-448₂の抗体の作用を示したものである。MsとIgGの反応は37°Cで10分間行った。IgG無添加時の反応は、preimmuneのIgGに依

Table 1-7 Effect of anti PB P-450 IgG on NADPH- or CHP-promoted lipid peroxidation in PB pretreated rat liver microsomes

Anti-PB P-450 IgG	MDA formation			
	NADPH		CHP	
	nmole/mg/20 min	%	nmole/mg/3 min	%
None	17.23	100	6.41	100
0.5 mg	11.82	68.6	5.83	91.0
1.0 mg	8.86	51.4	7.82	123.0

Table 1-8 Effects of anti-MC P-448₁ or MC P-448₂ IgG on NADPH-promoted lipid peroxidation in MC pretreated rat liver microsomes

Additions	MDA formation (nmole/mg/20 min)	Inhibition (%)
None	14.39	0
Anti-MC P-448 ₁ IgG (1.0 mg)	9.50	34.0
Anti-MC P-448 ₂ IgG (1.0 mg)	8.47	41.1
Anti-MC P-448 ₁ IgG +	4.01	72.1
Anti-MC P-448 ₂ IgG (1.0 mg + 1.0 mg)		

って阻害されなかったが、用いた全てのP-450の抗体によりNADPH-誘起脂質過酸化反応の阻害がみられた。しかしながら、CHP-誘起脂質過酸化反応は、NADPHの場合と異なり、P-450の抗体で阻害されることはなかった。この時P-450のTMPD-パーオキシダーゼ活性もまた、P-450の抗体3種により阻害されなかった(Table 1-9)。またNADPH-誘起脂質過酸化反応は、Fp₂の抗体により強く阻害されたが、その系にさらにP-450の抗体を添加させた場合、相加的な阻害は見られなかった(Table 1-10)。

Table 1-9 Effects of anti-P-450 IgGs on TMPD-peroxidase activity in MC and PB pretreated rat liver microsomes

Enzyme source	Additions	TMPD-peroxidase activity	
		nmole/mg/min	% of Control
PB-pretreated	None	178.1	100
	Anti-PB P-450 IgG		
	0.7 mg	161.4	90.6
	1.4 mg	143.3	80.5
	2.1 mg	151.0	84.8
	2.8 mg	154.3	86.6
MC-pretreated	None	65.9	100
	Anti-MC P-448 ₁ IgG		
	0.7 mg	54.2	82.3
	1.4 mg	50.3	76.4
	2.1 mg	51.7	78.5
	2.8 mg	54.5	82.7
	Anti-MC P-448 ₂ IgG		
	0.7 mg	57.8	87.8
	1.4 mg	62.6	94.9
	2.1 mg	48.9	74.3
	2.8 mg	56.7	86.1

Table 1-10 Absence of additive inhibitory effect of anti-PB P-450 IgG and anti-Fp₂ IgG on NADPH-promoted lipid peroxidation in PB treated rat liver microsomes

Anti-PB P-450 IgG (mg)	Malondialdehyde formation (n mole/mg/20 min)	
	-Anti-Fp ₂ IgG	+Anti-Fp ₂ IgG (1 mg)
0	7.50	1.97
0.25	6.66 (88.8)	1.71 (86.9)
0.50	5.36 (71.5)	1.71 (86.9)
0.75	5.29 (70.6)	1.71 (86.9)
1.00	4.15 (55.4)	1.79 (91.0)

Numbers in parentheses represent per cent of each control.

第4章 脂質過酸化反応への チトクロームP-450の 要求性

【実験方法】

1. リン脂質の調製

再構成系に用いたリン脂質は、1-1-3の方法により抽出後、アセトン処理したものをを用いた。

2. チトクローム b₅の精製

チトクローム b₅は ω -aminooctyl-Sepharose 4Bカラムにて分画した後、SpatzとStrittmatterの方法⁶⁷⁾により精製した。精製標品の比含量は33.1 nmol/mgであった。

【実験結果】

P-450、Fp₂およびリン脂質からなる再構成系を用い、NADPH-誘起脂質過酸化反応におけるP-450の重要性について検討した(Table 1-11)。P-450を含まない系での脂質過酸化反応は0.13nmole/ml/minであったのに対し、PB P-450あるいはMC P-448₂を添加することにより、PB P-450の場合約22倍、MC P-448₁の場合約8.5倍の上昇がみられた。P-450と同様にヘムを含む化合物またはFe³⁺が、再構成系でP-450と置き換わり得るかを比較したのがTable 1-12である。P-450としてはPB P-450を用いた。NADPH-ならびにCHP-誘起脂質過酸化反応いずれの反応系においても、他の化合物に比べPB P-450を加えた系のほうが高かった。また、P-450を熱変性させることにより、反応性が約90%低下し、ヘミンとほぼ同程度であった。Svingenら⁶²⁾は、Fig.1-11に示す仮説を提唱し、P-450はその連鎖段階にのみ関与すると報告しているが、ここで示した結果から、P-450はMsでの脂質過酸化反応全体に関与していることが考えられた。

Table 1-11 Requirements for NADPH-promoted lipid peroxidation in reconstituted microsomal electron transport systems

Components	Malondialdehyde formation (nmoles/ml/10 min)	
	- ADP-Fe ³⁺	+ ADP-Fe ³⁺
Control	U.D.	U.D.
+ NADPH-Cytochrome c reductase	0.13	1.56
+ Reductase + PB P-450	2.88	7.38
+ Reductase + MC P-448 ₂	1.12	4.13

Reaction mixtures contained 0.2 mM phospholipid phosphorus, 0.2 mM NADPH and the presence or absence of 2-0.1 mM ADP-Fe(NO₃)₃ in 80 mM Na,K-phosphate, pH 7.4. The following additions of NADPH-cytochrome c reductase, PB P-450 and MC P-448₂ were indicated 0.05 units per ml, 0.25 μM and 0.12 μM, respectively. Incubation was performed for 10 min at 37°C.

Table 1-12 Property of heme catalysts or Fe^{3+} for NADPH-and CHP-promoted lipid peroxidation in reconstituted systems

Catalysts	Conc (μM)	Malondialdehyde formation		
		NADPH system (nmoles/ml/10 min)		CHP system (nmoles/ml/2 min)
		- ADP- Fe^{3+}	+ ADP- Fe^{3+}	
PB P-450	0.12	0.904	2.346	1.000
Boiled P-450		—	0.230	—
Cytochrome b_5	0.19	0.115	0.423	0.154
Hemin	0.20	0.154	0.365	0.269
Hemoglobin	0.20	0.346	0.827	0.615
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	0.20	0.038	U.D.	U.D.

Reaction mixtures contained 0.2 mM phospholipid phosphorus, indicated concentration of catalysts and 0.2 mM cumene hydroperoxide (CHP system) or 0.03 units of NADPH-cytochrome c reductase per ml, 0.2 mM NADPH and the presence or absence of 2-0.1 mM ADP- $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (NADPH system) in 80mM Na,K-phosphate, pH 7.4.

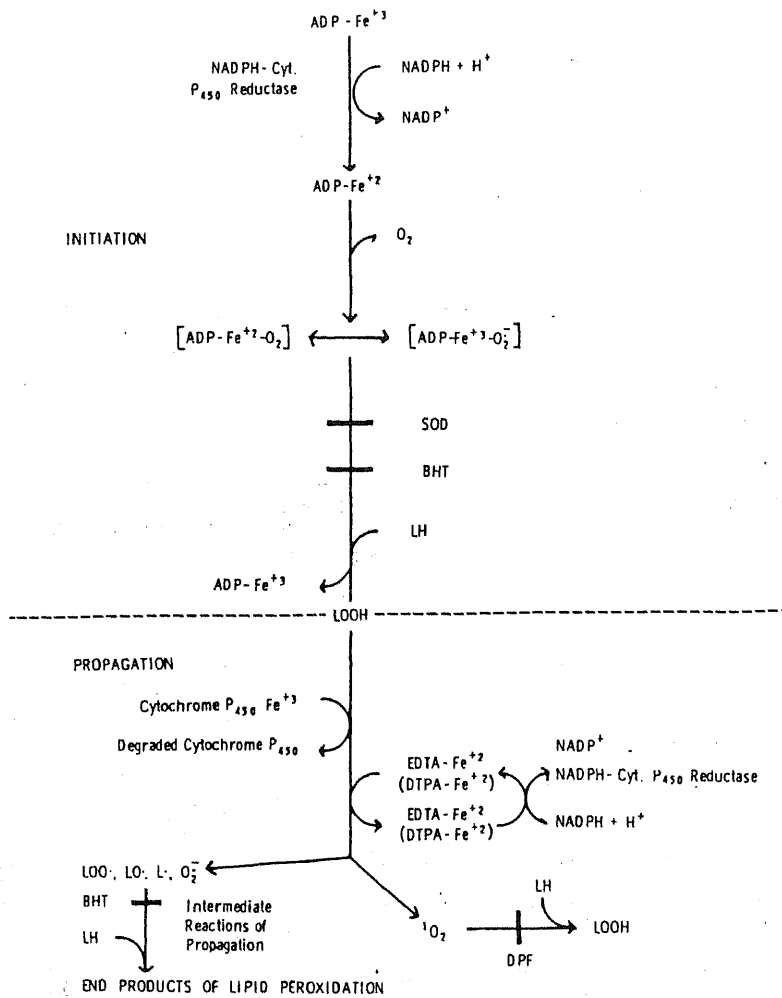


Fig. 1-11 Proposed scheme of NADPH-dependent lipid peroxidation

第5章 チトクロームP-450アイソザイムによる脂質過酸化に対する反応性の差異

【実験方法】

1. 酸素消費量の測定

再構成系での酸素消費量は、Clark-type electrode酸素電極を用い、空気飽和状態の37°Cにおける溶存酸素量215 μM を100%とし、それに対する消費量から求めた。

2. 過酸化リン脂質の調製

Msから抽出したリン脂質を、3時間紫外線照射し、大気中に72時間放置後、再び1-4に従いリン脂質画分として回収した。

3. サクシニルチトクローム cの調製およびスーパーオキシドアニオン生成量の測定

Noguchiらの方法⁶⁹⁾によりチトクローム cをサクシニル化した後、Sephadex G-25カラム、DEAE-Sephacellカラムにて未反応のチトクローム cを分離し、サクシニルチトクローム c(SCC)を調製した。スーパーオキシドアニオン(O_2^-)は、SCCの還元による550nmの吸光度変化を、分子吸光度係数21.1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いてその生成量を求めた。

4. NADPH-パーオキシダーゼ活性の測定

NADPH-パーオキシダーゼ活性は、Hrycayらの方法⁶⁹⁾を若干改変し、CHP1.5mM、NADPH0.2mM存在下にて340nmの吸光度の減少から測定した。

【実験結果】

PB P-450、MC P-448₁およびMC P-448₂を用い、再構成系に加えるP-450各アイソザイム量を変化させたときの脂質過酸化をFig.1-12に示した。いずれのP-450を用いた場合にも反応に対するP-450の要求性が明らかとなった。用いたいずれ

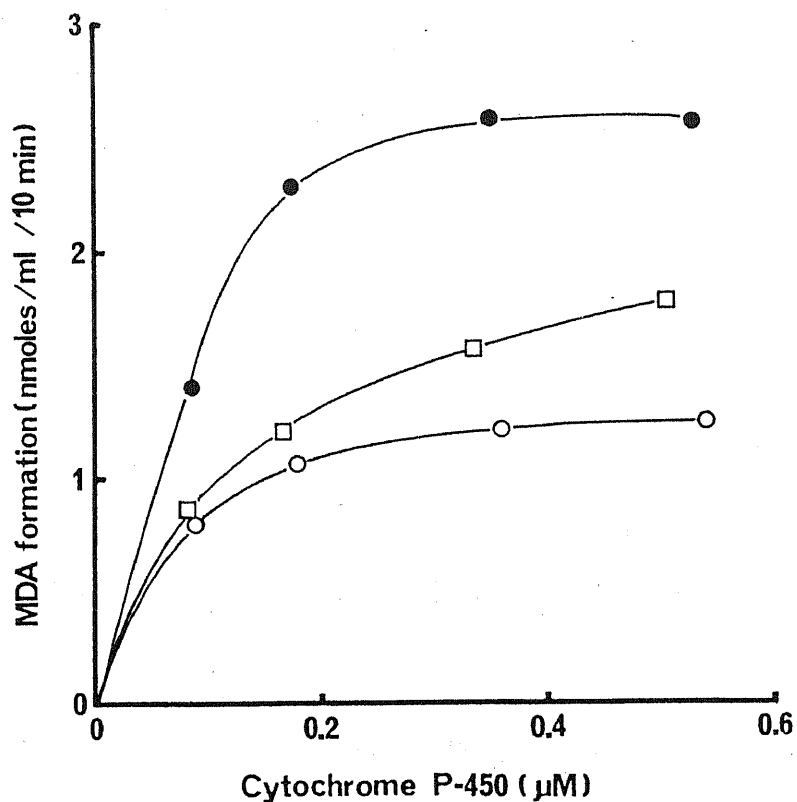


Fig. 1-12 Dependence of cytochrome P-450 on NADPH-promoted malondialdehyde formation in reconstituted system

Reaction mixtures contained 0.2 mM phospholipid phosphorus, 0.2 mM NADPH, 0.1 units of NADPH-cytochrome c reductase per ml and indicated concentration of MC P-448₁ (●), MC P-448₂ (○) or PB P-450 (□).

の濃度においてもP-450アイソザイム間での反応性は異なっており、MC P-488₁》PB P-450) MC P-448₂の順であった。Msの脂質過酸化反応には、パーオキシダーゼ依存性の反応も示されていることから、その反応性、いわゆるCHP-誘起脂質過酸化反応においても、P-450アイソザイムにより差異があるかについて検討した (Fig.1-13)。CHPに対する親和性に各アイソザイムで差異があることを考慮し、反応とCHP濃度の両逆数プロットを示した。図からも明らかに、その反応性には大きな違いがみられ、PB P-450 \geq MC P-448₂》MC P-448₁の順であった。この時、CHPに対する要求性にも大きな違いがみられ、反応性の低かったMC P-448₁の場合のCHPに対する K_m 値は約0.8mMと極めてCHPに対する親和性が低いことが判った。以降、反応性の差異が顕著にみられたMC P-448₁とMC P-448₂を主に用いて検討した。CHP-誘起脂質過酸化反応で見られた反応性の差異は、用いるパーオキシドの種類によるものではなかった (Table 1-13)。ここまで、NADPH-、CHP-誘起脂質過酸化反応に対する反応性がP-450アイソザイム間で異なることが明らかになったことから、次にその反応機作の同異について検討した。Svingenら⁶²⁾が、脂質過酸化の開始剤として用いているADP-Fe³⁺の添加効果を比較したのが、Table 1-14である。酸素消費量を指標とした場合にもNADPH-誘起脂質過酸化反応に対応してMC P-448₁の消費量が最も多かった。ADP-Fe³⁺を系に添加した時の脂質過酸化促進の程度は、P-450種によって同一ではなく、MC P-448₂では約3倍の上昇が認められたのに対し、MC P-448₁では1.85倍と低く、その比はADP-Fe³⁺無添加の場合は3.26であったのに対し、ADP-Fe³⁺を添加することにより2.0と小さくなることが明らかとなった。この結果は、酸素消費量を指標とした場合により顕著であった。次に酸素の活性化に対する作用を比較するために、種々の活性酸素スカベンジャーおよびCOのNADPH-誘起脂質過酸化反応に対する効果をP-448₁およびP-448₂で検討した (Table 1-15)。カタラーゼでは、両酵素反応共に阻害が認められなかった。スーパーオキシドディスムターゼ、COによる阻害はMC P-448₁で各々87および62%の阻害と、MC P-448₂に比べ強い阻害がみられた。このことから、MC P-448₁では活性酸素、特にO₂⁻の生成量が高いことが考えられた。実際、SCCの還元を指標にしてO₂⁻生成量を測定した時、MC P-448₁では2.36、MC P-448₂では0.36nmole/nmoleP-450/min と、MC P-448₁の方が約5倍高かった (Table 1-16)。それとは逆にCHP-誘起脂質過酸化反応性が高いMC P-448₂では高いTMPD-

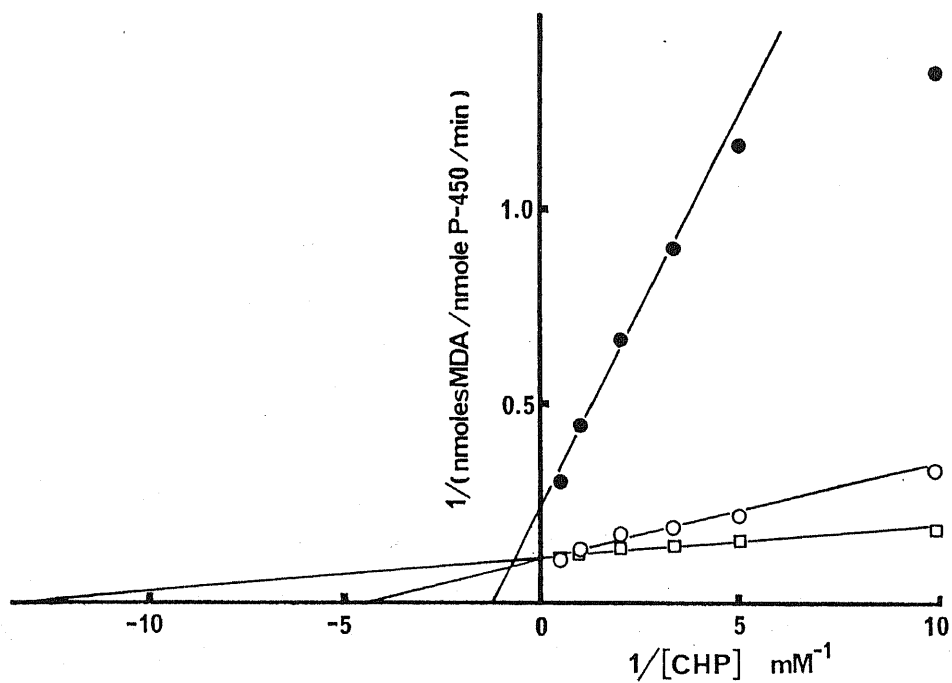


Fig. 1-13 Lineweaver-Burk plot, used to determine the apparent K_m for cumene hydroperoxide and V_{max} in cytochrome P-450-dependent malondialdehyde formation

Symbols represent MC P-448₁ (●), MC P-448₂ (○) and PB P-450 (□).

Table 1-13 Peroxide-promoted malondialdehyde formation in reconstituted system

Lipids and peroxides ^{a)}	Malondialdehyde formation (nmoles/nmole P-450/min)	
	MC P-448 ₁	MC P-448 ₂
Phospholipid		
+ Cumene hydroperoxide	0.917	1.839
+ t-Butyl hydroperoxide	0.083	0.690
+ Hydrogen peroxide	0.333	0.804
Peroxidized phospholipid ^{b)}	0.146	0.230

a) Each peroxide was added 0.2 mM at final concentration

b) Value of peroxide was 0.2 mole/mole lipid phosphorus

Table 1-14 Effect of ADP-Fe³⁺ on NADPH-promoted malondialdehyde formation and oxygen consumption catalyzed by cytochrome P-450

Cytochromes	Malondialdehyde ^{a)} formation		Oxygen ^{b)} consumption	
	-ADP-Fe ³⁺	+ADP-Fe ³⁺	-ADP-Fe ³⁺	+ADP-Fe ³⁺
MC P-448 ₁	1.11	2.05	9.03	10.32
MC P-448 ₂	0.34	1.03	4.31	8.16
PB P-450	0.64	1.58	4.36	9.00

Reaction mixtures contained 0.2 mM phospholipid phosphorus, 0.1 μM cytochrome P-450, 0.4 units of NADPH-cytochrome c reductase per ml, 0.2 mM NADPH and the presence or absence of 2-0.1 mM ADP-Fe(NO₃)₃ in 80 mM Na,K-phosphate, pH 7.4.

a) nmoles/nmole P-450/min

b) nmoles O₂/ml/min

Table 1-15 Influence of active oxygen scavengers and heme adducts on NADPH-promoted malondialdehyde formation catalyzed by cytochrome P-450

Additions	Per cent inhibition of malondialdehyde formation	
	MC P-448 ₁	MC P-448 ₂
Superoxide dismutase (90 units/ml)	87	28
Sodium benzoate (40 mM)	60	23
Catalase (100 units/ml)	0	0
Cyanide (1 mM)	24	15
CO (20% O ₂ : 80% CO)	62	8

Table 1-16 Relationship between the malondialdehyde formation and the succinylated cytochrome c reduction in reconstituted microsomal electron transport system

	Malondialdehyde formation	Succinylated cytochrome c reduction
	(n mole/n mole P-450/min)	
MC P-448 ₁	1.292	2.359
MC P-448 ₂	0.657	0.457

パーオキシダーゼ活性を有している事が判った。(Table 1-17)。

Table 1-17 Peroxidase activity of purified rat hepatic cytochrome P-450

Cytochromes	NADPH peroxidase	TMPD peroxidase
	(nmoles/nmole p-450/min)	
MC P-448 ₁	24.90	12.85
MC P-448 ₂	6.73	18.28
PB P-450	15.31	30.94

For a measurement of NADPH peroxidase, 0.1 nmole of cytochrome P-450 was preincubated with 0.2 units of NADPH-cytochrome c reductase and 50 μ g of dilauroyl phosphatidylcholine for 2 min at 25°C.

第6章 考察

ポリアミン、特にSpmはin vitroのMs脂質過酸化反応を、反応の基質となるリン脂質へ作用することにより強く阻害することが報告されている^{44, 70)}。一方CCl₄投与によりポリアミン代謝系を促進させることも知られている⁷¹⁾。ラットにCCl₄を投与することにより肝のSpm量の低下に伴う脂質過酸化の促進が認められたが、この脂質過酸化はSpmを投与することにより、その上昇が抑制され、この時肝内Spm量も維持されていた。これらのことから、Spmはin vivoにおいても肝脂質過酸化抑制作用を有することが判った。その作用機序について、先ずGSH酸化・還元酵素系に着目した。本酵素系は、GSHとカップリングすることにより、生体内過酸化物を対応するアルコール体に還元し、また、そこで生じたGSSGは還元系により、GSHに還元される⁷²⁾。Spmは本酵素系ならびにGSH量に変化を与えることなく、Spmの脂質過酸化抑制作用発現には寄与していないものと考えられた。CCl₄投与により、活性代謝物の生成にともなってP-450量が低下することが知られている⁷³⁾が、このP-450の減少はSpm投与によって回復することはなかった。また、正常ラットにおいてもSpmの作用が見られたことから、SpmはP-450によるCCl₄の活性代謝物の生成を抑制しているものではないと推察された。Msで認められたと同様にSpmで最も抑制作用が強く、脂質過酸化物の変動はポリアミンの中でもSpmの変動と良く対応していることが明らかとなった。以上の結果をまとめて考察すると、Spmの量的な面が最も重要と考えられ、in vivoで見られたSpmの脂質過酸化抑制作用は、in vitroの系で示されている、リン脂質との相互作用によるリン脂質の保護作用⁷⁰⁾、あるいは、最近報告されたO₂ 除去作用⁷⁴⁾による可能性が推察された。

いくつかの合成CPがMs脂質過酸化反応を阻害することから⁷⁵⁾、この阻害機構について検討した。Fig.1-6に示したCP類の中でも、2,3,3,3-CPは0.1mM添加時で約70%の阻害と、最も強い作用を示した。その効果は、反応時間によって変化する事はなく、ラジカルスカベンジャーとしての作用によるものではないと考えられた。また脂質に対する作用は、Spmに見られた様な完全な競合作用を示さず、かつ鉄イオンの存在化でその阻害作用が低下することから、2,3,3,3-CPの脂質過酸化阻害作用は、鉄イオンとのキレート作用とMsのリン脂質への相互作用による

ものであることが明らかとなった。

MsでのNADPH-誘起脂質過酸化反応が、PB P-450、MC P-448₁およびMC P-448₂の抗体により明らかに阻害され、Bairdの報告したP-450は本反応に関与しないという説⁵¹⁾は否定された。PB MsのNADPH-誘起脂質過酸化反応はFp₂の抗体を添加することにより阻害されたが、その時さらにPB P-450の抗体を添加しても変化は認められず、この反応においてはFp₂→P-450の電子伝達系が極めて重要であることが推察された。

再構成系を用いることにより、P-450アイソザイム間での比較を含めた検討が可能になった。CHP-誘起脂質過酸化反応で報告されていると同様に⁴⁹⁾、NADPH-誘起脂質過酸化反応においても、P-450は他のヘム化合物と比較しその反応の特異性が明らかとなり、その特異性はヘム蛋白としての機能によることが示された。

用いたP-450アイソザイムにより、NADPH-ならびにCHP-誘起脂質過酸化の反応性は異なり、NADPH-の系ではMC P-448₁、PB P-450、MC P-448₂の順に反応性が高く、CHPの系ではMC P-448₂、PB P-450、MC P-448₁の順であった。両反応系の違いは、NADPH-誘起脂質過酸化反応は、その開始段階と連鎖段階の2つの段階共に含む系であり⁶²⁾、CHP-誘起脂質過酸化反応の場合は連鎖段階の系⁴⁹⁾である。これらのことから、2つの段階へのP-450アイソザイムの関与が異なっていることが考えられた。NADPH-誘起脂質過酸化反応の系に、反応の開始段階に関与すると考えられている⁶²⁾ADP-Fe³⁺を添加することによる効果は、CHP-誘起脂質過酸化に対する反応性が高いMC P-448₂で著しく、約3倍の活性上昇と1.9倍の酸素消費量の増加が見られたのに対し、MC P-448₁では添加効果は小さかった。反応の開始剤の要求性がこの様に異なり、その反応が、スーパーオキシドディスムターゼ、COによる阻害がMC P-448₁で強く認められ、O₂⁻の生成量も多かった。以上のことからP-450は、脂質過酸化反応の重要な因子の1つであることがわかった。その関与についてはP-450アイソザイム間で異なっていた。すなわち、MCP-448₁は脂質過酸化反応の開始段階である、酸素の活性化を含む機作により反応に関与することが示され、またMC P-448₂では、CHPをはじめとした過酸化物により連鎖的に反応を引き起こすことにより関与することが示された。

第2編 チトクロームP-450と NADPH-チトクロームc (P-450)還元酵素

Msの薬物代謝酵素系の末端酵素であるP-450は、NADPHからの電子を主にFp₂を経て受け取り、薬物の代謝を行っている⁸⁾。P-450には多数のアイソザイムが存在し、各アイソザイム量は種々の誘導剤により特異的に大きく変動する⁷⁶⁾。またMsでのFp₂とP-450の量的関係は、その分子比は1:10~25とP-450がFp₂に比べかなり多いことも知られている²⁵⁾。WestとLu³⁰⁾は、精製した2種のP-450を含む再構成系において3,4-ベンツピレンの水酸化を行った場合、P-450がFp₂を競合することを報告した。Kamatakiら⁷⁷⁾は、ベンズフェタミン (BPhet) N-脱メチル化反応について再構成系で詳細に検討した結果、MsではP-450よりもむしろFp₂が律速酵素になっていると推論した。一方Miwaら³¹⁾は、精製したP-450やFp₂をMsに再結合させたラット肝Msを用い、BPhet N-脱メチル化反応は、用いるMsによりその律速酵素は異なる可能性があること、また再構成系での結果から、P-450とFp₂は互いに1:1で作用し電子伝達を行っていること^{78, 79)}を報告している。

この様にMsでの代謝反応での律速酵素がP-450アイソザイムの量的割合、さらにはFp₂とP-450の分子比や、P-450の還元能力が変動する事により変化するものと考えられる。そこで本編ではP-450とFp₂の相互作用に着目した。

アニリン(AN)はP-450との間で典型的なII型の基質差スペクトルを示し、さらにP-450還元速度を低下させることが知られている⁸⁰⁾。またMsでのAN水酸化活性は、エチルイソシアニド⁸¹⁾、アセトン^{82, 83)}、2,2'-ピピリジン⁸⁴⁾、メチラボン⁸⁵⁾やシアナイド⁸⁶⁾の様な物質を添加することに依り上昇する。しかしながら、その効果は用いる動物や、誘導剤の投与により異なり、ImaiとSato⁸⁷⁾はエチルイソシアニド添加によっても、ウサギ肝Msの活性の上昇は認められないことを示している。Anders⁸³⁾はアセトアニリド水酸化活性のアセトン添加による上昇が、PB前処理ラット肝Msではその作用が認められるのに対し、MC前処理ラット肝Msでは認められずむしろ阻害作用が認められることを報告した。これらのことから、

P-450アイソザイム間でアセトンに対する作用が異なることが考えられ、その差異について、P-450とFp₂との間の作用を中心に再構成系を用いて検討した。

ラットの薬物代謝能には著しい性差があることが知られており²⁶⁾、それはMs中のP-450量で見られる性差では説明不可能である^{88, 89)}。現在まで、P-450と薬物の親和性や薬物添加時のP-450還元速度の増加の雌雄間での性差が薬物代謝活性の性差を説明し得るという報告⁹⁰⁾もある。最近、肝Ms中には性差発現に寄与するP-450種が存在する可能性が考えられ、それらの分離・精製が行われた結果、雌雄各々に特有なP-450の存在が明らかになった²⁷⁾。しかしながら、それらのP-450種のみでは薬物代謝活性で見られる性差の全てを説明しえるものではない。

EM N-脱メチル化活性に着目した時、EM添加により促進されるP-450還元速度に見られる性差と極めてよく対応すること⁹⁰⁾、さらにMsではFp₂が律速酵素となっている可能性も考えられることから^{31, 77)}、基質依存のP-450還元速度で見られる性差が、P-450の基質結合能力によるのか、またはP-450のFp₂に対する親和性に対する違いによるものかを、精製したFp₂を雌雄肝Ms膜中に再結合させた時のP-450還元速度、およびEM N-脱メチル化活性の変動を中心に比較検討した。さらに、精製したFp₂をMsに再結合した場合に見られる種々の代謝活性の上昇は、用いる基質により異なり、Fp₂の要求性が同一ではないことから⁹¹⁾、Msに存在するP-450がFp₂に対する親和性が同一ではない可能性が考えられた。そこで引き続き、Fp₂をリガンドとしたアフィニティカラムクロマトグラフィーを雌雄ラット肝Msを酵素源として用い、Fp₂に対する親和性の異なるP-450の分離を試みた。

第1章 アニリン水酸化反応のアセトン 添加効果

【実験方法】

1. 実験動物

SD系雄性ラット(体重100~120g)を用いた。MCは25mg/kgの用量で8日間腹腔内投与し、PBは0.1%水溶液として3日間自由に飲ませた。

2. チトクローム P-450の精製

P-450は、ImaiとSatoの方法を改変したKamatagiらの方法⁷⁷⁾により精製した(1-3のPB P-450に対応するものである)。P-448は、HashimotoとImaiの方法⁹²⁾を改変して精製した(1-3のMC P448₂に対応するものである)。

3. 再構成系におけるアニリン水酸化活性の測定

全量 0.5ml中に、P-450またはP-448、Fp₂、15 μgのジラウロイル L-3-フォスファチジルコリン(DLPC)、2mM AN、NADPH-生成系(0.33mM NADP、8mM グルコース-6-リン酸、0.1 unit グルコース-6-リン酸脱水素酵素および6mM MgCl₂、NADPH-g.s.)および100mM kpi(pH 7.25)を含む再構成系により、37°Cで15分間反応を行った。AN水酸化活性はImaiらの方法⁹³⁾により、精製したp-アミノフェノールを定量した。CHP依存の反応系ではFp₂を含まず、NADPH-g.s.のかわりに1.5mMのCHPを用いて測定した。

4. その他

過酸化水素の生成は、Hildebrandtらの方法⁹⁴⁾により測定した。NADPHによるP-450の還元はCO存在下、嫌氣的条件下にてDiehlらの方法⁹⁵⁾により測定した。

【実験結果】

MsでのAN水酸化活性のアセトン添加による上昇が、MC前処理することにより消失すること⁹⁶⁾、Msや再構成系の結果より数種のP-450がAN水酸化能を有していることが明らかになっていることから^{86, 97, 98)}、アセトンの添加効果がP-450アイ

ソザイムにより異なることが考えられた。Fig.2-1にP-450またはP-448を含むAN水酸化反応の再構成系に、1Mまでのアセトン添加時の活性の変化を示した。両酵素のアセトンの作用は異なり、P-450の場合にはアセトン添加により活性は上昇し、0.5Mアセトン添加時に最も高い活性を示した。一方、P-448の場合にはP-450でみられたアセトン添加による活性の上昇は、用いた全ての濃度で認められず、むしろ活性は低下した。同様の結果が2,2'-ビピリジンを用いた場合にも認められた (Data not shown)。AndersとGanter⁹⁹⁾はアセトンの効果は活性酵素の生成または基質への酸素の導入が促進されていることによるものであると考察している。P-450の酸化・還元を介さないCHP依存性の反応の場合には、P-450においてもアセトンや2,2'-ビピリジン添加による活性の上昇はみられなかった (Fig.2-2)。Table 2-1にP-450とP-448の還元速度のアセトン添加効果を示した。P-450の還元速度は、ANを添加することにより低下するがこの低下はアセトンを加えることにより消失した。P-448の場合にはANならびにアセトン添加により、その還元速度は何ら変化を示さなかった。

酸素化型還元型P-450の自動酸化により生成され则认为されている過酸化水素がANまたはアセトン添加により変動し、その酸素化型複合体の安定性が影響されるや否やを検討した (Table 2-2)。P-450による過酸化水素の生成はアセトン添加により増大したが、代謝物であるp-アミノフェノールと生成した過酸化水素との比はアセトンの有無により変化しなかった。WerringloerとKawano¹⁰⁰⁾によれば、Fp₂のP-450還元能力はpHによって変化し、pHが低くなるに従いその能力は低下する。Fig.2-3にP-450によるAN水酸化反応に対するアセトンの効果のpHによる変動を示した。AN水酸化活性はpHが上がるに伴って上昇したが、アセトン添加効果は逆に減少した。

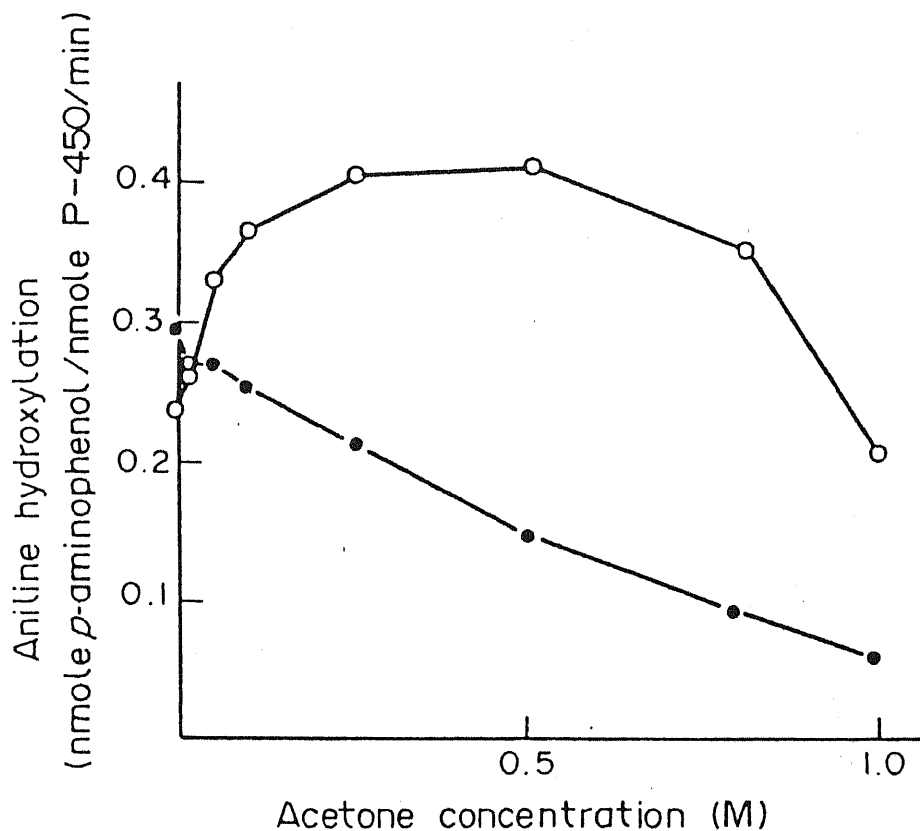


Fig. 2-1 Effect of acetone on aniline hydroxylation activity in the reconstituted system

The cytochrome P-450 system (○) consisted of 0.113 nmole of cytochrome P-450 (13.7 nmole/mg), 0.23 unit of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase (21.1 units/mg), and other components, as described in Materials, in a final volume of 0.5 ml. The cytochrome P-448 system (●) contained the same components as in the case of the cytochrome P-450 system except that 0.10 nmole of cytochrome P-448 (18.7 nmole/mg) was used in place of cytochrome P-450.

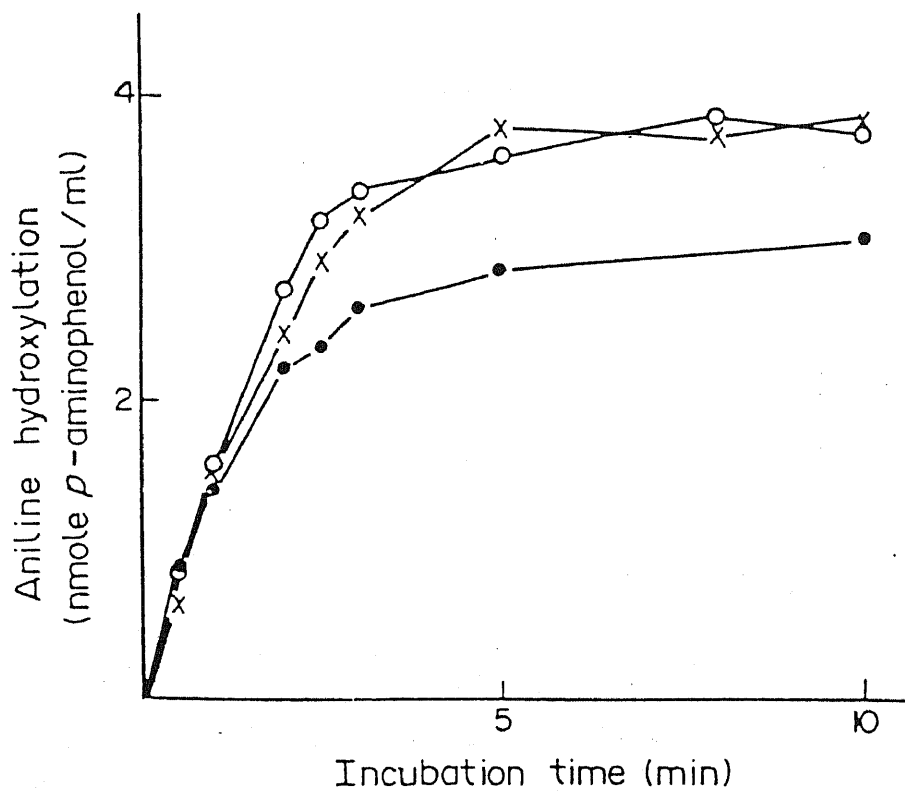


Fig. 2-2 Effects of acetone and 2,2'-bipyridine on cumene hydroperoxide-supported aniline hydroxylation catalysed by cytochrome P-450.

Aniline hydroxylation was measured in the presence of acetone (●) or 2,2'-bipyridine (x) or absence of these compounds (O). The final concentrations of acetone, 2,2'-bipyridine and aniline used were 0.5M, 0.5mM and 2mM, respectively.

Table 2-1 Effect of acetone on NADPH-dependent cytochrome P-450 reduction in the presence or absence of aniline

Addition	Cytochrome P-450 reduction	
	Cytochrome P-450 system (nmole P-450 reduced/min)	Cytochrome P-448 system (nmole P-448 reduced/min)
None	5.9	3.5
Aniline	3.2	3.6
Acetone	8.1	3.8
Aniline + acetone	7.7	3.2

Table 2-2 Effect of acetone on hydrogen peroxide formation in the presence or absence of aniline in reconstituted system

Groups	Formation of *		Ratio of product/H ₂ O ₂	Difference**
	p-aminophenol (nmole/nmole cytochrome/min)	H ₂ O ₂		
<u>Cytochrome P-450 system</u>				
None		2.40 ± 0.06		
Aniline	0.29 ± 0.01	1.83 ± 0.06	0.16	0.57
Acetone		3.83 ± 0.01		
Aniline + acetone	0.47 ± 0.03	2.97 ± 0.05	0.17	1.05
2,2'-Bipyridine		4.88 ± 0.05		
Aniline + 2,2'-bipyridine	0.41 ± 0.01	2.83 ± 0.12	0.15	2.05
<u>Cytochrome P-448 system</u>				
None		1.99 ± 0.02		
Aniline	0.26 ± 0.02	1.71 ± 0.03	0.15	0.28
Acetone		1.80 ± 0.06		
Aniline + acetone	0.24 ± 0.05	1.58 ± 0.03	0.15	0.22
2,2'-Bipyridine		2.36 ± 0.18		
Aniline + 2,2'-bipyridine	0.27 ± 0.02	2.03 ± 0.02	0.13	0.33

* Each value represents Mean ± S.D. of three determinations.

** Decrease in the formation of hydrogen peroxide due to aniline.

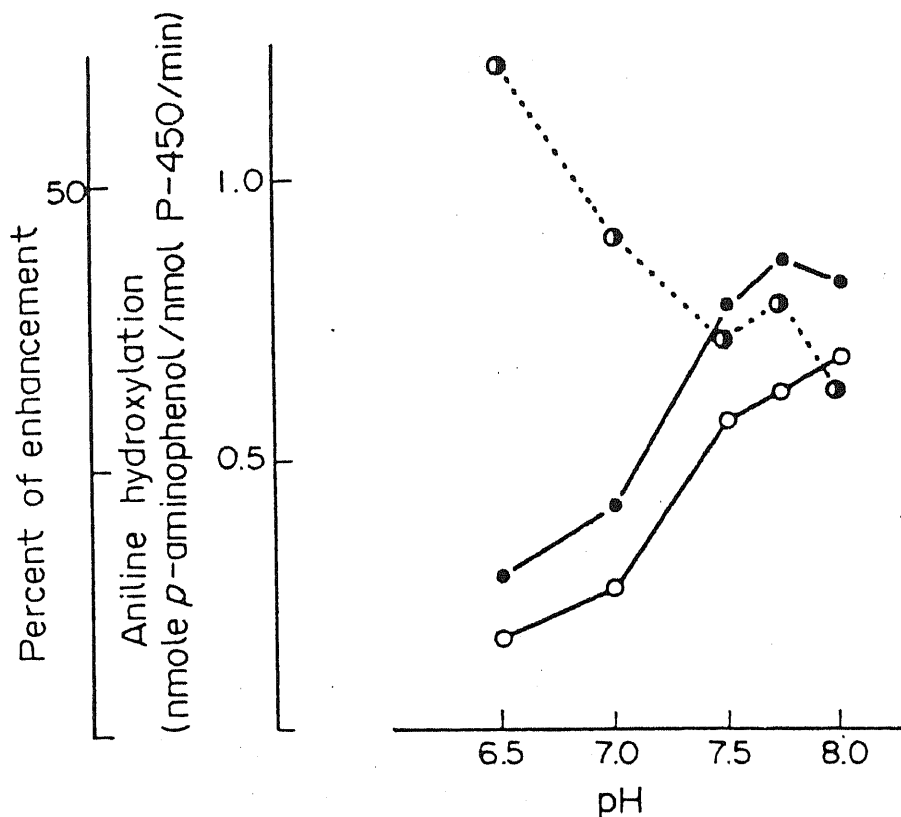


Fig. 2-3 Effect of pH on acetone enhancement of aniline hydroxylation in the reconstituted system. The reaction mixture consisted of 0.139 n mole of cytochrome P-450, 0.29 unit of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase and other components as described in Fig. 2-1 except that 50 mM Tris/Hepes of the indicated pH was used in place of phosphate (pH 7.25) in a final volume of 0.5 ml. The aniline hydroxylation activity was measured in the presence (●) or absence (○) of acetone. The activating effect of acetone (⊙) on aniline hydroxylation was represented as per cent of enhancement.

第2章 ラット肝ミクロゾームのエチルモルヒネN-脱メチル化活性に見られる性差

【実験方法】

1. 動物

SD系雌雄ラット(10週令)を用いた。

2. Fp₂のMsへの再結合

1-1-3に記したFp₂を用いた。Fp₂のMsへの再結合はFig.2-4に示すMiwaとChoの方法¹⁰⁾により行った。

3. 脱メチル化活性の測定

0.5ml中に約0.5mgのMs、100mM Na·Kpi(pH7.4)、0.1mM EDTA、5mM EM、NADPH-g.s.を含む反応液を用い37°Cで20分間反応を行った。過酸化水素依存の反応の場合はNADPH-g.s.のかわりに5mM過酸化水素を用い、反応開始前に3分間、37°C下で放置後3分間反応を行った。N-脱メチル化活性は生成するHCHOをNashの方法により測定した。

【実験結果】

雌雄ラット肝MsのNADPH-または過酸化水素依存EM N-脱メチル化活性を比較した(Table 2-3)。NADPHを用いた場合には雄で雌に比べ約4倍高い活性が認められたが、過酸化水素を用いた場合には性差は認められなかった。この結果は、EM N-脱メチル化活性に見られる性差は、少なくとも雌雄間でのP-450量の違いによるものではなく、NADPHからP-450への電子伝達能力の差異によるものと考えられた。このことから、雌においてはFp₂が全体の反応系を通しての律速酵素となっていることが考えられた。次に雄ラット肝Msから精製したFp₂をMsに再結合させFp₂量が増加した時に性差がどの様に変化するかを調べた。Msに再結合したFp₂を、そのチトクロームc還元活性で調べたのがFig.2-5である。図からも明らかのように、雌雄肝Ms共に添加したFp₂量に依存した活性の上昇が認められ、再

Microsomes

|
| add. purified reductase
| 0.1 M phosphate (pH 7.4)
| 0.1 mM EDTA
|
| Incubate for 20 min at 30°C
|
| Dilute with ice-cold 0.1 M
| phosphate (pH 7.4)
|
| Centrifuge at 105,000 x g for
| 60 min
|
| Suspend in 0.1 M phosphate (pH 7.4)
|
| Recentrifuge at 105,000 x g for
| 30 min
|
| Resuspend in 0.1 M phosphate
| (pH 7.4)

Fig. 2-4 Fortification of NADPH-
cytochrome c (P-450) reductase
into microsomes

Table 2-3 NADPH-Dependent and hydrogen peroxide-dependent ethylmorphine N-demethylation activities in male and female rat liver microsomes.

Microsomes	NADPH-dependent	Hydrogen peroxide-dependent
Male	11.35 ± 0.83 (4)	29.80 ± 2.50 (3)
Female	2.92 ± 0.28* (4)	34.99 ± 4.69 (3)

Results are expressed as nmole product formed per min per mg of protein in the form of mean ± S. E. ; the number of determinations is given in parentheses. Incubation mixture for hydrogen peroxide-supported N-demethylation was as described in MATERIALS AND METHODS except that 5 mM hydrogen peroxide was used in place of NADPH-generating system. Preincubation was conducted for 3 min before the addition of hydrogen peroxide to start the reaction. * p < 0.001

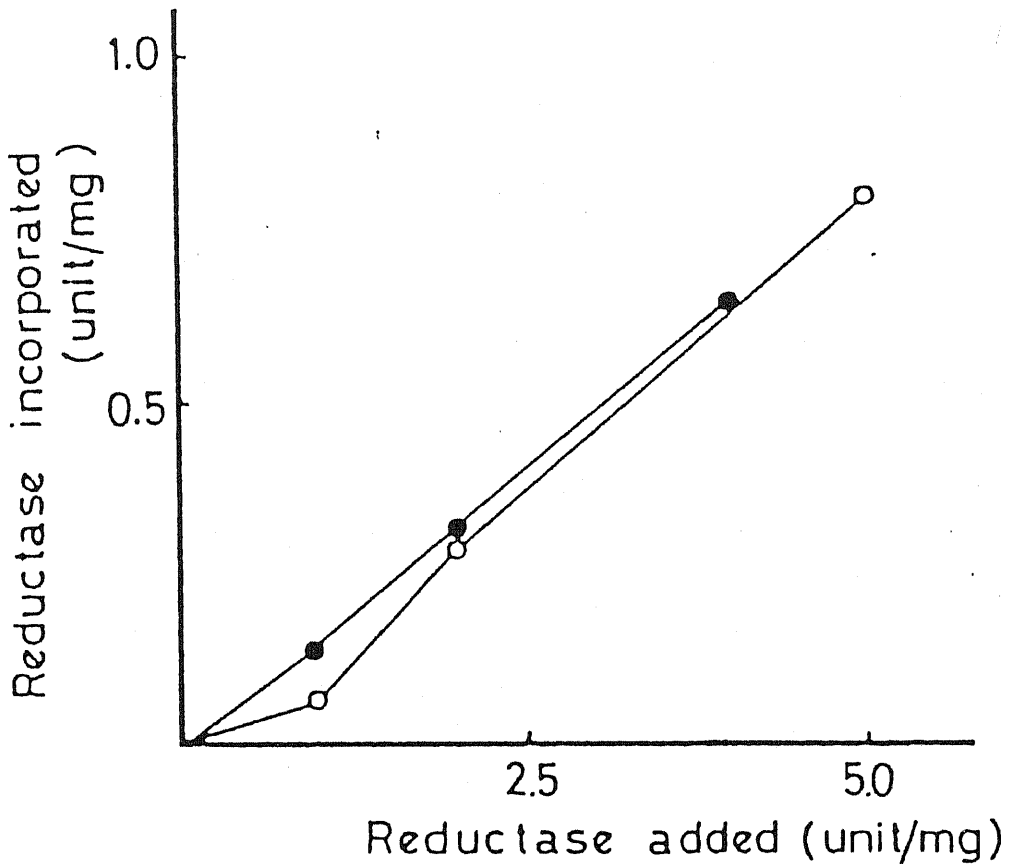


Fig. 2-5 Fortification of microsomes with purified NADPH-cytochrome c (P-450) reductase

Microsomes were separated and placed in three flasks. Each flask was incubated at 30°C for 20 min after addition of various amounts of purified reductase specified in the figure in the presence of 0.1 M Na, K-phosphate (pH 7.4). Microsomes was incubated with corresponding amounts of buffer as control. Control activities of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase of male (○) and female (●) rat liver microsomes were 0.128 and 0.116 unit/mg, respectively.

結合の効率に性差は見られなかった。Fp₂を再結合させたMsでのEM N-脱メチル化活性の雌雄間での変動を、各々のMsのFp₂の活性とEM N-脱メチル化活性に対する両逆数プロットをとり比較した (Fig. 2-6)。Fp₂をMsに再結合させることにより、雌雄共に活性の上昇がみられたが、その上昇の割合は雌雄間で異なり、雌の方が大きく性差は減少した。V_{max}で比較した時、雄で6.25、雌で5.71nmole/mg/minとほとんど性差は消失していた。またFp₂に対するKm値は雄で0.065、雌で0.5unit/mgであった。Gigonら⁹⁰⁾は、EM N-脱メチル化活性の性差は、EM添加によって上昇するP-450還元速度でみられる性差と良く対応することを報告していることから、Fp₂を再結合したMsのP-450還元速度の変動を比較した (Table 2-4)。EM非存在下におけるP-450還元速度は、Fp₂を再結合させることにより、雌雄ともほぼ同等の約1.4倍上昇した。一方EM存在化におけるP-450還元速度は、無処理Msでは雄の方が雌の約2倍程高く、EM依存のP-450の還元では約3.3倍の性差が見られ、これはTable 2-3で示した活性の性差によく対応していた。Fp₂を再結合させることによる還元速度の上昇はEM存在化でも認められたが、この場合には上昇の程度には雌雄差が見られ、雌でより上昇の程度が大きかった。EM依存のP-450還元速度に見られる性差は、結果として3.5倍から約1.4倍と小さくなることが示された。以上Fp₂をMsに再結合させることにより、EM N-脱メチル化活性の性差ばかりでなくP-450還元速度の性差も小さくなることが判った。

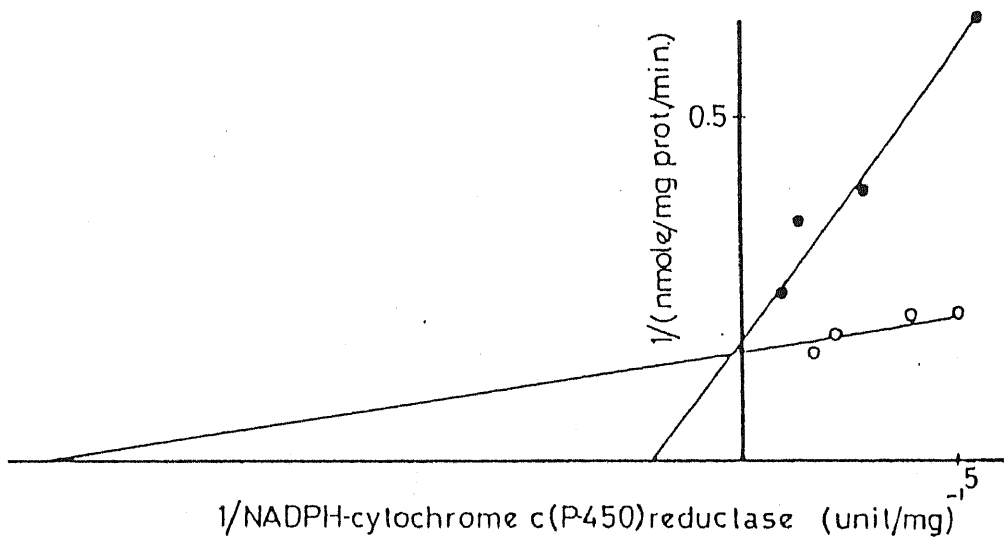


Fig. 2-6 Double reciprocal plots of ethylmorphine N-demethylation activity against NADPH-cytochrome c (P-450) reductase activity.

Liver microsomes were separated and placed in four flasks and other experimental details are as described in Fig. 2-5. Ethylmorphine N-demetylation activities were measured using male (○) and female (●) rat liver microsomes fortified with various amounts of reductase.

Table 2-4 Effects of the addition of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase on cytochrome P-450 reduction rate in microsomes from male and female rats.

Microsomes	Sex	Reductase (unit/mg)	Cytochrome P-450 reduction		Difference
			Control	Presence of ethylmorphine	
(nmole cyt. P-450 reduced/min/mg)					
Intact	Male	0.229	17.50	36.83	19.33
	Female	0.147	11.83	17.44	5.61
	Male/Female				3.45
Fortified	Male	1.287	24.95	43.66	18.71
	Female	1.055	17.58	30.82	13.24
	Male/Female				1.41

第3章 NADPH-チトクロームc (P-450)還元酵素と 親和性の異なるチトクローム P-450の分離・部分精製

【実験方法】

1. チトクロームP-450の分離・部分精製

Fp₂をリガンドとしたSephacrose 4Bの調製は、Cuatrecasasの方法¹⁰³⁾により行った。Fp₂と親和性の異なるP-450の精製の方法をFig.2-7に、用いる緩衝液をTable 2-5に示した。

2. 代謝活性の測定

反応液(0.5ml)は、65mM Kpi(pH7.25)、0.05nmole P-450、0.25nmole Fp₂、25μl DLPC、25μg デオキシコール酸、0.1mM EDTA、基質、NADPH-g.s.から成り用いた基質濃度は、ピフェニルの2.5mMを除いて1mMとした。反応は37°Cで20分を行った。7-エトキシクマリン(7-EC)0-脱エチル化活性はAitioの方法¹⁰⁴⁾により行った。ピフェニルの2位および4位の水酸化活性はJohnsonらの方法¹⁰⁵⁾により行った。Fp₂の濃度は456nmにおける分子吸光係数21.4mM⁻¹cm⁻¹¹⁰⁶⁾を用い測定した。

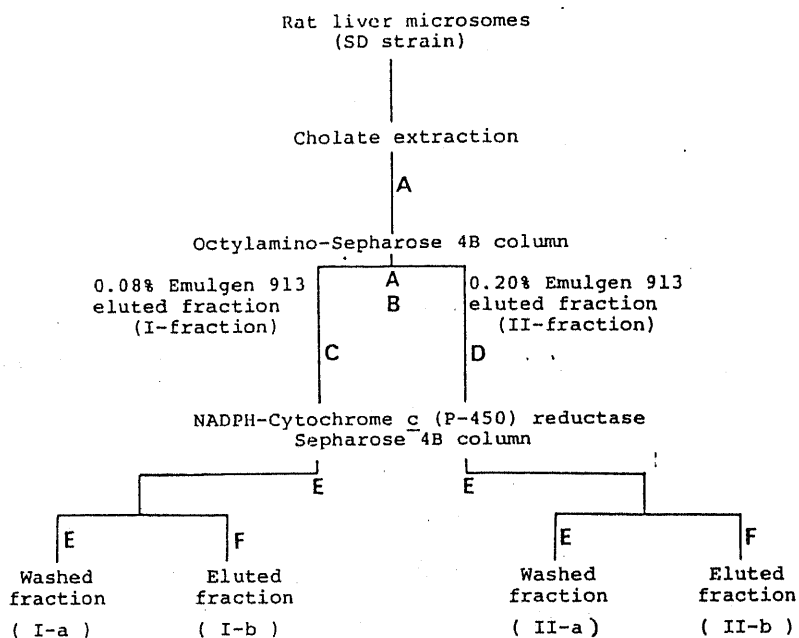
3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ゲル濃度は7.5% もしくは10%とし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、Laemmliの方法¹⁰⁷⁾により行った。蛋白はクマシーブリリアントブルーにて染色し、550nmの吸光度をスキャンニングした。

【実験結果】

Fig.2-7、Table 2-5に示した方法により、雌雄肝Msを用いてFp₂に対する親和性の異なるP-450の分離・部分精製を試みた。

コール酸による可溶化ならびにω-aminooctyl-Sepharose 4BカラムへのapplyはImaiとSatoの方法¹²⁾により行った。Kamatakiらの方法¹⁰⁸⁾により、イオン強度を10mMとして洗浄後、P-450を0.08% E-913ならびに0.2% E-913により2つの画分



* Emulgen 913 was removed by hydroxylapatite column chromatography

Fig. 2-7 Separation and purification profile of cytochrome P-450 having a different affinity for NADPH-cytochrome c (P-450) reductase from rat liver microsomes.

Table 2-5 Buffer solutions used for the purification of cytochrome P-450 having a different affinity for NADPH-cytochrome c (P-450) reductase from male and female rat liver microsomes

Buffer	Potassium phosphate buffer (pH 7.25)	Glycerol	Sodium cholate	Emulgen 913	DTT	EDTA	KCl
	mM	per cent	per cent	per cent	mM	mM	mM
A	100	20	0.6	-	1	1	-
B	10	20	0.6	-	1	1	-
C	10	20	0.5	0.08	1	1	-
D	100	20	0.4	0.20	1	1	-
E	10	20	-	0.20	-	-	-
F	10	20	-	0.20	-	-	200

DTT: Dithiothreitol, EDTA; Disodium ethylenediaminetetraacetate
 KCl: Potassium chloride

として溶出した。各画分をI、II fractionとした。ここで得られた両fractionにはFp₂活性は認められなかった。両fractionをbuffer Cで透析後Fp₂-Sephrose 4Bカラムにapplyすることにより、各々のfractionがさらに、カラムに未吸着のa fractionと200mMKClにより溶出されるb fractionに分離されることが判った。Fig.2-8に雄ラットのIおよびII fractionのFp₂-Sephrose 4Bカラムにおける溶出パターンを示した。両fractionからのP-450の回収率は約80%であった。I-a fractionはI-b fractionに比べ多量回収されたが、II-fractionでは、II-a および II-b fractionの回収率はほぼ同じであった。また雄ラットの I-a、II-a fractionへの回収率は雌に比べ僅かに低く、雄のI-b fractionへの回収率は雌の約2倍であった。一方、全てのfractionでa fractionに比べb fractionの方が高い比含量を示していた(Table 2-6)。SDS-PAGEの結果から、雌雄の各fractionはいくつかの蛋白の存在が確認されたが、各々のfractionで、その分子量は異なっており、雌雄の同じfractionでも分子量は同一ではなかった(Fig.2-9)。雄の4種のfractionを用いて、EM N-脱メチル化活性を指標に、P-450のFp₂に対する親和性を比較するために、Fp₂の量と両逆数プロットを取りそのK_m値を求め比較したのがFig.2-10である。ここから求めたFp₂に対する見かけのK_m値は、I-a、I-b、II-a、II-b fractionで各々0.208、0.024、0.225、0.083 μMであり、明らかに a fractionに比べ b fractionの方が小さい値を示し、b fractionの方がFp₂に対する親和性が強いことが活性を指標にした場合にも示された。7-EC O-脱エチル化活性を指標にした場合にも、値は異なるものの、I-b、II-b fractionの方がI-a、I-b fractionに比べ小さなK_m値を与えることが判った(Fig.2-11)。その値は、I-a、I-b、II-a、II-b fractionで各々 0.672、0.328、0.378、0.254 μMであった。雌雄ラットから各々得られた4種のfractionの薬物代謝活性をTable 2-7で比較した。雄ラットの場合、I-b fractionでEM、コデイン、BPhet N-脱メチル化活性、ピフェニル4位の水酸化活性が他のfractionに比べ高い活性を示した。雌ラットの場合は雄の場合とことなり、I-a fractionでBPhet、コデインN-脱メチル化活性で高い活性を示した。ここで部分精製した雄のI-bならびにII-b fractionの触媒するEM N-脱メチル化活性は、対応する雌のfractionに比べ2~3倍高い活性を示した。一方 II-a fractionでは雌の方が雄に比べ約5倍ほど高いEM N-脱メチル化活性を示した。

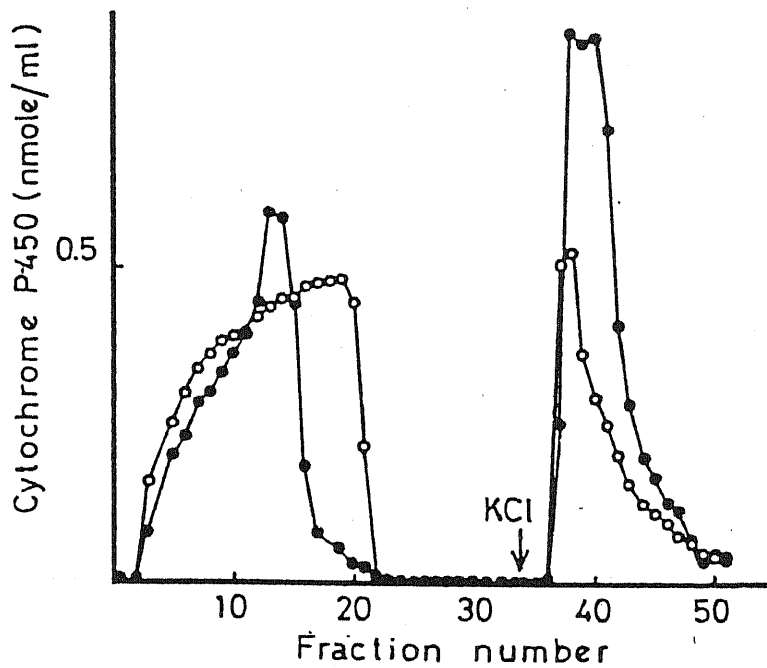


Fig. 2-8 NADPH-cytochrome P-450 immobilized Sepharose 4B column profiles of fractions I (O) and II (●) obtained from male rats.

Table 2-6 Purification of cytochrome P-450 having different affinities against NADPH-cytochrome P-450 reductase from rat liver microsomes

		Protein (mg)	Total content (nmoles)	Male Specific content (nmole/mg)	Recovery (%)
Microsomes		1239.8	1285.7	1.04	100.0
Solubilized supernatant		791.3	885.7	1.12	68.8
Octylamino- Sephrose 4B	I	115.4	238.9	2.07	18.6
	II	72.1	125.2	1.74	9.7
			(I fraction: 97.5 nmoles)		
	I-a	37.7	49.3	1.31	50.7*
	I-b	3.2	19.2	6.00	19.7*
Reductase- Sephrose 4B			(II fraction: 100.4 nmoles)		
	II-a	35.2	31.6	0.90	31.5*
	II-b	6.5	46.7	7.18	46.5*

* Numbers represent per cent of cytochrome P-450 applied to reductase immobilized Sepharose 4B column.

		Protein (mg)	Total content (nmoles)	Female Specific content (nmole/mg)	Recovery (%)
		530.0	399.7	0.75	100.0
		386.5	337.6	0.87	84.5
		33.7	84.9	2.52	21.2
		30.2	56.1	1.86	14.0
			(I fraction: 50.2 nmoles)		
		18.3	30.9	1.69	61.5*
		0.4	4.3	10.75	8.5*
			(II fraction: 44.7 nmoles)		
		19.0	20.2	1.06	45.2*
		1.8	19.9	11.06	44.6*

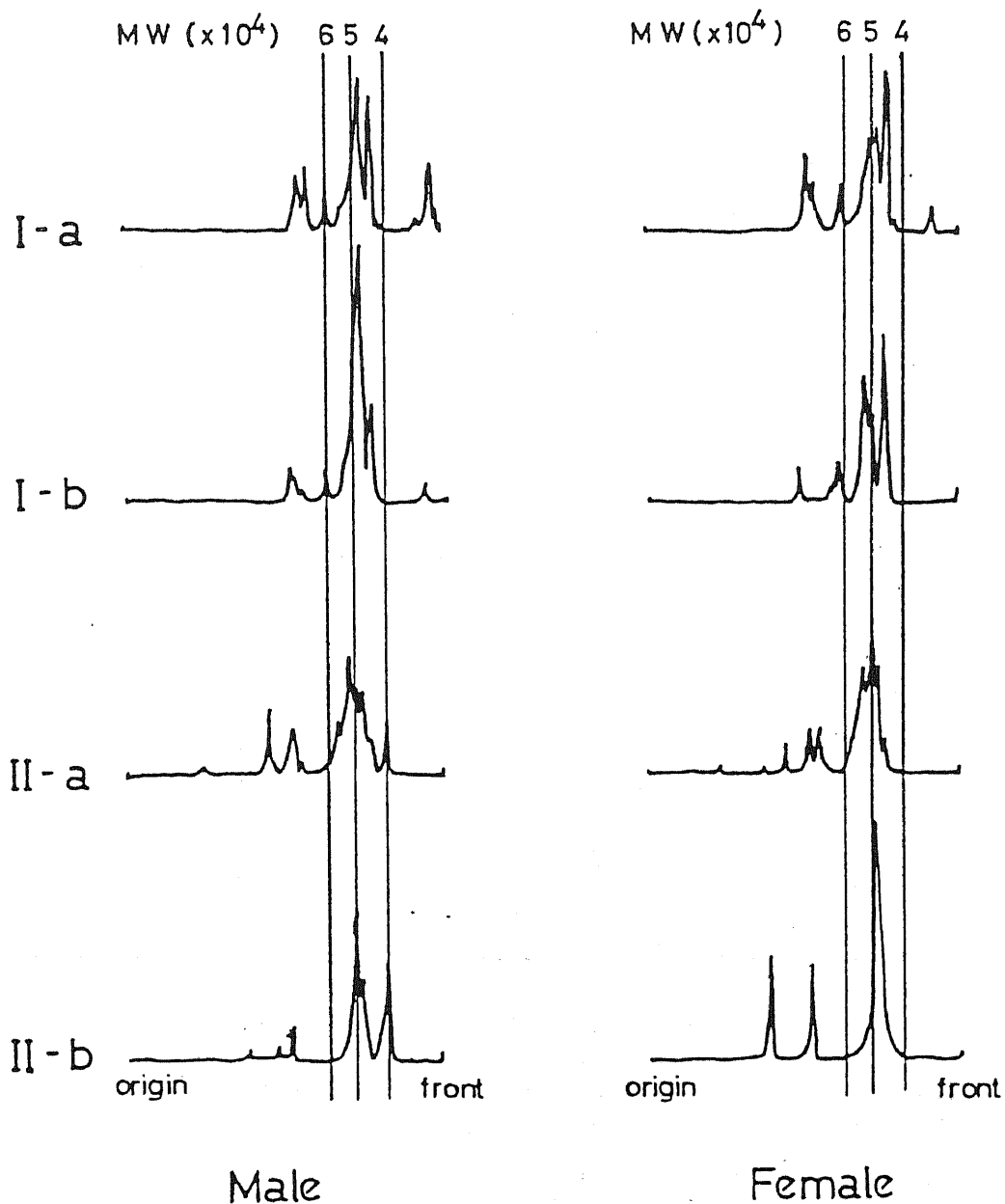


Fig. 2-9 Densitometric scans (550 nm) on an SDS-polyacrylamide gel after electrophoresis.

The concentration of protein applied was about 0.01 mg each, and the gel was stained with Coomassie brilliant blue

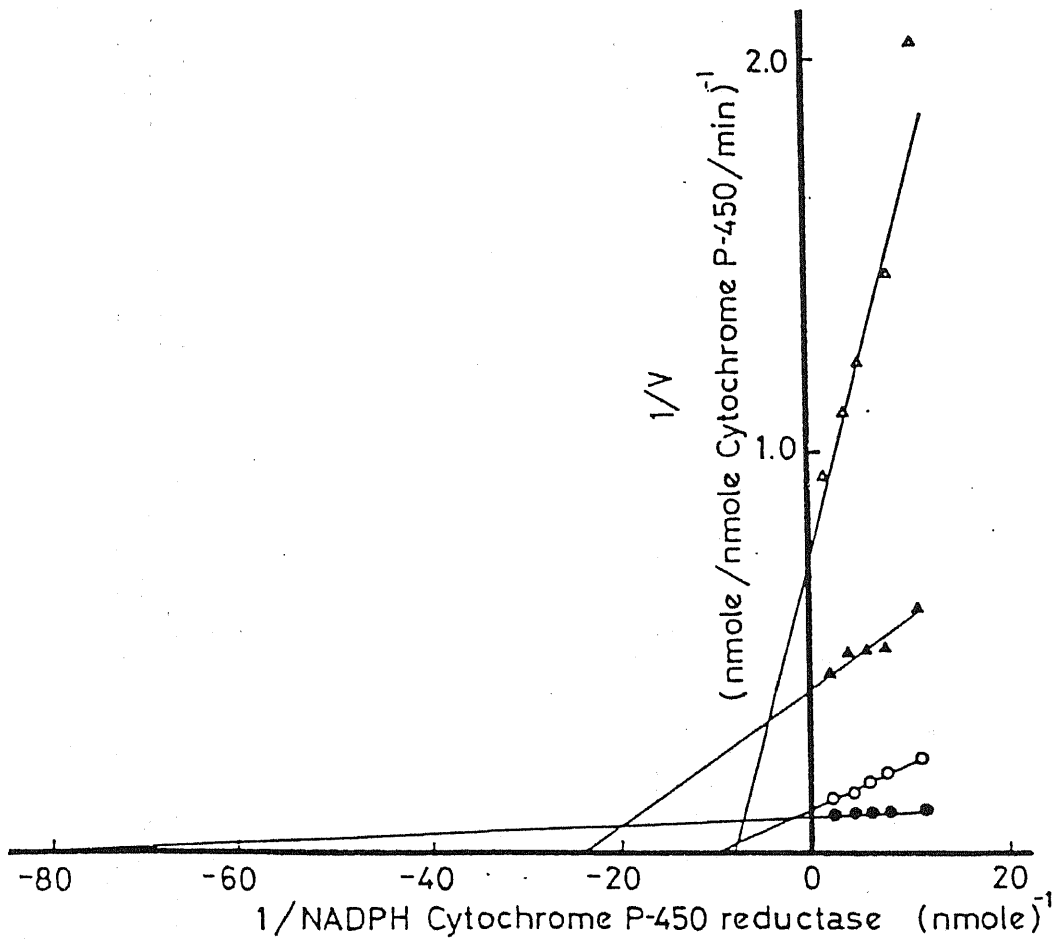


Fig. 2-10 Double resiprocal plot of ethylmorphine N-demethylation and NADPH-cytochrome c (P-450) reductase concentration.

Ethylmorphine N-demethylase activity was determined in a reconstituted system containing either fractions I-a (O), I-b (●), II-a (Δ) or II-b (▲) from male rats

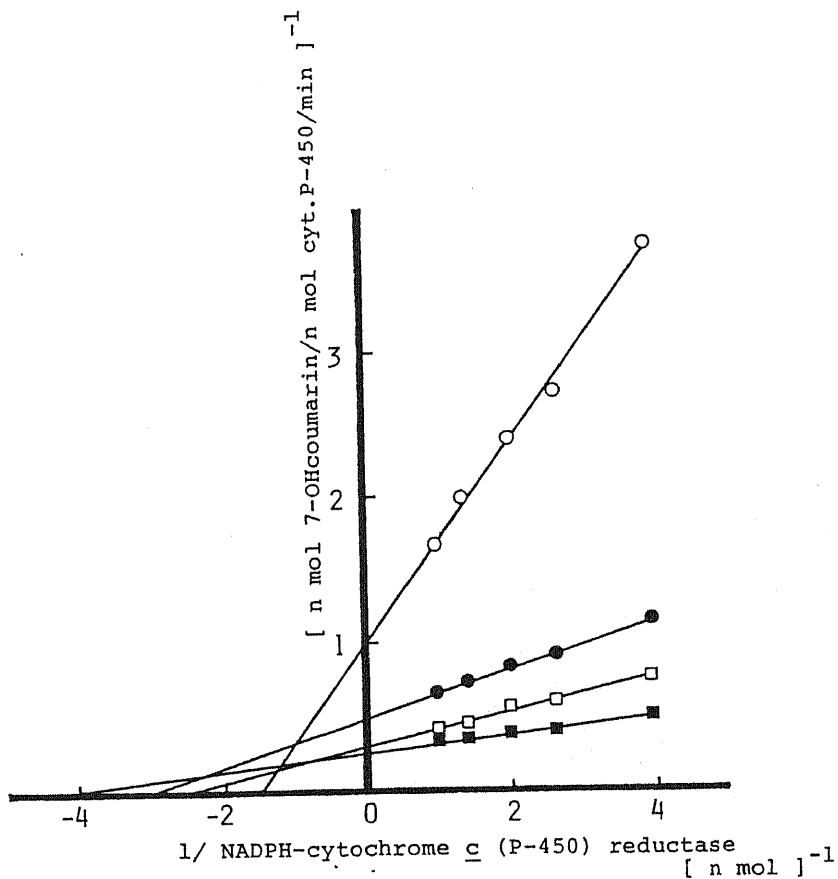


Fig. 2-11 Double reciprocal plot of 7-ethoxycoumarin O-deethylation and NADPH-cytochrome c (P-450) reductase concentration.

7-Ethoxycoumarin O-deethylase activity was determined in a reconstituted system containing either fractions I-a (○), I-b (●), II-a (□) or II-b (■) from male rats.

Table 2-7 Catalytic properties of cytochrome P-450s in reconstituted system.

	Male				Female			
	I-a	I-b	II-a	II-b	I-a	I-b	II-a	II-b
	(nmoles product/nmole cytochrome P-450/min)							
Ethylmorphine								
<i>N</i> -demethylation	8.06	15.54	1.52	6.58	8.74	6.36	7.21	2.36
Benzphetamine								
<i>N</i> -demethylation	4.46	9.58	0.65	1.93	3.00	0.46	0.87	1.52
Codein								
demethylation	2.55	12.84	2.38	3.01	5.36	2.27	3.69	2.53
Aniline								
4-hydroxylation	0.61	2.96	2.62	2.60	1.03	1.05	2.02	1.35
Biphenyl								
2-hydroxylation	N.D.*	N.D.*	18.26	N.D.*	43.20	24.83	59.54	78.34
4-hydroxylation	0.26	1.24	0.24	0.76	0.06	0.05	0.09	0.11

* N.D., not detectable

第4章 考察

ANやアセトアニリドの代謝は、アセトンを始めとするいくつかの化合物により活性化され⁸⁸⁻⁸⁹⁾、かつ用いるMsによりその作用は異なる⁹⁰⁾と報告されている。

肝Msから精製した2種のP-450を用い、P-450アイソザイムによってAN水酸化反応に対するアセトンの作用が異なることを明らかとした。近年フラボノイドのベンゾピレン水酸化反応に対する活性化ならびに阻害作用については、P-450アイソザイムにより異なり、また活性化を示す場合にはP-450のFp₂に対するK_m値が小さくなる事が報告されていることから^{109, 110)}、その作用機作として、Fp₂を介する電子伝達系に対する作用に着目した。P-450で示されたアセトンによる活性化作用は、Fp₂を介さない反応系では認められなかった。P-450還元速度が促進されることが明らかとなり、その場合にも、酸素化型P-450複合体の安定性は変化せず、P-450の還元が促進されている系ではアセトンの作用が弱まることから、この場合にはアセトンがP-450に作用することにより、P-450のFp₂に対する相互作用に変化を起こすことによりFp₂からの電子伝達能力を高めたためと考えられた。

ラット肝Ms薬物代謝活性で見られる性差は、P-450量やFp₂で見られる性差^{88, 89)}では説明が不十分であり、一方その性差は基質添加により促進されるP-450の還元能力の差によるという報告もある⁹⁰⁾。また報告されている雌雄ラット固有のP-450でもEM N-脱メチル化活性には性差は認められず、本活性の性差を説明し得ない⁹¹⁾。本編で明らかになった様に、EM N-脱メチル化活性は、NADPH-依存の反応では顕著に見られる性差が、Fp₂と分子状酸素を必要としない反応系では認められず、このことはEMに対する結合能の差異によるものではなく、NADPHからFp₂を経てP-450に電子伝達を行う能力の差によるものと考えた。実際、EM N-脱メチル化活性やEM依存のP-450還元速度の上昇にみられる性差はMs中のFp₂量を増やすことにより、小さくなることが判った。また求めたFp₂に対するK_m値を比較したとき雄では0.065unit/mgであり雌では0.5unit/mgと大きく異なり、かつTable 2-4に示した雌雄MsのFp₂の比活性は0.15~0.23unit/mgであることをあわせて考えた場合、雌Msでの反応はFp₂が律速酵素となっていると考えられた。

以上のことから、Ms中に存在するP-450でEM N-脱メチル化反応に高い活性を有

するP-450は、雄の場合にはFp₂に対する親和性の高いP-450であり、雌では逆にFp₂から効率よく電子伝達を行うことが困難な、いわゆるFp₂に対する親和性が低いことが考えられた。

Fp₂-Sephadex 4Bを用いることにより、雌雄ラット肝MsのP-450は吸着画分と未吸着画分に分離することが明らかとなった。雌雄ラットから各々得られたI-a、I-b、II-a、II-b fractionでのCO還元型差スペクトルの吸収極大波長が雄では450.0、451.0、449.0、449.5nmであり雌では450.5、448.5、448.0、448.0nmと僅かずつではあるが各fractionで違いが認められた。またSDS-PAGEにより求めた分子量、種々の代謝活性等にも違いが認められ、各fractionが異なったP-450種として分離されていることが判った。ここでFp₂に対するアフィニティカラムクロマトグラフィーを行うことによって得られた画分は、その代謝活性を指標にFp₂に対するK_m値を求めた時にも、カラムクロマトグラム上での性質を反映しており、Ms中には Fp₂に対する親和性の異なるP-450種が存在する事が明らかとなった。

EM N-脱メチル化活性を雌雄の各fractionで比較すると、雄では I-b および II-b fraction、いわゆるFp₂に対する親和性の高いP-450種で高い活性が認められ、雌では逆にa fractionに高い活性が認められた。さらにII-a fractionを雌雄で比較すると、雌の方が雄に比べ約5倍高い活性を示した。このfractionは、Fp₂-sephadex 4Bの未吸着画分であり、Fp₂に対する親和性が低いことから、先に示した Fp₂をMsに再結合させることにより減少するEM N-脱メチル化活性に見られる性差の変動に、雌雄のII-b fractionのこの違いが少なくともその一部が関与しているものと思われた。

第3編 カニクイザルのチトクローム P-450とNADPH- チトクロームc (P-450) 還元酵素の精製、ならびに それらを中心とした種差

薬物代謝の種差については、古くからin vivoでの薬物投与実験を主とした研究が行われてきた。Quinnら¹¹¹⁾はヘキソバルビタールの睡眠時間でみられる種差と、その生物学的半減期との間に極めて高い相関関係があることを報告し、その代謝速度の種差を示している。またクマリン¹¹²⁾やアンフェタミン¹¹³⁾の場合には、その代謝経路に種差があることが知られている。このような代謝速度、代謝経路でみられる種差について、1970年代以降狭義の薬物代謝酵素であるP-450を含むMsの電子伝達系についてのin vitroでの研究が中心になり、精製を含めた生化学的な面からの詳細な研究が行われる様になった。現在では、薬物代謝酵素系が殆どの実験動物種間で量的・質的に異なっていることが報告されている。一方、これらの種差、例えばSKF 525A等の薬物代謝阻害剤に対する作用や¹¹⁴⁾、薬物代謝酵素の誘導剤であるPBやMCに対する誘導能が、ラットやウサギの間で異なること等¹¹⁵⁾、動物種間でこのように差異がある。以上のことから、得られた結果を動物種を越えて同等に評価する事は困難であり、かつそれらの結果からヒトでの薬効・毒性を予測をすることには、極めて危険性が伴っているのが現状である。動物とヒトとの間で正しい評価を成し得るために、先ず、薬物代謝酵素系の動物種間での明確な違いを示すことが重要であろう。P-450については1970年代前半にその精製が可能になって以来¹²⁾、動物種間で比較検討が可能になり、現在ではラットで系統によるP-450も報告されている。またヒトの場合では、デブリソキン、スパルテイン、メフェニトイン等の代謝が遺伝的因子により制御されていること、また人種差もあることが指摘されている^{116、117、118)}。しかしながら、実験動物で示される薬効・毒性発現・活性代謝物の生成等の結果をヒトに外挿することを考えた場合、現在においてもその隔たりは大きいと言わざるを得ない。

それゆえにヒト以外の霊長類においての検討は必須なものであるが、現在までのところ、本酵素系に対する生化学的アプローチは殆どなされていない。そこで、薬物未処理カニクイザル (*Macaca irus*) 肝Msの薬物代謝酵素系の性質を明らかにするために、P-450とFp₂の精製を行い、さらにその精製標品あるいはそれに対する抗体を用い、数種の実験動物を用いて内在性のP-450とFp₂についてその種差について検討した。

第1章 薬物無処理カニクイザル肝 ミクロゾームのチトクローム P-450の精製

【実験方法】

1. 動物

雄性カニクイザル（体重3.49~4.09kg）を用いた。

【実験結果】

P-450の精製は先ずFig. 3-1に示す方法により行った。その時用いたbufferをTable 3-1に示した。MsはImaiとSatoの方法¹²⁾によりコール酸で可溶化後、 ω -animooctyl-Sepharose 4Bカラムにapplyした。Applyした約70%のP-450が、0.08% E-913により溶出された。溶出画分は20%グリセリンで3倍に希釈した後、buffer Eで平衡化したhydroxylapatiteカラムに吸着させた後buffer Hにて溶出した。溶出画分はbuffer Iにて透析後、DE-52カラムにapplyし、buffer Iにて洗浄することにより主分画を得た。この時、比含量は若干低下したが、SDS-PAGEにより検討した時P-450と思われる蛋白バンドはよく分離されていた。この画分はCM-Sephadex C-50カラムにapplyしbuffer Lにて溶出した。Hydroxylapatiteカラムを用いて界面活性剤であるE-913を除去し最終精製標品とした。その結果をまとめたのがTable 3-2である。P-450の比含量1.4nmole/mgのMsから精製を開始し、最終精製標品として比含量14.9nmole/mgのものを得た。

次に、前述の方法を改変して複数のP-450の精製を試みた。その方法ならびに使用したbuffer種をFig. 3-2、Table 3-3に示した。Hydroxylapatiteカラムにて、bufferのイオン強度をかえる事によりP-450は4つの画分に分離され、それぞれを溶出の順にP-450_{I-a}、P-450_{I-b}、P-450_{I-c}、P-450_{I-d}とした。DE-52カラムにおける挙動は、P-450_{I-a}、P-450_{I-c}、P-450_{I-d}はbuffer Kにより回収されたのに対し、P-450_{I-b}はイオン強度を10mMにあげることにより（buffer L）溶出された。以降、各P-450共にFig. 3-2に示す様にCM-Sephadex C-50、hydroxylapatiteカラムクロマトグラフィを行い最終精製標品とした。P-450_{I-a}、_{I-b}はDE-52カラム溶出画分で単一の標品であることが判明したためにCM-Sephadex C-50カラムを

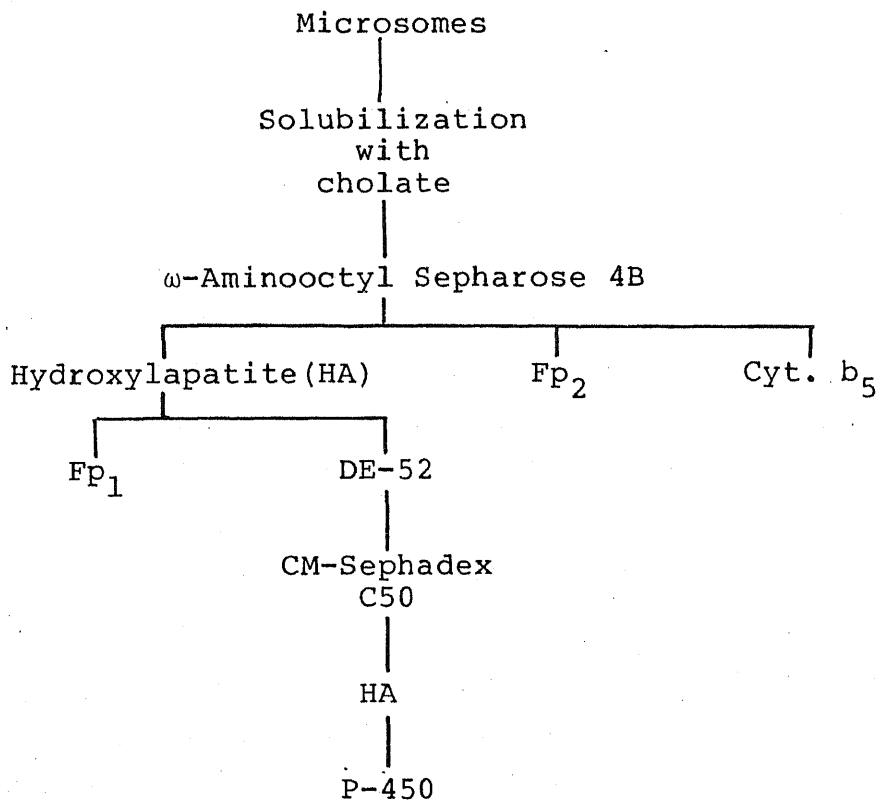


Fig. 3-1 Purification profile of cytochrome P-450 from untreated monkey liver microsomes

Fp₁ ; NADH-cytochrome b₅ reductase
 Fp₂ ; NADPH-cytochrome c (P-450) reductase

Table 3-1 Used buffers for the purification of cytochrome P-450 from untreated monkey liver microsomes

Buffer	Phosphate (mM)	pH	E-913 ^{a)} (%)	CA ^{b)} (%)	EDTA ^{c)} (mM)	DTT ^{d)} (mM)	PMSF ^{e)} (mg/ml)
A	100	7.25		0.6	1	1	0.1
B	100	7.25		0.5	1	1	0.1
C	100	7.25	0.08	0.4	1	1	0.1
D	33	7.25	0.2				
E	35	7.4	0.2				
F	60	7.4	0.2				
G	90	7.4	0.2				
H	150	7.4	0.2				
I	5	7.4	0.2	0.1		0.1	
J	25	7.25	0.2				
K	50	7.25	0.2				
L	100	7.25	0.2				
M	60	7.25	0.2				
N	60	7.4	0.2				
O	100	7.4					
P	500	7.4					

All buffers used here contain 20 % glycerol.

a) Emulgen 913, b) Cholic acid, c) Ethylenediamine-tetraacetic acid, d) Dithiothreitol, e) Phenylmethyl-sulfonylfluoride

Table 3-2 Purification of cytochrome P-450 from untreated monkey liver microsomes

	Protein (mg)	Total content (n mole)	Specific content (n mole/mg)	Recovery (%)
Microsomes	415.3	584.5	1.4	100.0
Solubilized supernatant	355.5	479.3	1.4	82.0
Aminooctyl column eluate	84.5	429.7	5.1	73.5
Hydroxylapatite column eluate	14.8	136.2	9.2	23.3
DE-52 column eluate	12.2	78.50	6.4	13.4
CM-Sephadex column eluate	4.98	60.57	12.2	10.4
Hydroxylapatite column eluate	2.48	36.93	14.9	6.3

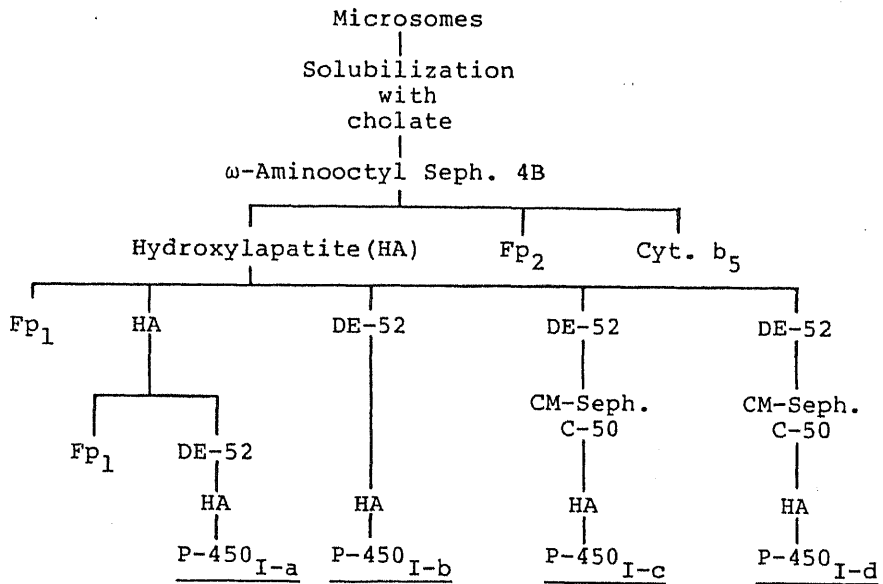


Fig. 3-2 Purification profile of cytochrome P-450 from untreated monkey liver microsomes

Table 3-3 Used buffers for the purification of multiple species of cytochrome P-450 from untreated monkey liver microsomes

Buffer	Phosphate (mM)	pH	E-913 (%)	CA (%)	EDTA (mM)	DTT (mM)	PMSF (mg/ml)
A	100	7.25		0.6	1	1	0.1
B	100	7.25		0.5	1	1	0.1
C	100	7.25	0.08	0.4	1	1	0.1
D	33	7.25	0.2				
E	35	7.4	0.2				
F	15	7.4	0.2				
G	80	7.4	0.2				
H	90	7.4	0.2				
I	150	7.4	0.2				
J	150	7.4	0.2	0.1			
K	5	7.4	0.2	0.1		0.1	
L	10	7.4	0.2	0.1		0.1	
M	25	7.25					
N	25	7.25	0.2				
O	50	7.25	0.2				
P	75	7.25	0.2				
Q	100	7.25	0.2				
R	150	7.25	0.2				
S	100	7.25					
T	15	7.4					
U	60	7.25	0.2				
V	60	7.4					
W	100	7.4					
X	15	7.25	0.2				
Y	50	7.4					
Z	500	7.4					

All buffers used here contain 20 % glycerol

用いなかったが、不純物が認められる場合には他の画分と同様に処理することにより不純物は除去された。先に精製したP-450は、P-450_{I-c}に対応するものである。精製の結果をTable 3-4に示した。Hydroxylapatiteカラムステップで4つのP-450画分に分離したが、回収されたP-450はP-450_{I-c}で最も多く146.3nmoleであり次いでP-450_{I-b}、P-450_{I-d}、P-450_{I-a}の順であった。最終精製標品の比含量はP-450_{I-a}、P-450_{I-b}、P-450_{I-c}、P-450_{I-d}で各々 11.8、10.7、10.6および6.11 nmole/mgであった。

Table 3-4 Purification of multiple species of cytochrome P-450 from untreated monkey liver microsomes

Step	Protein (mg)	P-450 (nmole)	Specific content (nmole/mg)	Ratio	Recovery (%)
Microsomes	822.4	1052.8	1.28	1.00	
Solubilized Supernate	665.9	1022.7	1.54	1.20	97.1
Octylamino- Sephacrose 4B	145.2	738.0	5.08	3.97	70.1
Hydroxylapatite					
80mM (P-450 _{I-a})	6.59	37.1	5.63	4.40	3.5
90mM (P-450 _{I-b})	13.7	104.1	7.61	5.95	9.9
150mM (P-450 _{I-c})	17.9	146.3	8.16	6.37	13.9
150mM + 0.1% CA (P-450 _{I-d})	7.12	38.3	5.39	4.21	3.6
DE-52					
P-450 _{I-a}	1.62	9.4	5.78	4.52	0.9
P-450 _{I-b}	5.19	37.1	7.14	5.58	3.5
P-450 _{I-c}	6.19	65.8	10.6	8.30	6.3
P-450 _{I-d}	3.49	23.9	6.86	5.36	2.3
CM-Sephadex C 50					
P-450 _{I-c}	1.09	23.0	21.2	16.6	2.2
P-450 _{I-d}	— *	6.5	— *	— *	0.6
Hydroxylapatite					
P-450 _{I-a}	0.44	5.2	11.8	9.20	0.5
P-450 _{I-b}	2.14	23.0	10.7	8.39	2.2
P-450 _{I-c}	1.46	15.5	10.6	8.27	1.5
P-450 _{I-d}	0.52	3.2	6.11	4.78	0.3

* Since concentration of protein was very low, accurate values could not be obtained.

第2章 精製したチトクローム P-450のスペクトル的特性 ならびに分子量の比較

【実験結果】

精製した4種のP-450の絶対スペクトルをFig. 3-3に示した。用いたP-450の濃度は P-450_{r-a}、P-450_{r-b}、P-450_{r-c}、P-450_{r-d}で各々0.66、0.53、1.15、0.53 μM とし、20%グリセリン存在下にて測定した。P-450_{r-b}を除く3種のP-450の酸化型絶対スペクトルは、Soret帯の吸収極大波長が417nmにあり、 α 帯および β 帯の幅広い吸収を565および535nm付近にもつ典型的な低スピン型のスペクトルを示した。P-450_{r-b}では、酸化型絶対スペクトルのSoret帯の吸収が390nm付近に肩を持ち415nmに吸収極大を示し、 α 帯が β 帯に比べ小さく消失しつつあることから、低スピン型と高スピン型の混合型のスペクトルであることが判った。ハイドロサルファイトによる還元型のスペクトルは、Soret帯の吸収極大が408~414nmと短波長にシフトが全ての標品で見られた。CO還元型差スペクトルの吸収極大波長を各標品で比較した時、P-450_{r-a}、P-450_{r-b}、P-450_{r-c}、P-450_{r-d}で各々 450、447.5、449、450.5nmと全ての標品で異なっていることが判った (Fig. 3-4)。

ここで精製した4種のサルP-450に対してSDS-PAGEを行った後イウーマシーブ リリアントブルーによる染色をした結果を示したのがFig. 3-5である。用いた全ての標品がほぼ単一なまでに精製されていることが明らかとなった。さらにこれから算出した各標品の分子量はP-450_{r-a}、P-450_{r-b}、P-450_{r-c}、P-450_{r-d}で各々 50000、48000、50000、53000 であり、P-450_{r-a}、とP-450_{r-c}は同一であったが、他の標品との間では分子量が互いに異なっている事が明らかとなった。

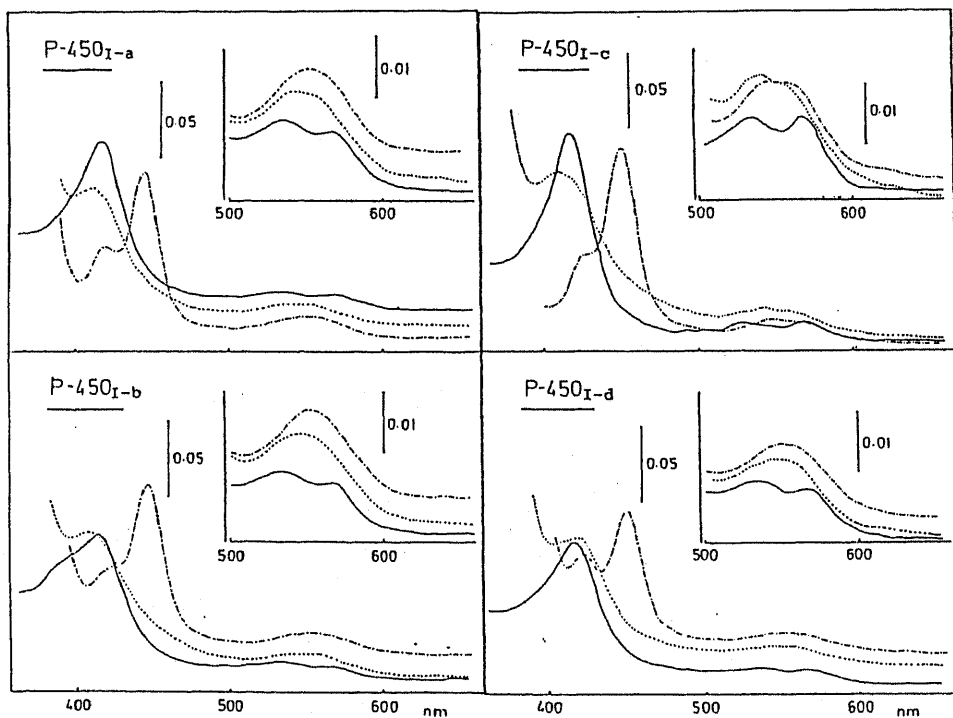


Fig. 3-3 Absorption spectra of oxidized (—), reduced (.....) and CO-reduced (----) forms of cytochrome P-450_{I-a}, P-450_{I-b}, P-450_{I-c} and P-450_{I-d} purified from untreated monkey liver microsomes

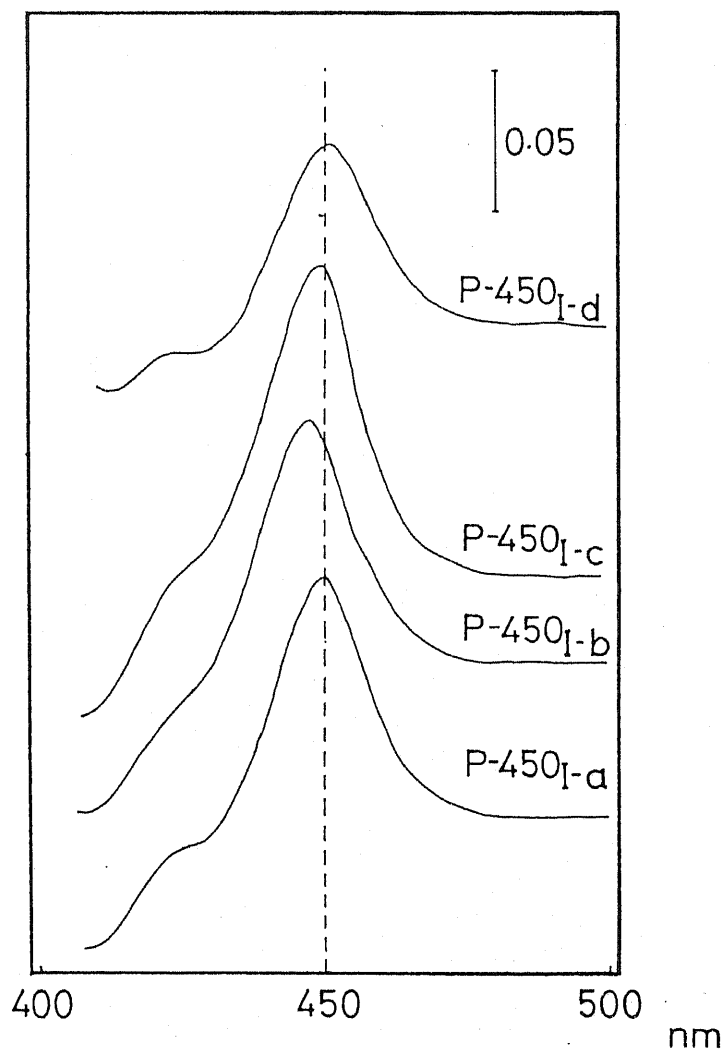


Fig. 3-4 CO-reduced difference spectra of cytochrome P-450_{I-a}, P-450_{I-b}, P-450_{I-c} and P-450_{I-d}

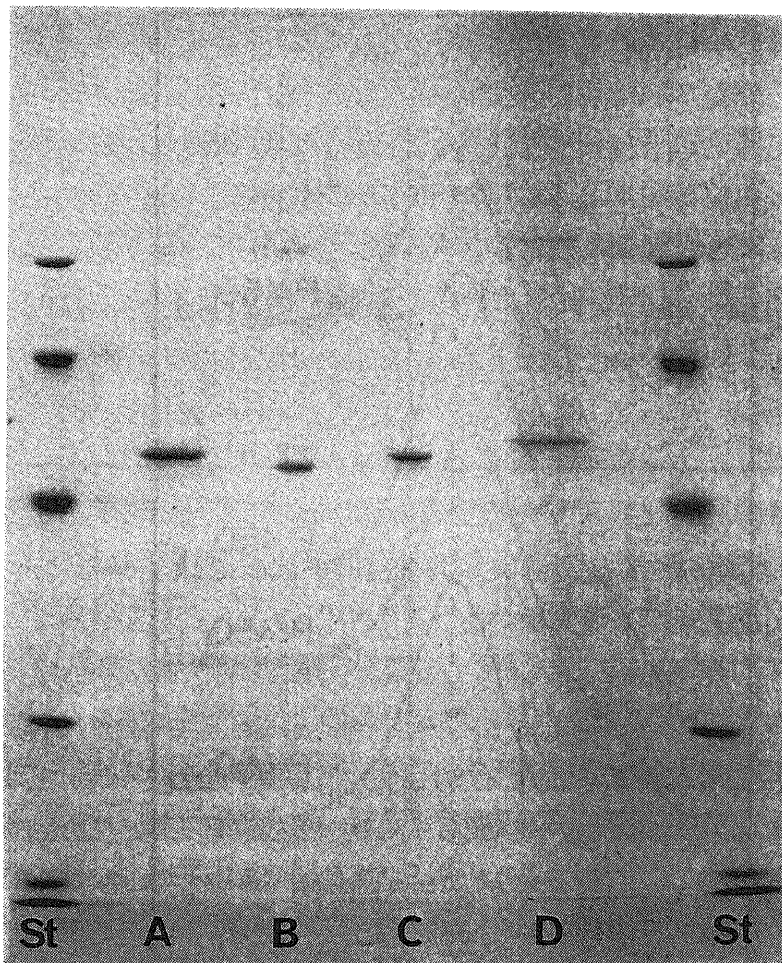


Fig. 3-5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified cytochrome P-450s.

The gel was stained with Coomassie brilliant blue.
1; P-450_{I-a} 2; P-450_{I-b} 3; P-450_{I-c} 4; P-450_{I-d}

第3章 チトクロームP-450アイソザイムの薬物代謝活性の比較

【実験方法】

1. 再構成系の反応液組成

反応液の組成はテストステロン (TS) 水酸化反応の場合を除き、0.5ml中、100mMKpi(pH7.4)、25 μ g DLPC、0.1 μ M P-450、1 unit Fp₂、0.1mM EDTA、基質から成り、NADPH-g.s.を加えて10分間または20分間反応を行った後、各々の活性を測定した。用いた基質濃度は、7-EC、BPhetは1mM、AM、EMは5mM、ANは2mMとした。

2. テストステロン水酸化活性の測定

TS水酸化活性の反応液は、1.の反応液を1.0mlで作成し、TSの濃度は0.2 mMとした。反応は37°Cで15分間行い、ベンゼン (5ml) で抽出後、有機層4.0mlを分取し蒸発乾固させた、残渣を50 μ lのイソプロパノールに溶解し測定試料とした。

代謝物の分離・定量は高速液体クロマトグラフィにより行った。カラムはTSK Silica-60 (ϕ 4.6 \times 250mm) を用い、展開溶媒 (n-ヘキサン:ジクロルメタン:エタノール=33:15:2.5) を2.3ml/minの流量で流すことにより、基質ならびに代謝物を分離し、240nmにて測定し、外部標準法により定量した。代謝物としてTSの2 α 、2 β 、6 β 、16 α 、7 α 、16 α 水酸化体を定量した。各々の水酸化体の溶出時間は4.6、5.2、7.2、8.0、13.0、15.1、35.7分であった。

3. NADPH-チトクローム C (P-450) 還元酵素およびチトクローム b₅

ここで用いたFp₂、b₅は、共にラット肝Msから各々1-1-3ならびに2-4の方法により精製したものである。

【実験結果】

サルとラットの3種のP-450の薬物代謝能を示したのがTable 3-5およびFig.3-6である。ラットの3種のP-450は、各々PB P-450ではBPhet N-脱メチル化活性、MC P-448₁ではAN水酸化活性、MC P-448₂では7-EC O-脱エチル化活性が高

Table 3-5 Catalytic activities of P-450_{I-C}, PB P-450, MC P-448₁ and MC P-448₂

	P-450 _{I-C}	PB P-450	MC P-448 ₁	MC P-448 ₂
Benzphetamine N-demethylation a)	1.05	36.47	10.99	12.84
Ethylmorphine N-demethylation a)	1.68	9.38	0.68	3.40
Aminopyrine N-demethylation a)	2.10	6.18	24.39	17.93
Aniline p-hydroxylation b)	0.54	1.13	11.08	1.32
7-Ethoxycoumarin O-deethylation c)	0.81	8.34	3.46	133.10

- a) n mole formaldehyde/n mole P-450/min
b) n mole p-aminophenol/n mole P-450/min
c) n mole 7-hydroxycoumarin/n mole P-450/min

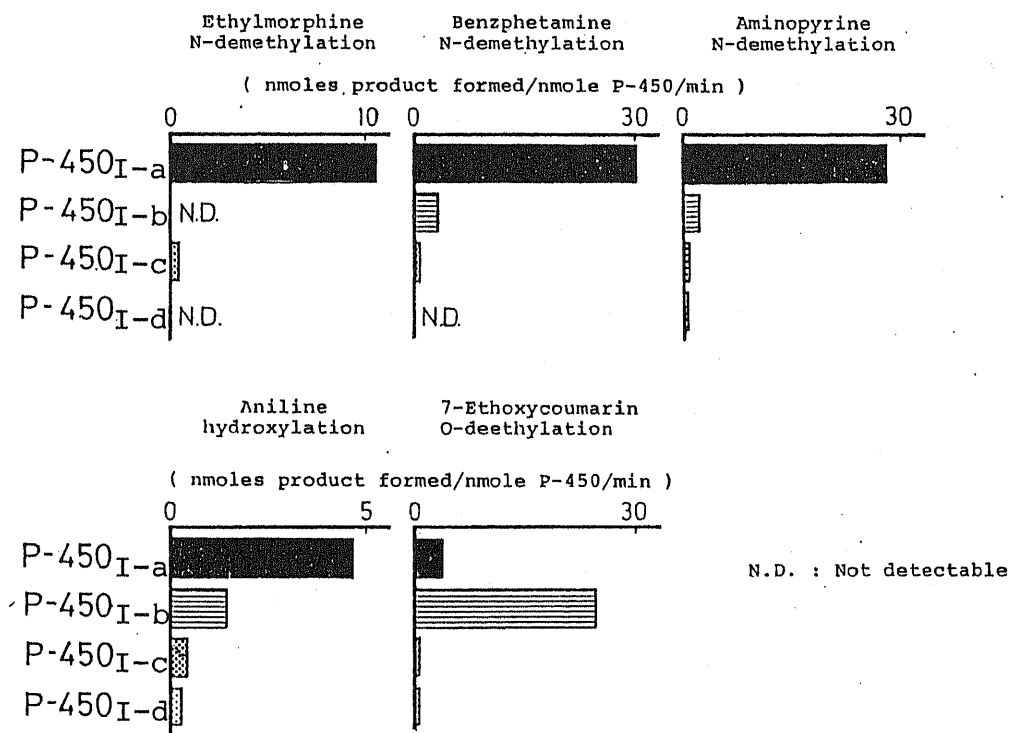


Fig. 3-6 Catalytic properties of purified cytochrome

P-450_I-a-d

く、その基質特異性が明確であるのに対し、P-450_{I-c}では、ここで用いた全ての基質に対する反応性は低く、基質特異性も不明瞭であった。P-450_{I-a}はEM、AM、BPhet N-脱メチル化活性ならびにAN水酸化活性が高く、P-450_{I-b}では7-EC O-脱エチル化活性が特異的に高かったが、P-450_{I-d}はP-450_{I-c}と同様に低い活性しか得られなかった。P-450_{I-c}とP-450_{I-a}では明確な基質特異性が示されなかったが、ここで用いたのは異物として分類される物であることから、次ぎに生体内での生理的基質を考慮し、TS水酸化能を調べた (Table 3-6)。P-450_{I-c}でTSの6 β ならびに16 α 水酸化活性が認められたが、6 β 水酸化活性の方が8.5倍高く、ここにP-450_{I-c}の基質特異性が明らかとなった。P-450_{I-a}では2 β 水酸化活性が認められた。P-450_{I-b}、P-450_{I-d}の場合代謝物と思われるピークは認められなかった。薬物代謝反応中には、最大活性を示すためにb₅を要求する場合があることが知られており¹¹⁹⁾雄ラット固有のP-450ではプロボキシクマリンO-脱プロピル化活性でb₅を添加することにより活性が上昇することから¹²⁰⁾、P-450_{I-b}、P-450_{I-c}においてもb₅要求性があるや否やを検討した。7-EC O-脱エチル化活性の場合、P-450で明らかなb₅要求性が認められ、P-450に対するb₅の比が約2の条件で約3倍の活性上昇が示されたが、一方P-450_{I-b}の場合にはb₅要求性は認められなかった (Fig. 3-7)。P-450_{I-c}によるTS6 β 水酸化活性もまたb₅添加により約5倍の活性上昇が認められ、本反応についてもP-450_{I-c}はb₅要求性があることが示されたが、TS16 α 水酸化反応に対してはb₅要求性は見られなかった (Fig. 3-8)。

Table 3-6 Testosterone hydroxylation activities catalyzed by four forms of monkey liver cytochrome P-450

	Testosterone hydroxylation activity		
	2 β (n mole/n mole P-450/min)	6 β	16 α
Cytochrome P-450 _{I-a}	0.82	N.D.	N.D.
Cytochrome P-450 _{I-b}	N.D.	N.D.	N.D.
Cytochrome P-450 _{I-c}	N.D.	0.17	0.02
Cytochrome P-450 _{I-d}	N.D.	N.D.	N.D.

The reconstituted system contained 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.1 n mole of cytochrome P-450, 2 unit of NADPH-cytochrome c reductase, 0.05 mg of dilauroyl-L-3-phosphatidylcholine, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM testosterone and NADPH-generating system. The reaction was started by adding NADPH-generating system and performed for 15 min. N.D.; not detectable

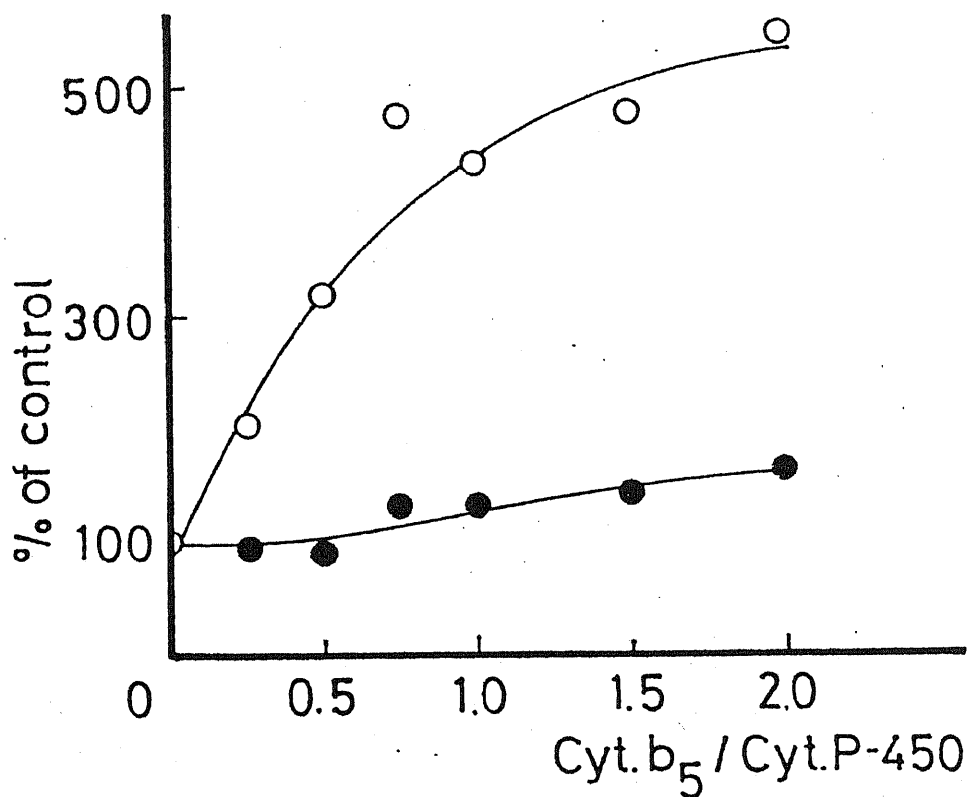


Fig. 3-8 Requirement of cytochrome b₅ for testosterone 6β (O) and 16α (●) hydroxylation activities catalyzed by cytochrome P-450_{I-c}

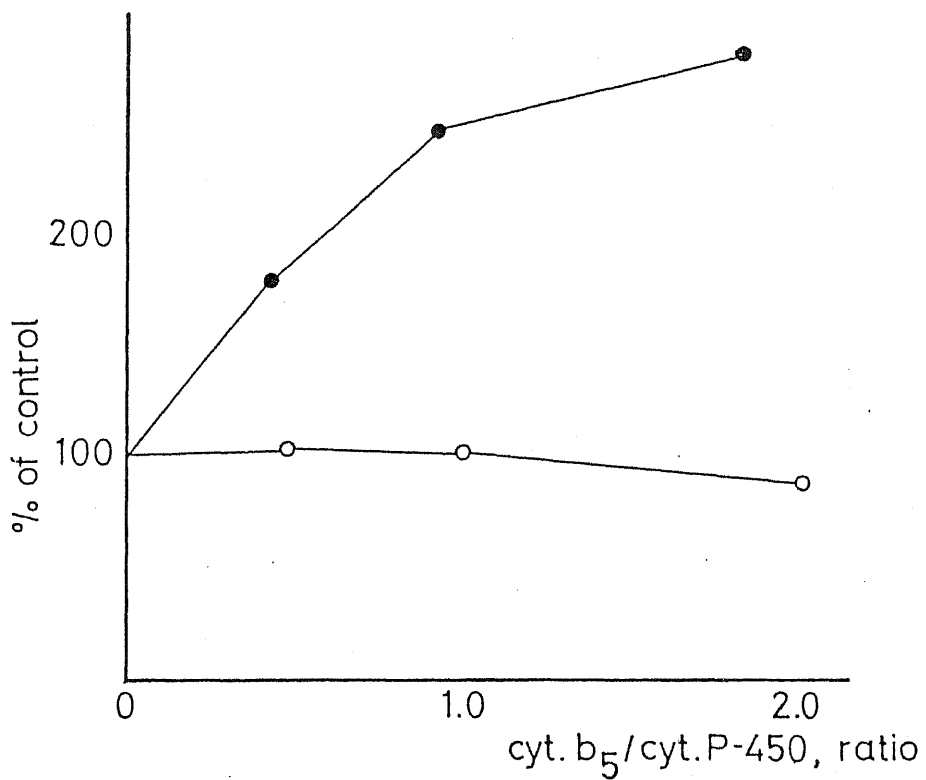


Fig. 3-7 Cytochrome b₅ requirement for 7-ethoxycoumarin O-deethylation activity catalyzed by cytochrome P-450_{I-b} (○) and P-450_{I-c} (●).

第4章 チトクロームP-450アイソザイムの免疫学的比較検討

【実験方法】

1. 抗体の作製

抗体の作製ならびにIgGの分離は1-3に示した方法により行った。

2. 7-エトキシマリノール0-脱エチル化活性に対するP-450の抗体による阻害実験

P-450とIgGを37°Cで10分間反応後、2-3の方法により7-EC 0-脱エチル化活性を測定した。

3. チトクロームP-450アイソザイムの定量

P-450I-b、P-450I-cの定量はGuengerichらの方法¹²¹⁾による western blot-peroxidase-anti-peroxidase-staining(western blot-PAP-staining)法により行った。

SDS-PAGE (ゲル濃度10%) 後、ニトロセルロースシートに蛋白を転写し、抗体と反応させた後、パーオキシダーゼ染色を行い、400nmの吸光度を測定することにより定量した。標準曲線は、シートごとに精製標品を用い作製した。

4. アズトレオナム投与実験

雄性カニクイザル (体重2.92~5.35kg) を用い1群4匹とし、アズトレオナム (AZT) を40、150、300mg/kg、およびセフォペラゾン (CPZ) を300mg/kgの用量で1日1回4週間静脈内投与を行った。

5. p-ニトロアニソール 0-脱メチル化活性、NADH-フェリシアニド還元酵素活性の測定

p-ニトロアニソール (p-NO₂AN1e) 0-脱メチル化活性はKamatakiらの方法¹²²⁾により測定した。

Fp₁の活性はMiharaとSatoの方法¹²³⁾により測定した。

【実験結果】

P-450_{I-a}、P-450_{I-b}、P-450_{I-c}およびP-450_{I-d}の触媒する7-EC O-脱エチル化活性の anti P-450_{I-b} IgGおよび anti P-450_{I-c} IgG添加による阻害の有無を Fig.3-9に示した。IgG無添加時のP-450_{I-a}、P-450_{I-b}、P-450_{I-c}、P-450_{I-d}の活性は各々1.83、12.4、0.28、0.44nmole/nmole P-450/minでありこれらの活性は無感作ウサギより調製したIgG 500 μg添加によっても変化しなかった。Anti P-450_{I-b} IgG添加によって対応する抗原であるP-450_{I-b}の活性が特異的に阻害された。Anti P-450_{I-c} IgGを添加した時、P-450_{I-b}による活性は殆ど阻害されなかった。P-450_{I-a}、P-450_{I-d}の活性は若干阻害されたが、P-450_{I-c}に比べ弱いものであった。ラットの薬物誘導性P-450 3種を用いてFig.3-9と同様の検討をしたのがFig.3-10である。PB P-450の活性がanti P-450_{I-b} IgGで若干阻害が認められたが Fig.3-11でP-450_{I-b}の活性がほぼ100%阻害された100 μg IgG添加時のP-450の場合の阻害は9%と極めて弱いものであった。他は全く阻害が認められなかった。

Western blot-PAP-staining法を用いてP-450種間の免疫学的特異性を比較した (Fig.3-11)。抗血清はP-450_{I-b}、P-450_{I-c}、PB P-450、MC P-448₁、およびMC P-448₂に対する5種類を用いた。MC P-448₂に対する抗血清はMC P-448₁とも反応することが示されたが、他のP-450_{I-b}、P-450_{I-c}、PB P-450、MC P-448₁に対する抗血清は対応する抗原とのみ反応が見られ、各々の免疫学的特異性が明確となった。

AZTを連続投与することによりP-450量の減少が認められたが、b₅量、Fp₁、およびFp₂の活性は変化しなかった (Table 3-7)。また、この時の薬物代謝活性については、TS6 β水酸化活性で低下の傾向が認められた以外、変動は見られなかった (Table 3-8, Table 3-9)。このP-450量の減少が、P-450_{I-b}あるいはP-450_{I-c}の減少を伴ったP-450の質的変動による可能性について、western-blot-PAP staining 法により各アイソザイムの定量を行った。MsはP-450_{I-b}またはP-450_{I-c}の抗血清により各々一本の染色バンドのみが認められた (Fig.3-12)。各P-450の定量を行った結果をTable 3-10に示した。対照群のP-450_{I-b}量は0.133nmole/mgであり、全体の10.5%をしめていた。P-450_{I-b}はAZT投与により変動しなかった。一方P-450_{I-c}は対照群で0.444nmole/mgと、全体の42%を占めていた。また、P-450_{I-c}はAZT投与により減少し、AZT150mg/kg投与群では対照群の

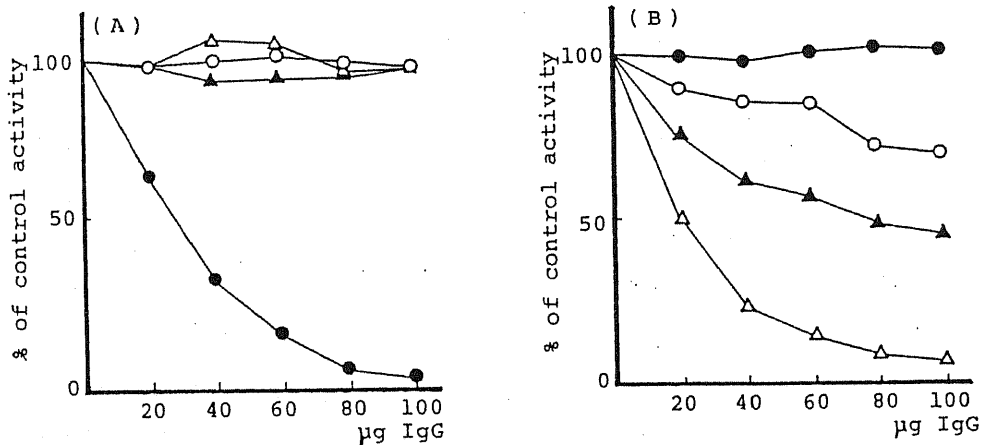


Fig. 3-9 Effects of anti-P-450_{I-b} IgG (A) and anti-P-450_{I-c} IgG (B) on 7-ethoxycoumarin O-deethylation activities catalyzed by P-450_{I-a} (○), P-450_{I-b} (●), P-450_{I-c} (Δ) and P-450_{I-d} (▲)

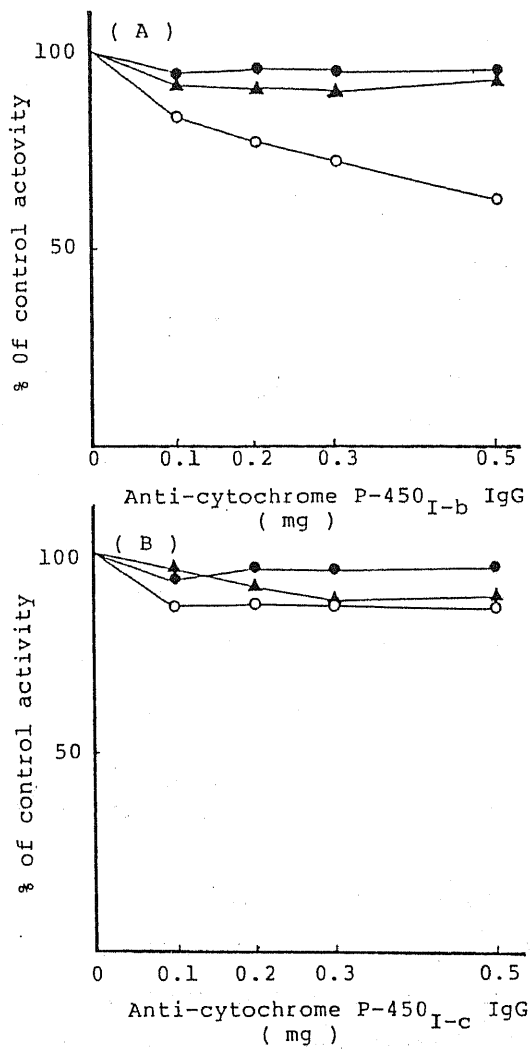


Fig. 3-10 Effects of anti-P-450_{I-b} IgG (A) and anti-P-450_{I-c} IgG on 7-ethoxycoumarin O-deethylation activities catalyzed by PB P-450 (○), MC P-448₁ (●) and MC P-448₂ (▲)

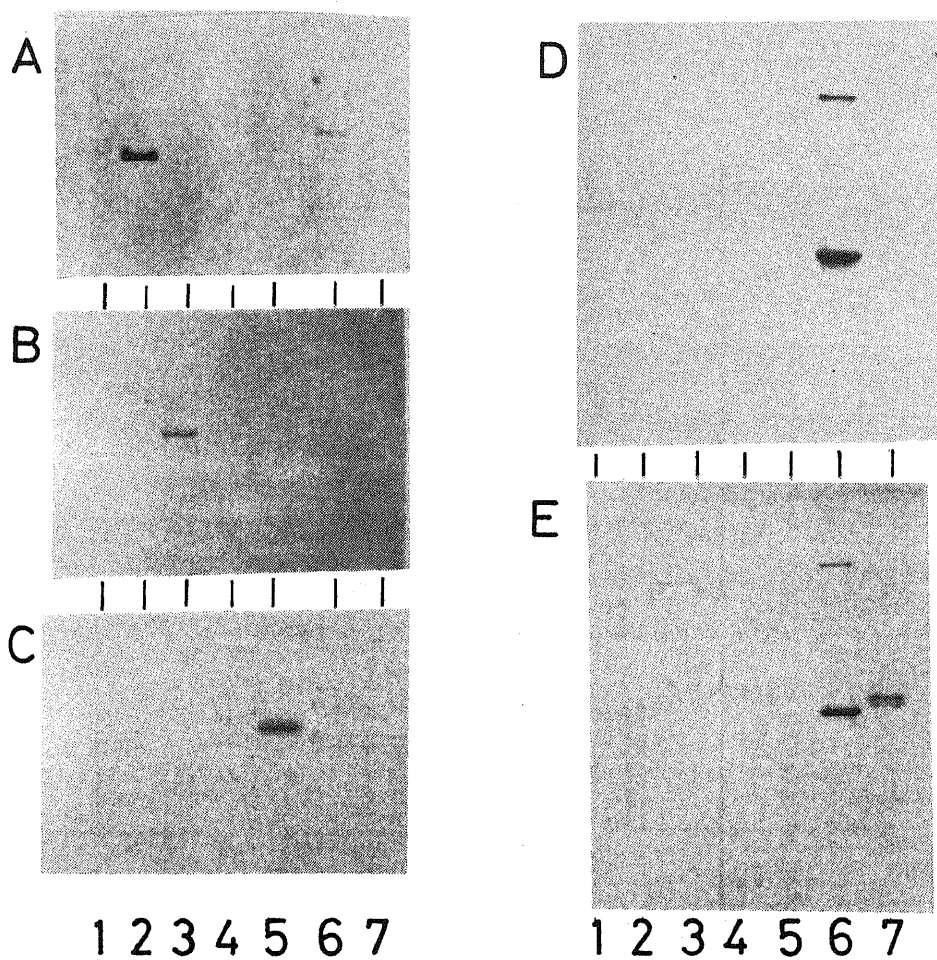


Fig. 3-11 Immunological staining of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis after transfer to nitrocellulose sheet.

Purified cytochrome P-450_{I-a} (1), P-450_{I-b} (2), P-450_{I-c} (3), P-450_{I-d} (4), PB P-450 (5), MC P-448₁ (6) and MC P-448₂ (7) were electrophoresed. Sheets were stained by anti-P-450_{I-b} (part A), anti-P-450_{I-c} (part B), anti-PB P-450 (part C), anti-MC P-448₁ (part D) or anti MC P-448₂ (part E) IgG.

Table 3-7 Effect of successive administration of aztreonam on cytochrome P-450 and b₅ contents and NADPH-cytochrome c reductase and NADH-ferricyanide reductase activities in crab eating monkey liver microsomes

	Cytochrome P-450	Cytochrome b ₅	NADPH-Cytochrome c reductase	NADH-Ferricyanide reductase
	(n mole/mg)		(unit/mg)	
Control	1.06 ± 0.06 (100)	0.39 ± 0.03 (100)	0.195 ± 0.004 (100)	3.22 ± 0.31 (100)
Aztreonam (40 mg/kg)	0.88 ± 0.03* (83)	0.39 ± 0.03 (100)	0.192 ± 0.009 (98)	3.37 ± 0.46 (105)
Aztreonam (150 mg/kg)	0.82 ± 0.05* (77)	0.37 ± 0.03 (95)	0.207 ± 0.005 (106)	3.16 ± 0.26 (98)
Aztreonam (300 mg/kg)	0.81 ± 0.02** (76)	0.34 ± 0.04 (87)	0.225 ± 0.018 (115)	3.30 ± 0.24 (102)
Cefoperazone (300 mg/kg)	1.07 ± 0.10 (101)	0.42 ± 0.06, (107)	0.235 ± 0.005** (121)	3.26 ± 0.21 (101)

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4 animals
 Numbers in parentheses represent per cent of control
 Significant difference from control; *: p < 0.05, **: p < 0.01

Table 3-8 Effect of successive administration of aztreonam on drug metabolizing activities in crab eating monkey liver microsomes

	Benzphetamine N-demethylase	Aminopyrine N-demethylase	p-Nitroanisole O-demethylase	Aniline hydroxylase	7-Ethoxycoumarin O-deethylase
	(n mole /mg protein/min)				
Control	4.625 ± 0.497 (100)	6.348 ± 0.550 (100)	2.488 ± 0.126 (100)	0.477 ± 0.018 (100)	1.965 ± 0.255 (100)
Aztreonam (40 mg/kg)	4.283 ± 0.394 (93)	6.308 ± 0.548 (99)	2.025 ± 0.261 (81)	0.462 ± 0.031 (97)	2.443 ± 0.587 (124)
Aztreonam (150 mg/kg)	4.765 ± 0.636 (103)	6.540 ± 0.638 (103)	2.575 ± 0.151 (103)	0.549 ± 0.024 (115)	2.373 ± 0.272 (121)
Aztreonam (300 mg/kg)	3.848 ± 0.223 (83)	5.915 ± 0.574 (93)	2.520 ± 0.179 (101)	0.567 ± 0.055 (119)	2.325 ± 0.154 (118)
Cefoperazone (300 mg/kg)	4.585 ± 0.150 (99)	7.833 ± 0.674 (123)	2.723 ± 0.288 (109)	0.598 ± 0.033* (125)	2.640 ± 0.372 (134)

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4 animals
Significant difference from control; *: p < 0.05

Table 3-9 Effect of successive administration of aztreonam on testosterone hydroxylation activities in crab eating monkey liver microsomes

	Testosterone hydroxylase			
	6 β	2 β	16 α	6 α
	(n mole/mg/min)			
Control	1.42 \pm 0.18	0.14 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
Aztreonam(40mg/kg)	1.21 \pm 0.09	0.12 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
Aztreonam(150mg/kg)	1.18 \pm 0.10	0.12 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
Aztreonam(300mg/kg)	1.25 \pm 0.16	0.13 \pm 0.02	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00
Cefoperazone (300mg/kg)	1.86 \pm 0.12	0.16 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00

Each value represents Mean \pm SE obtained from 4 animals.

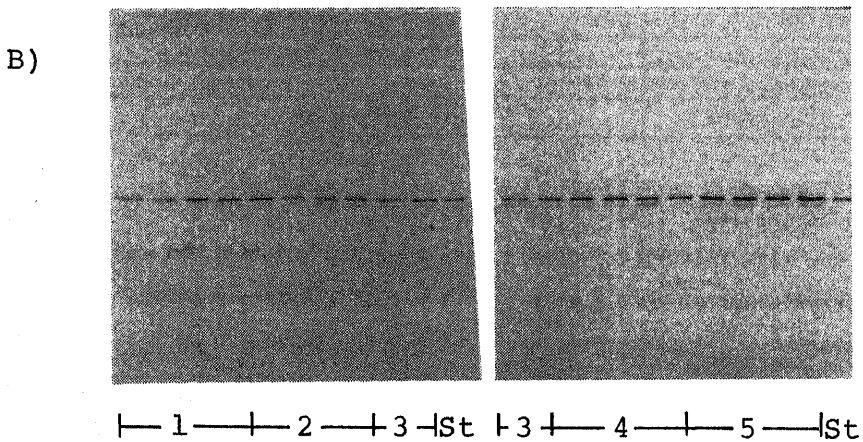
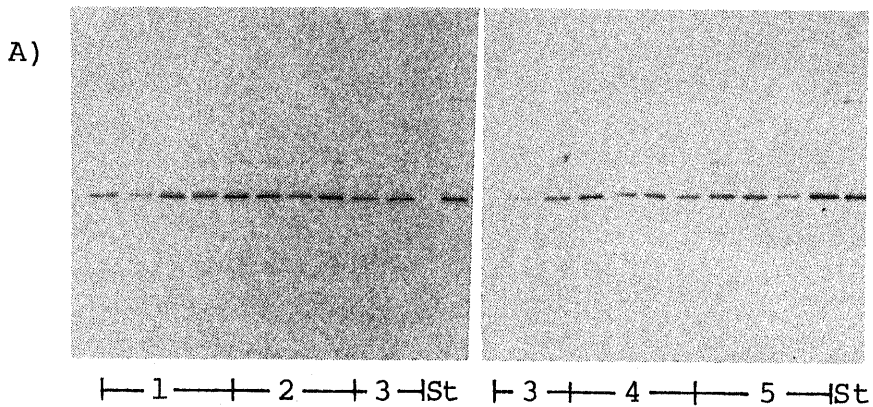


Fig. 3-12 Immunological staining of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis after transfer to nitrocellulose sheets.

Control(1), aztreonam 40 mg/kg(2), aztreonam 150 mg/kg(3), aztreonam 300 mg/kg and cephoperazone 300 mg/kg(5) monkey liver microsomes were electrophoresed. Sheets were stained by anti-P-450_{I-b} (part A) or anti-P-450_{I-c} (part B) IgG.

Table 3-10 Cytochrome P-450_{I-b} and P-450_{I-c} contents in aztreonam treated monkey liver microsomes

	Total cytochrome P-450	Cytochrome P-450 isozyme	
	n mole/mg	n mole P-450 _{I-b} /mg	n mole P-450 _{I-c} /mg
Control	1.09 ± 0.06	0.113 ± 0.017 (100.0)	0.444 ± 0.072 (100.0)
Aztreonam (40 mg/kg)	0.88 ± 0.03*	0.145 ± 0.020 (128.3)	0.282 ± 0.033 (63.5)
Aztreonam (150 mg/kg)	0.82 ± 0.05*	0.089 ± 0.017 (78.8)	0.239 ± 0.027* (53.8)
Aztreonam (300 mg/kg)	0.81 ± 0.02**	0.103 ± 0.016 (91.2)	0.297 ± 0.026 (66.9)
Cefoperazone (300 mg/kg)	1.07 ± 0.10	0.163 ± 0.048 (144.2)	0.553 ± 0.043 (124.5)

Each value represents Mean ± S.E. obtained from 4 animals
 Numbers in parentheses are per cent of control
 Significant difference from control: *, p < 0.05, **, p < 0.01

54%にまで有意に減少した。このP-450_{1-c}の減少の絶対量は、全体のP-450量の減少にほぼ対応していた。P-450_{1-c}がTS6β水酸化活性を有すること、AZT投与により本活性が低下傾向が認められたことから、ここで定量した両P-450種の個々の値とTS6β水酸化活性の個々の値との間の相関関係を調べた (Fig. 3-13)。
P-450_{1-c}量とTS6β水酸化活性との間に強い相関があることが判った ($r=0.886$)。

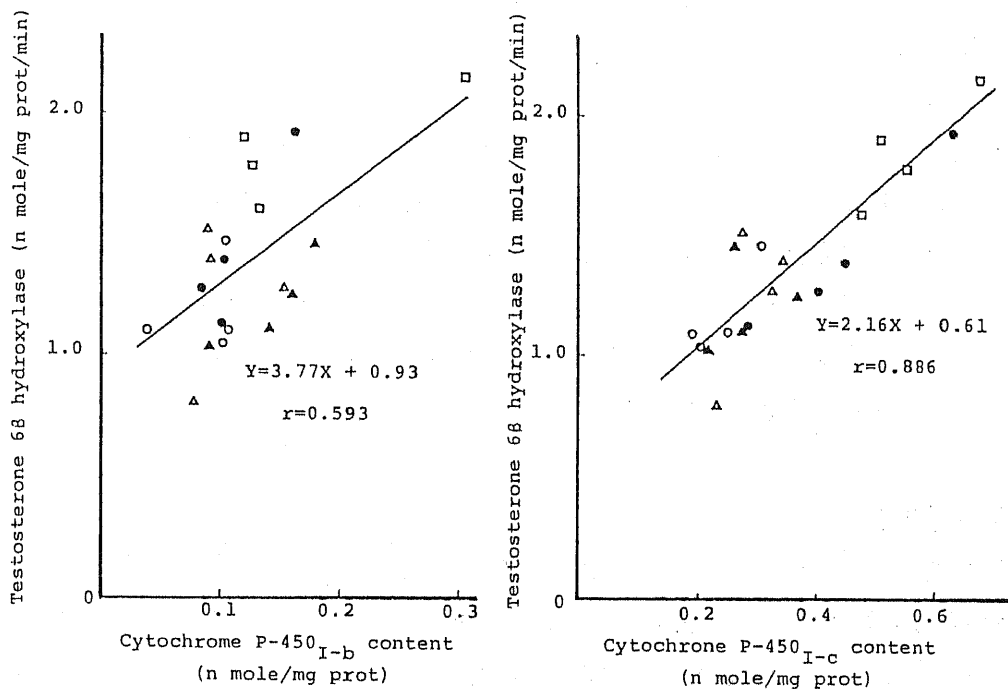


Fig. 3-13 Relationship between testosterone 6 β -hydroxylation activity and cytochrome P-450_{I-b} or P-450_{I-c} content in monkey liver microsomes.

●; Control, ▲; Aztreonam (40 mg/kg),
○; Aztreonam (150 mg/kg), △; Aztreonam
(300/mg/kg), □; Cefoperazone (300 mg/kg)

第5章 チトクロームP-450の種差 カニクイザルチトクローム P-450を中心として

3-5-1 実験動物の薬物代謝酵素系の比較

【実験方法】

1. 動物

動物は、SD系ラット（雄：体重340～370gもしくは180～200g、雌：体重240～270g）、雄性マウス（ddy系：体重26～29g、ICR系：体重27～33g、BALB/C系：体重20～25g）、雄性New Zealand 白色ウサギ（体重1.7～2.0kg）、雄性ゴールデンハムスター（体重100～109g）、雄性Hartley系モルモット（体重280～300g）、雄性リスザル（体重：870～890g）、雄性カニクイザル（体重3.0～3.8kg）のものを用い、絶食を行わずにMsを調製した。

【実験結果】

各動物のMsについてSDS-PAGEを行い比較した（Fig.3-14）。泳動に用いたMsはP-450として約6pmoleずつapplyした。全ての動物で、分子量45000～60000の間にP-450と思われる複数の蛋白が確認されたが、各動物でその染色のパターンは同一ではなく、主たる蛋白の分子量を比較すると、雌性ラットで51000、雄性ラットで52000、マウスでは系統間で違いはみられず、54000、ウサギが51000、ハムスターが48000、カニクイザルおよびリスザルが50000と、動物種間で異なることが判った。

サルを除いた動物のP-450、 b_5 含量ならびにFp₁、Fp₂の活性をFig.3-15に、代謝活性をFig.3-16、Fig.3-17に示した。P-450、 b_5 含量では、マウスの系統差は見られなかった。ウサギでP-450含量が高く、ハムスターでFp₂の活性が高い結果が得られ、Litterstらの結果¹²⁴⁾とほぼ同様であった。代謝活性を比較した時、AN水酸化活性を除く反応で、ラットの性差が確認された。ハムスターでAM、EM N-脱メチル化活性、7-EC O-脱エチル化活性が高かった。p-NO₂ANle O-脱メチル化活性はモルモットで高かった。この結果の一部はLitterstの報告と一致しており、薬物代謝酵素系の含量・活性、あるいは薬物代謝活性の性差・種差を確認で

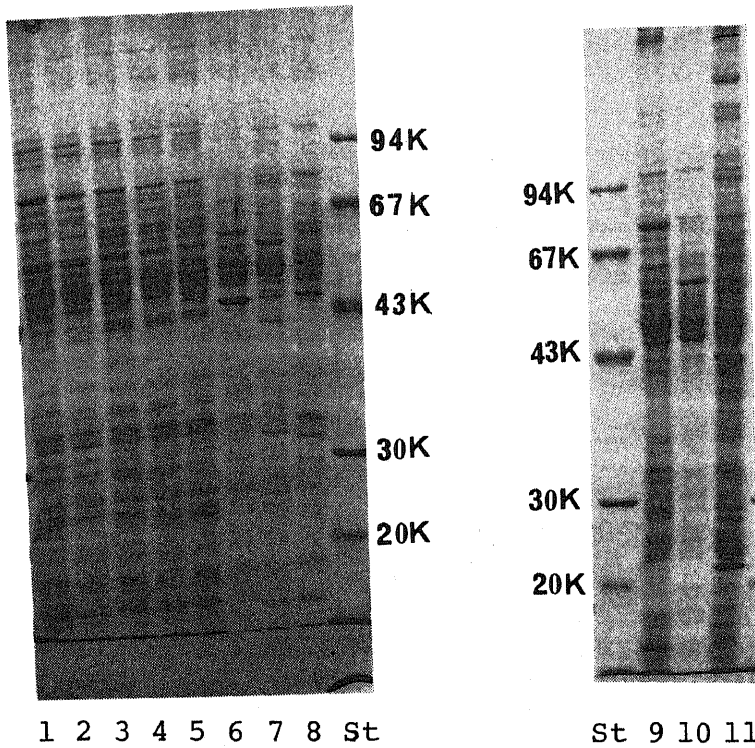


Fig. 3-14 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of liver microsomes.

The gels were stained with Coomassie brilliant blue.

1; Female rat, 2,9; Male rat, 3; Mouse (ddy), 4; Mouse (ICR), 5; Mouse (BALB/C), 6; Rabbit, 7; Hamster, 8; Guinea pig, 10; Crab eating monkey, 11; Common squirrel monkey

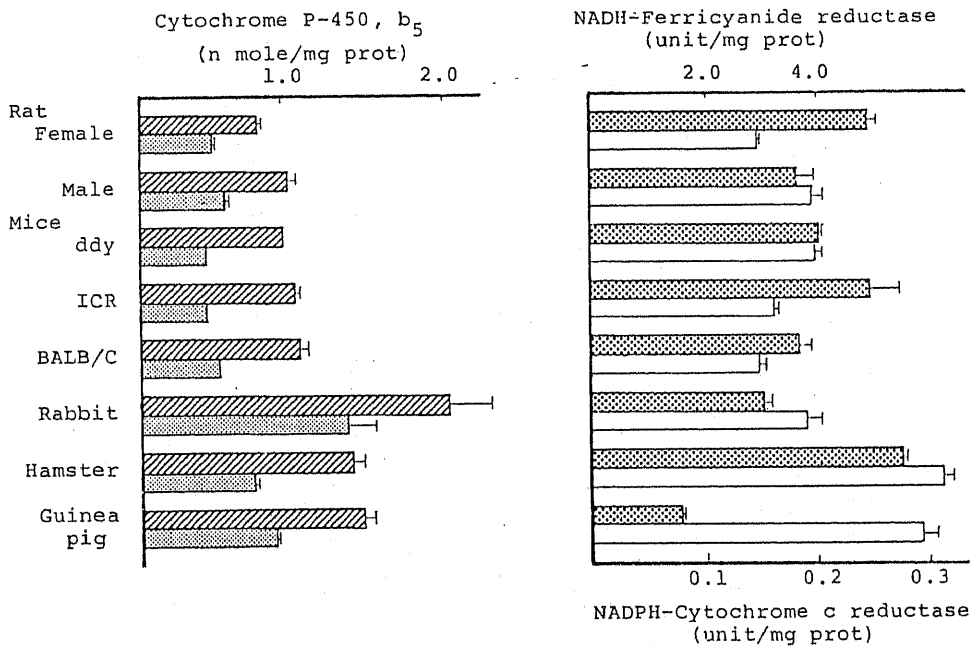


Fig. 3-15 Species, strain and sex differences of cytochrome P-450 (▨) and b_5 (▩) contents and NADH-ferricyanide reductase (▧) and NADPH-cytochrome c reductase (□) activities in liver microsomes.

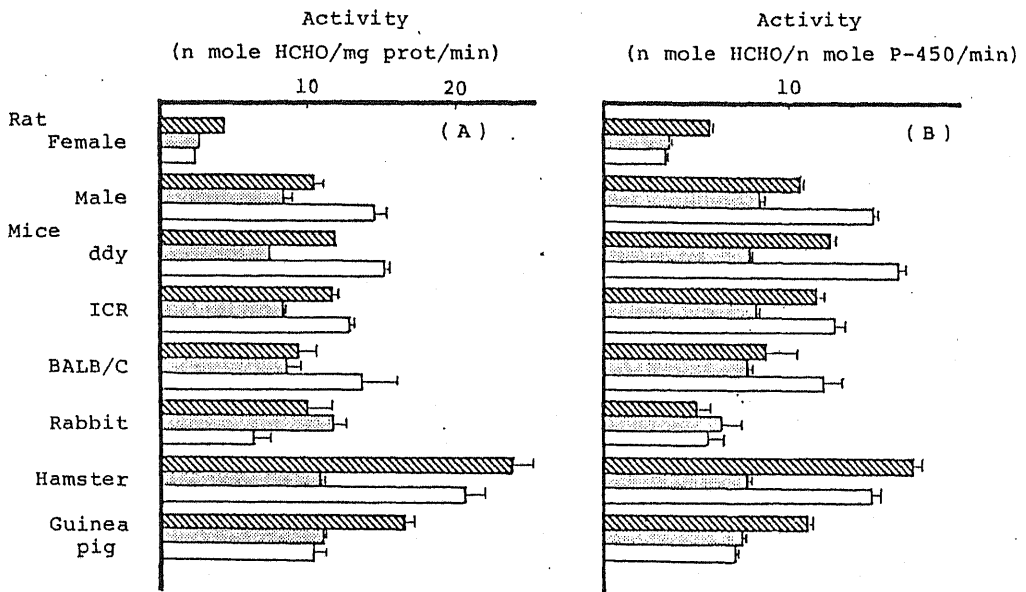


Fig. 3-16 Species, strain and sex differences of aminopyrine (▨), benzphetamine (▩) and ethylmorphine (□) N-demethylation activities in liver microsomes.

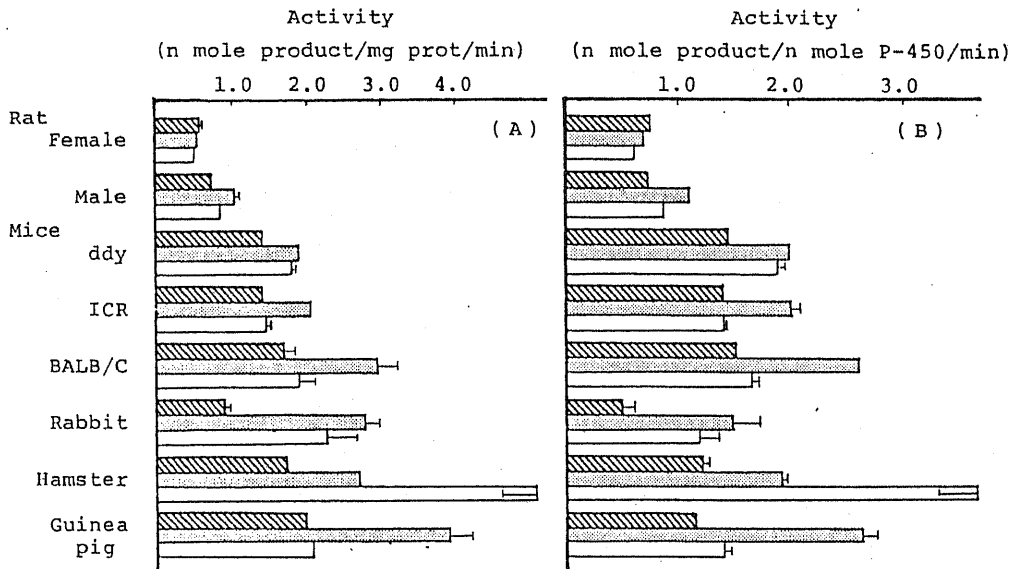


Fig. 3-17 Species, strain and sex differences of aniline hydroxylation (▨), p-nitroanisole O-demethylation (▩) and 7-ethoxycoumarin O-deethylation (□) activities in liver microsomes.

きた。 霊長類についての比較として、オナガザル科に属するカニクイザルと、オマキザル科に属するリスザルを用い検討した結果をFig.3-18に示した。P-450、 b_5 含量はカニクイザルの方がリスザルに比べ約3倍高く、 Fp_2 活性も約2.3倍カニクイザルの方が高かった。代謝活性においても、カニクイザルの方が全体的に高く、これはP-450含量の違いによるものと思われたがp-NO₂AN1e O-脱メチル化活性ではカニクイザルが、EM N-脱エチル化活性ではリスザルが高く、P-450量のみでは差異を論ずることは出来ず、カニクイザル、リスザルの間でもP-450の質的差異があることが推察された。

3-5-2 チトクロームP-450の種差——カニクイザルチトクロームP-450 を中心として

【実験方法】

1. 動物

3-5-1と同じものを用いた。雌雄リスザル（体重610~650g）を加えて検討した。

2. 抗体による阻害実験

Msは各抗体または抗体が含まれている50mMKpi（pH7.4）を混合し、37°Cで10分間反応後、TS水酸化活性、7-EC O-脱エチル化活性を反応時間を10分間として、3-3-2、および2-3に示した方法により測定した。

【実験結果】

まず、P-450_{I-b} P-450_{I-o}と免疫学的に類似したP-450種が、他の動物種においても存在するや否やについて検討した。5-3で精製したP-450_{I-b}、P-450_{I-o}に対する抗体を1-3に示した方法により調製し、それらを用いて種々の動物のMsをP-450として約6 pmoleずつ用いそれをSDS-PAGE後 western-blot-PAP staining法により比較した(Fig.3-19)。A)がP-450_{I-b}に対する抗体により処理したものである。雌性ラットではP-450_{I-b}よりも小さい分子量のP-450が強く染色されているのに対し、雄性ラットではP-450_{I-b}よりも若干分子量の大きなP-450が強く染色され、P-450_{I-b}の抗体と免疫学的に類似したP-450種で、ラットの場合性差が見られることが判った。マウスでは系統間で違いがみられず、3本の染色バンド

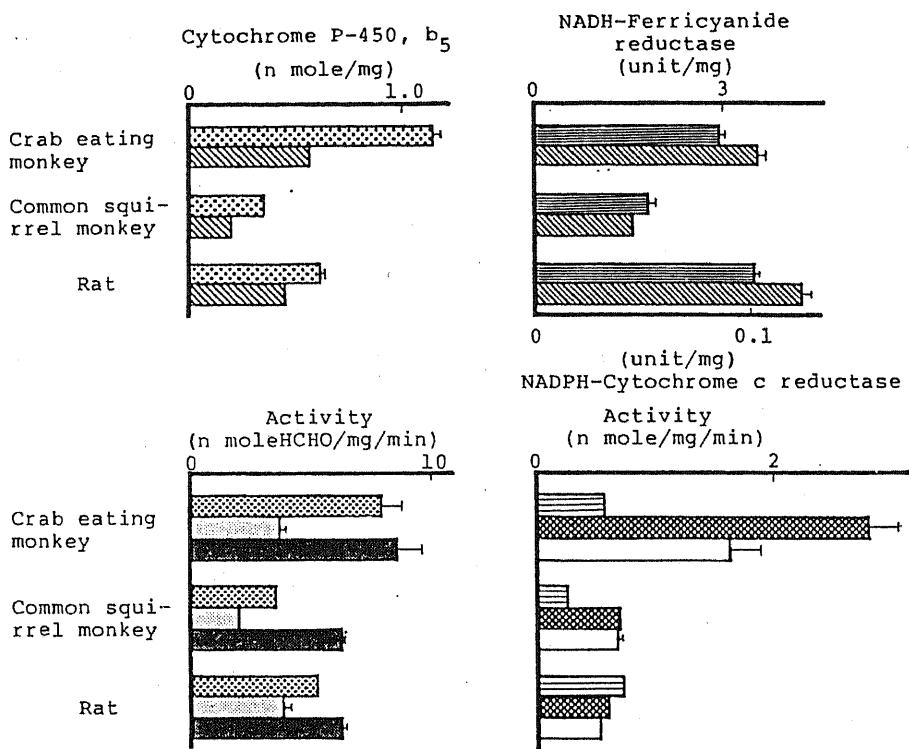
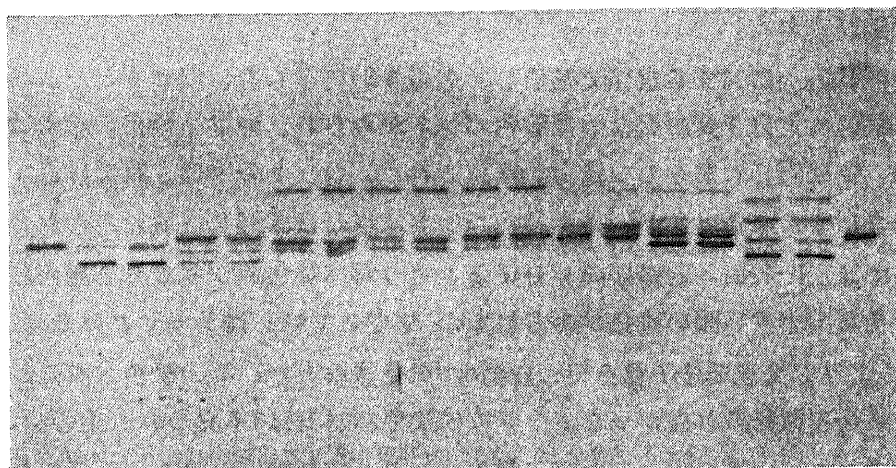


Fig. 3-18 Species differences in the activity of mixed function oxidases in liver microsomes.

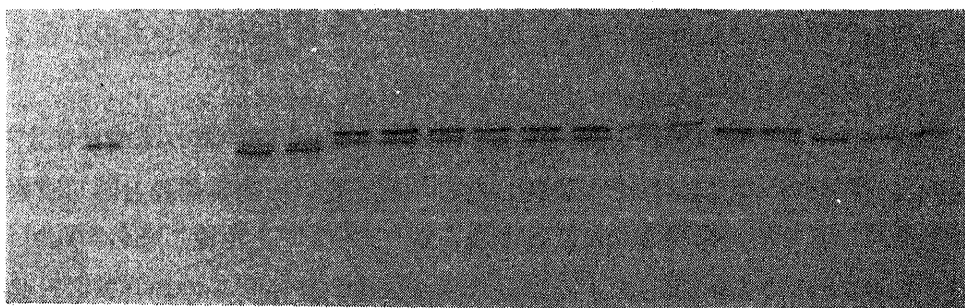
☒; Cytochrome P-450, ☒; Cytochrome b₅, ☒; NADH-ferricyanide reductase, ☒; NADPH-cytochrome c reductase, ☒; Aminopyrine N-demethylase, ☒; Benzphetamine N-demethylase, ☒; Ethylmorphine N-demethylase, ☒; Aniline hydroxylase, ☒; p-Nitroanisole O-demethylase, ☒; 7-Ethoxycoumarin O-deethylase

A



St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 St

B



St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 St

Fig. 3-19 Immunological staining of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis after transfer to nitrocellulose sheets.

Female(1,2) and male(3,4) rats, ddy(5,6), ICR (7,8) and BALB/C(9,10) mice, rabbit(11,12), hamster(13,14) and guinea pig(15,16) liver microsomes were electrophoresed. Sheets were stained by anti-P-450_{I-b} (part A) and anti-P-450_{I-c} IgG.

が確認された。

P-450_{1-c}に対する抗体で処理したものをB)に示した。ウサギとハムスターでは、P-450_{1-c}と分子量が異なった染色バンドがみられ、他は、染色の強弱はあるものの、ほぼ同じRf値をもつ蛋白が確認された。ラットの場合、雌では僅かに染色されたにすぎなかったが、その染色バンドは雄とほぼ同じ位置にみられた。雄ラットでは、P-450_{1-c}とほぼ同じ分子量をもつ薄い染色バンドよりも僅かに分子量の分子量の小さい強い染色がみられた。マウスでは、雄ラットとは逆に、P-450_{1-c}よりも大きな分子量を持つP-450が染色されたが、その染色された2本の蛋白に系統差は見られなかった。ウサギの染色バンドは2本見られ、その小さい分子量の蛋白はマウスの大きな分子量のバンドとほぼ同じRf値を示していた。ハムスターとモルモットは、他の動物と異なり、ハムスターでは強い1本の染色バンドと、わずかに小さい分子量の薄い染色バンドが見られ、この蛋白バンドがモルモットとほぼ同じ分子量を分子量を示していた。この2種の動物は、P-450_{1-b}の抗体を用いた場合にも特異的であり、互いに同じ分子量を示さないものの各々4本のバンドが確認された。

雌雄リスザルのMsを同様にSDS-PAGE、western-blot-PAP-Staining法によりP-450_{1-b}、P-450_{1-c}の抗体により染色したところ、互いの精製標品と同じRf値を持つ染色バンドのみが確認されたことから、各々のP-450を定量したのがTable 3-11である。Fig.3-18に示したようにリスザルはカニクイザルの約35%のP-450を含んでいるにすぎないにも拘らず、全体のP-450に対するP-450_{1-b}、P-450_{1-c}の割合は、雄で各々19%、41%とカニクイザルとほぼ同様の値を示し、かつ雌雄差は認められなかった。

P-450_{1-b}で反応性の高い7-EC O-脱メチル化活性が、P-450_{1-b}の抗体によりどのように変化するかを調べた (Table 3-12)。用いた動物の中でIgGを401 μ g添加時にカニクイザルで45%、ウサギで65%の阻害が見られたのを除き、他は弱い阻害しか示さず、P-450_{1-b}ならびにそれに免疫学的に類似したP-450種が、各動物のMs中で7-EC O-脱エチル化反応にあまり関与していないことが示唆された。

TS6 β 水酸化活性におけるP-450_{1-c}の抗体添加の効果をFig.3-20に示した。IgG無添加時の各動物の6 β 水酸化活性は、雄性ラットが2.76、雌性ラットが0.225nmole/mg/minであり、性差が認められた。またマウス (ICR)、ウサギ、ハ

Table 3-11 Quantitation of cytochrome P-450_{I-b} and P-450_{I-c} contents in common squirrel monkey liver microsomes.

	Cytochrome P-450 _{I-b}	Cytochrome P-450 _{I-c}
	(p mole P-450/mg)	
Male	69.6 ± 3.7 (19.5)	148.9 ± 12.5 (41.5)
Female	52.7 ± 13.0 (17.5)	159.3 ± 30.5 (53.4)

Each value represents Mean ± S.E. obtained from two animals.
 Numbers in parentheses represent percent of total cytochrome P-450 content.

Table 3-12 Comparison with the inhibitory effect of anti-P-450_{I-b} IgG on 7-ethoxycoumarin O-deethylation activity in liver microsomes.

Added IgG	Rat		Mice		
	Female	Male	ddy	ICR	BALB/C
0	1.65 (100)	3.06 (100)	3.47 (100)	3.25 (100)	4.53 (100)
57	1.52 (92.3)	2.84 (92.7)	2.99 (86.3)	2.82 (86.7)	3.53 (78.0)
172	1.55 (93.9)	2.70 (88.3)	2.86 (82.4)	2.66 (81.9)	3.25 (71.7)
287	1.49 (90.2)	2.72 (88.9)	2.77 (79.8)	2.52 (77.6)	3.10 (68.5)
401	1.40 (85.1)	2.54 (83.1)	2.65 (76.6)	2.45 (75.3)	2.88 (63.5)

Rabbit	Hamster	Guinea pig	Rat	Crab eating monkey	Common squirrel monkey
3.16 (100)	7.89 (100)	3.46 (100)	1.68 (100)	2.42 (100)	0.82 (100)
1.48 (46.8)	5.79 (73.4)	2.86 (82.8)	1.61 (96.9)	2.13 (86.8)	0.70 (85.1)
1.32 (41.8)	5.55 (70.3)	2.71 (78.3)	1.57 (93.8)	1.84 (75.0)	0.59 (71.7)
1.22 (38.5)	5.33 (67.6)	2.63 (76.1)	1.51 (90.1)	1.64 (64.7)	0.55 (67.1)
1.12 (35.6)	5.17 (65.6)	2.49 (72.0)	1.47 (87.8)	1.36 (55.6)	0.85 (103.2)

Numbers in parentheses represent percent of control

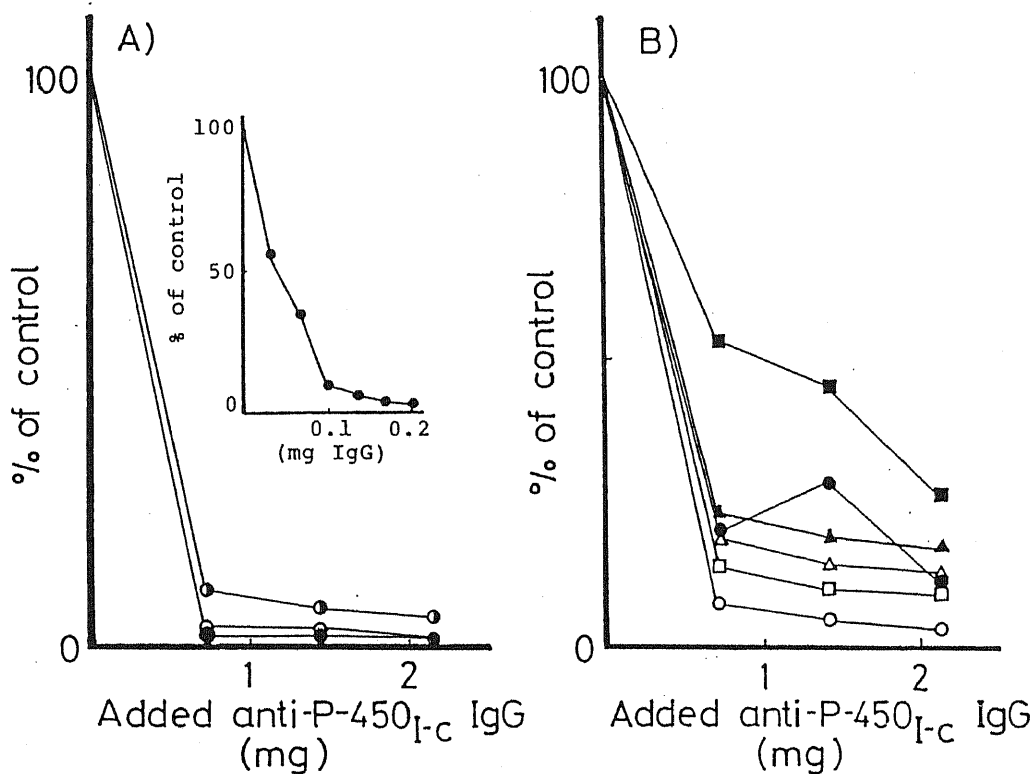


Fig. 3-20 Comparison with the inhibitory effect of anti-P-450_{I-c} IgG on liver microsomes testosterone 6β-hydroxylation activity in liver microsomes.

A) Rat (●), crab eating monkey (●), common squirrel monkey (○)

Inset; Inhibitory effect of lower amount of anti-P-450_{I-c} IgG on crab eating monkey liver microsomal testosterone 6β-hydroxylation activity.

B) Female rat (●), male rat (○), ICR mouse (Δ), rabbit (▲), guinea pig (■) and hamster (□)

ムスター、モルモット、カニクイザル、リスザルで各々、1.88、2.22、6.70、1.27、4.07、1.36nmole/mg/minと本活性も動物種により異なっていた。A)より、カニクイザル、リスザルの活性は0.7mgIgG添加により100%に近い阻害がみられることがわかった。またB)より、動物種によりIgG添加効果は若干異なっているものの、モルモットを除き75%以上の強い阻害見られ、P-450_{r-o}と免疫学的に類似したP-450が、多くの動物でTS6 β 水酸化反応を行っていることが示唆された。本活性はP-450_{r-b}の抗体によって全く阻害されなかった (Data not shown)。さらにTS16 α 水酸化活性は、カニクイザル、リスザル、ハムスター、モルモットでP-450_{r-o}の抗体によって阻害がみられたが、他では阻害がみられなかった (Data not shown)。

第6章 NADP-チトクロームc (P-450)還元酵素の種差

3-6-1 カニクイザル、モルモットおよびラット肝ミクロゾームのNADPH-チトクロームc (P-450)還元酵素の精製とその性質

【実験方法】

1. 動物

雌雄カニクイザル(体重2~3kg)、Hartley系雄性モルモット(体重350g)、SD系雄性ラット(10週令)を用いた。

2. NADPH-チトクロームc (P-450)還元酵素の精製

Msを1.5% E-913により可溶化後、Fig. 3-21に示したYasukochiとMaster¹²⁶⁾の変法により精製した。各ステップの溶出bufferをbuffer A~Cとして示した。

【実験結果】

カニクイザル、モルモットおよびラットのFp₂の精製の結果をTable 3-13、Table 3-14、Table 3-15に示した。精製標品の比活性はカニクイザル、モルモット、ラットで各々30.8、38.8、29.8unit/mgであった。その酸化型のスペクトルをFig. 3-22で比較したが、フラビンに特徴的な380nmならびに450nm付近の吸収に3種の標品の間には違いは見られなかった。精製標品のSDS-PAGEの結果をFig 3-23に示した。ここから求めた各標品の分子量は、カニクイザル、ラットでは78,000であり、モルモットでは80,000と3種間で同一ではなかった。また、カニクイザルのFp₂では、78,000の蛋白以外に58,000と20,000の2本の蛋白が確認された。Haniuら¹²⁷⁾はブタ肝MsのFp₂にはニックが入っているにもかかわらず、正常に近い構造を保っていると報告しており、それらはSDS処理することにより断裂し、80,000と60,000と20,000の3本の蛋白がSDS-PAGEの結果得られており、ここで見られたカニクイザルFp₂の現象も、サルと同様の変化が起こっているためと推察された。またモルモットのFp₂で見られた約70,000の蛋白は、プロテアーゼによって消化されたFp₂である。

Microsomes
 |
 Solubilization
 with Emulgen-913
 |
 DEAE-Sephadex A-50 column
 |
 buffer A
 |
 2,5-ADP - Sepharose 4B column
 |
 buffer B
 |
 Hydroxylapatite column
 |
 buffer C
 |
 NADPH-cytochrome P-450 reductase

buffer A: 100mM Tris-HCl buffer pH 7.7
 20% Glycerol 0.2% Emulgen-913
 300mM KCl
 2 μ M FMN
 buffer B: 10mM Kpi buffer pH 7.25
 20% Glycerol
 0.2% Emulgen-913
 0.7mM NADP⁺ (or 0.7mM 2-AMP)
 buffer C: 150mM Kpi buffer pH 7.25
 20% Glycerol

Fig. 3-21 Purification profile of
 NADPH-cytochrome c (P-450) reductase
 from liver microsomes.

Table 3-13 Purification of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase from crab eating monkey liver microsomes.

	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit /mg)	Ratio	Recovery (%)
Microsomes	4178.6	1394.0	0.33	1.0	
Solubilized supernatant	3520.7	1394.0	0.40	1.20	100
DEAE- Sephadex A-50	670.2	743.6	1.11	3.36	53.3
Z,5'-ADP - Sephrose 4B	24.3	634.6	26.1	79.1	45.5
Hydroxylapatite	8.1	249.5	30.8 (25.8-30.8)	93.3	17.9

Table 3-14 Purification of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase from rat liver microsomes.

	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit /mg)	Ratio	Recovery (%)
Microsomes	1400.0	303.5	0.22	1.0	
Solubilized supernatant	1125.5	266.9	0.23	1.05	87.9
DEAE- Sephadex A-50	66.2	95.0	1.44	6.55	31.3
Z,5'-ADP - Sephrose 4B	1.6	61.2	38.8	176.4	20.2

Table 3-15 Purification of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase from guinea pig liver microsomes.

	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit /mg)	Ratio	Recovery (%)
Microsomes	1486.0	929.8	0.63	1.0	
Solubilized supernatant	1241.5	916.7	0.74	1.18	98.6
DEAE- Sephadex A-50	118.2	694.8	5.88	9.39	74.7
2,5'-ADP - Sephadex 4B	7.2	252.5	35.1	56.0	27.2
Hydroxylapatite	6.8	202.8	29.8	47.6	21.8

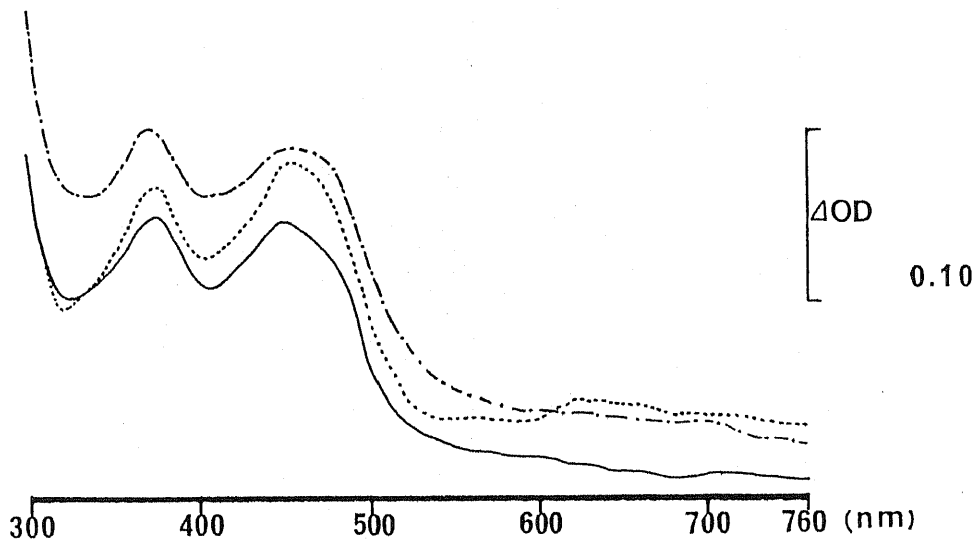


Fig. 3-22 Absorption spectra of oxidized forms of purified monkey (—), rat (.....) and guinea pig (-·-) NADPH-cytochrome c (P-450) reductase.

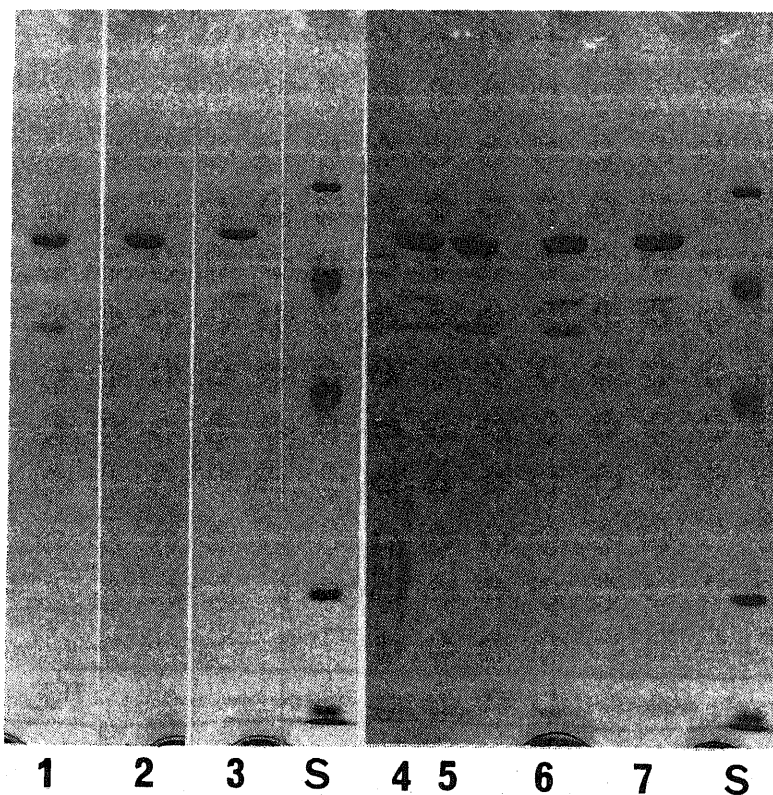


Fig. 3-23 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified NADPH-cytochrome c (P-450) reductase preparations.

1; Monkey reductase, 2; Rat reductase
 3; Guinea pig reductase
 4; 1+2+3, 5; 1+2, 6; 1+3, 7; 2+3
 S; Standard

3-6-2 NADPH-チトクローム c (P-450) 還元酵素の種差

【実験方法】

1. 動物

カニクイザル、ラット、モルモット、マウス (ICR)、ハムスターは、3-5と同様な物を用いた。イヌは雄性ビーグル犬 (体重約10kg) を、雄性ブタは屠殺直後に剥離したものをを用いた。

2. プロテアーゼによる限定分解

α -キモトリプシン、Staphylococcus aureus V_8 プロテアーゼ (V_8 プロテアーゼ) による限定する分解は、Williamsらの方法¹²⁸⁾に準じた。反応停止後のSDS-PAGEは15%アクリルアミドゲルにて行った。

3. アミノ酸分析法

グリセリンを除去した精製標品 (約200 μ g) を6N HCl下で、24、48、および72時間加水分解後、アミノ酸分析計 (日立835-10型) で各アミノ酸を分離・定量した。

4. Ouchterlony免疫二重拡散法

NoshiroとOmuraの方法⁶⁵⁾に従い、室温にて行った後、amido blackにて染色した。

5. 抗体による阻害実験

Fp₂の抗体はNoshiroとOmuraの方法⁶⁵⁾により作製し、IgG分画を調製した。Msを酵素源として用いる場合には、Ms (0.4unit/ml) を25°Cにて10分間IgGと反応させた後活性を測定した。精製標品を用いる場合には、標品 (0.4unit/ml) とIgGを混合し、4°C下で一晩放置後、15,000rpmで10分間遠心を行い、その上清の活性を測定した。

【実験結果】

Fp₂の種差を先づ精製標品にて比較した。 α -キモトリプシンまたは V_8 プロテア

ーゼにより限定分解後SDS-PAGEを行った結果がFig.3-24、Fig.3-25である。プロテアーゼによる処理は40分まで経時的に行った。モルモットのFp₂は、 α -キモトリプシンにより分解されにくく、また他の2種のペプチドパターンも同一ではなかった。V₈プロテアーゼを用いた場合には、3種の標品間での差異が顕著に認められ、これらの間での一次構造の違いが明確となった。カニクイザルのFp₂のアミノ酸組成をもとめ、今まで報告されているウサギ、ラット、ブタのそれと比較した (Table 3-16)。ラットのFp₂と比べると、Asx、Pro、Ileでの組成の違いが示され、Metzgerらの方法¹²⁹⁾によりdifference indexを求めたとき、その値は4.12であり、ここで示した中でブタとラットの間で得られた4.23に次いで大きな値であった。さらにラットおよびカニクイザルのFp₂に対する抗体を作製し、免疫学的比較を行った。3種の精製標品と2種の抗体との間の免疫交叉性を Ouchterlony免疫二重拡散法により調べた結果、両IgGに対する明確な沈降線は、各々対応する抗原とのみ認められた (Fig.3-26)。Fp₂の活性の両IgG添加による阻害程度を比較したのがFig.3-27である。カニクイザルFp₂の抗体による阻害は、50 μ gIgG添加により抗原の活性は100%阻害されたのに対し、モルモットのFp₂の活性はこの時阻害されず250 μ gIgG添加時に約60%阻害が見られた。ラットFp₂の活性は全く阻害されなかった。ラットFp₂の抗体による阻害もまた対応する抗原に特異的であり、1mgIgG添加時においても、カニクイザルおよびラットFp₂の活性は約25%程度阻害されたにすぎなかった。種々の動物の肝Msを用いて同様に比較した (Fig.3-28)。カニクイザル、ラット、モルモットでは、精製標品を用いた場合とほぼ同様の結果が得られた。興味深いことには、マウス、ハムスターではラットFp₂の抗体により強く阻害され、ラットとほぼ同等の阻害が見られた。カニクイザル、ブタ、イヌ、ではその阻害は弱いものであった。それとは逆に、カニクイザルFp₂の抗体を用いた場合には、ブタ、イヌでカニクイザルと同様、強い阻害が認められ、ラット、マウス、ハムスターの活性阻害は弱かった。

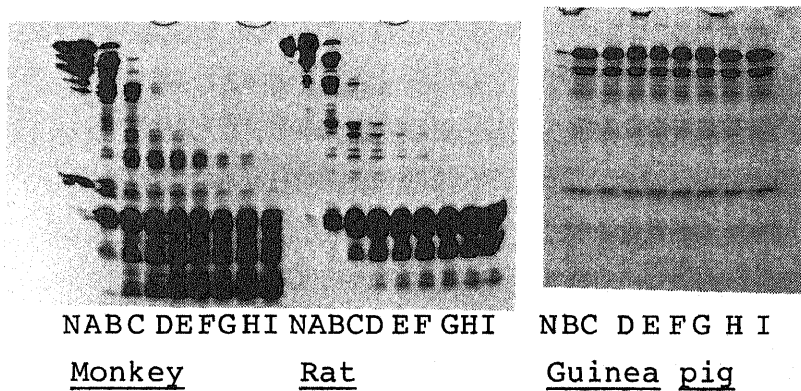
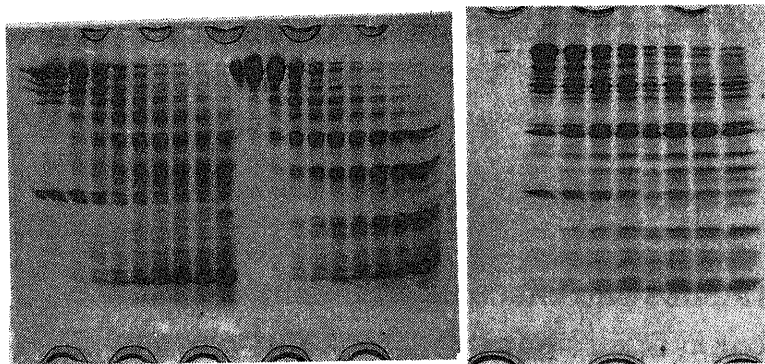


Fig. 3-24 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of monkey, rat and guinea pig NADPH-cytochrome P-450 reductases following proteolysis by chymotrypsin.

Digestion was performed for 0 (A), 1 (B), 5 (C), 10 (D), 15 (E), 20 (F), 25 (G), 30 (H) and 40 (I) min. N; Non treated



NABCD EFGHJNABCDEF GH J N C DEF GH I J
Monkey Rat Guinea pig

Fig. 3-25 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of monkey, rat and guinea pig NADPH-cytochrome P-450 reductases following proteolysis by *Staphylococcus aureus* V₈ protease. Digestion time was described in Fig. 3-24.

Table 3-16 Amino acid compositions of NADPH-cytochrome P-450 reductase

	Residue/Reductase			
	Monkey (78K)	Rat ^{a)} (76K)	Pig ^{b)} (80K)	Rabbit ^{c)} (77K)
Asx	49	61	76	64
Thr	36	33	45	33
Ser	46	39	47	41
Glx	83	79	94	82
Pro	22	30	34	29
Gly	47	48	50	44
Ala	53	52	54	56
Val	40	42	42	44
Met	14	15	16 ^{d)}	14 ^{d)}
Ile	20	22	22	21
Leu	58	66	70	57
Tyr	28	38	30	28
Phe	26	31	28	25
Lys	36	34	35	30
His	15	22	20	15
Arg ^{e)}	36	35	39	34
Trp ^{f)}		8	(10)	6
Cys	4	4	8	10
Total	643	659	720	633

a) J.L. Vermilion and M.J. Coon (1978)
J. biol Chem., 253, 2694

b) M. Haniu et al (1984) J. biol. Chem.,
259, 13703

c) J.S. French and M.J. Coon (1979)
Arch. Biochem. Biophys., 195, 565

d) Determined as methionine sulfone

e) Not accurate due to destruction of
Trp on HCl hydrolysis

f) Determined as cysteic acid

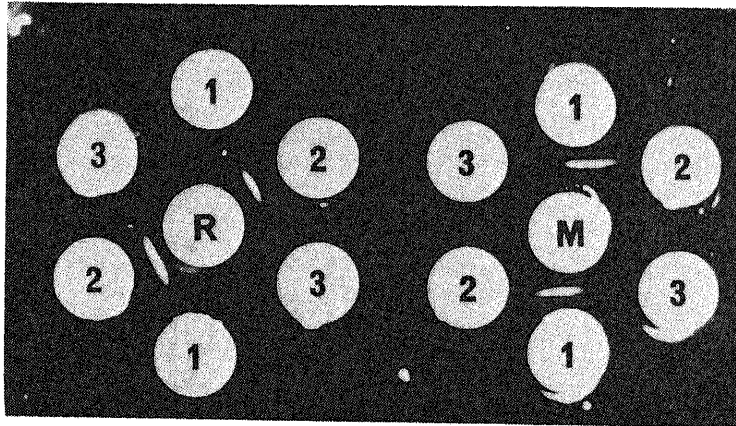


Fig. 3-26 Double-diffusion analysis of monkey, rat and guinea pig NADPH-cytochrome P-450 reductase on Ouchterlony plate.

M; Anti-monkey reductase IgG
 R; Anti rat reductase IgG
 1; Monkey reductase
 2; Rat reductase
 3; Guinea pig reductase

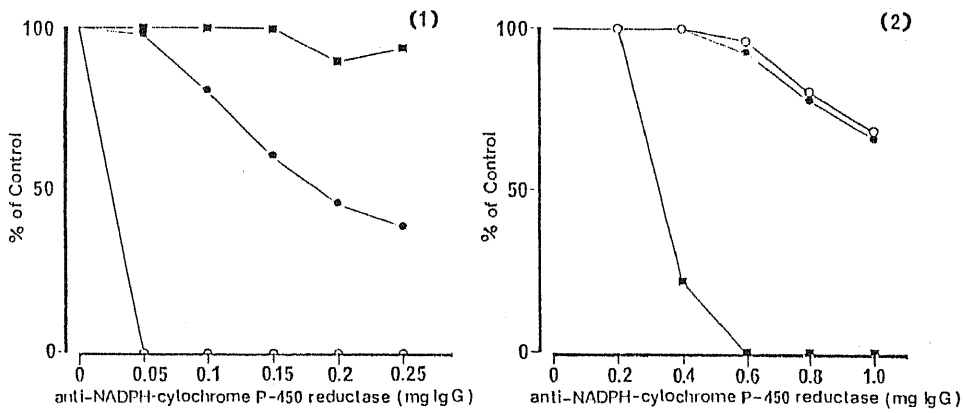


Fig. 3-27 Inhibition of NADPH-cytochrome c reductase activity of purified monkey (○), rat (■) and guinea pig (●) NADPH-cytochrome c (P-450) reductase by the antibody raised against the monkey reductase (1) or the rat reductase (2).

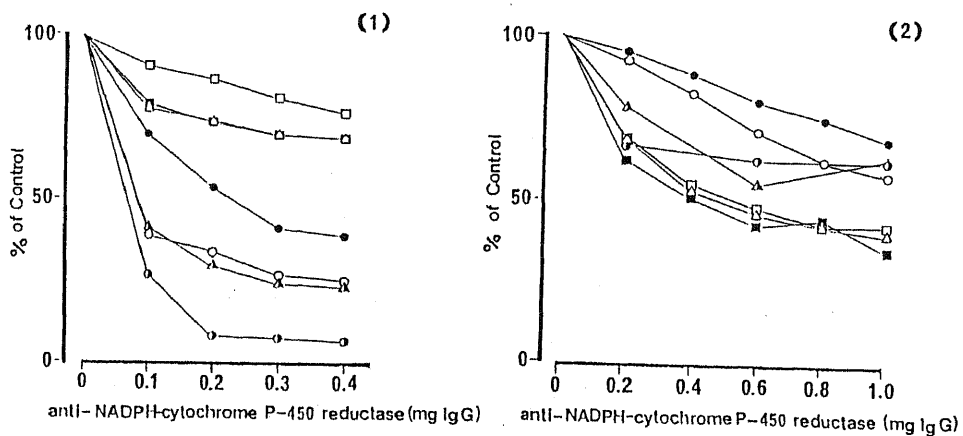


Fig. 3-28 Inhibition of NADPH-cytochrome c reductase activity by anti-monkey (1) or rat (2) NADPH-cytochrome c (P-450) reductase IgG in monkey (O), rat (■), guinea pig (●), hamster (Δ), mouse (□), dog (⊙) and pig (▲) liver microsomes.

第7章 考察

肝MsのP-450ならびにFp₂の精製については、ラット、ウザギを初めいくつかの動物種あるいはヒトに関して、薬物誘導性、非誘導性の報告があるのに対し、サルに関しては、MC前処理カニクイザルを用いて、1種類のP-450の精製が報告されているのみである¹³⁰⁾。本編において、薬物未処理カニクイザル肝Msから、4種類のP-450を精製し、かつFp₂を精製しその性質を明らかにした。精製したカニクイザルの4種のP-450とラットのPBまたはMC誘導性の3種のP-450の性質についてTable 3-17に要約した。P-450_{r-b}の酸化型絶対スペクトルのSoret体の吸収は、390nmにその吸収の肩がみられ、吸収極大波長は415nmと通常の低スピン型のものに比べ2nm短波長にシフトしていた。この390nm付近の吸収はE-913を添加することにより増加し、それに伴い415nmの吸収は低下することが示された。PB P-450、P-450_{r-c}ではE-913添加によるスペクトルの変化は認められなかった。Denkら¹³¹⁾はラット肝Msを用いた実験から、非イオン性界面活性剤がI型の基質差スペクトルを示すと報告していることから、P-450_{r-b}はE-913と基質結合部位またはヘムと相互作用し易いP-450種であることが推察された。またカニクイザルの4種のP-450は、その抗体を用いた結果から、P-450_{r-b}、P-450_{r-c}の抗体を用いることにより、互いに免疫学的に異なっていることが判った。さらにこれらは、ラットの薬物誘導性のP-450種 (PBP-450、MC P-448₁、MC P-448₂) とは異なっていた。

P-450_{r-b}、P-450_{r-c}の各々を定量することにより、P-450_{r-c}がカニクイザル肝Msの主なP-450であり全体の約4割を占めていること、リスザルにおいても、その割合は同様であることが明らかとなった。AZT投与によるP-450の減少は、特異的なP-450_{r-c}の減少によるMs中のP-450の質的変動によるものであることが判った。またP-450_{r-c}はMs中でTS6β水酸化反応に強く関与しており生体内基質の代謝に重要な役割を演じている可能性が推察された。ここで精製したP-450種を今まで報告されているさまざまなP-450との比較を試みたとき、P-450_{r-c}とRyanらの報告によるP-450g¹⁸⁾、またはP-450_{PCN/E}¹³²⁾と類似の性質を有していた。

何種類かの実験動物肝Msを用いて、P-450_{r-b}、またはP-450_{r-c}の抗体との免疫交叉性を調べた結果、用いた全ての動物でP-450_{r-b}ならびにP-450_{r-c}と免疫学的に極めて類似したP-450が存在することが明らかとなったが、それは動物種間で

Table 3-17 Properties of seven forms of cytochrome P-450 purified from monkey or rat liver microsomes.

Cytochrome P-450							
	P-450 _{I-a}	P-450 _{I-b}	P-450 _{I-c}	P-450 _{I-d}	PB P-450	MC P-448 ₁	MC P-448 ₂
Enzyme source	monkey	monkey	monkey	monkey	rat	rat	rat
Inducer					PB	MC	MC
Spectrum peak (nm)							
Absolute oxidized Soret band	417	415	417	417	417	391	417
CO-reduced difference Soret band	450	447.5	449	450.5	450	448	448
Molecular weight	50,000	48,000	50,000	53,000	52,000	52,500	56,000
Specific substrate	Bphet, AM, AN	7-EC	TS		Bphet	AN	7-EC

Abbreviations: PB; phenobarbital, MC; 3-methylcholanthrene, Bphet; benzphetamine, 7-EC; 7-ethoxycoumarin, AN; aniline, AM; aminopyrine, TS; testosterone

同一のP-450が存在するというのではないことが、各動物種で分子量は同一ではなく複数の蛋白が確認されたことから推察される。またラットにおいては、性差も確認され、両抗体と免疫学的に類似したP-450もまたラットの薬物代謝能で見られる性差に関与している可能性が推察された。

さらに、P-450₁₋₀の抗体により、カニクイザルばかりでなく種々の動物のMsにおけるTS6β水酸化活性が特異的に阻害され、Fig. 3-18で確認された種々の動物のP-450がMs中で本反応に強く関与していることは、TSが生体内物質であることを考えた時、極めて興味深い。

Guengerichら¹³³⁾はラット、ウサギ及び、ヒトのFp₂は免疫学的に異なること、Williamsら¹²⁸⁾は、虹ますのFp₂はラットと異なること等、P-450ばかりでなくFp₂にも種差が存在している。ここで精製したカニクイザルFp₂は、ラット、およびモルモットのFp₂とは免疫学的にも異なることを明らかにした。またカニクイザルFp₂と免疫学的に類似した動物種として、ブタ、イヌが示されたが、ブタのFp₂に関しては、Naniuら¹²⁷⁾ SDS-PAGEにより分裂する2本の蛋白の存在等も含めて類似性が高いものと思われた。

総括

狭義の薬物代謝酵素であるP-450アイソザイムの機能的差異に関し、第1編では脂質過酸化とP-450、第2編ではFp₂とP-450の相互作用について、第3編では霊長類に属するカニクイザルのP-450ならびにFp₂を中心とした種差に関して検討した結果を以下に要約した。

1. 生体内アミンの1つであるSpmをラットに投与することにより、肝の脂質過酸化物が低下し、Spmが肝脂質過酸化低下作用を有することが明らかとなった。この作用は正常およびCCl₄投与ラット共に認められ、P-450によるCCl₄の代謝的活性化作用をSpmが抑制するのではなく、むしろ反応の基質となるリン脂質への作用が脂質過酸化抑制に重要な役割を演じていると考えられる。
2. In vitroのMs脂質過酸化反応は、合成CPのリン脂質への作用と鉄とのキレート作用により阻害されることが判った。
3. 肝Msの脂質過酸化反応には、P-450が重要な因子の1つであることを、Msでの抗体を用いた実験あるいは再構成系で明確にした。またその作用機作はP-450アイソザイム間で同一ではなく、MC P-448₁に見られる酸素の活性化に強く作用するP-450種と、MC P-448₂で示される、生成した過酸化物による連鎖的な反応に作用するP-450種があることが判明した。
4. アセトンによるAN水酸化活性の上昇にはP-450種により差異があることが明らかとなり、その活性化は、アセトンがP-450のFp₂からの電子伝達能力を高め、P-450の還元速度を上昇させることによるものと考えられた。
5. ラットのEM N-脱メチル化活性に見られる性差の一部は、雌雄間で本反応に関与するP-450のFp₂に対する親和性が異なり、雌においてはFp₂が律速酵素とな

っているためと考えられた。

6. Fp₂-Sepharose 4Bカラムを用い、雌雄ラット肝Ms中には、Fp₂に対する親和性の高いP-450種と低いP-450種が存在すること、ならびにそれらの一部はEM N-脱メチル化活性に見られる性差に関与していることを明らかにした。

7. 薬物未処理カニクイザル肝Msから、性質の異なる4種のP-450の精製に成功し(P-450_{I-a}、P-450_{I-b}、P-450_{I-c}、P-450_{I-d})、サルでのP-450の分子多様性を明確なものとした。P-450_{I-c}はカニクイザルおよびリスザルの肝Ms中の主たるP-450種であることが明らかとなり、カニクイザルにAZTを投与することによるP-450の減少はP-450_{I-c}の減少によることが判った。

8. P-450_{I-b}ならびにP-450_{I-c}と免疫学的に類似したP-450が、雄性ラット、マウス、モルモット、ハムスター、ウサギおよび雌性ラットにも存在すること、しかしそれらは同一のものではないことが示された。P-450_{I-c}と免疫学的に類似したP-450が、各動物種で特異的に6β水酸化反応に寄与していることが判った。

9. カニクイザル肝MsのFp₂の精製に成功し、その抗体を用いた免疫学的比較検討の結果、カニクイザルのFp₂は、ブタ、イヌのFp₂と類似しており、一方ラットのFp₂はマウスとハムスターのFp₂と類似していることが判った。

謝辞

終わりに臨み、本論文提出の機会を与えていただき、また終始御指導と御鞭撻をいただき、さらに本論文の御校閲を賜りました、恩師千葉大学薬学部北川晴雄教授に心から深く感謝致します。

また、本研究遂行に対し、終始適切なるご指導、御助言を賜りました千葉大学医学部金人保好男教授、千葉大学薬学部広瀬聖雄教授、元千葉大学薬学部佐藤哲男助教授（現東京薬科大学教授）、千葉大学活性物質研究所五十嵐一衛教授、広島大学医学部木村栄一教授、元広島大学医学部八並高志助教授（現湧永製薬株式会社）、元千葉大学薬学部鎌滝哲也助手（現北海道大学教授）、および、千葉大学薬学部北田光一助手に深謝致します。

さらに、本研究を通じて御協力いただきました千葉大学薬学部上野光一講師、五十嵐隆助手に深く感謝致します。

加えて、本研究に心から協力して下さった甲 重雄、水流添暢智各元千葉大学薬学部研究生、美細津 正修士、安藤めばえ、本橋恵子、浜田明子、中村俊弘、吉田央恵各学士、および、研究室の方々に心から感謝致します。

さらに加えて、貴重なサルの試料を快く提供下さった故・藤原 徹氏（元国立予防衛生研究所）、堀江 透氏（エーザイ株式会社）に感謝致します。

掲載雑誌目録

1. 第1編、第1章の内容は、Toxicol. Appl. Pharmacol. に下記の表題で投稿中である。

Polyamine lowered hepatic lipid peroxide level in rats

2. 第1編、第2章の内容は、Biochem. Pharmacol., 31,1658-1661(1982)に下記の表題で掲載されたものである。

Inhibitory action of macrocyclic polyamines on lipid peroxidation in rat liver microsomes.

3. 第2編、第1章の内容は、Biochem. Pharmacol., 32,3151-3155(1983)に下記の表題で掲載されたものである。

Effect of acetone on aniline hydroxylation by a reconstituted system.

4. 第2編、第2章の内容は、Biochem. Biophys. Res. Commun., 97, 1527-1534 (1980)に下記の表題で掲載されたものである。

Sex difference in N-demethylation activity of ethylmorphine in rat liver microsomes.

5. 第2編、第3章の内容は、Biochem. Pharmacol., 34,1846-1849(1985)に下記の表題で掲載されたものである。

Separation partial purification and characterization of cytochrome P-450 having a different affinities for NADPH-cytochrome P-450 reductase from rat liver microsomes.

6. 第3編、第1章、第2章、第3章および第4章の内容の一部は、Biochem. Biophys Res. Commun., 125, 1089-1095(1984)に下記の表題で掲載されたものである。
Purification and properties of cytochrome P-450 from untreated monkey liver microsomes.

7. 第3編、第6章の内容は、Biochem. Biophys. Res. Commun., に下記の表題で投稿中である。

Purification and comparative properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase from monkey and other experimental animals.

引用文献

- 1) Brodie, B. B., Gillette, J. R. and La Du, B. N. (1958) *Ann. Rev. Biochem.*, 27 427
- 2) Klingenberg, M. A. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.*, 75 376
- 3) Garfinkel, D. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.*, 77 493
- 4) Omura, T. and Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239 2370
- 5) Cooper, D. Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosental, O. and Estabrook, R. W. (1965) *Science* 147 400
- 6) Imai, Y. and Sato, R. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22 620
- 7) Remmer, H., Schenkman, J. B., Estabrook, R. W., Sasame, H., Gillette, J. R., Narasimhulu, S., Cooper, D. Y. and Rosental, O. (1966) *Mol. Pharmacol.*, 3 113
- 8) Ernster, L. and Orrenius, S. (1965) *Fed. Proc.*, 24 1190
- 9) Lu, A. Y. H. and Coon, M. J. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243 1131
- 10) Hildebrandt, A. and Estabrook, R. W. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.*, 143 66
- 11) Ichikawa, Y. and Yamano, Y. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, 131 490
- 12) Imai, Y. and Sato, R. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60 8
- 13) 青山俊文、今井嘉郎、佐藤 了 (1982) *生化学* 54 834
- 14) Coon, M. J., van der Hoeven, T. A., Dahl, S. B. and Haugen, D. A. (1978) *Methods Enzymol.*, 52 109
- 15) Koop, D. R., Persson, A. V. and Coon, M. J. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256 10704
- 16) Koop, D. R., Morgan, E. T., Tarr, G. E. and Coon, M. J. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257 8472
- 17) Ryan, D. E., Thomas, P. E., Reik, L. M. and Levin, W. (1982) *Xenobiotica*, 12 727

- 18) Ryan, D. E., Iida, S., Wood, A. W., Thomas, P. E.,
Lieder, C. S. and Levin, W. (1984) J. Biol. Chem., 259
1239
- 19) Ryan, D. E., Ramanathan, L., Iida, S., Thomas, P. E.,
Haniu, M., Shively, J. E., lieber, C. S. and Levin, W.
(1985) J. Biol. Chem., 260 6385
- 20) Huang, M. T., West, S. B. and LU, A. Y. H. (1976) J.
Biol. Chem., 251 4659
- 21) Negishi, M. and Nebert, D. W. (1977) J. Biol. Chem.,
252 3970
- 22) Kitada, M. Yamazaki, C., Hirota, K. and Kitagawa, H.
(1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., 93 1020
- 23) Kmamtaki, T., Sugiura, M., Yamazoe, Y. and Kato, R.
(1979) Biochem. Pharmacol., 28 1993
- 24) Wang, P., Mason, P. S. and Guengerich, F. P. (1980)
Arch. Biochem. Biophys., 199 206
- 25) Kitada, M., Kamataki, T, Itahashi, K., Rikihisu, T.,
Kato, R. and Kanakubo, Y. (1985) Arch. Biochem.
Biophys., 241 275
- 26) Kato, R. (1974) Drug Metab. Rev., 3 1
- 27) Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Nagai, T. and
Kato, R. (1983) Arch. Biochem. Biophys., 225 758
- 28) MacGeoch, C., Morgan, E. T., Halpert, J. and
Gustafsson, J.-A. (1984) J. Biol. Chem., 259 15433
- 29) Thomas, P. E., Lu, A. Y. H., Ryan, D., West, S. B.,
Kawaler, J. and Levin, W. (1976) Mol. Pharmacol., 12
746
- 30) West, S. B. and Lu, A. Y. H. (1972) Arch. Biochem.
Biophys., 153 298
- 31) Miwa, G. T., West, S. B. and Lu, A. Y. H. (1978) J.
Biol. Chem., 253 1921
- 32) Kitada, M., Igarashi, T., Kamataki, T. and Kitagawa, H.
(1977) Jpn. J. Pharmacol., 27 481
- 33) Bhuyan, K. C. and Bhuyan, P. K. (1984) Current Eye
Res., 3 67

- 34) Gravind, J., Hartman, S., Clemmensen, J., Jensen, K. E. and Dam, H. (1952) Acta Pathol. Microbiol., 30 1
- 35) Recknagel, R. O. (1967) Pharmacol. Rev., 19 145
- 36) Myers, C. E., McGuire, W. P., Liss, R. H., Ifrim, I., Grotzinger, K. and Young, R. C. (1977) Science, 197 165
- 37) Handa, K. and Sato, S. (1975) Gann, 66 43
- 38) Bus, J. S., Aust, S. D. and Gibson, J. E. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., 58 749
- 39) Little, C. and O'Brien, P. J. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 145
- 40) Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984) Ann. Rev. Biochem., 53 749
- 41) Jänne, J., Raina, A. and Siimes, M. (1964) Acta Physiol. Scand., 62 352
- 42) Chapmann (1976) Drug Metab. Disp., 4 417
- 43) Kitada, M., Igarashi, K., Hirose, S. and Kitagawa, H. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., 87 388
- 44) Kitada, M., Naito, Y., Igarashi, K., Hirose, S., Kankubo, Y. and Kitagawa, H. (1981) Biochem. Pharmacol., 33 487
- 45) Hochstein, P. and Ernster, L. (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun., 12 388
- 46) Levin, W., Lu, A. Y. H., Jacobson, M., Kuntzman, R., Poyer, J. L. and McCay, P. B. (1973) Arch. Biochem. Biophys., 158 842
- 47) Pederson, T. C. and Aust, S. D. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., 48 789
- 48) Pederson, T. C., Burge, J. A. and Aust, S. D. (1973) J. Biol. Chem., 248 7134
- 49) O'Brien, P. J. and Rahimtula, A. (1975) J. Agric. Food Chem., 23 154
- 50) Ekström, G. and Ingerman-Sundberg, M. (1984) Biochem. Pharmacol., 33 2521

- 51) Baird, M. B. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95 1510
- 52) 八木国夫 (1979) *臨床検査* 23 115
- 53) Hissin, P. J. and Hilf, R. (1976) *Anal. Biochem.*, 74 214
- 54) Fujimoto, K., Igarashi, K., Screspha, R. D. and Okui, K. (1985) *Int. J. Cancer*, 35 821
- 55) Phillips, A. H. and Langdon, R. G. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237 2652
- 56) Lawrence, R. A. and Burk, R. F. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71 952
- 57) Massey, V. and Williams, Jr. C. H. (1965) *J. Biol. Chem.*, 240 4470
- 58) Lowry, O. H., Rosebraugh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193 265
- 59) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. (1957) *J. Biol. Chem.*, 226 497
- 60) Bertlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.*, 234 446
- 61) Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) *Methods Enzymol.*, 52 302
- 62) Svingen, B. A. Buege, J. A., Frederick, O., O'Neal, F. O. and Aust, S. D. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254 5892
- 63) Wills, E. D. (1969) *Biochem. J.*, 113 315
- 64) Kitada, M, Sakamoto, K., Rikihisa, T. and Kanakubo, Y. (1984) *Biochem. Pharmacol.*, 33 3971
- 65) Noshiro, M. and Omura, T. (1978) *J. Biochem.*, 83 61
- 66) Hrycay, E. G. and O'Brien, P. J. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 153 480
- 67) Spatz, L. and Strittmatter, P. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68 1042
- 68) Noguchi, M., Yoshida, T. and Kikuchi, G. (1983) *J. Biochem.*, 93 1027

- 69) Hrycay, E. G., Jonen, H. G., Lu, A. Y. H. and Levin, W. (1975) Arch. Biochem. Biophys., 166 145
- 70) Tadolini, B., Cabrini, L., Landi, L., Varani, E. and Pasquali, P. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., 122 550
- 71) Pös", H. and Pegg, A. E. (1982) Arch. Biochem. Biophys., 217 730
- 72) Igarashi, T., Satoh, T., Hoshi, K., Ueno, K. and Kitagawa, H. (1982) Life Sci., 31 2655
- 73) Head, B., Moody, D. E., Woo, C. H. and Smuckler, E. A. (1981) Toxicol. Appl. Pharmacol., 286
- 74) Vanella, A., Pinturo, R., Geremia, E., Tiriolo, P., D'Urso, G., Rizza, V., Di Silvestro, I., Grimaldi, R. and Brai, M. (1980) IRCS Medical Sci., 8 940
- 75) Igarashi, K., Kashiwagi, K., Kakegawa, T., Hirose, S., Yatsunami, T. and Kimura, E. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 633 457
- 76) Shiraki, H. and Guengerich, F. P. (1984) Arch. Biochem. Biophys., 235 85
- 77) Kamataki, T., Lee, M. C., Belcher, D. H. and Neal, R. A. (1976) Drug Metab. Disp., 4 180
- 78) Miwa, G. T., West, S. B., Huang, M. T. and Lu, A. Y. H. (1979) J. Biol. Chem., 254 5695
- 79) Miwa, G. T. and Lu, A. Y. H. (1984) Arch. Biochem. Biophys., 234 161
- 80) Gigon, P. L., Gram, T. E. and Gillette, J. R. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 558
- 81) Imai, Y. and Sato, R. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 25 80
- 82) Anders, M. W. (1968) Arch. Biochem. Biophys., 126 269
- 83) Anders, M. W. (1972) Arch. Biochem. Biophys., 153 502
- 84) Anders, M. W. (1969) Biochem. Pharmacol., 18 2561
- 85) Leibman, K. C. (1969) Mol. Pharmacol., 5 1

- 86) Kamataki, T., Kitada, M., Chiba, K., Kitagawa, H., Imai, Y. and Sato, R. (1980) *Biochem. Pharmacol.*, 29 1141
- 87) Imai, Y. and Sato, R. (1968) *J. Biochem.*, 63 380
- 88) Masry, S. D., Cohen, G. M. and Mannering, G. J. (1974) *Drug Metab. Rev.*, 2 267
- 89) Kato, R., Takanaka, A. and Takayanagi, M. (1968) *Jpn. J. Pharmacol.*, 18 482
- 90) Gigon, P. L., Gram, T. E. and Gillette, J. R. (1969) *Mol. Pharmacol.*, 5 109
- 91) Kitada, M., Kitagawa, H. and Kamataki, T. (1979) *Biochem. Pharmacol.*, 28 2670
- 92) Hashimoto, C. and Imai, Y. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68 821
- 93) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R. (1966) *J. Biochem.*, 60 417
- 94) Hildebrandt, A. G., Roots, I., Tjoe, M. and Heinemeyer, G. (1978) *Methods. Enzymol.*, 52 344
- 95) Diehl, H., Schadeln, J. and Ullich, V. (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 351 1359
- 96) Powis, G. and Boobis, A. R. (1975) *Biochem. Pharmacol.*, 24 424
- 97) Wada, F., Shimakata, H., Takasugi, M., Kotake, T. and Sakamoto, T. (1968) *J. Biochem.*, 64 109
- 98) Lu, A. Y. H., Jacobson, W., Levin, W., West, S. B. and R. Kuntzman, R. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 153 294
- 99) Anders, M. W. and Ganter, J. E. (1979) *Life Sci.*, 25 1085
- 100) Werringloer, J. and Kawano, S. (1980) "Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450" (Eds. Gustafsson, J. -A et al) p. 359, Elsevier, Amsterdam
- 101) Miwa, G. T. and Cho, A. K (1976) *Life Sci.*, 18 983
- 102) Nash, T. (1953) *Biochem. J.*, 55 416

- 103) Cuatrecasas, P. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245 3059
- 104) Aitio, A. (1978) *Anal. Biochem.*, 85 488
- 105) Johnson, E. F., Schwab, G. E. and Muller-Eberhard, U. (1979) *Mol. Pharmacol.*, 15 708
- 106) French, J. S., Guengerich, F. P. and Coon, M. J. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255 4112
- 107) Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227 680
- 108) Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Matsuda, N., Ishii, K. and Kato, R. (1983) *Mol. Pharmacol.*, 24 146
- 109) Huang, M. T., Chang, R. L., Fortner, J. G. and Conney, A. H. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256 6829
- 110) Huang, M. T., Johnson, E. F., Muller-Eberhard, U., Koop, R., Coon, M. J. and Conney, A. H. (1981) 256 10897
- 111) Quinn, P. G., Axelrod, J. and Brodie, B. B. (1958) *Biochem. Pharmacol.*, 1 152
- 112) Kaighen, M. and Williams, R. T. (1961) *J. Med. Pharmaceut. Chem.*, 3 25
- 113) Williams, R. T. (1974) *Biochem. Soc. Trans.*, 2 759
- 114) Kato, R., Onoda, K. and Takayanagi, M. (1969) *Jpn. J. Pharmacol.*, 19 438
- 115) Alvales, A. P., Shilling, G. and Levin, W. (1970) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 175 4
- 116) Mahgoub, A., Idle, J. R., Lancaster, R. and Smith, R. L. (1977) *Lancet*, 2 584
- 117) Eichelbaum, M. (1979) *Clin. Pharmacokinet.*, 16 187
- 118) Schmid, B., Bircher, J., Preisig, R. and K pfer, A. (1985) *Clin. Pharmacol. Ther.*, 38 618
- 119) Imai, Y. (1979) *J. Biochem.*, 86 1697
- 120) Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Nagai, T. and Kato, R. (1982) *Life Sci.*, 31 2603
- 121) Guengerich, F. P., Wang, P. and Davidson, N. K. (1982) *Biochemistry*, 21 1698

- 122) Kamataki, T., Kitada, M., Shigematsu, H. and Kitagawa, H. (1979) *Jpn. J. Pharmacol.*, 29 191
- 123) Mihara, K. and Sato, R. (1966) *J. Biochem.*, 60 417
- 124) Litterst, C. L., Mimnaugh, E. G., Reagan, R. L. and Gram, T. E. (1975) *Drug Metab. Disp.*, 3 259
- 125) Litterst, C. L., Gram, T.E., Mimnaugh, E. G., Eber, P. L., Emmerling, D. and Freundenthal, R. I. (1976) *Drug Metab. Disp.*, 4 203
- 126) Yasukochi, Y. and Masters, B. S. S. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251 5337
- 127) Haniu, M., Iyanagi, T., Legesse, K. and Shively, J. E. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259 13703
- 128) Williams, D. E., Becker, R. R., Potter, D. W., Guengerich, F. P. and Buhler, D. R. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.*, 225 55
- 129) Metzger, M., Shapiro, M. B., Mosimann, J. E. and Vinton, J. E. (1968) *Nature*, 219 1166
- 130) 渡辺民朗、大町鉄雄、佐上郁子、藤井 博、藤原 徹、須崎百合子 (1983)
" 第10回環境汚染とそのトキシコロジーシンポジウム " P-35
- 131) Denk, H., Schenkman, J. B., Bacchin, P. G., Hutterer, F., Schaffner, F. nad Popper, H. (1971) *Exp. Mol. Phathol.*, 14 263
- 132) Guengerich, F. P., Dannan, G. A., Wright, S. T., Martin, M. V. and Kaminsky, L. S. (1982) *Biochemistry*, 21 6019
- 133) Guengerich, F. P., Wang, P., Mason, P. S. (1981) *Biochemistry*, 20 2379

正誤表

p. 1	下から1行目	Ymano → Y <u>am</u> ano
p. 3	上から10行目	排出 → 排 <u>sh</u> え
p. 6	上から9行目から10行目	示されている <u>れている</u> ⁴³⁾ 。 → 示されている ⁴³⁾ 。
p. 22	表題	Fig 1-6 → Fig_ 1-6
p. 41	上から2行目から3行目	パーオキ <u>セ</u> ダーゼ → パーオキ <u>シ</u> ダーゼ
p. 51	上から10行目	P448 ₂ → P_448 ₂
p. 56	タイトル中	<u>pre</u> oxide → <u>per</u> oxide
p. 99	下から10行目	Tabale 3-7 → Table 3-7
p. 106	表の説明文中	Contyol → Control
p. 118	上から6行目から7行目	僅かに分子量の <u>分子量の</u> 小さい染色が見られた。 → 僅かに分子量の小さい染色 <u>バンド</u> が見られた。
p. 118	上から13行目	ほぼ同じ分子量を <u>分子量</u> を示していた。 → ほぼ同じ分子量を示していた。
p. 142	上から6行目	金 <u>人</u> 保好男 → 金 <u>久</u> 保好男
p. 146	引用文献 23)	K <u>ma</u> mtaki → K <u>ka</u> mtaki