

## 学位論文題名

## ハムスター肝チトクロームP450の性差の研究

## 学位論文内容の要旨

第I相薬物代謝酵素であるチトクロームP450(以下P450あるいはCYP(個々の分子種を表記する場合)と略す)は多重遺伝子族を形成し多くの分子種が存在する。薬物代謝に性差があることは古くから知られており、性特異的P450分子種の存在がその要因であり、それらの発現が性ホルモンや成長ホルモン(GH)によって調節されることも明らかとなっている。しかし、薬物代謝の性差の報告はラットおよび一部の系統のマウスに限られていた。当研究室のMiuraらは薬物代謝の性差が広範な動物種においても存在すると考え検討し、ハムスター肝P450にも性差が存在することを見いだした。即ち、ハムスター肝ミクロゾーム画分には少なくとも2種以上のラットCYP2C11と免疫的に類似したP450分子種が存在し、SDS-PAGE上で分子量の小さい分子種はオスに、分子量の大きい分子種はメスに多く存在していた。そこで本研究はハムスターの性差を分子レベルで確認し、その発現調節機構を解明することを目的とした。

第I章 ハムスター肝チトクロームP450分子種のcDNAクローニングと構造解析

各P450分子種に特異的なプローブを設計するため、cDNAクローニングを行ない、一次構造を解析した。ハムスター肝cDNAライブラリーをラットの対応する分子種のcDNAをプローブとしてスクリーニングし、4種のCYP2C遺伝子サブファミリー、2種のCYP2E遺伝子サブファミリーに属するcDNAを単離した。4種のCYP2C分子種は全て490残基のポリペプチドであり、P450の国際命名委員会からCYP2C25、2C26、2C27、2C28と命名された。推定アミノ酸配列にはミクロゾーム型P450に特徴的な多くの配列が認められた。CYP2C25、2C26、2C27はアミノ酸配列で互いに90%以上の相同性を示し、他の動物の分子種と比較すると、ラットCYP2C6に最も高い相同性(81.2~82.5%)を示した。他のハムスターCYP2C分子種に対し低い相同性(71.4~72.6%)を示すCYP2C28は、ラットCYP2C24に対し88.7%の相同性を示し対応する分子種である可能性が示唆された。2種のCYP2E分子種のcDNAは、3'-非翻訳領域の長さのみが異なるcDNAであり、493残基からなる同一のポリペプチド(CYP2E1)をコードしていた。他の動物の分子種と比較したところ、アミノ酸配列のレベルで78.1~90.3%の相同性を示した。

第II章 CYP2C遺伝子ファミリーに属する分子種の機能解析

現在までにハムスターCYP2C分子種の機能に関する報告はなされていない。そこで、4種のcDNAにコードされるポリペプチドがP450であるか否か確認すると同時に、その機能を明らかにするために酵母での発現を行なった。cDNAの翻訳領域を発現ベクターpAAH5の酵母アルコール脱水素酵素プロモーター下流に挿入し出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae* AH22株に導入した。組換酵母のミクロゾームをウエスタンブロット分析した結果、全ての組換酵母が抗ラットCYP2C11抗体と交叉反応性を示すポリペプチドを発現していた。CYP2C27はオス肝ミクロゾームに多く発現している分子種とSDS-PAGE上でほぼ同じ移動度を示し、CYP2C27がオスに多く発現しているP450分子種である可能性が示唆された。酵母ミクロゾームの還元

型CO差スペクトルを測定した結果、全て450nm付近に吸収極大を持つスペクトルを示しcDNAにコードされるポリペプチドがP450であると証明された。マイクロゾーム画分を用いて酵素活性を測定し、ハムスターCYP2Cが以下の4種全てあるいは一部の酵素活性を有することが示された。アミノピリンN-脱メチル化酵素活性は4種全てに同程度認められた。一方、CYP2C25、2C26のベンツフェタミンN-脱メチル化酵素活性は他の2分子種より高かった。トルブタミド水酸化酵素活性はCYP2C25、2C26および2C27で認められたがCYP2C28では認められなかった。テストステロン水酸化酵素活性はCYP2C25のみが有し16β位を水酸化した。

### 第三章 ノーザンプロット分析およびS1ヌクレアーゼプロテクション分析を利用した各P450分子種の発現レベルの解析

単離したP450分子種の発現レベルに性差があるか否か明らかにするため、分子種に特異的なオリゴヌクレオチドを用いたノーザンプロット分析を行なった。CYP2C27は肝および腎において発現しており、肝では約5倍、腎ではそれ以上の性差（オス>メス）が存在した。また、この性差は4週令以降に生じ性成熟に伴って現われることが明らかになった。先のウエスタンプロット分析の結果と考え併せると、ハムスター肝でオスに多く発現している分子種はCYP2C27であることが強く示唆された。CYP2C28は肝のみに発現が認められオスで有意に多く発現していた。CYP2C25、CYP2C26は調べた範囲では肝のみで発現しており顕著な性差は認められなかった。CYP2E1は肝で高く発現し、腎、肺でも発現が確認された。しかし、その発現に性差は認められなかった。また、ハムスターでは他の動物と異なり3'-非翻訳領域の長さが異なる2種のmRNAが発現していることも確認された。P450の発現レベルは種々の化合物の投与で変化することが知られている。そこでCYP2C27の性差がP450誘導剤の投与によって影響されるか否か検討した。CYP2C27の発現レベルは3-メチルコランズレン（3-MC）、プレグネノロン16α-カーボニトリルの投与では影響を受けなかったが、フェノバルビタール（PB）投与によって上昇した。しかし、性差は保たれていた。CYP2C25の発現レベルは3-MC、PBの投与で上昇したがその効果はオスにおいてより顕著で性差が現われた。

### 第四章 CYP2C27分子種の性ホルモンおよび成長ホルモンによる発現調節の解析

CYP2C27の性差発現機構について検討した。その結果、CYP2C27の発現にテストステロンおよびGHが関与していることが明らかになった。性腺摘除によりオスでは発現レベルが低下、メスで上昇し性差が消失した。そこにテストステロンを投与すると雌雄共に発現レベルは上昇した。脳下垂体摘除によっても性腺摘除と同様に性差が消失した。そこにGHを1日2回7日間皮下投与すると発現レベルが上昇し、ミニポンプで持続注入すると発現レベルが低下した。以上の結果はテストステロンとオス型GH分泌が促進的に、メス型GH分泌が抑制的に作用することを示している。テストステロンの影響がラットで示されている様に脳下垂体を介した間接的なものであるか否か検討するため、脳下垂体摘除後にテストステロンを投与した。CYP2C27発現レベルは上昇する傾向にあり、脳下垂体を介さない肝細胞への直接的な効果あるいは他の因子を介する経路の存在が示唆された。

以上、本研究によって薬物代謝の性差がラット、マウスに限られたものではなく他の動物（ハムスター）にも存在することが分子レベルで立証された。さらに、その調節機構はラット、マウスのものと類似しており性差が種を越えて共通の機構によって生じていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 鎌 滝 哲 也  
副査 教授 横 沢 英 良  
副査 助教授 澤 田 均  
副査 助教授 横 井 毅

学位論文題名

## ハムスター肝チトクローム P450の性差の研究

薬物代謝における性差は古くから知られているが、薬物代謝の性差の報告はラットおよび一部の系統のマウスに限られていた。しかし、本研究においてハムスターにおいても性差があることを分子レベルで確証した。本研究は薬物代謝の性差に関して新しい概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

### 1) ハムスターチトクローム P450 の cDNA クローニング

ノーザンブロット分析に用いる分子種特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計するために cDNA クローニングを行ない、4種のハムスター CYP2C 分子種 (CYP2C25、2C26、2C27、2C28) と1種のハムスター CYP2E (CYP2E1) の一次構造を明らかにした。CYP2C25、2C26、2C27は互いにアミノ酸配列で90%以上の相同性を示し、他の動物種の CYP2C 分子種と比較するとラット CYP2C6 に最も高い相同性を示した。他方、CYP2C28は他のハムスター CYP2C 分子種には71.4~72.6%の低い相同性を示し、他の動物種との比較ではラット CYP2C24 に最も高い値を示した。ハムスター CYP2E1 は CYP2C サブファミリーに比べ概して高い動物種間相同性を示した。それらは全てミクロゾーム型 P450 の特徴を有していることが明らかとなった。

### 2) ハムスターチトクローム P450 の酵母における発現

4種のハムスター CYP2C cDNA クローンが真に P450 をコードするも

のであるか否かを確認すると同時に、どのような酵素活性を有するかを明らかにするため酵母に発現させた。酵母に導入されたcDNAによって酵母内に外来P450が発現し、ハムスターCYP2C分子種が酵素活性を有するP450であることが立証された。また、酵素活性には分子種間で差異が認められた。現在までにハムスターCYP2C分子種の酵素活性に関する報告はなく、本研究によって、4種全てがN-脱メチル化酵素活性を、CYP2C28以外がトルブタミド4位水酸化酵素活性を、CYP2C25がテストステロン16 $\beta$ -水酸化酵素活性を示すことが初めて明らかになった。

### 3) 4種にチトクロームP450の発現レベルの解析

各分子種の一次構造を基にオリゴヌクレオチドプローブを作製し、ノーザンブロット分析あるいはS1ヌクレアーゼプロテクション分析によって各分子種の発現レベルの検討を行なった。CYP2C27は肝および腎で発現が認められ約5倍の性差（雄性>雌性）が存在した。CYP2C28は肝のみで発現が認められ有意に雄性のレベルが高かった。一方、CYP2C25とCYP2C26は調べた限りでは肝のみに発現が認められ顕著な性差はなかった。CYP2E1の発現は肝のみならず腎、肺でも認められた。また2種の大きさの異なるmRNAが転写されていることが示された。CYP2C27の性差は性成熟に伴って現われることが示され、性差発現に性ホルモン、GHの関与が示唆された。CYP2C25とCYP2C26も生後発達に伴う発現レベルの変化が認められた。

### 4) CYP2C27の発現調節

顕著な性差が認められたCYP2C27について、性ホルモン、GHによって性差発現が調節されているか否かを検討した。性腺摘除によりCYP2C27のmRNAレベルは雄性では低下、雌性では上昇し、性差が消失した。性腺摘除ハムスターにテストステロンを投与すると雌雄でレベルの上昇が認められ、テストステロンがCYP2C27の発現に促進的に作用していることが示された。脳下垂体摘除によって雄性ではmRNAレベルが低下し雌性では上昇し性差は消失した。脳下垂体摘除ハムスターにGHを雄性型の分泌様式で投与するとmRNAレベルは上昇し、GHを雌性型の分泌様式で投与すると抑制された。また脳下垂体摘除ハムスターにテストステロンを投与したところmRNAレベルの上昇が認められ、テストステロンが脳下垂体を介さず肝細胞に直接作用しCYP2C27の発現を促進する機構の存在が推測された。以上の結果より、ハムスターCYP2C27の性差がテストステロンおよびGHの分泌

様式の違いによって生じ、テストステロンの効果は脳下垂体を介するものと、介さないものの二通りの発現機構があることが推測された。

以上、本研究は本論文「ハムスター肝チトクロームP450の性差の研究」に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。