

学 位 論 文 題 名

P450発現系の新規構築とその系を用いた
CYP1Aの酵素活性の種差に関する研究

学位論文内容の要旨

1. 序論

薬物代謝における種差は、薬物のヒトにおける安全性の予測を困難にする最大の問題である。薬物代謝の種差の原因としては、動物種間における 1)薬物代謝酵素の発現量の差、および 2)薬物代謝酵素自身の酵素活性の差、の2つが考えられるが、後者についての報告は極めて少ない。

チトクローム P450 (以下、P450 あるいは CYP)の中で、CYP1A1 と CYP1A2 はいずれも発ガンへの関与などの点から注目を集めている分子種である。しかし、これらの分子種の酵素活性の種差を同一条件下で検討した報告はない。そこで本研究では、ヒト、マウス、ハムスター、モルモットの CYP1A1 と CYP1A2 について、どのような酵素活性の違いがあるのか、またその酵素活性の種差は一次構造上のどの領域に由来するのかを明らかにすることを目的とした。本研究では、P450 の酵母発現系を新たに構築し、これらについて検討した。

2. 各種動物肝 CYP1A1、CYP1A2 および P450 還元酵素の cDNA クローニング

マウス、ハムスター、モルモット肝 cDNA ライブラリーから CYP1A1、CYP1A2 cDNA および P450 に電子を伝達する P450 還元酵素の cDNA を単離した。また、ヒト肝 cDNA から CYP1A1、CYP1A2 cDNA を polymearse chain reaction 法によって単離した。

推定アミノ酸の相同性は、CYP1A1 cDNA 間あるいは CYP1A2 cDNA 間では 70 % 以上、P450 還元酵素では 90 % 以上であった。また、P450 還元酵素の FMN(flavin mononucleotide)結合領域近傍に、動物から微生物に至るまでよく保存された酸性アミノ酸クラスターを初めて見いだした。

3. P450 および P450 還元酵素の酵母発現系の検討

P450 を酵母で発現させたときの発現効率、分子種によって大きく異なる。そこで、cDNA の非コード領域の修飾による酵母内発現量の変化について検討した。

マウス *Cyp1a1* cDNA をモデルとして、非コード領域除去の影響について検討した。その結果、マウス *Cyp1a1* cDNA の非コード領域の除去により、発現効率が増加した。また、CYP1A2 や P450 還元酵素 cDNA でも同様な結果を得た。以上の結果より、酵母における発現効率を増加させる方法について明らかにした。

4. P450 発現のための新規酵母株の作成

酵母 P450 還元酵素から動物 P450 への電子伝達効率は低い。そこで、ハムスター P450 還元酵素を安定に高発現する新規酵母株を作成した。 δ 配列を相同組換えのターゲットとしてハムスター P450 還元酵素発現ユニットを酵母 YPH500 株の染色体の複数の位置へ導入し、高い P450 還元酵素活性を示す酵母株—High-red 酵母と命名—を得た。

ハムスターP450還元酵素発現ユニットはHigh-red酵母の第V染色体に6コピー以上挿入されていた。また、High-red酵母は富栄養培地中100世代以上にわたって安定な形質転換体であった。

親酵母であるYPH500とHigh-red酵母にマウスCYP1A1発現プラスミドを導入し比較すると、High-red酵母はYPH500に比べ、20倍のP450還元酵素活性を示し、発現したマウスCYP1A1の酵素活性はおおよそ250倍上昇した。この結果より、本研究で作成したHigh-red酵母は非常に高いP450酵素活性を得られる有用な酵母であると考えられた。

5. ヒト、マウス、ハムスター、モルモットにおけるCYP1A1、CYP1A2の酵素活性の種差
ヒト、マウス、ハムスター、モルモットのCYP1A1およびCYP1A2をHigh-red酵母で発現させ、それらの酵素活性の種差について検討した。

CYP1A1のベンゾ[a]ピレン3位水酸化酵素活性および7-エトキシマリノール-O-脱エチル化酵素活性を比較すると、マウスが最も高く、次いでヒトであった。マウスとハムスターの7-エトキシマリノール-O-脱エチル化酵素活性には60倍の差があった。次に、High-red酵母のカナバニン耐性への突然変異率および生存率を指標とした新規変異原性試験法を開発し、4種の動物のCYP1A1のアフラトキシンB₁代謝的活性化能を比較した。その結果、ヒトCYP1A1のアフラトキシンB₁の代謝的活性化能が他の動物種のCYP1A1より低いことが示された。

CYP1A2の7-エトキシマリノール-O-脱エチル化酵素活性ではハムスターが最も高く、次いでマウス、ヒトの順であった。また、カフェイン代謝反応では、カフェイン代謝物の比率は動物種によって若干異なっていた。一方、4種の動物のCYP1A2のアフラトキシンB₁代謝的活性化能を比較すると、ハムスターCYP1A2が他の動物種のCYP1A2よりも非常に高い代謝的活性化能を示した。

以上のように、これら4種の動物のCYP1A1、CYP1A2の酵素活性には大きな種差が存在することを明らかにした。

6. マウスCYP1A1とハムスターCYP1A1の7-エトキシマリノール-O-脱エチル化酵素活性の種差に関わる一次構造上の領域の検索

マウスCYP1A1とハムスターCYP1A1における7-エトキシマリノール-O-脱エチル化酵素活性の種差に関わる領域をキメラCYP1A1の作成により検討した。

マウス、ハムスターのCYP1A1の7-エトキシマリノール-O-脱エチル化酵素活性の速度論的パラメータを求めたところ、K_mよりもV_{max}が大きく異なっていた。そこで、マウスCYP1A1 cDNAとハムスターCYP1A1 cDNAをおおよそ3分割して組み合わせたキメラCYP1A1 cDNA、および中央3分の1の領域をさらに2分割して組み合わせたキメラCYP1A1 cDNAを作成し、High-red酵母で発現させた。これらのキメラCYP1A1の中では、中央3分の1の前半領域がマウス由来であるキメラCYP1A1が高い7-エトキシマリノール-O-脱エチル化酵素活性を示した。また、この高い酵素活性を示すキメラCYP1A1はハムスターCYP1A1よりも高いV_{max}を示した。この結果より、中央3分の1の前半領域が、マウスCYP1A1とハムスターCYP1A1のV_{max}の種差に最も重要な領域であることを明らかにした。この領域はこれまでに報告されているP450の機能領域とは異なった領域であった。

6. まとめ

本研究において、高いP450酵素活性が得られる酵母発現系を新たに構築した。また、本発現系を用いて、ヒト、マウス、ハムスター、モルモットCYP1A1とCYP1A2における酵素活性の種差について検討し、以下のような結論を得た。

- 1) 4種の動物種のCYP1A1、CYP1A2の酵素活性には大きな種差が存在する。この薬物代謝酵素自身の酵素活性の種差を同一条件下の比較により初めて見いだした。
- 2) マウスとハムスターのCYP1A1の酵素活性の種差はV_{max}の違いに由来しており、これには中央3分の1の前半領域が強く関わっている。この領域はこれまで機能が未同定であった領域であり、本研究によって初めて機能を明らかにした。

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

P 450発現系の新規構築とその系を用いた CYP1A の酵素活性の種差に関する研究

薬物代謝能における種差は、ヒトにおける薬物の薬効・毒性をより正確に予測する上で極めて重要である。しかし、これまでの研究においては、動物種間における薬物代謝酵素の発現量の差に関する研究に比べ、薬物代謝酵素の分子当たりの酵素活性（ターンオーバー数）の差に関する報告は少なかった。

本研究ではこの点に関してチトクローム P450（以下 P450 または CYP）を中心に詳しく研究し、数々の新発見をした。本研究は薬物代謝に関して有用な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) 各種動物の P450 と NADPH-P450 還元酵素 cDNA の単離

まず、ヒト、マウス、ハムスター、モルモットから *CYP1A1*、*CYP1A2* cDNA を単離し、その塩基配列を決定し、一次構造上の相同性について明らかにした。これらの中では、モルモットの *CYP1A1*、*CYP1A2* cDNA が初めて単離された cDNA であった。ハムスター *CYP1A1*、*CYP1A2* cDNA は本研究とほぼ同時期に塩基配列が報告されたが、一部の塩基配列が異なっていた。また、マウス、ハムスター、モルモットから P450 還元酵素の cDNA を単離した。これら 3 種はいずれも初めて単離された cDNA である。これらについて一次構造の解析を行い、高い相同性を有していることを明らかにした。特に、P450 還元酵素から P450 への電子伝達において接点となっていると考えられる FMN 結合領域付近の酸性アミノ酸配列が動物から植物、微生物に至るまで非常によく保存されていることを初めて見いだした。

2) 酵母における酵素の発現効率の改良

マウス CYP1A1 をモデルとして、cDNA の非翻訳領域の除去による発現効率の変化について検討した。その結果、cDNA の非翻訳領域をトリミングすることにより、酵母内発現量が増加することを明らかにした。また、CYP1A2 や P450 還元酵素についても同様な検討を行い、マウス CYP1A1 に限らず、CYP1A2 や P450 還元酵素でも発現効率が上昇することを見いだした。

3) NADPH-P450 還元酵素を高発現する新規酵母株の樹立

P450 を発現させ酵素活性を検討するための酵母、すなわち動物由来の P450 還元酵素を安定に高発現している新規酵母株 (High-red 酵母) を樹立した。安定性と高発現を両立させるため、 δ 配列を相同組換えのターゲットにしたマルチインテグレーションを手法として用いた。その結果、親酵母に比較しておよそ 20 倍の P450 還元酵素活性を示し、同時発現させたマウス CYP1A1 の 7-エトキシマリン *O*-脱エチル化酵素活性が親酵母で発現したときの 250 倍になる組換え酵母、High-red 酵母を樹立した。

4) High-red 酵母を用いた CYP1A の酵素活性の種差

単離した CYP1A1 と CYP1A2 を High-red 酵母で発現させ、酵素活性における種差や変異原物質の代謝的活性化能における種差を明らかにした。特に、同じ分子種であっても酵素活性や基質特異性などが大きく異なっており、CYP1A1 や CYP1A2 の酵素活性の種差も個体の薬物代謝能における種差の原因となりうることを明らかにした。また、組換え High-red 酵母が酵母内で高い P450 酵素活性を有することを利用した新しい変異原性試験法を開発した。

5) P450 の酵素活性の種差の原因となる一次構造の推定

P450 の酵素活性における種差の原因となっている一次構造上の領域を推定するために、マウス-ハムスターキメラ CYP1A1cDNA の作成と High-red 酵母での発現を行った。速度論的解析により、CYP1A1 の 7-エトキシマリン *O*-脱エチル化酵素活性における種差が $V_{\max}$ の差に由来していることを明らかにした。また、7-エトキシマリン *O*-脱エチル化酵素活性における種差に、これまで機能が未同定であったマウス CYP1A1 の 141 番目から 208 番目のアミノ酸を含む領域が強く関与していることを明らかにした。本研究では異なった動物由来の同一分子種の酵素活性の比較検討と、同一分子種のキメラ体の作成というアプローチを用いたため、新しい機能領域が特定できたと考えられる。

以上、本研究は P450 の動物種差の原因となるペプチドの一次構造を明らか

にした。 本論文『 P450 発現系の新規構築とその系を用いた CYP1A の酵素活性の種差に関する研究』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。