

学 位 論 文 題 名

イヌ Cytochrome P450 2D15 の分子

生物学的手法を用いた機能解析

学位論文内容の要旨

本研究では、肝臓での薬物代謝において重要な CYP2D 分子種に着目し、実験動物として重要であるにもかかわらず、情報の少ないイヌ CYP2D 分子種の機能解析を目的とした。まず、イヌ CYP2D 分子種 cDNA を単離し、塩基配列、アミノ酸配列を完全に決定した。他動物種の CYP2D 分子種と比較したところ 60% 以上の相同性があり、また保存配列も確認された。したがって、単離した cDNA は CYP2D 分子種であると同定され、CYP2D15 と命名された。また、ウシや霊長類(ヒト、サル)の CYP2D 分子種とは約 75% の相同性、齧歯類(モルモット、ラット、マウス)とは 70% 以下の相同性で、動物種間でばらつきがあり、薬物代謝活性にも違いがあることが予想された。

そこで、イヌ CYP2D15 cDNA からバキュロウイルス発現系を用いて発現蛋白を作成した。発現蛋白は、イヌ CYP2D15 に特異的なペプチド抗体を用いた Western blot 解析によって、イヌ肝ミクロソーム中の CYP2D15 と同一であることが示唆された。また、スペクトル解析による定量で、薬物代謝を測定するために十分な量の P450 が発現されていることがわかった。次に CYP2D 分子種の典型的な基質である、ブニトロロールとイミプラミンを用いて、発現 CYP2D15 の薬物代謝活性を測定した。CYP2D15 発現蛋白は高いブニトロロール 4 位水酸化およびイミプラミン 2 位水酸化活性を持ち、CYP2D 分子種としてラットやヒトの CYP2D 分子種と同じ性質を示したが、イヌ CYP2D15 はイミプラミン *N* 脱メチル化活性もよく触媒する点で、ユニークな基質特異性を有していた。キニンによる代謝阻害実験により、イヌ肝ミクロソーム中で、イヌ CYP2D15 がブニトロロールおよびイミプラミンの水酸化活性の主酵素であることが示唆された。また、イミプラミン *N* 脱メチル化活性も部分的に肝ミクロソーム中で CYP2D15 が関与していることが考えられた。

ヒト、ラットの CYP2D 分子種は、肝ミクロソーム中の含有量が少ないことが知られているが、Sakamoto らは、イヌ CYP2D15 は含有量が多い分子種であると報告した。そこで、作成した CYP2D15 発現蛋白を用いて、イヌ肝ミクロソーム中の CYP2D15 の含有量を検討したが、非常に少ないことが推察された。

次に、CYP2D15 発現蛋白を用いてイヌ、ラット、ヒトの間で種差が存在することが知られているプロプラノロール(PL)代謝、デブリスキン代謝を調べた。これまで報告されているように、イヌ肝ミクロソームでは、PL 4 位水酸化(4-OH)、5 位水酸化(5-OH)

に関して、ヒト肝ミクロソームとは逆の立体選択性を示した。また、ラット肝ミクロソームにおいて主要な代謝物である7位水酸化体は全くみられなかった。このようなイヌ肝ミクロソームのユニークなPLの部位および立体選択性は、CYP2D15発現蛋白でも同様にみられた。また、CYP2D15に特異的なペプチド抗体によって、イヌ肝ミクロソームの4-, 5-OH活性は強く阻害された。したがって、イヌ肝ミクロソームによるプロプラノロール4-, 5-OHの部位および立体選択性には、イヌCYP2D15が大きく関わっていることが示された。また、CYP2D15発現蛋白は高いPL N脱イソプロピル化(DIP)活性を持つが、CYP2D15特異的なペプチド抗体によって、イヌ肝ミクロソームでのPL DIP活性は阻害されなかった。したがって、イヌ肝ミクロソームによるPL DIPは、他の分子種によって触媒されていると考えられた。

デブリソキンはヒトCYP2D6の遺伝的多形性を示す代表的な基質であるが、イヌ肝ミクロソームでは低基質濃度でデブリソキン4位水酸化活性は検出されなかった。CYP2D15発現蛋白でもデブリソキン4位水酸化活性は、顕著に低かった。高基質濃度においても、CYP2D15発現蛋白はイヌ肝ミクロソームに比べてそれほど高い活性を示さなかった。したがって、イヌ肝ミクロソームの低デブリソキン4位水酸化活性は、イヌCYP2D15のデブリソキン4位水酸化活性が顕著に低いためであることが示された。

最後に、生体内物質としてテストステロンの代謝をラットCYP2D1、CYP2D2、ヒトCYP2D6、イヌCYP2D15で測定した。その結果、それぞれの分子種は異なる代謝部位特異性を示した。ヒトCYP2D6はテストステロンの6 β 位水酸化および17位酸化、イヌCYP2D15は17位酸化のみで顕著な活性を示した。一方イヌCYP2D15同様、高いブニトロロール4位水酸化活性を持つラットCYP2D2は全ての部位でほとんど活性がみられなかった。しかし、ブニトロロール4位水酸化活性を持たないラットCYP2D1は、7 α 位水酸化において顕著な活性を示した。

以上のことから、イヌCYP2D15の発現蛋白を用いることによって、イヌCYP2D15の基本的な性質が本研究で明らかになった。本研究の知見は、CYP2D分子種に関する動物種差を考える上で有効な指標を与えるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 渡 邊 智 正
副 査 助 教 授 升 田 真 木 彦

学 位 論 文 題 名

イヌ Cytochrome P450 2D15 の分子 生物学的手法を用いた機能解析

ヒト薬物代謝酵素 P450 の一分子種、cytochrome P450 2D (CYP2D)は多くの医薬品の代謝に関与している。医薬品を創製するためには、動物からヒトへの外挿を考慮しなければならないが、実験動物として重要なイヌの CYP2D に関する情報は少ない。そこで、田崎君はイヌ CYP2D 分子種の機能解析を目的とした。まず、イヌ CYP2D 分子種 cDNA を単離し、塩基配列、アミノ酸配列を完全に決定した。他の CYP2D 分子種との相同性は、動物種間でばらつきがあり、薬物代謝活性にも違いがあることが予想された。

次にイヌ CYP2D15 cDNA からバキュロウイルス発現系を用いて発現蛋白を作成し、この発現蛋白を使って様々な薬物代謝活性を調べた。CYP2D15 発現蛋白は高いブニトロロール4位水酸化およびイミプラミン2位水酸化活性を持ち、CYP2D 分子種としてラットやヒトの CYP2D 分子種と同じ性質を示したが、イヌ CYP2D15 はイミプラミン *N* 脱メチル化活性もよく触媒する点で、ユニークな基質特異性を有していた。

次に、CYP2D15 発現蛋白を用いてイヌ、ラット、ヒトの間で種差が存在することが知られているプロプラノロール(PL)代謝、デブリソキン代謝を調べた。これまで報告されているように、イヌ肝ミクロソームでは、PL 4位水酸化(4-OH)、5位水酸化(5-OH)に関して、ヒト肝ミクロソームとは逆の立体選択性を示した。また、ラット肝ミクロソームにおいて主要な代謝物である7位水酸化体は全くみられなかった。このようなイヌ肝ミクロソームのユニークな PL の部位および立体選択性は、CYP2D15 発現蛋白でも同様にみられた。CYP2D15 に特異的なペプチド抗体によって、イヌ肝ミクロソームの4-、5-OH 活性は強く阻害された。したがって、イヌ肝ミクロソームによる PL4-、5-OH の部位および立体選択性には、イヌ CYP2D15 が大きく関わっていることが示された。デブリソキンはヒト CYP2D6 の遺伝的多形性を示す代表的な基質であるが、イヌ肝ミクロソームでは低基質濃度でデブリソキン 4

位水酸化活性は検出されなかった。CYP2D15 発現蛋白でもデブリソキン 4 位水酸化活性は、顕著に低かった。したがって、イヌ肝ミクロソームでデブリソキン 4 位水酸化活性が低いのは、この反応における CYP2D15 の触媒活性が顕著に低いためであることが示された。

以上のように、田崎君は、バキュロウイルス発現系によるイヌ CYP2D15 の発現蛋白を用いることによって、イヌ CYP2D15 の基本的な性質を本研究で明らかにした。本研究の知見は、今後 CYP2D 分子種に関する動物種差を考える上で有用となると考えられる。よって、審査員一同は田崎君が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。