

学位論文題名

Molecular basis of drug oxidation polymorphism in the
Dark Agouti rat: importance of cytochrome P450 2D2

(Dark Agouti 系ラットにおける薬物代謝多形の

分子機構：シトクロム P450 2D2 の重要性)

学位論文内容の要旨

シトクロムP450(CYP)は、外来異物を代謝解毒するだけでなく、性ステロイド、エイコサノイド、レチノイドなど様々な生理活性物質の生合成、分解を行う多種多様な酵素群である。このCYP酵素群の中でもCYP2Dサブファミリーは人の臨床に応用されている30種以上の薬物の代謝を担うこと、また、それらの薬物の代謝に遺伝的多形が存在することから多数の研究がなされている。CYP2Dに起因する遺伝的多形によって、様々な動物種が薬物代謝、その結果として薬物反応に著しい個体差を示すことから、CYP2Dの発現機構、代謝機能を知ることは医薬品開発、臨床医学において重要な課題となっている。

Dark Agouti(DA)ラットは、薬物代謝のデブリソキン型遺伝的多形の低活性モデル実験動物として知られている。そして、DAラットがデブリソキン型遺伝的多形に該当する薬物に対して低活性であるのは、CYP2D1 mRNA発現が欠損しているためであると考えられている。しかし、CYP2D1だけではなく、ラット肝ミクロソームより精製されたCYP2D2がデブリソキン4位水酸化反応を触媒することが報告された。

そこで本研究では、ラット肝ミクロソームにおける蛋白発現が確認されているCYP2D1、CYP2D2について、肝臓における発現量、薬物代謝特性について検討を行った。CYP2D1、CYP2D2の一次構造をもとにそれぞれに特異的なペプチド抗体を作成し、蛋白発現量をウエスタンブロッティング法により定量した。その結果、DAラットではCYP2D2の発現量が顕著に低いことが明らかになった。また、S1ヌクレアーゼ解析によるmRNA発現の検討

により、CYP2D1 mRNAは発現が欠損しているのではなく、その発現量が顕著に低いことが明らかになった。従って、DAラットではCYP2D1遺伝子が欠損しているのではなく、その転写機構に問題があると考えられた。また、CYP2D2 mRNAも同様に、低発現であることが明らかとなった。そして、これらの結果をSDラットと比較することにより、CYP2D1、CYP2D2の発現量がデブリスキン代謝活性と高い相関を持つことが明らかとなった。

バキュロウイルス発現系によりリコンビナントCYP2D1、CYP2D2を作成し、これらがCYPの特性であるスペクトルの挙動、電子伝達に關与する補酵素の要求性を保持していることを確認した。リコンビナントCYP2D1、CYP2D2は共にデブリスキン4位水酸化反応を触媒し、これらの遺伝子が機能的であることを示した。また、CYP2D2によるデブリスキン4位水酸化反応は、CYP2D1依存の反応よりも10倍程度高い活性値を示した。

以上の結果より、DAラットがデブリスキンに対して低代謝活性であるのは、CYP2D1のみではなく、CYP2D1、CYP2D2が共に低発現であることが原因であると考えられた。

また、デブリスキン4位水酸化活性と同様に遺伝的多形を示すブニトロロール4位水酸化は、CYP2D2によって触媒されるがCYP2D1によっては触媒されないことが明らかとなった。さらに、ラット肝ミクロソームにおけるブニトロロール4位水酸化活性をほぼ完全に阻害するP450BTL抗体は、リコンビナントCYP2D2の活性を同様に阻害した。従って、DAラットのブニトロロール代謝が低活性であるのは、CYP2D2のみの発現量が低いことに起因していると考えることができた。

同一のメカニズムが考えられていたデブリスキン型遺伝的多形は、単一もしくは複数の酵素が関わる場合があることが明らかになった。このことから、薬物代謝遺伝的多形を理解するためには、単一の酵素のみではなく、その薬物代謝に関わる酵素群（サブファミリー）の基質特異性、代謝反応速度、発現量を詳細に検討する必要性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 渡 邊 智 正
副 査 助 教 授 数 坂 昭 夫

学 位 論 文 題 名

Molecular basis of drug oxidation polymorphism in the Dark Agouti rat: importance of cytochrome P450 2D2

(Dark Agouti 系ラットにおける薬物代謝多形の
分子機構：シトクロム P450 2D2 の重要性)

薬物代謝酵素シトクロムP450(CYP)の一つのサブファミリーであるCYP2Dによる薬物代謝に遺伝的多形が存在し、そのため、デブリソキン等の医薬品による薬効毒性に著しい個体差が生じる。このことから、CYP2Dの発現機構、代謝機能を知ることは医薬品開発、臨床医学において重要な課題となっている。

デブリソキン等の薬物代謝遺伝的多形の低活性モデル実験動物として、Dark Agouti(DA)系ラットが知られている。DAラットの低活性は、CYP2D1 mRNAが発現していないことに起因すると考えられてきた。しかし、一方でCYP2D2がデブリソキン4位水酸化反応を効率良く触媒することが報告された。

そこで、山本君は、CYP2D1、CYP2D2について、それぞれの肝臓における発現量、薬物代謝特性について検討を行った。特異的なペプチド抗体を作成し、その抗体によるイムノブロッティングにより、DAラットではCYP2D2の蛋白発現量が顕著に低いこと、また、S1ヌクレアーゼ解析によるmRNA発現の検討により、DAラットではCYP2D1、CYP2D2 mRNA共に低発現であることを示した。そして、これらの結果をSD、DA両系ラットにおける薬物代謝活性と比較し、特にCYP2D2の発現量と高い相関を持つことを明らかにした。さらに、バキュロウイルス発現系を用いた発現蛋白により、CYP2D1に比して、CYP2D2の薬物代謝活性が顕著に高いことを示した。

以上の結果より、DAラットがデブリソキン等の薬物に対して低代謝活性であるのは、CYP2D1のみではなく、むしろ活性の高いCYP2D2の発現が低いことが原因であると考

えられた。これらの研究は、他の動物種において起こる薬物応答性の個体差を理解するための基礎的な知見として、今後の薬物代謝遺伝的多形の解明に寄与するところ大であると考えられる。よって、審査員一同は山本幸男君が博士（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。