

学 位 論 文 題 名

The genetic bases of inter- and intrastrain differences in CYP2D-dependent drug metabolism in rats

(ラットにおける CYP2D の系統差及び個体差の分子機構の解明)

学位論文内容の要旨

シトクロムP450 (CYP, P450) は、生理活性物質の合成や代謝だけでなく、医薬品や環境汚染物質などの外来異物の代謝にも関与する酵素群である。特にヒトCYP2D6は、医薬品の約30%を代謝するにも関わらず多くの遺伝多型が存在する事から、薬効の個人差や副作用の発現に深く関与している。このため、CYP2D分子種は、毒性学上、非常に重要な分子種として位置付けられている。そこで本研究では、CYP2D分子種依存の薬物代謝反応におけるラットの系統差及び個体差、そしてそれらを引き起こすメカニズムについて、明らかにする事を目的とした。

第1章では、Dark Agouti(DA)ラットにおけるCYP2D2mRNA低発現機構を解明した。DAラットは、ヒトCYP2D6の典型的基質を代謝する能力が著しく低いため、ヒトCYP2D6の代謝欠損者の動物モデルとして用いられている。ヒトCYP2D6の典型的基質の多くは、ラットCYP2D2によって代謝され、特にDAラットでは、Sprague-Dawley (SD) ラットやWistar系ラットに比べ、CYP2D2 mRNA及び蛋白質発現量が低い事が、CYP2D分子種依存の代謝活性が低い原因であると報告されている。しかし、DAラットにおいて、CYP2D2 mRNA発現量が低下している原因については、未だ明らかにされていない。そこで、CYP2D2遺伝子の5'上流域を、4kbにわたりシークエンス解析を行ったところ、DAラットにおいてTATAボックスの近傍にシトシンからチミンへの一塩基置換がある事を見出した。一方、SDラットでは同領域に変異は認められなかった。次にElectrophoresis mobility shift assayから、DAラットにおいて検出された一塩基置換は、核蛋白質(転写因子)/DNA複合体の形成を低下させる事が確認された。また、CYP2D2遺伝子のプロモーター領域の各種欠失変異体を用いたレポーターアッセイの結果、この一塩基置換により転写活性は約1/4に低下した。さらに、Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometryを用いて、CYP2D2遺伝子発現に関与する転写因子の同定を試みた。その結果、転写装置の足場蛋白として働く多機能な核蛋白質として知られる、ヘテロ核内リボ核蛋白質 K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: hnRNP K)が、コアプロモーター領域に結合する事を明らかにした。よって、DAラットにおけるCYP2D2mRNAの低発現は、CYP2D2遺伝子のプロモーター領域内の一塩基置換により、hnRNP K蛋白質のDNA結合が低下する事が原因である事を初めて明らかにした。

第2章では、ジアゼパム代謝における系統差及び個体差発現機構を解明した。抗

不安薬として世界で広く使用されているジアゼパムには、3位水酸化、N脱メチル化、*p*位水酸化の3つの代謝経路が存在する。これまでの研究から、低基質濃度ではジアゼパム*p*位水酸化が、ラットにおける主要な代謝経路であり、かつ著しい系統差(約300倍)及び個体差(約200倍)を示す事が報告されている。さらに、抗体を用いた阻害実験から、CYP2D分子種がこの代謝反応に関与する事が示唆されたが、CYP2D2の発現量の差では説明できない事が報告されており、未だその代謝酵素の同定には至っていない。そこで、ウエスタンブロット法を用いて、高活性個体のみに特異的に発現する蛋白質を単離した。アミノ酸シークエンスによってN末端配列を決定したところ、今まで主な触媒反応がわかっていない、CYP2D3のアミノ酸配列と完全に一致した。酵母に発現させたCYP2D3は、ジアゼパム*p*位水酸化活性を示したが、CYP2D2にはその活性がない事も再構成系実験を用いて確認した。さらに、定量リアルタイムPCR法により、CYP2D3 mRNA量を測定した。ところが、系統間及び個体間で、*p*位水酸化活性と相関のある発現量の差は認められなかった。そこで、CYP2D3のcDNAシークエンスを調べた。低活性個体では、一塩基挿入によるフレームシフトが認められ、P450の活性中心であるヘム結合領域の上流に終止コドンが形成されていた。このため、*p*位水酸化の低活性個体では、代謝機能を失った蛋白質が合成される事が予想された。したがって、CYP2D3の翻訳領域内の一塩基挿入により、機能的なCYP2D3をコードするmRNAの発現が低下する事で、ジアゼパム*p*位水酸化の系統差及び個体差が引き起こされる事を初めて明らかにした。

以上の結果から、CYP2D分子種依存の薬物代謝反応における、ラットの系統差及び個体差発現の分子機構を明らかにした。ラットは、特に薬物代謝研究において多用されているにも関わらず、薬物代謝酵素に関する系統間及び個体間での遺伝的背景については、これまで明らかにされていなかった。また、CYP2D分子種は医薬品に対する感受性を決定する、最も重要な分子種の一つである事から、本研究成果は、薬物代謝研究におけるラットの系統を選択する際に、非常に有用な指標を与えるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	石 塚 真由美
副 査	教 授	稲 波 修
副 査	教 授	安居院 高 志
副 査	名誉教授	藤 田 正 一

学 位 論 文 題 名

The genetic bases of inter- and intrastrain differences in CYP2D-dependent drug metabolism in rats

(ラットにおける CYP2D の系統差及び個体差の分子機構の解明)

シトクロムP450 (CYP, P450) は、生理活性物質の合成や代謝だけでなく、医薬品や環境汚染物質などの外来異物の代謝にも関与する酵素群である。特にヒトCYP2D6は、医薬品の約30%を代謝するにも関わらず多くの遺伝多型が存在する事から、薬効の個人差や副作用の発現に深く関与している。このため、CYP2D分子種は、毒性学上、非常に重要な分子種として位置付けられている。そこで酒井紀彰氏は、CYP2D分子種依存の薬物代謝反応におけるラットの系統差及び個体差、そしてそれらを引き起こすメカニズムについて、明らかにする事を目的として、本研究を行った。

第1章では、Dark Agouti(DA)ラットにおけるCYP2D2mRNA低発現機構を解明した。DAラットは、ヒトCYP2D6の典型的基質を代謝する能力が著しく低いため、ヒトCYP2D6の代謝欠損者の動物モデルとして用いられている。ヒトCYP2D6の典型的基質の多くは、ラットCYP2D2によって代謝され、特にDAラットでは、Sprague-Dawley (SD)ラットやWistar系ラットに比べ、CYP2D2 mRNA及び蛋白質発現量が低い事が、CYP2D分子種依存の代謝活性が低い原因であると報告されている。しかし、DAラットにおいて、CYP2D2 mRNA発現量が低下している原因については、未だ明らかにされていない。そこで、CYP2D2遺伝子の5'上流域を、4kbにわたりシークエンス解析を行ったところ、DAラットにおいてTATAボックスの近傍にシトシンからチミンへの一塩基置換がある事を見出した。一方、SDラットでは同領域に変異は認められなかった。次にElectrophoresis mobility shift assayから、DAラットにおいて検出された一塩基置換は、核蛋白質(転写因子)/DNA複合体の形成を低下させる事が確認された。また、CYP2D2遺伝子のプロモーター領域の各種欠失変異体を用いたレポーターアッセイの結果、この一塩基置換により転写活性は約1/4に低下した。さらに、Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometryを用いて、CYP2D2遺伝子発現に関

与する転写因子の同定を試みた。その結果、転写装置の足場蛋白質として働く多機能な核蛋白質として知られる、ヘテロ核内リボ核蛋白質 K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: hnRNP K)が、コアプロモーター領域に結合する事を明らかにした。よって、DAラットにおけるCYP2D2mRNAの低発現は、CYP2D2遺伝子のプロモーター領域内の一塩基置換により、hnRNP K蛋白質のDNA結合が低下する事が原因である事を初めて明らかにした。

第2章では、ジアゼパム代謝における系統差及び個体差発現機構を解明した。抗不安薬として世界で広く使用されているジアゼパムには、3位水酸化、N脱メチル化、*p*位水酸化の3つの代謝経路が存在する。これまでの研究から、低基質濃度ではジアゼパム*p*位水酸化が、ラットにおける主要な代謝経路であり、かつ著しい系統差(約300倍)及び個体差(約200倍)を示す事が報告されている。さらに、抗体を用いた阻害実験から、CYP2D分子種がこの代謝反応に関与する事が示唆されたが、CYP2D2の発現量の差では説明できない事が報告されており、未だその代謝酵素の同定には至っていない。そこで、ウエスタンブロット法を用いて、高活性個体のみに特異的に発現する蛋白質を単離した。アミノ酸シークエンスによってN末端配列を決定したところ、今まで主な触媒反応がわかっていない、CYP2D3のアミノ酸配列と完全に一致した。酵母に発現させたCYP2D3は、ジアゼパム*p*位水酸化活性を示したが、CYP2D2にはその活性がない事も再構成系実験を用いて確認した。さらに、定量リアルタイムPCR法により、CYP2D3 mRNA量を測定した。ところが、系統間及び個体間で、*p*位水酸化活性と相関のある発現量の差は認められなかった。そこで、CYP2D3のcDNAシークエンスを調べた。低活性個体では、一塩基挿入によるフレームシフトが認められ、P450の活性中心であるヘム結合領域の上流に終止コドンが形成されていた。このため、*p*位水酸化の低活性個体では、代謝機能を失った蛋白質が合成される事が予想された。したがって、CYP2D3の翻訳領域内の一塩基挿入により、機能的なCYP2D3をコードするmRNAが発現せず、ジアゼパム*p*位水酸化の系統差及び個体差が引き起こされる事を初めて明らかにした。

以上の結果から、酒井紀彰氏はCYP2D分子種依存の薬物代謝反応における、ラットの系統差及び個体差発現の分子機構を明らかにした。ラットは、特に薬物代謝研究において多用されているにも関わらず、CYP2Dに関する系統間及び個体間での遺伝的背景については、これまで明らかにされていなかった。また、CYP2D分子種は医薬品に対する感受性を決定する、最も重要な分子種の一つである事から、本研究結果は、薬物代謝研究におけるラットの系統を選択する際に、非常に有用な指標を与えるものと考えられる。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者酒井紀彰氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。