

氏名	さわ だ なつ み 澤 田 夏 美
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1310号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Metabolism of vitamin D ₃ by mammalian cytochromes P450 (哺乳動物由来シトクロム P450 によるビタミン D ₃ の代謝)
論文調査委員	(主査) 教授 井上 國世 教授 大東 肇 教授 伏木 亨

論文内容の要旨

ビタミン D₃ は肝臓で25位が、腎臓で1 α 位が水酸化され1 α , 25(OH)₂D₃, いわゆる活性型ビタミン D₃ へと変換される。活性型ビタミン D₃ は骨代謝やカルシウムの恒常性維持などに関わっているため、ビタミン D₃ の不足により、くる病や骨粗鬆症などの骨に関する病気になることが知られている。また、細胞の分化や増殖などにも関わっており、活性型ビタミン D₃ アナログは癌の治療薬として研究開発が進められている。そのため、活性型ビタミン D₃ やそのアナログが生体内でどのように代謝されるかを知ることは重要である。本論文は、ビタミン D₃ の代謝に関わる3種類のシトクロム P450, CYP27A1 (25位水酸化酵素), CYP27B1 (1 α 位水酸化酵素) および CYP24 (24位水酸化酵素) を大腸菌で発現させ、酵素化学的性質を解析したものである。これら3種類のシトクロム P450 はいずれもミトコンドリア内膜に存在する膜結合型酵素であり、生体内に微量にしか存在しないため精製が困難であったが、大腸菌で発現させることにより、酵素化学的性質の解析が可能となった。このシトクロム P450 発現菌体の膜画分を調製し、アドレノドキシニンおよび NADPH-アドレノドキシニン還元酵素を含む再構成系でビタミン D₃ 類と反応させ、その代謝産物を HPLC および LC-MS により分析した。その主な内容は以下のとおりである。

1. ヒト由来 CYP27A1 発現菌体の膜画分を調製し、ビタミン D₃ に対する活性を調べたところ主代謝産物は 25(OH)D₃ であったが、それ以外に7種類の代謝産物のピークが検出され、それぞれ26位および27位水酸化体、27位オキソ体、25(OH)D₃ がさらに水酸化された 24R,25(OH)₂D₃, 1 α , 25(OH)₂D₃, 25,26(OH)₂D₃ およびビタミン D₃ の脱水素体であると推測された。速度論的解析をおこない、ミカエリス定数 K_m および最大反応速度 V_{max} を求めたところ、ビタミン D₃ 25位水酸化活性の K_m は 3.2 μ M, V_{max} は 0.27mol/min/mol P450 であった。25(OH)D₂ については26位、1 α 位、24位の順で水酸化反応が起こりやすいことが示された。

2. マウスおよびヒト由来 CYP27B1 発現菌体の膜画分を調製し、25(OH)D₃ に対する活性を調べたところ、その代謝産物は 1 α , 25(OH)₂D₃ であることが示された。また、その他のビタミン D₃ アナログに対する活性を調べたところ、CYP27B1 の基質特異性はマウスとヒトとで共通であることが示された。さらに、25位の水酸基は基質の認識のために重要であること、24位の水酸基は活性を上昇させること、他方、23位の水酸基は活性を低下させることが示された。

3. ビタミン D 依存性くる病タイプ I の患者から CYP27B1 アミノ酸置換変異体が17種類発見された。変異箇所が多くは6種のミトコンドリア型 P450 全般にわたり保存性の高いアミノ酸残基であり、これらはミトコンドリア型 P450 の活性発現に重要な役割を果たしていると推測された。大腸菌で発現させた、くる病患者由来の変異型 CYP27B1 は、いずれも、ほぼ完全に活性を失っていた。CYP27B1 は大腸菌での発現量が極めて低く、ヘムの吸収に基づく分光学的な解析が不可能であった。このため、CYP27B1 と相同性が高く、大腸菌での発現量が高い CYP27A1 に同様の変異を導入し、構造と機能に与える影響を検討した。その結果、変異アミノ酸残基は、P450 の構造安定性、ヘムとの結合、酵素の活性化などに関わっていることが明らかになった。

4. ラットおよびヒト由来 CYP24 発現菌体の膜画分を調製し、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ および $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する活性を調べた。ラット酵素、ヒト酵素ともに $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ をカルシトロン酸にまで代謝する 6 段階の反応と $25(\text{OH})\text{D}_3$ をテトラノール- $23(\text{OH})\text{D}_3$ へと代謝する 4 段階の反応を司ることが明らかになった。ヒト酵素については 23 位水酸化に始まる 4 段階の反応経路があり、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ をラクトン体まで代謝することが示された。また、活性型ビタミン D_3 にフッ素が付加されたアナログであるヘキサフルオロ体に対する活性を調べたところ、ラットでは 3 種類、ヒトでは 4 種類の代謝産物が検出された。

以上の結果から、生体内で見られる数多くのビタミン D_3 代謝産物のほとんどは、これらの 3 種類のシトクロム P450 によって生じることが明らかになった。これら 3 種類の酵素の大腸菌発現系は医薬品として有用なビタミン D_3 アナログの合成や代謝予測に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ビタミン D_3 は生体内で活性型ビタミン D_3 へと変換され、その生理作用を発揮する。活性型ビタミン D_3 はカルシウムの恒常性維持、骨代謝、細胞の分化や増殖などに関わっている。すでに、活性型ビタミン D_3 とそのアナログはくる病や骨粗鬆症の治療薬として実際に用いられており、また、癌の治療薬としても強く期待されている。本研究は、ビタミン D_3 の代謝に関与する 3 種類のシトクロム P450 を大腸菌で発現させ、その酵素化学的性質を明らかにしたものであり、成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. ヒト由来 CYP271 (ビタミン D_3 25 位水酸化酵素) のビタミン D_3 および $25(\text{OH})\text{D}_3$ に対する活性の速度論的パラメータを明らかにした。また、CYP27A1 はビタミン D_3 の 25 位のみならず 1α 位、24 位および 26 位をも水酸化できる酵素であることを示した。

2. マウスおよびヒト由来 CYP27B1 (ビタミン D_3 1α 位水酸化酵素) の基質特異性を明らかにし、生理的に重要な基質である $25(\text{OH})\text{D}_3$ に加えて $24R,25(\text{OH})\text{D}_3$ に対しても 1α 位水酸化活性を示すことを示した。

3. 17 種類のくる病患者由来変異型 CYP27B1 を大腸菌で発現させた。いずれの変異型酵素もほぼ完全に失活しており、CYP27B1 が完全に失活することにより、くる病症状が呈されることを示した。また、変異型酵素の性質を詳細に解析することにより変異箇所のアミノ酸残基は、P450 の構造安定性、ヘムの結合、酸素の活性化などに関与する残基であることを示した。

4. ラットおよびヒト由来 CYP24 (ビタミン D_3 24 位水酸化酵素) は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を 24 位水酸化から始まる 6 段階の反応によりカルシトロン酸まで代謝することを明らかにした。さらに、ヒト CYP24 は 23 位水酸化に始まる 4 段階の反応経路を触媒し、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ をラクトン体へと代謝することを明らかにした。CYP24 の性質には動物種差があるため、動物実験だけではビタミン D_3 アナログのヒトでの代謝を予測することは困難である。一方、本研究で確立した、ヒト CYP24 大腸菌発現系を用いることによりビタミン D_3 のヒトでの代謝予測が効率よく行えることを示した。その一例として、活性型ビタミン D_3 にフッ素が付加されたヘキサフルオロ体の代謝を調査し、ラットとヒトでは代謝経路に明瞭な違いのあることを示した。

以上のように本論文は、大腸菌発現系を用いてビタミン D_3 の代謝に関わる 3 種類のシトクロム P450 の酵素化学的性質を解析し、ビタミン D_3 とそのアナログの生体内での代謝に関する多くの重要な知見を得たものであり、酵素化学、生命有機化学および栄養化学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年1月16日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。