

氏 名	はやし こう じ 林 浩 司
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2353 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Functional Analysis of Mammalian Cytochromes P450 by Using Heterologous Expression Systems (異種細胞発現系を用いた哺乳動物チトクローム P450の機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 國 世 教 授 伏 木 亨 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

チトクローム P450 (以下 P450 または CYP と略称) は、分子状酸素からの一原子酸素を様々な脂溶性物質に添加する酵素であり、哺乳動物生体内でのステロイドや脂溶性ビタミン等の内在性物質や、医薬品や環境化学物質等の外来化合物の代謝に重要な役割を担っている。哺乳動物 P450 については、現在までに220以上の P450 遺伝子の存在が報告されている。これらは細胞内局在性および P450 への電子供与タンパク質の違いによりミトコンドリア型とミクロソーム型に分類される。本論文は、多様な哺乳動物 P450 の機能を解明するために、様々な哺乳動物 P450 を発現する組換え体微生物の作製、発現させた P450 を用いた代謝解析、P450 人工タンパク質の作製、P450 反応機構解析に関する結果をまとめたものである。主な内容は以下のとおりである。

1. ラット CYP24 による活性型ビタミン D₃ アナログの代謝解析

医薬品開発候補化合物である活性型ビタミン D₃ アナログを基質とし、大腸菌で発現させたラットミトコンドリア型 CYP24 によるインビトロ代謝解析を行い、天然の活性型ビタミン D₃ との代謝パターンの違いを示した。ラット CYP24 発現組換え大腸菌の膜画分を用いて代謝解析を行い、CYP24 が 26, 26, 26, 27, 27, 27-ヘキサフルオロカルシトリオール [F₆-1 α , 25-(OH)₂D₃, ST-630] の 23S 位水酸化反応を行うことを示した。CYP24 の ST-630 に対する活性はカルシトリオール [1 α , 25-(OH)₂D₃] の 24 位および 23 位水酸化活性に比べ、はるかに低かった。

2. ヒト肝臓 P450 による薬物代謝解析およびラット肝臓 P450 との比較

ヒトとラットの肝臓 P450 について様々な化食物に対する代謝や肝臓中の P450 含量を調べ、両者の種差を明確にした。ヒト P450 発現組換え体酵母から精製した 9 種の P450 とラット肝臓ミクロソームから精製した P450 を用いて、再構成系同一条件下で、ヒトおよびラット P450 による種々の薬物に対する代謝活性を測定し、両者の基質特異性および反応特異性について比較した。さらに、ヒトおよびラット P450 に対する抗体を用い、肝臓ミクロソーム内での存在比率の違いを比較した。ラットとヒトとの肝臓 P450 の種差の検証により、薬効・毒性試験および薬物代謝における実験動物データのヒトへの外挿に重要な知見を得た。また、11 種のヒト P450 発現酵母を作製し、インビトロ代謝予測系を構築した。ヒト P450 発現酵母ミクロソームを商品化し、ヒトでの薬物代謝予測に有用な試薬の提供を可能にした。

3. ヒト CYP3A4 と酵母 NADPH-P450 還元酵素の人工融合酵素の解析

ヒト CYP3A4 と酵母 NADPH-P450 還元酵素との人工融合酵素を作成し、酵母で発現した。CYP3A 抗と NADPH-P450 還元酵素の融合酵素化によって、電子伝達効率の増大、これに伴う高いテストステロン 6 β 位水酸化活性を実現した。さらに、人工融合酵素とヒトチトクローム b₅ を酵母で同時発現した。ヒト b₅ を同時発現することにより、テストステロン 6 β 位水酸化活性のミカエリス定数やテストステロン結合の解離定数が減少し、カップリング効率 (NADPH 消費に対するテストステロン 6 β 位水酸化反応の割合) が著しく増大した。ヒトチトクローム b₅ が人工融合酵素の CYP3A4 に結合し、基質結合部位の構造に影響を与えることが示唆された。

4. ラット CYP27 と酵母 NADPH-P450 還元酵素の人工融合酵素の作製

ミトコンドリア型からマイクロソーム型に改変したラット CYP27（ミトコンドリア型 CYP27成熟タンパク質の前にウシ CYP17のマイクロソーム移行シグナルを付加して作製）と酵母 NADPH-P450還元酵素との人工融合酵素を作製し、酵母内発現を行った。融合酵素化による電子伝達効率およびモノオキシゲナーゼ活性の著しい増大を達成した。マイクロソーム型 CYP27がミトコンドリアからマイクロソームに局在を変えるばかりでなく、マイクロソーム型 P450は NADPH-P450還元酵素から電子を受け取り、機能することを明らかにした。一連のミトコンドリア型 P450と NADPH-P450還元酵素との融合酵素化によるミトコンドリア型 P450の高いモノオキシゲナーゼ活性の達成は、ミトコンドリア型 P450反応の触媒反応プロセスへの応用の可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

チトクローム P450（以下 P450または CYP と略称）は、分子状酸素からの一原子酸素を様々な脂溶性物質に添加する酵素であり、哺乳動物生体内でのステロイドや脂溶性ビタミン等の内在性物質、さらに医薬品、環境化学物質等の外来化合物の代謝に重要な役割を担っている。哺乳動物 P450については、現在までに220以上の遺伝子の存在が報告されており、細胞内局在性や P450への電子供与タンパク質の違いによりミトコンドリア型とマイクロソーム型に分類される。本論文は、多様な哺乳動物 P450の機能を解明するために、様々な哺乳動物 P450を発現する組換え体微生物の作製、発現させた P450を用いた代謝解析、P450人工タンパク質の作製、P450反応機構解析を行い、医薬品、農薬等の代謝予測系を確立したものであり、評価できる主な点は以下のとおりである。

1. ヒトやラットの P450を大腸菌や酵母のような異種細胞系で発現させ、それらを駆使して多数の哺乳動物 P450を対象としたインビトロ代謝解析を実施した。ビタミン D₃ アナログである医薬品開発候補化合物と天然型ビタミン D₃ との代謝パターンの違いを明らかにし、また、ヒトおよびラット各9種の肝臓 P450の代謝解析を同一条件下で行い、両者の種差を明確にした。従来、18種にもおよぶ P450の代謝特性を比較した例はなく、貴重なデータを提供した。
2. P450と NADPH-P450還元酵素の融合酵素化技術を用いて、ヒト CYP3A4のモノオキシゲナーゼ活性を飛躍的に増大させ、さらに、それまで明確ではなかった CYP3A4代謝反応機構におけるチトクローム b₅の役割を明らかにした。また、ミトコンドリア型からマイクロソーム型へと変換したラット CYP27と酵母 NADPH-P450還元酵素との融合酵素を作製し、高いモノオキシゲナーゼ活性を達成した。ミトコンドリア型 P450をマイクロソーム型に変換し、さらに還元酵素との人工融合酵素を作製する工程をミトコンドリア型 P450の高活性型への有効な機能改変法として提示した。
3. 11種のヒト P450を発現した酵母からなるインビトロ代謝予測系を構築し、ヒトその薬物代謝予測に有用な試薬としての商品化した。また、マイクロソーム型およびミトコンドリア型 P450と NADPH-P450還元酵素との人工融合酵素は、医薬品や農薬の工業生産に応用可能なことを確認した。

以上のように本論文は、哺乳動物由来の多種類の P450を大腸菌や酵母などの異種細胞で発現させた酵素系を用いることにより P450のもつ多様な機能を解析するとともに、この酵素系が医薬や農薬の合成および薬効評価へ応用できることを実証的に示したものであり、酵素化学、微生物生産学、栄養化学、薬理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論受として価値あるものと認める。

なお、平成12年12月21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。