

氏 名	楠 堂 達 也
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1406 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 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	農学研究科食品生物科学専攻
学位論文題目	Structure-function analysis of cytochromes P450 involved in vitamin D metabolism (ビタミンDを代謝するシトクロム P450 の構造と機能の解析)
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

活性型ビタミンDはカルシウムやリンの恒常性に加え、細胞分化誘導作用、細胞増殖抑制作用など多方面での生理作用を持っている。そのため、多くのビタミンDアナログがくる病、骨粗鬆症、ガンなどの治療薬として開発されてきた。一方、ビタミンDアナログの生理作用を評価する際、その代謝産物の生理作用をも考慮する必要がある、代謝研究はきわめて重要である。ビタミンDの代謝においては、ミトコンドリア型シトクロム P450 の一種である CYP24 が中心的役割を果たす。CYP24 はビタミンD₃を C-23 経路と C-24 経路によって代謝するが、両経路の反応性には大きな動物種差が知られている。したがって、ヒト体内におけるビタミンDアナログの代謝を正確に予測するには動物実験だけでは不十分である。そのため、CYP24 の反応特異性、基質認識機構、動物種差について *in vitro* で理解することが重要である。本論文は、CYP24 によるビタミンD₃およびビタミンDアナログに対する作用について CYP24 変異体を用いて詳細に解析し、また、放射菌 P450 (CYP105A1) がビタミンDに作用することを見出し、その酵素活性についても詳細な検討を加えたものである。その主な内容は以下の通りである。

1. ヒト CYP24 による $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ および $25(\text{OH})\text{D}_3$ に対する作用を検討し、それらの側鎖が切断された 25, 26, 27-trinor-23-ene-体 (1) が生成されることを見出した。本反応はラット CYP24 ではほとんど検出されず、ヒトとラット間で著しい種差が示された。また、反応生成物 1 のビタミンDレセプターへの結合能は活性型ビタミンD₃の 1/500 であったことから、本反応は活性型ビタミンD₃の不活性化に関与すると考えられた。
2. 活性型ビタミンD₃の20位が異性化した20エピ体に対する CYP24 の作用を検討した。反応生成物は CYP24 による活性型ビタミンD₃の場合とは異なっており、また、その反応性にはヒトとラット間の種差が認められた。20エピ体の反応生成物のビタミンD₃レセプターへの結合能を調べた結果、ラット生体内では20エピ体は CYP24 により完全に不活性化されるが、ヒト生体内ではその効果が持続する可能性が高いことが示唆された。
3. 活性型ビタミンD₃のA環水酸基のジアステレオマー 4 種類を用いて、ラット CYP24 およびヒト CYP24 による作用について検討した。反応速度パラメータを比較したところ 1 位と 3 位の水酸基が基質結合に関与していることが示された。ヒト CYP24 の場合、3 位の水酸基が α 位にあるものでは C-23 経路の反応性が著しく高く、3 位の水酸基は基質認識だけでなく CYP24 の反応特異性にも影響を与えることが示唆された。
4. CYP24 の反応性の動物種差に関与しているアミノ酸残基の特定を試みた。ラット CYP24 の 2 種類変異体 (1500T, T416M) でビタミンD₃のに対してヒト型の作用性が見られたことから、Ile 500 と Thr 416 が動物種差に影響を与えている可能性が示唆された。コンピューターモデリングにより CYP24 の立体構造を推定したところ、これらの残基は基質のトリエン部分あるいはA環部分の近傍に存在すると推測された。したがって、ヒト CYP24 とラット CYP24 のビタミンD₃に対する反応性の違いは基質結合部位のアミノ酸残基の違いに基づく基質の配向性の違いによるものと考えられた。
5. 放射菌 *Streptomyces griseolus* 由来の CYP105A1 を大腸菌で大量発現させた。CYP105A1 がビタミンD₂およびD₃に

対して25位水酸化活性を有し、25(OH)D₃に対して1 α 位水酸化活性を有することを明らかにした。本酵素の性質はビタミンDの25位水酸化酵素CYP27A1と類似しているが、CYP27A1に比べてビタミンD₂に対して特に高い活性を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、CYP24によるビタミンDアナログの分解過程や代謝経路、CYP24の基質認識および動物種差について多くの重要な知見が得られた。また、ビタミンD₃を代謝する水溶性P450の酵素学的性質に関する知見を得た。これらの結果は、優れた生理作用を持ち安全に代謝されるビタミンDアナログの開発に対し重要な知見を与えうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

活性型ビタミンDはカルシウムやリンの恒常性に加え、細胞分化誘導作用、細胞増殖抑制作用など多様な生理作用を持つことから、これまでに多くのビタミンDアナログがくる病、骨粗鬆症、ガンなどの治療薬として開発されてきた。本論文は、哺乳類のビタミンDアナログ代謝において中心的役割を果たすシトクロムP450であるCYP24およびビタミンDへの作用性を有する微生物P450の反応特異性、基質認識機構、動物種差について詳細な解析を加えたものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. ヒトCYP24による1 α , 25(OH)₂D₃および25(OH)D₃の作用において新規の反応生成物を見出し、本酵素が活性型ビタミンD₃の不活性化に関与している可能性を示した。また、この反応はラットCYP24では見られず、顕著な種差を認めた。
2. CYP24による活性型ビタミンD₃の20位エピ体に対する反応は活性型ビタミンD₃の場合とは大きく異なっていること、また、種差が存在することを明らかにした。20位エピ体はラット生体内ではCYP24により完全に不活性化されるが、ヒト生体内ではその効果が持続する可能性があることを示した。
3. CYP24による活性型ビタミンD₃のA環水酸基のジアステレオマー4種類に対する作用を検討し、3位の水酸基がCYP24の基質認識および反応特異性に関与していることを明らかにした。
4. CYP24の反応特異性における動物種差に影響を与えているアミノ酸残基を特定した。また、コンピューターモデリングによりこれらのアミノ酸残基の位置を推定し、これらの残基の基質認識における関与を明らかにした。
5. 微生物由来のP450のであるCYP105A1がビタミンD₂およびD₃に対する25位水酸化活性、および25(OH)D₃に対する1 α 位水酸化活性を有することを明らかにし、哺乳類由来CYP27A1と極めてよく似た性質をもつことを示した。

以上のように本論文は、ヒトおよびラット由来CYP24のビタミンDに対する反応機構、基質認識機構、反応の動物種差、さらに微生物由来P450のビタミンD類に対する反応性について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16年2月12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。