

氏名	都 築 大 輔		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	薬 学		
学位授与番号	博甲第2522号		
学位授与の日付	平成15年 3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	部位特異的変異導入法によるCYP2D6遺伝子バリエーションの作成、 酵母発現ならびに機能解析		
論文審査委員	教授 成松 鎮雄	教授 篠田 純男	教授 山本 重雄

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、主要な薬物代謝に関与する主要な CYP 分子種で、しかも遺伝子多型性を示す CYP2D6 の酵素蛋白質の構造・機能相関の分子論的解明を目指して、アミノ酸置換によりプロードラッグの代謝活性変化が示唆されている CYP2D6 バリエーションを酵母細胞に発現させ、薬物代謝活性を検討した。

先ず第1段階として CYP2D6 の6種のバリエーション (P34S, G42R, R296C, S486T, P34S/S486T, R296C/S486T) を発現した酵母マイクロソーム画分を調製した。還元型 CO-差スペクトルと Western blot 分析で CYP 含量を測定したところ、R296C、S486T 及び R296C/S486T では WT とほぼ同等の CYP2D6 量を示したが、G42R では WT の約 1/2、P34S/S486T では約 1/5 であり、P34S は痕跡程度であった。一方、酵母 whole cell 蛋白質の Western blot 分析ではいずれのバリエーションも WT と同程度の蛋白質量が認められた。降圧薬デブリンソキン (DB)並びに β 遮断薬ブニトロロール (BTL) を基質とする速度論的解析の結果を勘案すると、P34S は小胞体膜へのアンカーリング効率が低いものの、一旦アンカーリングできた CYP 蛋白質は WT と同等の機能を示すことが推察された。一方、G42R はアンカーリング効率の低下に加えて蛋白質のコンフォメーション変化を惹起する可能性が示唆された。

第2段階として N-末端から42番目のアミノ酸残基置換による CYP2D6 酵素蛋白質の機能低下現象に焦点を当てて、5種の CYP2D6 ミュータント蛋白質 (G42V、G42F、G42S、G42K 及び G42E) を発現した酵母マイクロソーム画分を調製した。WT と比較して G42V 及び G42F の酵素機能に変化はなく、G42S ではその酵素機能に影響はないものの、小胞体膜へのアンカーリング効率低下が示唆された。荷電を持つ極性アミノ酸残基 (Arg、Lys 及び Glu) で Gly-42 を置換した場合、酵素活性が大きく低下した。第1段階と同様の分光学的、免疫化学的および酵素速度論的検討の結果、G42R、G42K 及び G42E の酵素活性低下の要因は小胞体膜への酵素蛋白質のアンカーリング効率の低下と蛋白質のコンフォメーション変化による K_m 値の増大であり、G42K ではこれに加えて P450 の P420 への変換、すなわち CYP2D6 蛋白質の不安定性によることが示唆された。

本研究で得られた、CYP2D6 遺伝子上、特に翻訳蛋白質の N-末端領域に生じる SNP が酵素蛋白質の立体構造や小胞体へのアンカーリング効率に影響し、酵素機能を大きく変化させるとの見解は、21世紀に普及すると思われるテーラーメイド薬物療法の実施に向けた、重要な基礎的知見をもたらすものと考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究では、主要な薬物代謝に関与する主要なCYP分子種で、しかも遺伝子多型性を示すCYP2D6の酵素蛋白質の構造・機能相関の分子論的解明を目指して、CYP2D6バリエーションを酵母細胞に発現させ、薬物代謝活性を検討した。先ず第1段階としてCYP2D6の6種のバリエーションを発現した酵母マイクロゾーム画分を調製した。還元型CO-差スペクトルとWestern blot分析でCYP含量を測定したところ、R296C、S486T及びR296C/S486TではWTとほぼ同等のCYP2D6量を示したが、G42RではWTの約1/2、P34S/S486Tでは約1/5であり、P34Sは痕跡程度であった。一方、酵母whole cell蛋白質のWestern blot分析ではいずれのバリエーションもWTと同程度の蛋白質量が認められた。基質酸化反応の速度論的解析の結果を勘案すると、P34Sは小胞体膜へのアンカーリング効率が低いものの、一旦アンカーリングできたCYP蛋白質はWTと同等の機能を示すことが推察された。一方、G42Rはアンカーリング効率の低下に加えて蛋白質のコンフォメーション変化を惹起する可能性が示唆された。第2段階としてN-末端から42番目のアミノ酸残基置換によるCYP2D6酵素蛋白質の機能低下現象に焦点を当てて、5種のCYP2D6ミュータント蛋白質を発現した酵母マイクロゾーム画分を調製した。WTと比較してG42V及びG42Fの酵素機能に変化はなく、G42Sではその酵素機能に影響はないものの、小胞体膜へのアンカーリング効率低下が示唆された。荷電を持つ極性アミノ酸残基（Arg、Lys及びGlu）でGly-42を置換した場合、酵素活性が大きく低下した。第1段階と同様の分光学的、免疫化学的および酵素速度論的検討の結果、G42R、G42K及びG42Eの酵素活性低下の要因は小胞体膜への酵素蛋白質のアンカーリング効率の低下と蛋白質のコンフォメーション変化によるKm値の増大であり、G42Kではこれに加えてP450のP420への変換、すなわちCYP2D6蛋白質の不安定性によることが示唆された。以上の薬物代謝化学的知見は、テーラーメイド薬物療法の実施に向けた重要な基礎的知見をもたらすものであり、学位に値すると判定した。