

氏名	吉柳 公雄
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博乙第4176号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文の題目	ラットCYP2D1及びCYP2D2 による位置選択的基質酸化反応における アミノ酸残基の役割
論文審査委員	教授 成松 鎮雄    教授 勝 孝    助教授 埴岡 伸光

#### 学位論文内容の要旨

医薬品の代謝反応を触媒する主要な酵素であるヒト CYP2D6 は遺伝子多型性を有し、薬物動態の差が薬効・副作用の発現の個人差をもたらす可能性がある。実験動物として汎用されているラットにも CYP2D 酵素が発現しており、ラット CYP2D 酵素による基質酸化反応に関する知見は、ラットを用いた医薬品候補化合物の *in vivo* 体内動態や *in vitro* 代謝実験データをより精確にヒトに外挿する上で重要な要素となる。本研究では、ラット肝ミクロゾーム画分における CYP2D1 及び CYP2D2 の含有量や基質特異性の相違を生じるメカニズムの解明を目的として、

- 1) N 末端領域の 43 番目と 45 番目のアミノ酸残基
- 2) 活性中心領域の 216 番目と 219 番目のアミノ酸残基

に着目し、部位特異的変異導入法を用いてそれぞれのタンパク質をコードする cDNA に変異を導入し、酵母細胞に酵素タンパク質を発現させた。これらの酵母ミクロゾーム画分を用いて、酵素含量及び基質特異性へ及ぼす影響を調べた結果、N 末端領域の 43 及び 45 番目のアミノ酸残基が CYP 酵素タンパク質の安定性や小胞体膜へのアンカーリングに重要な役割を担っていることが示唆された。また、CYP2D1 及び CYP2D2 により降圧薬 DB 並びに乱用性薬物 5-MeO-DIPT が酸化され、その活性や酸化反応の位置選択性が N-末端から 216 及び 219 番目のアミノ酸残基を相互置換することにより変化することが明らかになった。そのメカニズムについて、分子モデリングによりラット CYP2D 酵素の構造と機能の関連性を考察した結果、活性中心領域の 216 番目と 219 番目のアミノ酸残基が基質酸化において果たす役割が明らかとなった。特に CYP2D2 の Asp-219 はイオン性相互作用により基質を捕捉する点において、ヒト CYP2D6 の Glu-216 と同じ役割を果たし、ラット CYP2D2 がヒト CYP2D6 と類似の基質酸化反応特性を示すメカニズムの一つと考えられた。

## 論文審査結果の要旨

医薬品の代謝反応を触媒する主要な酵素であるヒト CYP2D6 は遺伝子多型性を有し、薬物動態の差が薬効・副作用の発現の個人差をもたらす可能性がある。実験動物として汎用されているラットにも CYP2D 酵素が発現しており、ラット CYP2D 酵素による基質酸化反応に関する知見は、ラットを用いた医薬品候補化合物の *in vivo* 体内動態や *in vitro* 代謝実験データをより精確にヒトに外挿する上で重要な要素となる。本研究では、ラット肝ミクロゾーム画分における CYP2D1 及び CYP2D2 の含有量や基質特異性の相違を生じるメカニズムの解明を目的として、

- 1) N 末端領域の 43 番目と 45 番目のアミノ酸残基
- 2) 活性中心領域の 216 番目と 219 番目のアミノ酸残基

に着目し、部位特異的変異導入法を用いてそれぞれのタンパク質をコードする cDNA に変異を導入し、酵母細胞に酵素タンパク質を発現させた。これらの酵母ミクロゾーム画分を用いて、酵素含量及び基質特異性へ及ぼす影響を調べた結果、N 末端領域の 43 及び 45 番目のアミノ酸残基が CYP 酵素タンパク質の安定性や小胞体膜へのアンカーリングに重要な役割を担っていることが示唆された。さらに N 末端から 216 及び 219 番目のアミノ酸残基を CYP2D1 と CYP2D2 で入れ換えると、還元型 CO 差スペクトラムにおいて、CYP2D1 には大きな変化はないが、CYP2D2 では野生型で見られた 420 nm のピークが消失し、典型的な CYP のスペクトルを与えた。そのメカニズムについて、分子モデリングによりラット CYP2D 酵素の構造と機能の関連性を考察した結果、CYP2D2 の Asp-219 と Tyr-110 の間に水素結合が形成され、タンパク質の高次構造が変化することによると推定される。

また、CYP2D1 及び CYP2D2 により降圧薬 DB 並びに乱用性薬物 5-MeO-DIPT が酸化され、その活性や酸化反応の位置選択性が N-末端から 216 及び 219 番目のアミノ酸残基を相互置換することにより変化することが明らかになった。そのメカニズムについて、分子モデリングにより検討した結果、活性中心領域の 216 番目と 219 番目のアミノ酸残基が基質酸化において果たす役割が明らかとなった。特に CYP2D2 の Asp-219 はイオン性相互作用により基質を捕捉する点において、ヒト CYP2D6 の Glu-216 と同じ役割を果たし、ラット CYP2D2 がヒト CYP2D6 と類似の基質酸化反応特性を示すメカニズムの一つと考えられた。

これらの知見は、博士（薬学）に十分相当するものと判定した。