



Title	還元酵素との相互作用によるシトクロムP450活性化のメカニズム
Author(s)	宮本, 正芳
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52260
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

平成 26 年度 博士論文

還元酵素との相互作用による
シトクロム P450 活性化のメカニズム

大阪大学 大学院薬学研究科
創成薬学専攻 分子反応解析学分野
宮本 正芳

目次

序論	1
はじめに	1
本論	7
第一章 CPR の大量発現系および精製法の確立	7
1. WT-CPR の大量発現および精製	7
2. $\Delta 60$ -CPR の大量発現および精製	9
3. シトクロム c を用いた CPR の酵素活性評価	11
4. 小括	13
第二章 精製 CPR を用いた CYP2C19 の薬物代謝活性評価	15
1. CYP2C19 の大量発現および精製	15
2. 精製 CPR を用いた CYP2C19 の薬物代謝活性測定	16
3. 精製 CPR を用いた CYP2C19 の薬物代謝活性測定の結果	18
4. 小括	22
第三章 CPR の CYP2C19 に対する結合親和性の評価	23
1. Biacore T200 を用いた解離定数測定系の構築	23
2. CPR の CYP2C19 に対する解離定数の測定	26
第四章 CPR の CYP2C19 に対する電子伝達速度の評価	27
1. 嫌気条件下における CPR から CYP2C19 への電子伝達速度	27
2. WT-CPR および $\Delta 60$ -CPR からの CYP2C19 への電子伝達速度の測定	29
3. 共鳴ラマン分光法を用いた基質結合型 CYP2C19 のヘム周辺環境の評価	32
第五章 CYP2C19 の薬物代謝反応における uncoupling 反応の測定	34
1. 活性酸素種の定量による uncoupling 反応検出法の構築	34
2. 活性酸素種および代謝物の定量による uncoupling/coupling 反応の検出	37

第六章 考察	39
1. CYP2C19 に対する CPR の結合親和性	39
2. CYP2C19 に対する CPR の電子伝達	41
3. Uncoupling 反応が CYP2C19 の薬物代謝に与える影響	42
総括	47
実験の部	51
試薬	51
実験機器	57
実験操作	59
参考文献	68
謝辞	75

序論

はじめに

フラビンとはイソアロキサジン骨格を持つ化合物の総称であり、ビタミン B₂ であるリボフラビンなどがその代表である。ヒトの生体内においてはリボフラビンから FAD、FMN が合成され、これらの化合物はタンパク質の補因子として用いられている。フラビンを補因子とするタンパク質はフラビントタンパク質と呼ばれ、ヒトゲノム上にコードされているタンパク質全体の 2~3 %を占めており、最も種類が多いタンパク質の 1 つである(1,2)。フラビントタンパク質は生体内で様々な機能を示すが、主にミトコンドリア(3) やミクロソーム(4)の電子伝達系の補酵素として、二電子系電子供与体である NADH や NADPH から一電子受容体への変換体として働いていることが多い。特に 2 つのフラビンを持つものはジフラビントタンパク質と呼ばれており、ヒトにおいて良く知られているもののひとつにシトクロム P450 還元酵素 (CPR) が挙げられる。

CPR はその主な電子伝達のパートナーであるシトクロム P450 (CYP) の発見よりも 10 年ほど前にシトクロム c 還元機能を持った酵素として酵母から単離された(5)。その後、CPR は細菌類からマスのような魚類、ラットやブタといった哺乳類まで幅広い生物において発見され(6-10)、生命の維持に欠かせない重要なタンパク質であることが明らかとなっていった。例えば *in vivo* の実験により CPR をノックアウトしたマウスでは胚性致死になることが示されるとともに(11)、肝臓での発現を特異的にノックアウトした場合にはマウスの肝臓に脂肪の蓄積が見られ、特に薬物代謝活性が大幅に低下することが報告された(12)。また、ヒトの CPR には一塩基多型 (SNPs) と呼ばれる変異が存在する(13-15)。SNPs とは特定の生物種集団において 1% 以上の頻度で生じるゲノムの一塩基変異であるが、この変異

によってアミノ酸配列が変化した SNP 変異体がヒト CPR でも多数発見されている。たった 1 つのアミノ酸の変化では大きな影響を生じない場合もあるが、フラビンとの結合に関与する部位に変異が生じた CPR の SNP 変異体では電子伝達機能の大幅な低下が確認された(16)。これにより、ヒトにおいてもコレステロールやステロイドの産生異常によって骨奇形などが引き起こされる。これらの疾患は副腎酵素欠損症の 1 つである P450 オキシドレダクターゼ欠損症と呼ばれている(13)。

こうした CPR の異常による疾患には、多くの場合 CYP の反応が深く関わっている。CYP は CPR と同様に生物界に広く存在するヘムタンパク質であり、その機能は異物代謝、脂肪酸代謝、ステロイド合成・代謝、レチノイン酸代謝など多岐に渡っている。特に肝臓における異物代謝では薬物代謝という観点から特に盛んに研究がなされてきた。ヒトにおいて CYP には 57 の遺伝子が確認されているが、肝臓においては全ての CYP を 1 種類の CPR が還元している。そのため、先に述べたような CPR の変異は CYP 全体の機能に大きな影響を与える。

肝臓における CPR と CYP の反応は小胞体内膜上で起きると考えられている。どちらのタンパク質も膜結合型のタンパク質であり、疎水性が高い膜結合領域が脂質膜内部に埋まって存在している。CPR の膜外ドメインの構造は 1997 年に Wang らによる X 線結晶構造解析によって明らかになった(17)。CPR は膜結合領域、FMN ドメイン、接続ドメイン、FAD ドメインの 4 つのドメインからなる (Fig. 1)。FAD ドメインには NADPH との結合サイトが存在し、NADPH から受け取った電子を FAD へと伝達する。その後、電子は FMN ドメインに存在する FMN へと送られ、FMN は還元型もしくはセミキノン型へと変化する。電子はさらに FMN から CYP を始めとするいくつかのヘムタンパク質へと送られるのであるが、Wang らの研究によって明らかになった CPR の結晶構造では FMN ドメイン中の FMN は CPR 分子の内側を向いており (Fig. 1 A)、他のタンパク質との結合・電子伝達に

適さないものであった。そこで、CPR は構造変化によって FAD-FMN 間の分子内電子伝達に適した close 型構造と FMN から他のタンパク質への分子間電子伝達に適した open 型構造の 2 つをとり得るのではないかという仮説が提唱された (Fig. 1 A, B)。この CPR の構造変化に関しては現在まで様々な研究がなされている(18-21)。Hamdane らは、FMN ドメインと接続ドメインを繋ぐヒンジ領域と呼ばれる可動性が高いループ構造を欠損させた CPR を用いる事で CPR の可動性を低下させ、FMN が外部に露出した open 型と考えられる構造を X 線結晶構造解析により明らかにした(18)。また、Pudney らは CPR の FAD ドメインと FMN ドメインを蛍光標識し、蛍光共鳴エネルギー移動を測定することで CPR の構造変化をとらえることを試み、フラビンの還元状態が CPR の構造変化に寄与していると提唱した(21)。

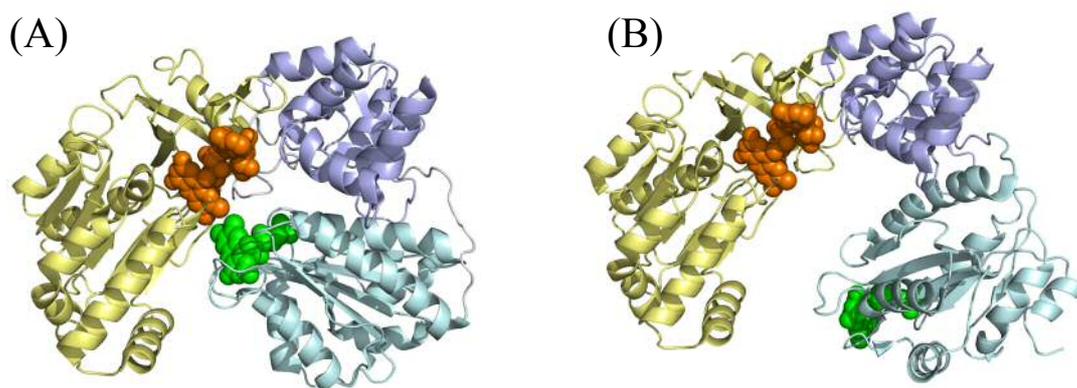


Figure 1. Crystal structures of N-terminal membrane anchor truncated CPR. CPR consists of one N-terminal membrane anchor domain and three hydrophilic domains, i.e., FMN-binding (cyan), connecting (purple), and FAD-binding (yellow) domains. In the closed conformation (A, PDB: 1AMO), electrons are transferred from FAD (orange) to FMN (green). In order for FMN-binding domain to interact with a CYP, CPR largely changes from closed (A) to open conformation (B, PDB: 3ES9).

こうした研究から、CPR の FMN ドメインと CYP が結合した複合体についてもコンピュータシミュレーションなどの研究を通して徐々に明らかになりつつある(18,22)。FMN ドメイン表面にグルタミン酸やアスパラギン酸のような残基が存在するのに対し(23,24)、CYP の近位側表面にはリシンやアルギニンといった塩基性アミノ酸残基が局在する部位があり(25-27)、CPR と CYP はこれらの電荷を帯びたアミノ酸残基間の相補的な静電的相互作用によって結合する。この結合によって接近した FMN と CYP のへムの間で電子の伝達が起こり、CYP は還元されて代謝反応を開始する。

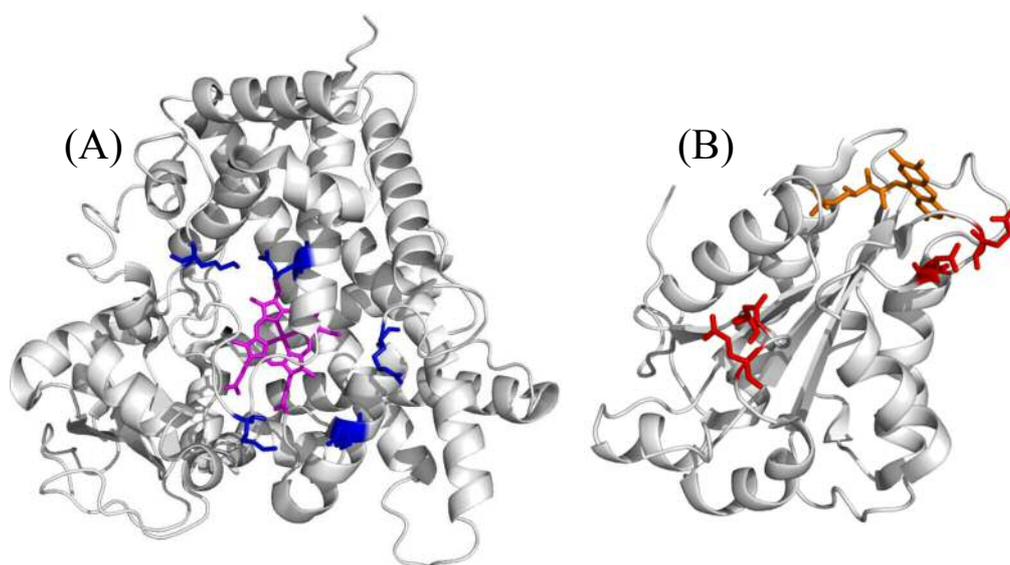


Figure 2. The basic amino acid residues (blue) localized at the proximal side of CYP2C19 (A, PDB: 4GQS) and the acidic amino acid residues (red) on the surface of FMN-binding domain of human CPR (B, PDB: 3QE2). These residues interact electrostatically with each other.

ここまで CPR と CYP 間の膜外親水性ドメイン間での静電的相互作用に関して述べてきたが、疎水性相互作用の存在も示唆されている (28)。この疎水性相互作用を担う部位は主に膜結合領域であると考えられている。しかし、静電的相互作用に比べて研究は進んでおらず、具体的な相互作用メカニズムには不明な点が多い。

疎水性相互作用の重要性は、CPR の N 末端に位置する膜結合領域をトリプシン処理によって切断すると CYP に対する作用を失ってしまう点からも示唆される(29-31)。これまでに膜結合領域の機能について幾つかの研究がなされてきたが、膜結合領域を欠損させた CPR が CYP に対する活性を失う原因については特定されていない。初期の研究では、膜結合領域を欠損させた CPR は CYP に結合できず、電子の伝達も行われなかったのではないかと考えられてきた(31)。しかし、電気化学的な実験により膜結合領域を欠損させた CPR の FMN ドメインが CYP を還元できることが示され、CPR の膜結合領域は CPR から CYP への電子伝達には直接関わらないことが示唆された(32)。また、ナノディスクと呼ばれる人工脂質膜を用いた実験では、膜結合領域の有無はフラビンの酸化還元電位に影響を及ぼさないことが示された(33)。また、ヒト CPR とは異なり酵母の CPR では N 末端を除いても CYP への活性が失われなかったことに加え(31)、CPR の膜結合領域をシトクロム b_5 のものに変えた実験では CYP17A に関しては活性があったものの、CYP3A4 には活性は無かった(34)。このように多くの研究がなされているが、矛盾する結果も多く、具体的に CYP との相互作用のどの段階で CPR の N 末端膜結合領域がどのように機能しているのかは分かっていない。

現在最も支持されている膜結合領域の機能は、CPR の膜外親水性ドメインを膜に繋ぎとめるアンカーとしての役割である(35-37)。主な還元パートナーである CYP も CPR と同様に膜結合タンパク質であり、2 つの酵素が脂質膜上に存在すると適切な向きや角度で結合することが容易になると考えられている。また、結合がスムーズに行われると CPR が有する FMN の溶媒側への露出が最小限になり、CPR 由来の活性酸素種の発生を抑えることができることも主張された(36)。こうした仮説が現在の主流であるが、脂質膜が存在しない反応系で完全長の CPR は CYP を活性化できることも示されている(38,39)。そのため、単純に脂質膜に固定する機能だけでは CYP への活性を完全に失うことの原因を説明することは難し

いと考えられる。また、膜結合領域を欠損させた CPR は CYP と結合しないことが主張されているが、静電的な相互作用は起こりうるため、2 つのタンパク質が全く結合しないとは考えにくい。そこで私は CPR の膜結合領域が CYP の活性化に深く関与していると考え、CYP に対する結合性や電子伝達、ヘム上での酸素分子の反応などの観点から測定を行い、CPR の膜結合領域の新規機能の発見を目指した。

本論

第一章 CPR の大量発現系および精製法の確立

1. WT-CPR の大量発現および精製

ヒト WT-CPR 遺伝子は千葉大学医学部附属病院薬剤部の有吉範高先生より提供して頂いた。この WT-CPR 遺伝子を発現ベクターである pCold I に組み込み、大腸菌 (BL21) に形質転換して、LB 培地を用いた大量培養の条件検討を行った。WT-CPR の発現は LB 培地を氷浴に浸けて低温にすることで誘導し、通常の LB 培地に終濃度 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.7) を加える事で WT-CPR の発現量を増加させる事ができた。しかし WT-CPR は N 末端に疎水性領域を持つ膜タンパク質であるため、大腸菌内で封入体を形成して凝集する可能性が高く、精製は非常に困難であると予想された。そこでタンパク質の N 末端側に正の電荷を持ったヒスチジンが 6 つ連なっている His₆ tag が付いた融合タンパク質として発現させた。一般的に His₆ tag が付加されるとタンパク質の可溶性が上昇する。さらに菌体を破碎する方法として超音波破碎とフレンチプレスの両方を試した結果、フレンチプレスによる破碎の方が CPR の変性を抑えられることを見出した。また、界面活性剤である Triton X-100 を使用することで WT-CPR を可溶性画分に得ることに成功した。

WT-CPR は NADPH と選択的に強く結合するタンパク質であるため、精製には NADPH の類似体である 2'5'ADP が担体に固定された 2'5'ADP Sepharose 4B (GE Healthcare) を使用し、カラムからの溶出には同様に NADPH の類似体である 2-AMP を使用した(40)。精製によって得られたフラクションサンプルについて SDS-PAGE を行ったところ、75 kDa 付近に WT-CPR の単一バンドが確認された (Fig. 3 B)。完全長の CPR は 77 kDa ほどであるため、純度が高い WT-CPR が得られたと考えられた。このタンパク質を濃縮し、紫外可視吸光度計によって測定

を行ったところ Fig. 3 A のようなスペクトルが得られた。CPR はフラビンを持つタンパク質であり、400 nm 付近にフラビンに特徴的な二山のピークが観測された。さらに、600 nm 付近にも幅の広い小さなピークが見られた。これはラジカル型のフラビンであるセミキノンによるピークであると考えられた(16,40,41)ことから、精製された WT-CPR には半還元型のタンパク質が混ざっていることが分かった。CPR の濃度は 454 nm のモル吸光係数の値を用いて吸光度から算出できるが、この ϵ_{454} の値は酸化型 CPR の吸光度より求められた値であるため(16,41)、得られた WT-CPR を完全に酸化したスペクトルから濃度を求める必要があった。そこで微量のフェリシアンカリウムを加える事で酸化型 WT-CPR のスペクトルを得て、濃度を算出した。

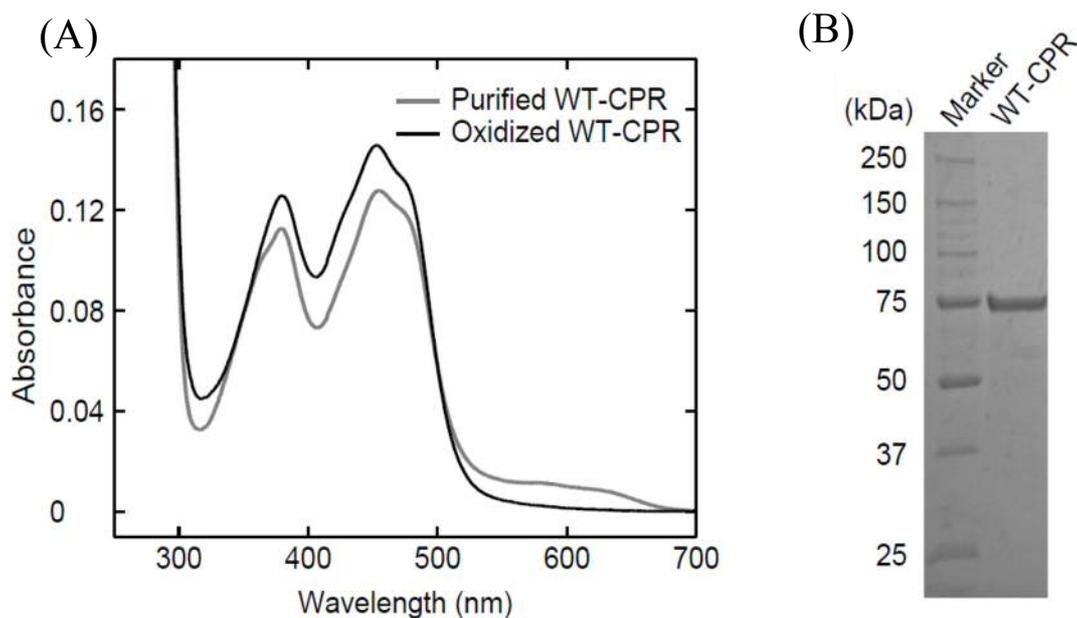


Figure 3. UV-visible absorption spectra (A) and SDS-PAGE of purified WT-CPR (B). The spectra of purified (gray line) and ferricyanide-oxidized CPR (black line) are shown. The purified CPR was electrophoresed and stained by Coomassie brilliant blue.

2. $\Delta 60$ -CPR の大量発現および精製

WT-CPR の膜結合領域の機能を調べるため、膜結合領域を欠損させて可溶性にした CPR の大量発現を試みた。CPR の膜結合領域は SOSUI と呼ばれるツールを用いて相当する配列を予測した(42)。その結果、N 末端側 23~45 番目のアミノ酸残基がヘリックス構造を形成して脂質膜に埋まっていることが予測された。また、過去の研究において、CPR はトリプシンを作用させると 59 位のリシンの C 末端側ペプチド結合が加水分解し、得られた C 末端側の構造は可溶性を持ち cyt. c を還元する機能を維持していることが報告されている(29-31)。そこで本研究では 60 番目のアミノ酸残基まで欠損させ 60 位にメチオニンを加えて発現させた $\Delta 60$ -CPR を作製した。この $\Delta 60$ -CPR は膜結合領域を含んだアミノ酸配列を欠損しているため、可溶性を有していると考えられる。

WT-CPR 遺伝子を鋳型として PCR 法により N 末端側を欠損させた $\Delta 60$ -CPR 遺伝子を調製し、pCold I ベクターに組み込んで大腸菌に形質転換後、大量培養を行った。また、 $\Delta 60$ -CPR も WT-CPR と同様に N 末端側に His₆ tag が付いた融合タンパク質として発現させた。しかし、WT-CPR に比べて十倍以上の量が可溶性画分に得られたため、Ni-NTA Agarose を使用した一次精製を行い、得られたフラクションをさらに 2'5'ADP Sepharose 4B カラムで二次精製にかけた。精製後に SDS-PAGE を行い、WT-CPR よりもやや下に太いバンドが確認されたため (Fig. 4)、 $\Delta 60$ -CPR が得られたと判断した。また、WT-CPR と同様に吸光度を測定し、濃度を算出した。

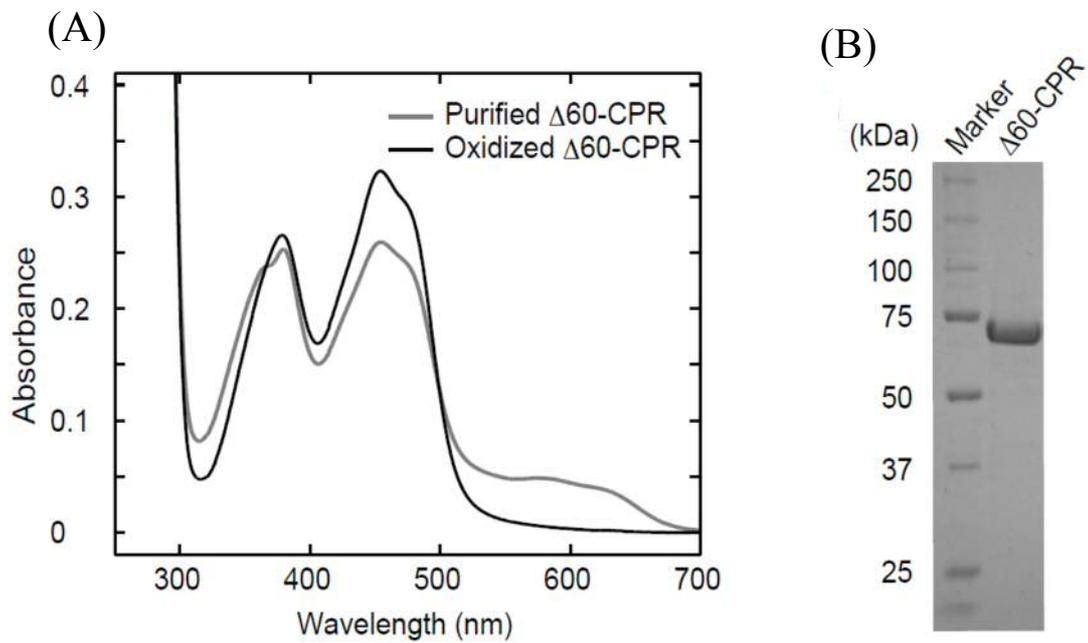


Figure 4. UV-visible absorption spectra (A) and SDS-PAGE of purified $\Delta 60$ -CPR (B). The spectra of purified (gray line) and ferricyanide-oxidized CPR (black line) are shown. The purified $\Delta 60$ -CPR was electrophoresed and stained by Coomassie brilliant blue.

3. シトクロム *c* を用いた CPR の酵素活性評価

精製により得られた WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR の還元活性の測定にはシトクロム *c* (cyt. *c*) を用い、550 nm における cyt. *c* の吸光度の変化から還元活性を調べた (43)。CPR の酵素活性 (Enzyme unit) は一般的に『1 Unit とは 37°C、pH 7.4 の条件下で 1 分間に 1 μmol の cyt. *c* を還元する量』と定義されている(43)。cyt. *c* の還元速度より両 CPR の酵素活性を算出したところ、WT-CPR 1 μM が 2.43 Units/mL の酵素活性を示し、 $\Delta 60$ -CPR 1 μM は 2.63 Units/mL の酵素活性を有していた(Table 1)。また、この酵素活性の測定の際に用いる反応系の NADPH の量を 1~20 μM の間で変化させて、NADPH 濃度に対して cyt. *c* の還元速度をプロットすると Fig. 5 のようになった。このプロットを Michaelis-Menten 式で解析すると両 CPR の NADPH に対する K_m の値 (K_m^{NADPH}) が得られた(20,24)。WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR の K_m^{NADPH} を Table 1 に示す。これらの測定により、WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR の cyt. *c* に対する還元能および NADPH に対する結合性を評価することができた。その結果、膜結合領域を欠損させたことによる影響はほとんど見られないことがわかった。

Table 1. Enzymatic parameters of WT- and $\Delta 60$ -CPRs. The enzyme unit (U) of CPR is defined as the reduction of 1.0 μmole of ferric cytochrome *c* with NADPH per minute at pH 7.4 and at 37°C.

	CPR enzyme unit (U/mL)/ μM of CPR)	K_m^{NADPH} (μM)
WT-CPR	2.43 \pm 0.02	4.17 \pm 0.54
$\Delta 60$ -CPR	2.63 \pm 0.11	3.92 \pm 0.40

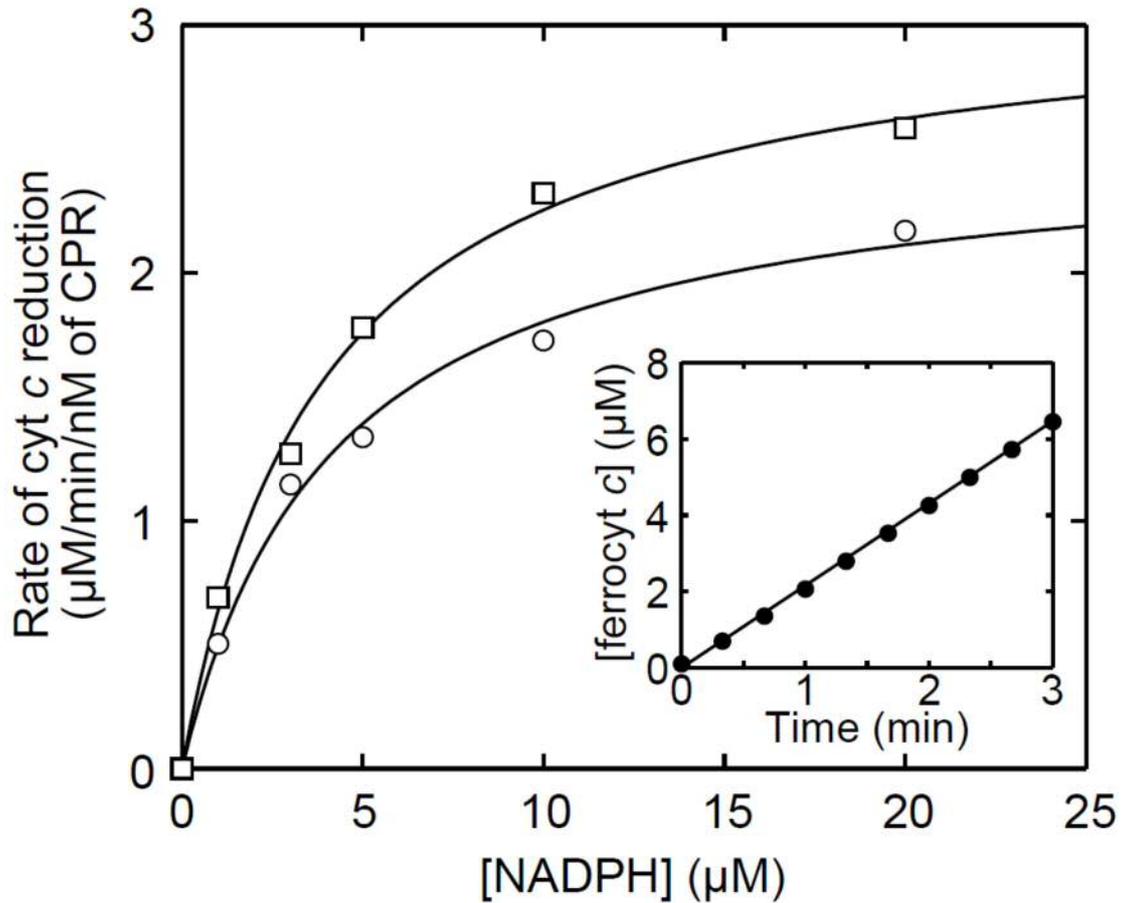


Figure 5. Reduction kinetics of CPRs for ferricytochrome *c*. The inset shows time course of ferrocytochrome *c* production by WT-CPR with 20 μM NADPH. The reduction rates were calculated from the slopes and plotted against NADPH concentrations. A solution containing ferricytochrome *c* (100 μM) and either WT- (open circles) or $\Delta 60$ -CPR (open squares) (1 nM) was pre-incubated for 3 min at 37°C in a buffer containing 100 mM potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, and 20% glycerol (pH 7.4), and the reduction was initiated by the addition of NADPH.

4. 小括

完全長の WT-CPR のみならず膜結合領域を欠損させて水溶性を高めた $\Delta 60$ -CPR についても大量発現系の構築と精製法の確立に成功した。また、その純度も非常に高く、酵素活性の結果も過去の報告(44)と同様であったことから、十分に活性が高いタンパク質が得られたと判断した。そして、それぞれの CPR の濃度から算出した培養・精製により得られたタンパク質の収量は、WT-CPR では 1 L の培養で 0.39 mg であり、 $\Delta 60$ -CPR では 1 L の培養で 2.1 mg であった。

WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR はほぼ同じ酵素活性を示し、 K_m^{NADPH} の値にもほとんど変化はなかった。この結果より、CPR の膜結合領域は酵素としての機能に大きく影響を与えていないと考えられる。序論でも述べたように、NADPH は CPR の FAD ドメインに結合し、FAD を介して FMN ドメインに含まれる FMN に電子が伝達される。そして FMN から *cyt. c* への電子伝達の前に大きな構造変化が生じて FMN が *cyt. c* のヘムに向けて露出される。NADPH の結合からこうした過程を経て CPR の還元酵素としての機能が発揮されるのであるが、*cyt. c* への酵素活性が膜結合領域の有無に左右されないという事は、分子内の電子伝達や CPR の構造変化に膜結合領域は関与しないことが強く示唆される。また、FMN から *cyt. c* 中のヘムへの電子伝達も正常に行われたため、FMN 周辺の構造が変化することによる FMN の酸化還元電位や *cyt. c* への結合性の変化にも膜結合領域は影響しないのではないかと考えられる。

このように、十分に活性を持った CPR が得られたことから、次に CYP の代謝活性の測定に適用することを考えた。膜結合領域を失った CPR は CYP に対する酵素活性を失うと考えられていることから、 $\Delta 60$ -CPR を用いた反応系では大幅な CYP の代謝活性低下もしくは代謝反応の消失が起きると予想される。しかしながら、膜結合領域の機能が脂質膜に CPR を固定化させるためだけであるなら、反応系に脂質を加えない場合、WT-CPR は $\Delta 60$ -CPR と同じような活性を示すのではな

いかと考えた。そこで WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR のそれぞれを用いた反応系において、脂質の有無についても検討を行った。

第二章

精製 CPR を用いた CYP2C19 の薬物代謝活性評価

1. CYP2C19 の大量発現及び精製

CYP は膜タンパク質であるために精製が困難であるが、可溶性を高めた CYP を大腸菌にて大量発現させる系が当研究室にて確立されている(45)。この系により、膜結合ドメインを除去した全合成 CYP2C19 遺伝子を用いて高発現かつ高純度に CYP2C19 を単離、精製することを目指した。pET3a を基に作成されたクローニング・発現用ベクター pBEX に野生型 CYP2C19 遺伝子を組み込み、CPR と同様に発現用大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した。TB 培地で 48 時間、37°C で振盪培養を行い、タンパク質の精製には 3 種類のカラム DEAE-Sepharose Fast Flow、Octyl-Sepharose、Hydroxy Apatite (45) を使用した。3 種類のカラムを順に用いて精製を進めると、280 nm の夾雑タンパク質のピークの低下が見られ、CYP2C19 が精製された。また濃縮後のスペクトルにおいて CO 結合還元型 (Ferrous-CO 型) の測定により 450 nm にピークが見られたことから、活性体として CYP2C19WT が単離されていることが確認された (Fig. 6)。

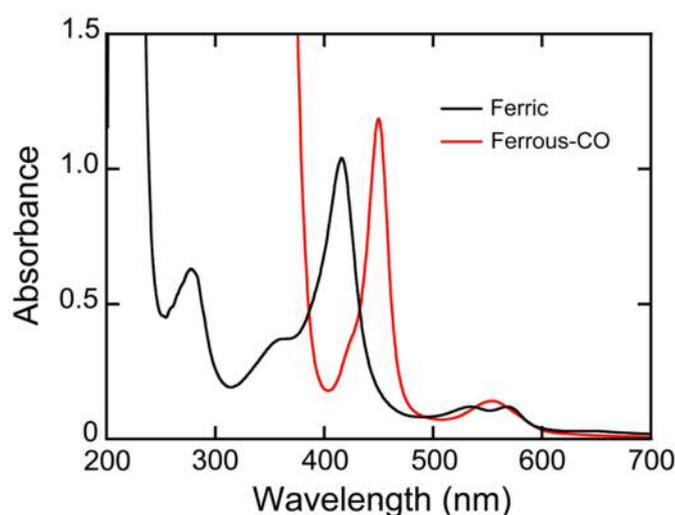


Figure 6. UV-visible absorption spectra of CYP2C19 in the ferric (black line) and ferrous CO-bound (red line) states.

2. 精製 CPR を用いた CYP2C19 の薬物代謝活性測定

$\Delta 60$ -CPR が CYP2C19 に対してどの程度の活性化機能を有しているのかを評価するため、精製 CPR を用いた CYP2C19 の代謝活性測定を行った。CYP2C19 は主に塩基性の薬物に対して代謝活性を示すことが知られている。そのような薬物の中で代表的なものとして、三環系抗鬱薬であるアミトリプチリン (AMT)、イミプラミン (IMP)、プロトンポンプ阻害薬であるオメプラゾール (OPZ) とランソプラゾール (LPZ) を本研究で用いた。各基質の化学構造式と CYP2C19 によって代謝を受ける部位を Fig. 7 に示す。AMT と IMP はどちらも代謝によって *N*-脱メチル化される。また、OPZ と LPZ は CYP2C19 によって芳香環が水酸化されることが知られている。

UPLC によってこれらの基質のピークを代謝産物のピークと分離して検出し、それぞれの検量線を作製した。そして CYP2C19 と CPR の存在下、様々な基質濃度で反応させて代謝産物の経時的増加率および基質の減少率から代謝速度 V を算出し、各基質濃度に対してプロットした。Michaelis-Menten 式 (Eq. 1) を用いてフィティングを行い、ミカエリス定数 K_m と最大反応速度 V_{max} から代謝活性の指標となる内因性クリアランス CL_{int} ($= V_{max}/K_m$) を求め、代謝活性を評価した (Eq. 2)(45)。

$\Delta 60$ -CPR と WT-CPR の比較により CYP の活性化に対する膜結合領域の役割を調べるため、脂質膜の有無による影響についても検討した。CPR にとって膜結合領域が脂質膜につなぎ止めておくためだけの役割であるならば、脂質成分を反応系から除いた場合に WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR とで活性が同程度になるのではないかと考えられた。本研究では脂質膜を構成するリン脂質として、CYP の活性測定に用いられることが多い 1,2-Didodecanoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (DLPC) を選択した。

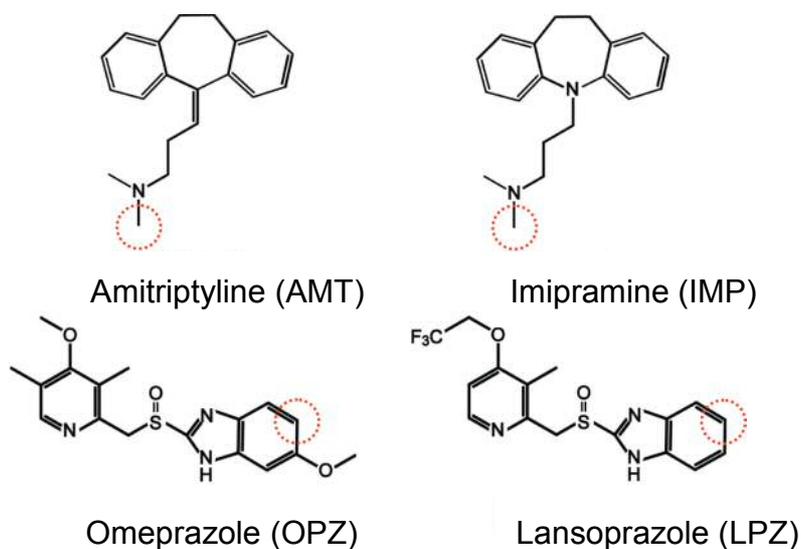


Figure 7. Chemical structures of the substrates used in this research. Red circles indicate the position of metabolism.

Equation 1. Equation for Michaelis-Menten plots.

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

V : reaction velocity

V_{\max} : maximum reaction velocity

$[S]$: concentration of a substrate

K_m : Michaelis constant

Equation 2. Equation for CL_{int} .

$$CL_{\text{int}} = \frac{V_{\max}}{K_m}$$

CL_{int} : intrinsic clearance

3. 精製 CPR を用いた CYP2C19 の薬物代謝活性測定結果

精製 CPR を用いた CYP2C19 による基質代謝反応の測定結果を Fig. 8 と Table 2 に示す。DLPC 存在下で WT-CPR を用いて CYP2C19 の基質代謝を測定した結果、精製した WT-CPR により CYP2C19 は高い活性を示すことが分かった。特に AMT と IMP に対しては V_{\max} の値が 78 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP 及び 149 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP と非常に高い値を示した。また、OPZ と LPZ に対しても WT-CPR によって活性化された CYP2C19 による代謝産物が観測され、 V_{\max} 、 K_m の値が算出された。

一方、WT-CPR を用いた反応系について、DLPC を加えなかった場合には DLPC を加えた系と比べて、全ての基質において反応速度が大幅に低下した。Table 2 を見ると、AMT では V_{\max} の値は 78 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP から 38 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP に低下し、LPZ でも 1.4 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP から 0.71 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP におよそ半減した。また、IMP では V_{\max} の値が 149 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP から 30 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP、OPZ では 13 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP から 1.6 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP と DLPC 存在下で得られた V_{\max} に比べて約 10 ~ 20 % 程度に減少した。一方、 K_m については DLPC の有無によって大きな値の変化は見られず、代謝反応の指標となる CL_{int} の値の低下は V_{\max} の低下によるものであることが示された。

$\Delta 60$ -CPR を用いた反応でも CYP2C19 による AMT と IMP の代謝が検出され、 V_{\max} と K_m の値が算出された。しかし DLPC を加えても加えなくても $\Delta 60$ -CPR では WT-CPR のような V_{\max} の増減が見られず、AMP を基質とした場合には V_{\max} の値は 21 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP (+DLPC) と 16 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP (-DLPC) であり、IMP を基質とすると 18 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP (+DLPC) と 13 ($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP (-DLPC) となった。これらの値を WT-CPR を用いた場合と比較すると、値は AMP、IMP において DLPC を加えずに WT-CPR を反応させた時の V_{\max} の値と比較的近い値であった。また、 K_m の値は AMT と IMP において $\Delta 60$ -CPR と WT-CPR の間で

DLPCの有無に関わらずどの条件でも同程度の値を示した。これらの結果より、 $\Delta 60$ -CPRでは膜結合領域が失われているため脂質膜と結合できず、DLPC非存在下でのWT-CPRを用いた場合と同様の活性を示したのだと示唆される。このことからAMTとIMPの代謝反応ではCPRの膜結合領域は脂質膜へのアンカーとしての機能を果たし、WT-CPRとCYP2C19が結合しやすくなるように働いていたと考えられる。これは従来の膜結合領域の機能の仮説に従う結果であった。

しかし、OPZとLPZに対してWT-CPRではDLPC非存在下でもCYP2C19による代謝反応は見られたが、 $\Delta 60$ -CPRではDLPCの有無に関わらずOPZとLPZの代謝反応は全く見られなかった。そのため、 $\Delta 60$ -CPRは反応系に含まれる基質によってはCYPを活性化する機能に差を生じる可能性が示された。そして膜結合領域の機能がAMTやIMPの代謝反応の時のように単なる脂質膜への固定であるだけでなく、CYPの活性化に強く関与している可能性が示唆された。

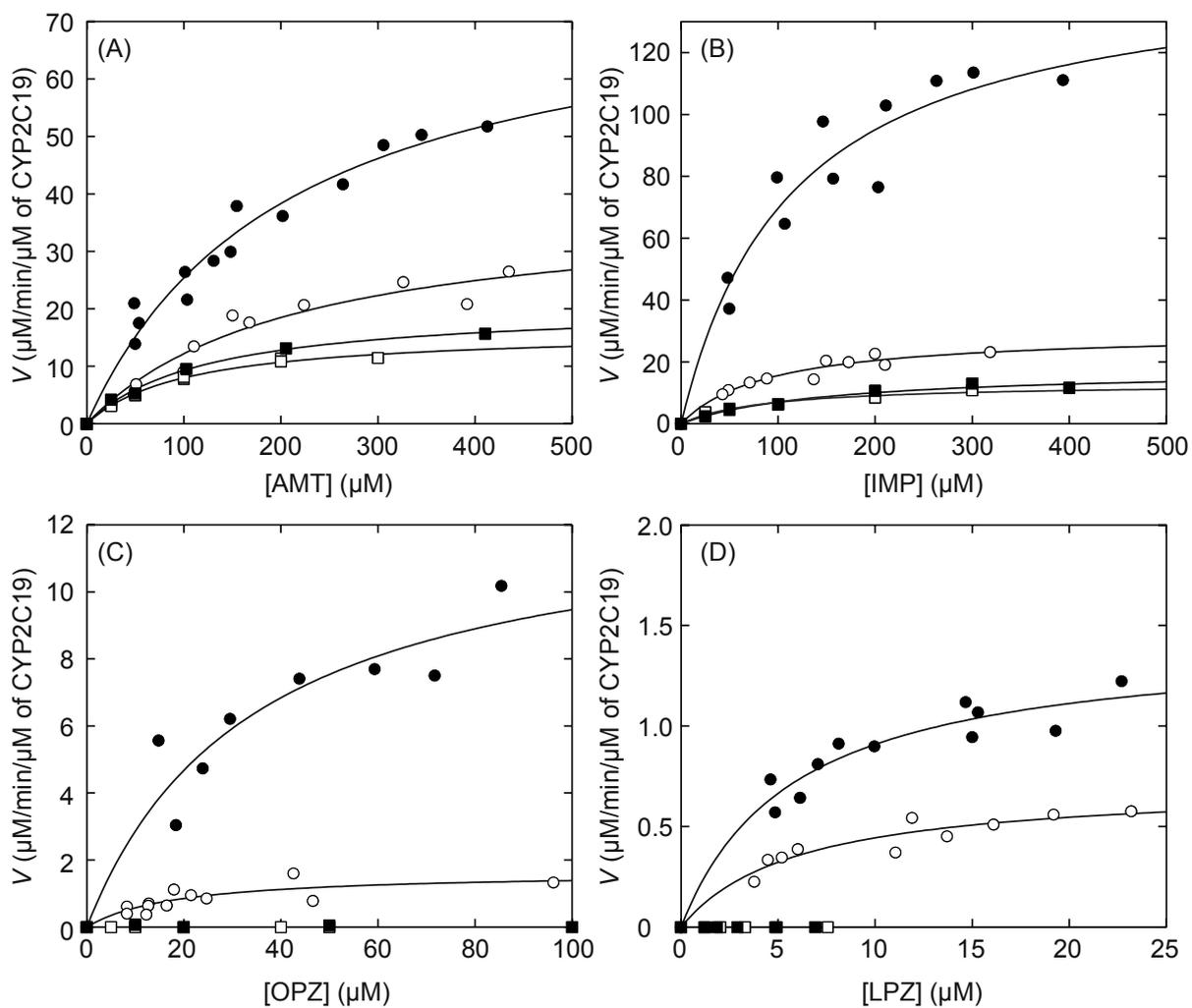


Figure 8. Drug metabolizing activity of CYP2C19 with WT- and $\Delta 60$ -CPRs. Activities were measured in the presence of various concentrations of AMT (A), IMP (B), OPZ (C), and LPZ (D). The reaction velocities with WT-CPR (circles) or $\Delta 60$ -CPR (squares) were plotted against drug concentrations in the presence (filled symbols) or absence (open symbols) of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DLPC.

Table 2. Metabolizing activities of CYP2C19 for AMT, IMP, OPZ, and LPZ. The activities were measured with WT- and $\Delta 60$ -CPRs in the presence and absence of DLPC. N.D.; not determined.

Drugs	CPRs	DLPC	V_{\max} (($\mu\text{M}/\text{min}$)/ μM of CYP)	K_m (μM)	CL_{int} ((mL/min)/ μmol of CYP)
AMT	WT	+	78 ± 7	208 ± 39	376 ± 38
		-	38 ± 6	214 ± 64	178 ± 30
	$\Delta 60$	+	21 ± 1	122 ± 11	169 ± 11
		-	16 ± 1	104 ± 11	157 ± 10
IMP	WT	+	149 ± 17	114 ± 33	1300 ± 240
		-	30 ± 3	91 ± 24	326 ± 55
	$\Delta 60$	+	18 ± 2	152 ± 47	116 ± 22
		-	13 ± 2	89 ± 26	148 ± 29
OPZ	WT	+	13 ± 2	35 ± 15	369 ± 98
		-	1.6 ± 0.3	19 ± 9	88 ± 25
	$\Delta 60$	+	~ 0	N.D.	N.D.
		-	~ 0	N.D.	N.D.
LPZ	WT	+	1.4 ± 0.1	5.8 ± 1.5	248 ± 43
		-	0.71 ± 0.07	6.0 ± 1.7	119 ± 22
	$\Delta 60$	+	~ 0	N.D.	N.D.
		-	~ 0	N.D.	N.D.

4. 小括

$\Delta 60$ -CPR を用いた CYP2C19 の基質代謝反応の測定結果より、CPR の膜結合領域の欠損が CPR を介した CYP の酵素活性を消失させるという結果が得られたが、基質の種類によってその原因が変化することが新たに示唆された。今回の結果では AMT と IMP の代謝反応の場合には $\Delta 60$ -CPR の CYP2C19 に対する活性が低下したが、この活性の低下は脂質膜との相互作用の消失に起因するものであると考えられた。しかし、OPZ と LPZ に関しては脂質膜の有無に関わらず CYP2C19 の代謝反応が見られず、 $\Delta 60$ -CPR が CYP2C19 に対して還元機能を持つかどうかは確認されなかった。

このように CYP2C19 に対する $\Delta 60$ -CPR の相互作用は CYP2C19 に結合している基質の種類に依存して変化しているように思われた。OPZ や LPZ 結合型 CYP2C19 に対して $\Delta 60$ -CPR が相互作用できなくなるのであれば、それは OPZ や LPZ 結合型 CYP2C19 との複合体形成に、あるいはその後の電子伝達において CPR の膜結合領域が関与していることを示しているのではないかと考えられる。

そこで、CPR が CYP に結合して電子を伝達する過程で CPR の膜結合領域はどのように作用しているのかを調べるため、以下の 3 つの仮説を立てた。

仮説①：膜結合領域がなければ CPR は CYP に結合できない。

仮説②：結合が可能でも CYP に電子を伝達できない。

仮説③：結合可能で電子伝達できても、CYP のへム上で酸素が活性化されない。

以上 3 つの観点に関して個別に検証実験を行い、CPR の機能を評価した。

第三章

CYP2C19 に対する CPR の結合親和性の評価

1. Biacore を用いた CYP2C19-CPR の解離定数測定系の構築

まず、 $\Delta 60$ -CPR が OPZ や LPZ 結合型 CYP2C19 と結合できず CYP2C19 の代謝反応が起こらなかったのではないかと考え、CPR と CYP2C19 の結合親和性の評価を行った。タンパク質間の相互作用を調べるために、Biacore を用いた手法に着目した。この手法は近年様々なタンパク質間の結合親和性の測定に用いられており、CPR とヘムオキシゲナーゼとの結合親和性が測定されている(46)。センサーチップへの固定化法として His₆ tag を用いる手法があり、WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR はどちらも N 末端側に His₆ tag を付加してあるため容易に固定化ができるという利点がある。また、His₆ tag を利用することで固定化する CPR の向きを揃えることができ、再現性のある測定が期待できる。さらに、基質と結合していない CYP と CPR の結合親和性を測定することも可能である。測定に用いる running buffer に加える基質濃度を解離定数 (K_d) の 10 倍以上とすることで 90 % 以上の CYP が基質と結合した状態となり、基質結合型 CYP と CPR の結合を測定することが可能である。以上の利点から、Biacore を用いた手法が CPR-CYP 間の K_D の測定に適していると考え、測定を行った。まず CYP2C19 の各基質に対する K_d を吸収滴定法により求めた。吸収滴定法では CYP に基質が結合することで CYP のスペクトルが変化することを使用して K_d を算出した。この結果とスペクトル変化を以下に示す。

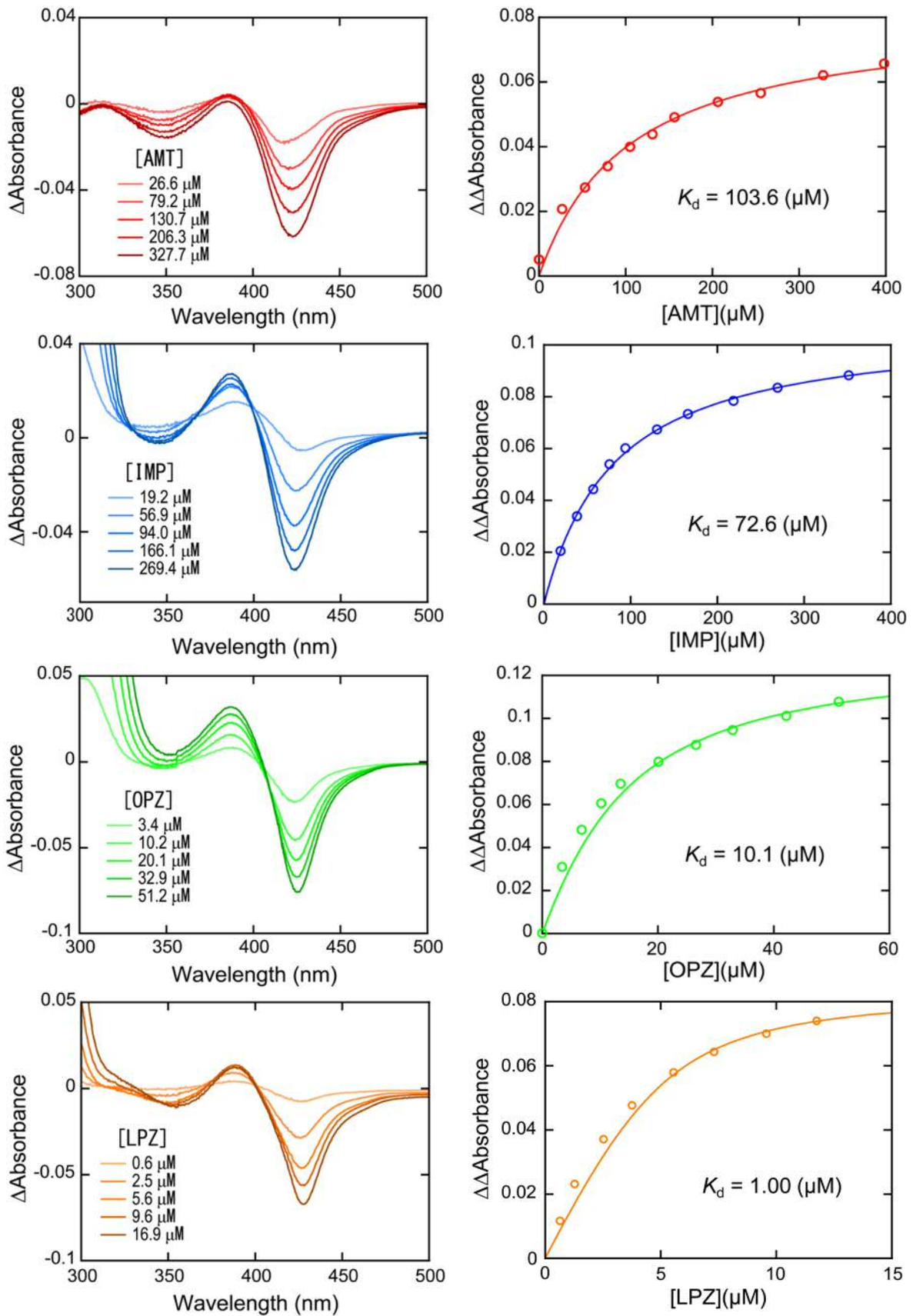


Figure 9. Spectral changes of CYP2C19 in the course of drug titrations. AMT (red), IMP (blue), OPZ (green), and LPZ (brown).

これらの吸収滴定によって得られた K_d の値から Biacore を用いた測定における各基質の適切な濃度を定めた。

200 RU 程度となるように CPR をセンサーチップ上に固定化し、アナライトである CYP2C19 は 0.16 ~ 10 μM の濃度で調製した。測定の結果 Fig. 10 のようなセンサーグラムが得られ、これを Biacore T200 software version 1.0 (GE Healthcare) を用いて two-state binding model により解析した。

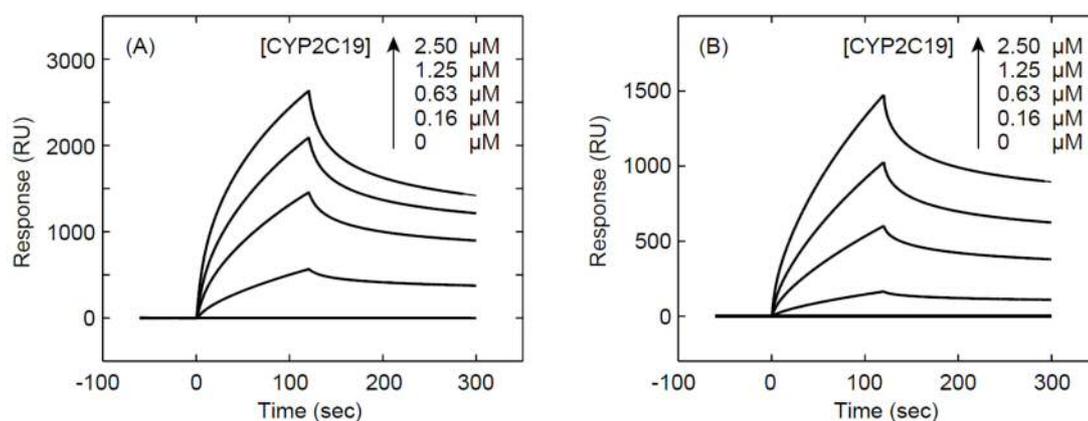


Figure 10. Sensorgrams of CYP2C19 binding to WT-CPR (A) and $\Delta 60$ -CPR (B) in the presence of LPZ. Analyte solutions contained LPZ (100 μM) and CYP2C19 (0.16 μM , 0.63 μM , 1.25 μM , or 2.50 μM) and were flowed over a sensor chip on which the CPRs were immobilized. The flow rate was 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, and contact and dissociation were monitored for 120 and 180 seconds, respectively. The sensorgrams were analyzed with Biacore T200 Evaluation Software version 1.0 assuming a two-state reaction.

2. Biacore T200 を用いた CPR-CYP2C19 の解離定数の測定

解析により得られた K_D の結果を Table 3 に示す。基質非結合型の CYP2C19 に対する WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR の K_D はそれぞれ 1.99 μM および 1.54 μM であり、ほぼ同程度であった。次にそれぞれの薬物を加えた場合、WT-CPR ではどの薬物でも基質非結合時の K_D 値より低下し、結合親和性が上昇した。これに対して $\Delta 60$ -CPR では WT-CPR と同様に AMT と IMP を加えると基質非結合時に比べて K_D 値が低下したが、OPZ や LPZ では WT-CPR に比べて K_D 値が 3 倍ほどに上昇した。しかし、 $\Delta 60$ -CPR は CYP に対して全く結合できなくなったわけではないため、OPZ や LPZ に対する代謝活性の消失は結合親和性の低下によるものではないと考えられる。そこで、 $\Delta 60$ -CPR は CYP と複合体を形成できても、OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 に電子を伝達することができないのではないかと考えた。

Table 3. Binding affinity of CPRs for CYP2C19 in the absence and presence of drugs. Dissociation constants (K_D) were determined with Biacore T200 software using an equation: $K_D = k_{d1} k_{d2} / k_{a1}(k_{d2} + k_{a2})$.

Drugs	K_D of WT-CPR (μM)	K_D of $\Delta 60$ -CPR (μM)
None	1.99 \pm 0.09	1.54 \pm 0.20
AMT (1 mM)	1.31 \pm 0.34	0.48 \pm 0.02
IMP (1 mM)	0.49 \pm 0.05	0.24 \pm 0.16
OPZ (400 μM)	0.89 \pm 0.24	<u>2.35 \pm 0.29</u>
LPZ (100 μM)	0.64 \pm 0.04	<u>2.09 \pm 0.16</u>

第四章

CYP2C19 に対する CPR の電子伝達速度の評価

1. CO 雰囲気下における CPR から CYP2C19 への電子伝達速度の測定

$\Delta 60$ -CPR は OPZ、LPZ 結合型 CYP と複合体を形成することができた。しかし結合親和性が WT-CPR とは異なる傾向を示したため、電子伝達に変化が生じたのではないかと考え、結合に続く段階である CYP への電子伝達について検討を行った。CO 雰囲気下で CYP に第一電子が伝達されると、還元されたヘムに一酸化炭素 (CO) が配位し、Ferrous-CO 型に特徴的な吸収ピークが 450 nm に見られる。この性質を利用し、CO をパージした反応液中で CPR を介して CYP を還元させ、450 nm における吸光度の上昇から第一電子の伝達速度を求めた。この際、反応系に酸素が含まれていると還元されたヘムが酸素と反応して素早く自動酸化を起こしてしまい、Ferrous-CO 型のスペクトルが観測できない。そこで、反応液をセル内に入れてゴム栓で密封し、脱気および CO パージにより酸素を除いた反応系を構築した。450 nm における吸収度の上昇を経時的に追跡し、CO 結合型 CYP2C19 の濃度を求めると Fig. 12 のようにプロットされた。

得られたプロットから、Ferrous-CO 型 CYP2C19 の生成反応は数分から数十分で収束することがわかった。これは他の CYP の還元反応に比べて遅かった(28,47)。しかしながら CYP の還元速度には分子種で大きな差があり、Guengerich らの研究によると、CPR による CYP の還元反応速度定数 k (min^{-1}) は、CYP2E1 では 1900 min^{-1} 、1A2 では 800 min^{-1} であるのに対し、CYP2C9 では 4 min^{-1} と非常に低い値を示している(47)。そのため、CYP2C19 を用いた測定結果は CYP2C 属の還元が他の分子種に比べてかなり遅いことと矛盾しない。

また、得られたプロットから最初の 1 分間のプロットを用いて接線から initial electron transfer rate を算出し、これを電子伝達速度とした。

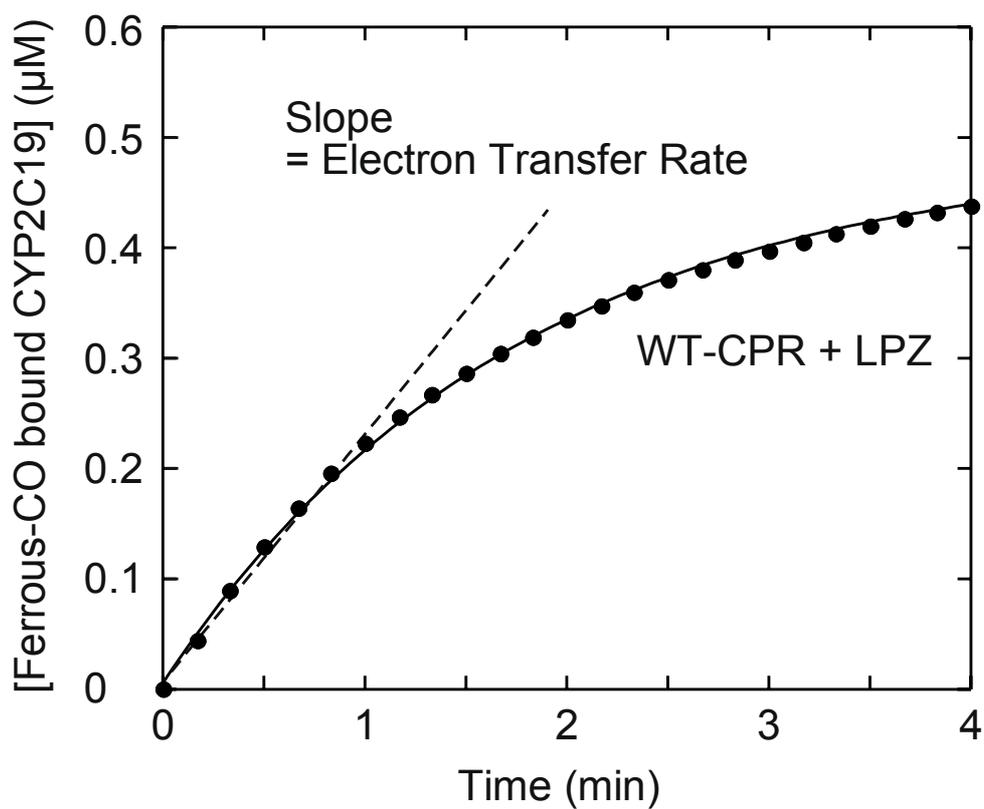


Figure 12. Reduction of CYP2C19 by WT-CPR under CO atmosphere. Absorbance changes at 450 nm of ferrous-CO bound CYP2C19 (1 μM) were monitored in the presence of 0.1 μM CPR and 100 μM NADPH under 1 atm CO in a buffer containing 100 mM potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, 20% glycerol (pH 7.4), 100 μM LPZ and 30 $\mu\text{g/mL}$ DLPC. The reduction rate was estimated with the initial slope of the formation of ferrous-CO bound CYP2C19, as typically observed in the presence of 100 μM LPZ.

2. WT-CPR および $\Delta 60$ -CPR からの CYP2C19 への電子伝達速度の測定

WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR について電子伝達速度の測定を行い、薬物代謝活性測定の時と同様に 4 種の基質及び DLPC の影響について検討した。結果を Fig. 13 と Table 4 に示す。

基質非結合型 CYP2C19 に対する電子伝達速度には WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR の間で大きな差はなく、電子伝達速度はおよそ $0.1\sim 0.15 \mu\text{M of CYP2C19}/\text{min}$ の値を示した。DLPC の有無に関しても大きな差はなく同程度の電子伝達速度を示した。一方、基質結合型 CYP2C19 に対する電子伝達は、CPR と CYP の結合親和性の測定結果と同様に CYP2C19 へ基質が結合することで、基質非結合型 CYP2C19 に対する電子伝達速度とはやや異なる値を示した。AMT と IMP では CYP2C19 に結合しても CPR からの電子伝達速度にはあまり大きな影響は見られなかったが、OPZ や LPZ では電子伝達速度は $0.2\sim 0.28 \mu\text{M of CYP2C19}/\text{min}$ 程度まで上昇していた。特に DLPC 存在下の WT-CPR による電子伝達速度は最も顕著に変化しており、基質非存在下では CYP2C19 に対する電子伝達速度が $0.123 \mu\text{M of CYP2C19}/\text{min}$ であったのに対し、基質結合型 CYP2C19 に対しては AMT、IMP、OPZ、LPZ 結合型に対してそれぞれ 0.153 、 0.178 、 0.277 、 $0.223 \mu\text{M of CYP2C19}/\text{min}$ の電子伝達速度を示した。また、AMT の場合を除いて WT-CPR による電子伝達は DLPC の有無の影響を受けにくいようであった。

一方 $\Delta 60$ -CPR の電子伝達速度を見ると、OPZ 結合型 CYP2C19 に対して WT-CPR よりも電子伝達速度の低下が見られ、 $0.173 \mu\text{M of CYP2C19}/\text{min}$ であった。これは CPR-CYP 結合親和性低下の影響を受けたものではないかと考えられる。また、DLPC が存在しない条件下では、DLPC が存在する系での $\Delta 60$ -CPR の電子伝達速度よりもさらに電子伝達速度が低下しており、OPZ 結合型 CYP2C19 を最も速く還元できる DLPC 存在下の WT-CPR の電子伝達速度 $0.277 \mu\text{M of CYP2C19}/\text{min}$ と比べて、DLPC 非存在下の $\Delta 60$ -CPR は約 1/2 程度の電子伝達速度である $0.122 \mu\text{M}$

of CYP2C19/min で CYP2C19 を還元していた。代謝反応や CPR との結合親和性の測定で OPZ と同じ傾向を示していた LPZ でも同様の影響があり、DLPC 添加時の WT-CPR による CYP への電子伝達速度が 0.223 μM of CYP2C19/min であるのに対して、DLPC 無添加時の $\Delta 60$ -CPR による電子伝達速度は 0.142 μM of CYP2C19/min となった。

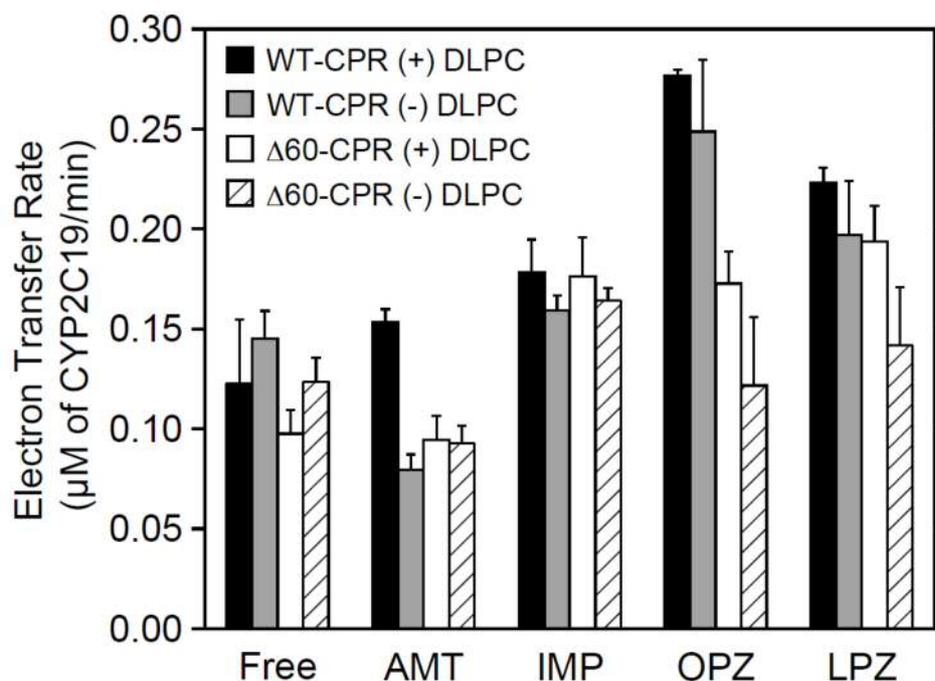


Figure 13. The reduction rates with WT-CPR or $\Delta 60$ -CPR were determined in the absence or presence of AMT (1000 μM), IMP (1000 μM), OPZ (400 μM), and LPZ (100 μM) with or without 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DLPC.

Table 4. Electron transfer rates (μM of CYP2C19/min). AMT, (1000 μM); IMP, (1000 μM); OPZ, (400 μM); LPZ, (100 μM).

	DLPC	Free	AMT	IMP	OPZ	LPZ
WT-CPR	+	0.123±0.032	0.153±0.007	0.178±0.016	0.277±0.003	0.223±0.008
	-	0.145±0.014	0.080±0.008	0.159±0.008	0.249±0.036	0.197±0.027
$\Delta 60$ -CPR	+	0.098±0.012	0.094±0.012	0.176±0.019	0.173±0.016	0.194±0.018
	-	0.124±0.012	0.093±0.009	0.164±0.006	0.122±0.034	0.142±0.029

これらの結果より、CPR から CYP2C19 への電子伝達速度は WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR ではやや差があるものの、 $\Delta 60$ -CPR でも基質結合型 CYP2C19 に電子を伝達できることが分かった。また、OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 に対しては $\Delta 60$ -CPR の電子伝達速度は WT-CPR に比べて低下していたが、これは $\Delta 60$ -CPR と OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 間の結合親和性も同じような傾向を示していたことから、結合親和性に影響を受けているのではないかと考えられる。電子伝達には正しい形で CPR-CYP 複合体が形成されることが重要であり、こうした結合によって電子伝達速度が影響を受けることは十分に考えられる。その一方で結合親和性の観点から考えると、最も高い親和性で CPR-CYP2C19 複合体を形成させた IMP において電子伝達速度は最も大きな値を示すはずである。しかし、DLPC 存在下の WT-CPR が最も速く電子を伝達した CYP2C19 は OPZ 結合型であった。この点をふまえて考察すると、電子伝達速度が変化する要因は大きく 2 つあると考えられる。1 つは本研究でも測定を行った CPR-CYP 結合親和性である。基質が CYP2C19 と結合することで CYP 側の構造変化が引き起こされ、CPR と CYP2C19 の結合が促進されることにより電子の伝達速度が上昇すると考えられる。

そしてもう 1 つが基質の結合による CYP の酸化還元電位の変化である。CYP は通常の状態ではヘムに水が配位した 6 配位の形をとっている。この時、平衡によって水がヘムから解離した 5 配位型の CYP もごく僅かに存在していると考えられている。ここに基質を加えると、基質がヘムポケット内部に結合してヘム上の水を追い出し、5 配位の CYP の割合が増加する。この 5 配位成分の割合の変化の度合いは基質自身の疎水性やヘムポケットのどの位置にどのような強さで結合するのかわ大きく変わると考えられている(48)。このようなヘムポケット内部での基質の結合については共鳴ラマン分光法による測定を用いることでヘムの周辺環境の変化から評価できると考え、測定を試みた。

3. 共鳴ラマン法を用いた基質結合型 CYP2C19 のヘム周辺環境の評価

共鳴ラマン分光法ではヘムの面内伸縮振動を観測することができ、その伸縮振動の中にはヘムの構造や状態と相関するピークが幾つか存在する。また、ヘム鉄を 2 価に還元し CO を第 6 配位子として結合させたときの共鳴ラマンスペクトルを測定すると、ヘム鉄と CO の伸縮振動を示す $\nu(\text{Fe-CO})$ と呼ばれるピークが観測され、ヘムに配位した CO 周辺の極性が変化することにより波数が変化することが知られている(49-51)。一般的に CO 周辺環境が疎水性に傾くほど高波数にシフトするため、この伸縮振動のピークを観測することで基質の結合によるヘム周辺環境の変化を検出することができる。Fig. 14 は基質存在下における CO 結合還元型 CYP の共鳴ラマンスペクトルであるが、4 種類の基質結合型の CYP2C19 において $\nu(\text{Fe-CO})$ を見てみると、AMT と IMP の場合では 472 cm^{-1} 、 471 cm^{-1} と基質非結合型の 469 cm^{-1} に比べて波数変化は小さかった。一方、OPZ と LPZ では 488 cm^{-1} と 479 cm^{-1} であり、AMT や IMP と比べて大きな波数シフトが見られた。高波数へのシフトはヘムポケットがより疎水的な環境になったことを示しており、OPZ や LPZ が CYP2C19 に結合すると AMT や IMP との結合よりもヘムポケットを疎水的な環境に変え、水をよりヘム上から追い出しやすくなると考えられる。そして基質結合により 5 配位となった CYP2C19 はヘムの酸化還元電位が変化してより電子を FMN から受け取りやすくなる。こうしたメカニズムにより、OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 では電子伝達速度が AMT、IMP 結合型 CYP2C19 よりも速くなったと考えられる。

したがって、本研究で得られた CYP2C19 への電子伝達速度の測定は CPR-CYP 結合性の要因と酸化還元電位の要因の 2 点から、 $\Delta 60$ -CPR でも CYP2C19 へ電子が伝達できたことを矛盾なく示す結果と言える。

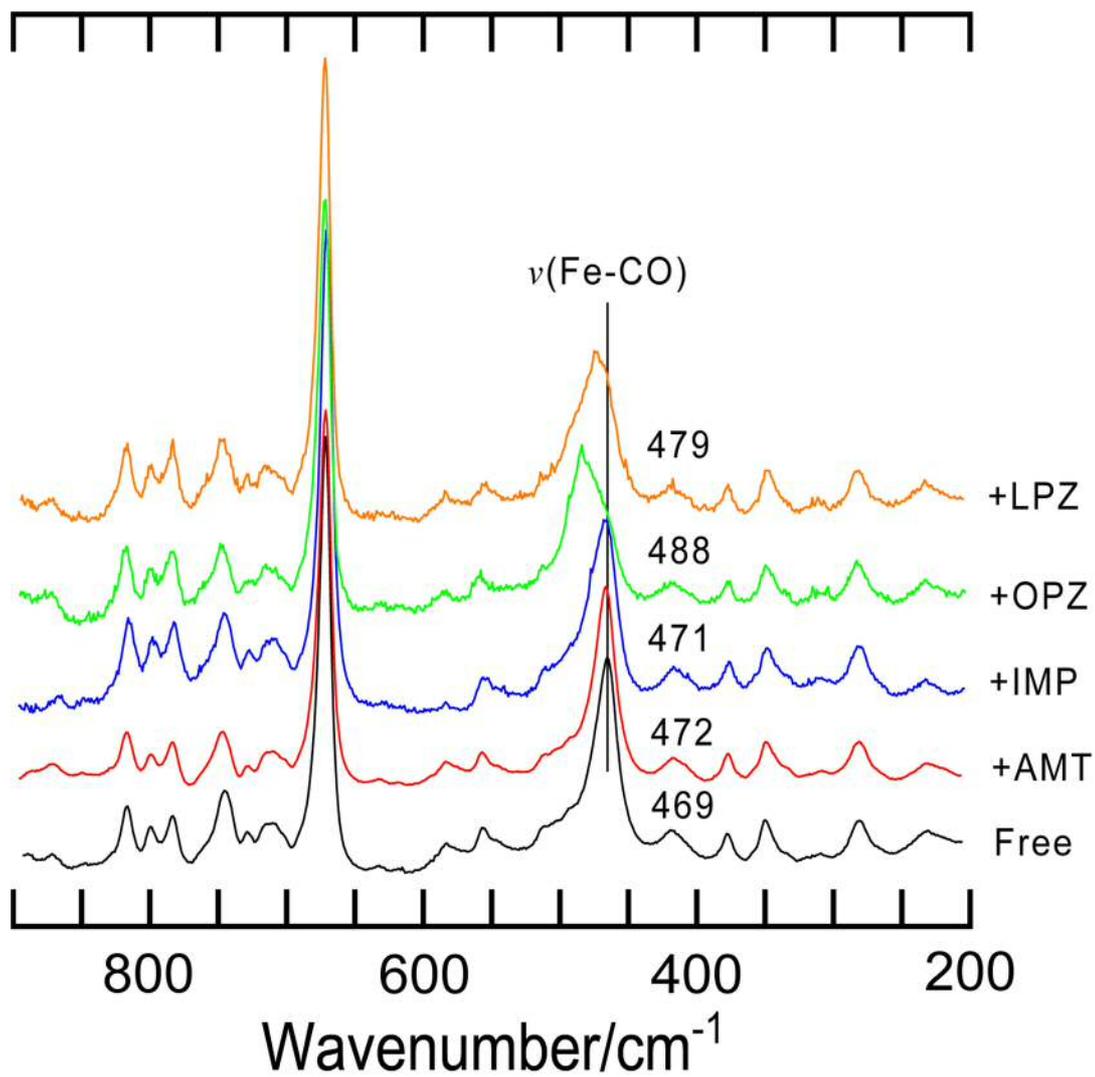


Figure 14. Resonance Raman spectra of ferrous-CO bound CYP2C19 in the absence and presence of AMT (1000 μM), IMP (1000 μM), OPZ (400 μM), and LPZ (100 μM).

第五章

CYP2C19 の薬物代謝における uncoupling 反応の測定

1. 活性酸素種の定量による uncoupling 反応検出法の構築

Fig 15. に CYP の反応サイクルを示す。これを見ると、電子伝達後に CYP のヘム上で生じる反応にはプロトンの供給が必要である。2 度の電子の供給により、ヘム上に配位した酸素はラジカル型になっており、ここに 2 つのプロトンが供給され、酸素の O-O 結合が開裂されて compound I と呼ばれる非常に反応性が高い酸化活性種が生じる。CYP の薬物代謝反応においてはこの compound I の形成が非常に重要であり、この compound I が基質の特定の部位と接近することで一原子酸素添加反応が起きる。もし酸素へのプロトンの供給に異常が生じると、compound I の形成が阻害されてヘム上の酸素は shunt 経路と呼ばれる経路で活性酸素に変化してしまう(52)。私は、 $\Delta 60$ -CPR において OPZ と LPZ の代謝反応が消失したのは、CPR の膜結合領域がこのプロトンの供給に関与しているためではないかと考え、shunt 経路で生じる活性酸素を定量することで仮説の検証を行った。

Uncoupling 反応とは CPR からの電子によって活性化された酸素がヘムから脱離して shunt 経路により活性酸素種へと変化してしまう反応である(53)。逆に、電子伝達と共役し、正常に O-O 結合が開裂して compound I が生成する反応を coupling 反応と呼ぶ。Uncoupling/coupling 反応の分岐はプロトンの供給が正常に起きるかどうかにによって左右されると考えられるが、プロトンの供給を直接観測することは難しい。そこで、shunt 経路によって生成される活性酸素種を定量することで、どれくらいの頻度で uncoupling 反応が起きているのかを決定することを考えた。Fig.15 の CYP の反応サイクル中で shunt 経路と呼ばれる経路は 3 つ存在する(54)。それぞれ(1) auto-oxidation shunt、(2) peroxide shunt、(3) oxidase shunt であり(53,55,56)、この内 oxidase shunt は compound I が基質を酸化できない場合に生じる

経路であると考えられる。それぞれの shunt 経路ではスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、水 (H_2O) が生成される。この内、 $O_2^{\cdot-}$ は寿命が非常に短くすぐさま H_2O_2 へと変化するため、 H_2O_2 の生成量を調べる事で電子がどれくらい有効に消費されたのかが判断できると考えた。

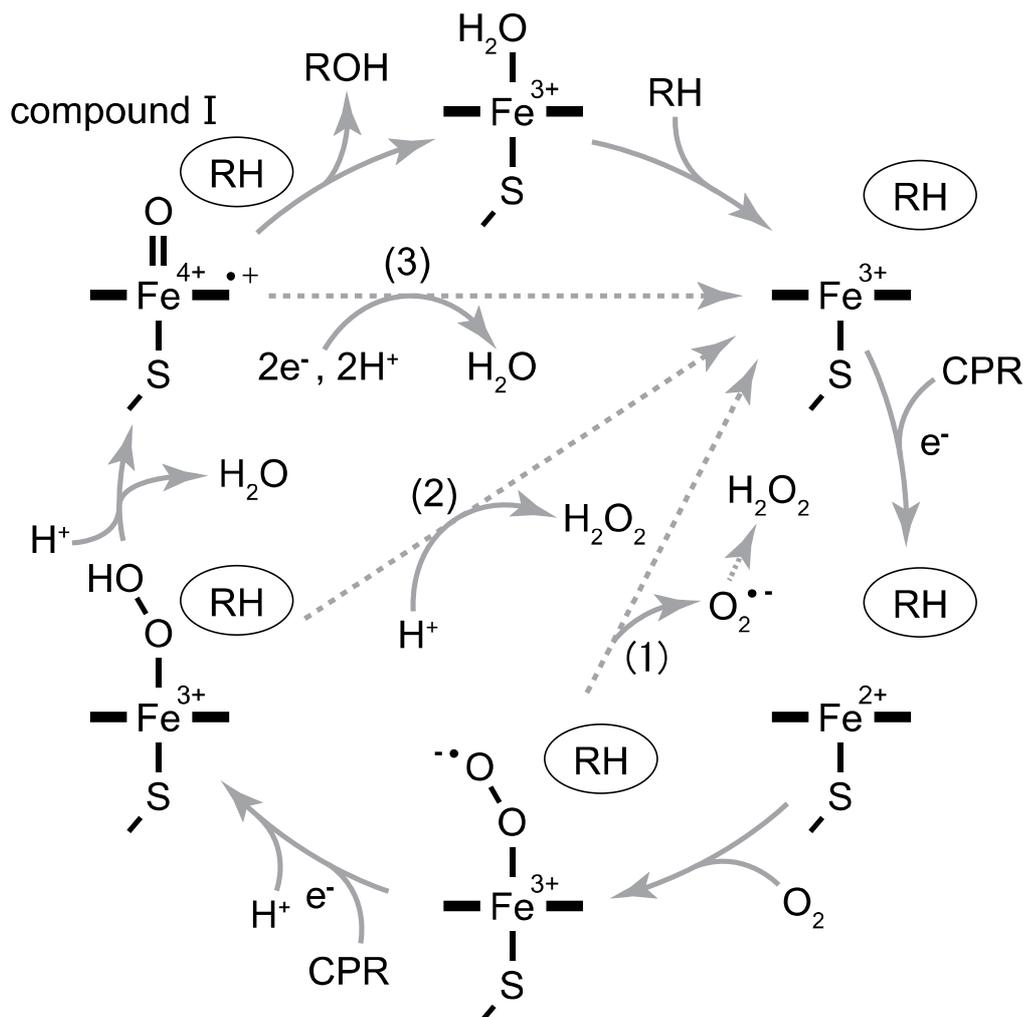


Figure 15. Catalytic cycle of CYP (54). One mole of a drug is converted to its metabolite with one mole of oxygen, two moles of electrons, and two moles of protons. The uncoupling reaction that wastes electrons is classified into (1) auto-oxidation, (2) peroxide, and (3) oxidase shunts, which are depicted with dashed gray lines.

そこで 100 μM の NADPH を CYP2C19 の代謝反応で消費させ、生成された代謝物及び H_2O_2 を定量した。NADPH は 1 分子で 2 当量の電子を CPR に供給することができる。また、1 分子の基質を代謝するために必要な電子も 2 当量であり、peroxide shunt によって生成される H_2O_2 が 1 分子生じるために必要な電子も 2 当量である。さらに、oxidase shunt で H_2O が生成される場合には 4 当量の電子が必要であり、100 μM の NADPH を全て CYP の代謝反応によって消費させた場合、測定により定量することが難しい H_2O の生成量を以下の式によって求めることができる(57-59)。

$$\text{Equation 4 : } [\text{H}_2\text{O}] = ([\text{NADPH}] - [\text{Metabolites}] - [\text{H}_2\text{O}_2])/2$$

H_2O_2 の定量には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とその基質となる蛍光試薬を用いた測定キット (Enzo) を使用した。濃度が既知の標準 H_2O_2 を用いて検量線を作成し、その検量線よりサンプルの H_2O_2 濃度を算出した。また、精製が不十分なタンパク質には大腸菌由来のカタラーゼが混入し、 H_2O_2 を分解して測定を妨げる可能性がある。そこで測定には高純度に精製した CPR と CYP を使用し、あらかじめ標準 H_2O_2 と混ぜても H_2O_2 が分解されないことを確認した。

2. 活性酸素種および代謝物の定量による uncoupling/coupling 反応の検出

WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR による電子の供給によって CYP2C19 が生成した H_2O_2 および各基質の代謝物の濃度、計算によって求められた H_2O の生成量を Table 5 に示す。まず、基質が入っていない反応系では WT-CPR でも $\Delta 60$ -CPR でも約 $40 \mu M$ の H_2O_2 が生成した。これは、薬物代謝が起こらなくても、CPR から CYP2C19 に電子が伝達された後、CYP の shunt 経路によって一定量の電子が消費されていることを示している。また、 H_2O の生成量も計算により求められたが、CYP2C19 が基質と結合していない状態でも compound I の形成は一定の割合で起きることがわかった。

しかし、基質を反応系に加えて CYP による代謝反応が起きると、WT-CPR を用いた場合には H_2O_2 生成量が著しく減少した。この時の H_2O_2 生成量の減少割合は基質の種類によって異なり、AMT、IMP では特に著しい減少が見られた。一方、 $\Delta 60$ -CPR でも AMT や IMP を加えた場合には H_2O_2 生成量が減少したが、WT-CPR ほど著しくはなかった。OPZ、LPZ を加えた場合には H_2O_2 の生成量は $40\sim 50 \mu M$ ほどとなり、基質を反応系に入れていない場合と同程度の H_2O_2 生成量となった。また、それぞれの条件下での基質の代謝量を比較すると、 H_2O_2 生成量が少ない条件ほど代謝反応が活発に行われる傾向にあった。DLPC の存在も H_2O_2 や代謝物生成に影響を与えており、WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR の両方において全ての基質の代謝反応で H_2O_2 生成量が DLPC の添加によって減少していた。さらに、 H_2O の生成量も計算によって求めたが、どの条件下でもほぼ一定量が生成されており、oxidase shunt 経路は CYP の薬物代謝反応にあまり影響を与えないことがわかった。

Table 5. Production of H₂O₂, H₂O, and metabolites by drug metabolism. Absorbance of NADPH at 340 nm was measured to follow the complete consumption of 100 μM NADPH, and the amounts of metabolites and H₂O₂ were determined. The amounts of H₂O produced by shunt path 3 were calculated with equation 4.

Drugs	CPRs	DLPC	H ₂ O ₂ (μM)	metabolites (μM)	H ₂ O (μM)
None	WT	+	41.7 ± 0.6		29.5
		-	39.2 ± 0.5		30.0
	Δ60	+	42.5 ± 2.6		31.1
		-	41.1 ± 2.2		31.1
AMT	WT	+	8.9 ± 0.4	38.9 ± 0.1	26.1
		-	17.9 ± 2.1	24.3 ± 0.7	28.9
	Δ60	+	21.5 ± 1.9	24.9 ± 0.7	26.8
		-	24.5 ± 0.5	18.1 ± 1.6	28.7
IMP	WT	+	2.6 ± 0.4	49.7 ± 2.0	23.9
		-	6.5 ± 1.6	36.3 ± 4.4	28.6
	Δ60	+	15.8 ± 0.6	40.7 ± 0.3	21.7
		-	18.5 ± 0.5	33.1 ± 0.6	24.2
OPZ	WT	+	21.7 ± 0.8	15.3 ± 2.4	31.5
		-	25.6 ± 0.4	6.8 ± 0.1	33.8
	Δ60	+	39.9 ± 0.8	0	30.1
		-	42.7 ± 2.7	0	28.7
LPZ	WT	+	18.4 ± 1.0	6.5 ± 2.1	37.5
		-	24.9 ± 0.6	4.0 ± 0.2	35.5
	Δ60	+	45.5 ± 0.7	0	27.2
		-	48.9 ± 1.3	0	25.6

第六章

考察

1. CYP2C19 に対する CPR の結合親和性

Biacore を用いた測定の結果より、CYP2C19 は基質と結合することで WT-CPR との結合親和性が上昇することが分かった。この結合親和性の変化は CYP2C19 に基質が結合すると CYP2C19 の CPR との結合に関与する部分の構造が変化することで生じると考えられる。そのような構造変化を起こす部位として CYP2C19 の近位側に存在する C-ヘリックスが挙げられる。C-ヘリックス上には CPR との結合に関与している塩基性アミノ酸残基が局在している(25,26)。そのため、C-ヘリックスは CPR との結合において重要な役割を果たすが、結晶構造に関する Scott や Zhao らの報告により CYP2B4 の薬物結合型では非結合型と比べて C-ヘリックスの位置がより外側へ動いていることが示されている(60,61)。

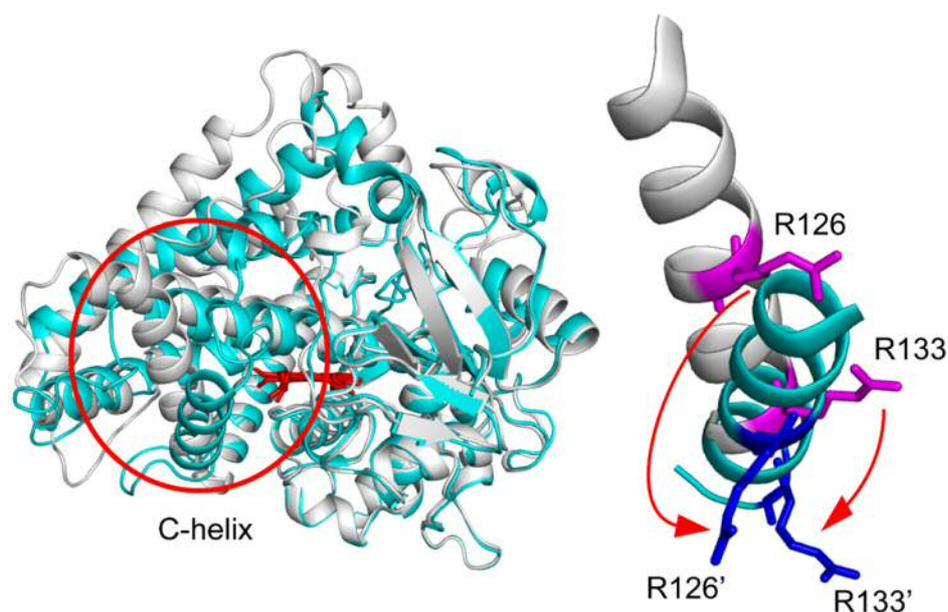


Figure 16. Comparison between drug-bound (cyan) and -free (white) CYP2B4 crystal structures. The amino acids that face CPR (R126 and R133) on the C-helix are highly conserved, and the C-helix of CYP2B4 changes its conformation by the drug binding.

このことから、CYP は薬物と結合すると CPR との結合に関与するアミノ酸残基の位置が変化し、それに対応して CPR の FMN ドメインの結合する向きや角度が変化することで結合親和性の変化が起こると予想される。このように CPR と CYP の相互作用が変化すると、基質が結合していない CYP に電子を供給してしまう還元当量の浪費を防ぐだけでなく、生体に有害な活性酸素の発生を抑制する仕組みにもなりえるため、生理的にも意義がある相互作用メカニズムであると言える。

一方、 $\Delta 60$ -CPR でも AMT、IMP 結合時には CYP2C19 に対する K_D の値の低下があり、CYP の構造変化に応じた結合ができていると考えられた。しかし、OPZ、LPZ の場合には WT-CPR とは違って K_D の値の低下が見られず、やや上昇していた。このことから、 $\Delta 60$ -CPR は OPZ や LPZ 結合型 CYP2C19 の構造変化に応じた結合ができず、その要因が膜結合領域にあるのではないかと考えられた。つまり、AMT、IMP 結合時における CYP2C19 と CPR の複合体は双方の親水性ドメイン同士の静電的相互作用のみで生じたが、OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 と CPR の複合体形成には静電的相互作用だけではなく、CPR の膜結合領域を構造上必要としている可能性が高い。Biacore による K_D 値の測定では脂質膜が存在していないため、CPR の膜結合領域はアンカーとしては機能していない。また、OPZ、LPZ を CYP に結合させた際には $\Delta 60$ -CPR と WT-CPR で K_D に差が見られたことから、CYP との複合体形成に膜結合領域が持つ疎水性が関与しており、CYP の疎水性を持った部位と接近することでこの複合体の安定化に寄与していることも考えられる。

しかし、 $\Delta 60$ -CPR は CYP に対して全く結合できなかったわけではなく、結合親和性の低下によって OPZ や LPZ の代謝反応が全く見られなくなったとは言い難い。そこで $\Delta 60$ -CPR は CYP と複合体を形成できているにもかかわらず、OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 に電子を伝達することができないのではないかと考え、次に結合後の電子伝達についての評価を行った。

2. CYP2C19 に対する CPR の電子伝達

CPR から CYP2C19 への電子伝達速度の測定により、まず基質が結合することで電子伝達速度が速くなることが分かった。これは、CYP2C19 に基質が結合することで、CYP2C19 に対する CPR の結合親和性の変化と CYP2C19 の酸化還元電位の変化が引き起こされるためであると考えられる。また、OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 との結合親和性が WT-CPR に比べて低下していた $\Delta 60$ -CPR では、OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 への電子伝達速度も同様に低くなっていた。こうした相関により、 $\Delta 60$ CPR は OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 との結合が生じにくくなっていると言え、CPR の膜結合領域は OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 との結合に関与している可能性が示唆された。

しかしながら、 $\Delta 60$ -CPR は OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 と複合体を形成して電子を供給することは可能であり、電子を伝達できる CPR-CYP2C19 複合体の形成が行われていると考えられる。本研究におけるこれらの結果は $\Delta 60$ -CPR で還元された CYP2C19 が OPZ や LPZ を代謝できなかった原因が、CYP と CPR との結合親和性や電子伝達の点にあるという仮説を否定するものとなった。そのため、代謝反応が起こらない原因は電子伝達後の過程にあるのではないかと考えた。

3. Uncoupling 反応が CYP2C19 の薬物代謝に与える影響

ここまでの実験結果より、 $\Delta 60$ -CPR が結合した CYP では uncoupling 反応を生じやすく、特に OPZ、LPZ 結合型 CYP では $\Delta 60$ -CPR から供給された電子が shunt 経路により活性酸素の生成に消費されてしまうことが分かった。これはつまり、CPR の膜結合領域が compound I の形成に関与していることを示している。これまでに、CYP における compound I の形成にはヘムのすぐ上に存在する I-ヘリックスが重要な機能を果たすことが報告されている(62,63)。I-ヘリックス上には全ての CYP 分子種において保存度が高いスレオニン残基がヘムに向いて存在している (Fig. 16)。Imai らの研究により、このスレオニン残基をアラニンやバリンに置換したところ、compound I の形成が抑制されて H_2O_2 が遊離してくることが確認され(52)、スレオニンとその近くに存在する水分子やヘム上の酸素分子との間に水素結合ネットワークが構築されていると考えられた。このネットワークはヘム上の活性化された酸素にプロトンを供給するとともに O-O 結合の開裂を促進し、compound I を形成させる(62,63)。

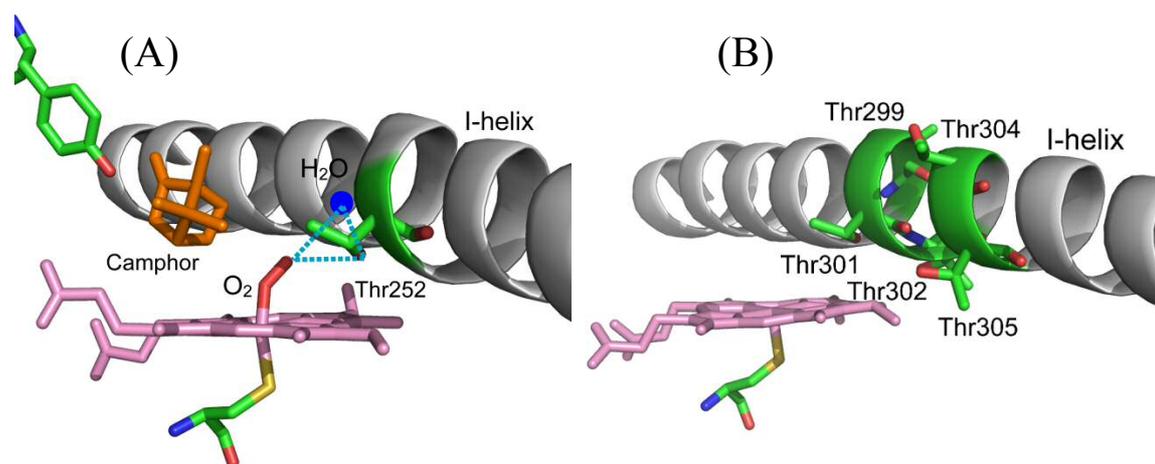


Figure 17. Crystal structures of P450_{cam} (A, PDB:1DZ8) and CYP2C19 (B, PDB:4GQS). A putative hydrogen bonding network, which involves the conserved threonine, water, and oxygen, is shown (A). CYP2C19 has five threonine residues above the heme, and they may compose a complicated hydrogen bonding network.

上述のように、compound I 形成には CYP の遠位側 (I-ヘリックス側) の水素結合ネットワークが重要な役割を演じている。一方、CPR は CYP の近位側に結合するが、これが compound I 形成メカニズムにどのような影響を与えるのだろうか。これに関しては緑濃菌の CYP である P450_{cam} の X 線結晶構造解析により重要な手がかりが示されている。2013 年に Tripathi らによって P450_{cam} とその還元酵素であるプチダレドキシンの複合体の結晶構造が明らかになり、プチダレドキシスが P450_{cam} の近位側に結合することで、P450_{cam} の遠位側にある I-ヘリックスが動いてスレオニン残基の位置が変化し、酵素反応に適した構造になることが示唆された(64)。CYP2C19 でも同様に CPR との結合が遠位側 I-ヘリックスの構造に影響を与えると考えられる。したがって、 $\Delta 60$ -CPR による代謝活性の消失は、膜結合領域の欠失が CYP2C19 との結合様式に影響を与え、compound I の形成を阻害したためではないかと思われる。

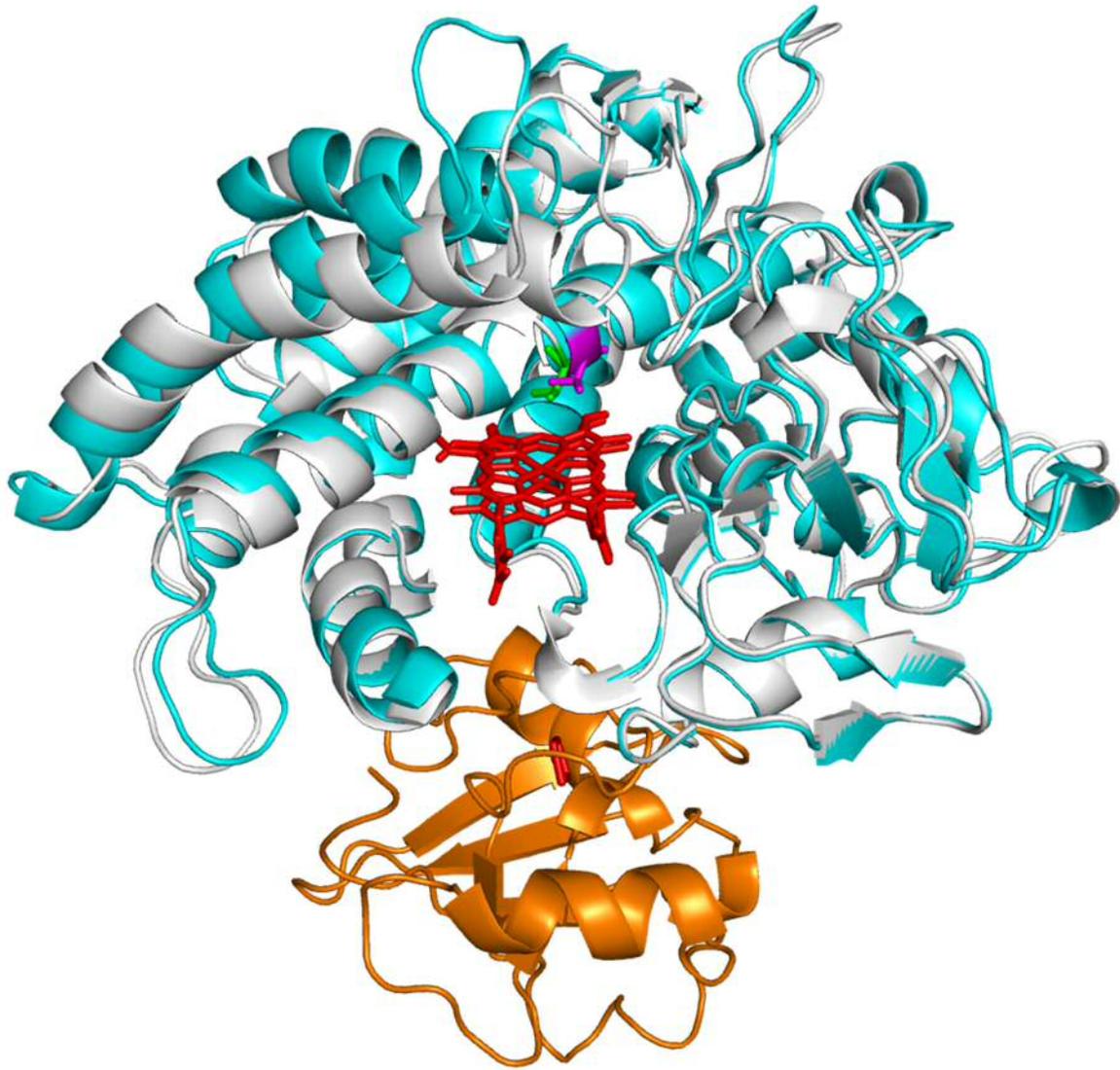


Figure 18. Comparison between putidaredoxin-bound (cyan, PDB: 4JX1) and -free (white, PDB: 3L63) P450_{cam} crystal structures. The putidaredoxin is shown in orange. Threonine 252 (T252) on the heme are highly conserved, and the position of T252 (green, before docking; purple, after docking) changes by the docking of putidaredoxin.

それでは、膜結合領域はどのように CYP との複合体形成に寄与していたのだろうか。私の実験結果からまず言えることは、膜結合領域による作用は脂質膜がない条件下でも働くということである。CYP2C19 の代謝活性測定の結果 (Table 2) や、CPR の CYP2C19 に対する結合性の測定 (Table 3)、uncoupling 反応の測定などの実験結果を見ると、WT-CPR は脂質膜がない条件下でも CYP2C19 と強く結合すると同時に、uncoupling 反応の抑制と CYP2C19 の OPZ、LPZ 代謝反応が確認されている。これに対して同じ条件下での測定で $\Delta 60$ -CPR は OPZ、LPZ の反応系で uncoupling 反応の抑制が全く行われていない。そのため、CPR の膜結合領域はその構造自体の影響で CYP との複合体を安定化させていると考えられる。このような CPR-CYP 複合体安定化の機構として疎水性相互作用が考えられる。CYP 側の疎水性アミノ酸残基を変異させることで CPR との結合性や基質代謝活性が低下したという過去の報告があり(26)、疎水性相互作用によって CPR と CYP は結合の向きを決めているのではないかと考えられる。疎水性アミノ酸残基同士の相互作用によって CPR と CYP の結合する向きが正しく決まり、電荷を帯びたアミノ酸残基同士の静電的な相補性が保たれることで、CPR と CYP の複合体が安定化していると思われる。

また、私の研究において uncoupling 反応の測定より、基質の結合も compound I の形成に影響を与えていることが明らかになった。基質非結合型 CYP では約 40% の電子が CYP の反応サイクル (Fig. 15) における(1)(2) 経路の uncoupling 反応で消費されていたが、IMP が CYP に結合すると WT-CPR では uncoupling 反応が 90% 以上抑制された。抑制の度合いは基質によって異なっており、その要因としてヘムポケット内部での基質の位置やヘム周辺環境の変化が挙げられる。第四章でも述べたが、CYP2C19 の基質存在下における CO 結合還元型共鳴ラマンスペクトルの結果より、CYP に結合する基質の種類によってヘムポケット内部の環境が大きく変化していることがわかった。これは基質の疎水性や CYP への結合の様式、位

置などが強く影響していると考えられる。こうしたヘムポケットの環境の違いが I-ヘリックス上のスレオニン残基の向きや位置に影響を与えることで、水素結合ネットワークに差が生まれると考えられる。また、P450_{cam} では 252 位にスレオニン残基があるが、ヒトの CYP2C 系の分子種には複数のスレオニン残基がヘム近傍に局在している(29)。これら複数のスレオニンが基質ごとに異なったプロトンネットワークを構築している可能性があり、uncoupling 反応の抑制度合いに差が生まれるのではないかと思われる。

ヘムの近位側軸配位子であるシステイン残基についても還元酵素の結合が影響を与え、ヘム上の O-O 結合開裂を促進することが報告されている(65)。このような還元酵素による一種のエフェクター的な作用というのは CPR ではこれまでに報告はなく、本研究によって CPR の膜結合領域がその機能に関与していることが示唆された。

総括

本研究ではヒト CPR の膜結合領域を欠損させた $\Delta 60$ -CPR を作製して WT-CPR と機能を比較し、膜結合領域を失った CPR が CYP に対するどのような機能を失うのかを特定することで、膜結合領域の役割と CYP の活性化機構を解明することを試みた。

まず $\Delta 60$ -CPR と WT-CPR は NADPH に対する結合性と cyt. *c* への電子伝達機能に関して差がなかったことから、CPR 分子内および CPR-CYP 分子間の電子伝達機能について膜結合領域の有無は影響を与えないことがわかった。このことから、CPR の膜結合領域は CPR が CYP に対して作用する時に重要な働きを示すのではないかと考えられた。

実際に CYP2C19 の基質代謝活性を測定すると、 $\Delta 60$ -CPR を用いた場合には代謝活性の低下 (AMT と IMP) と消失 (OPZ と LPZ) が観測された。脂質膜を加えない反応系でも測定を行ったが、OPZ と LPZ の代謝反応系では WT-CPR と $\Delta 60$ -CPR の間で活性に明確な差が見られたため、膜結合領域の役割は単なる脂質膜へのアンカーではなく、CYP2C19 の活性化に関わるものではないかと考えるに至った。そこで CPR-CYP 間の結合親和性と電子伝達活性の評価を行ったところ、CPR は膜結合領域を失うことで OPZ や LPZ と結合した CYP2C19 との複合体形成能が低下することが分かった。このことから CPR の膜結合領域は CYP2C19 との結合に関与することが示唆された。しかし電子伝達は $\Delta 60$ -CPR でも可能であり、当初予想されたような CPR-CYP 結合の不具合による電子伝達活性の消失は確認されなかった。そのため、 $\Delta 60$ -CPR の OPZ、LPZ 結合型 CYP2C19 への結合親和性の低下には電子伝達に大きな支障をきたすほどの影響はないことがわかった。これらの結果より、CPR の膜結合領域の主な機能は CYP への結合や電子伝達の促進でもないと考えられた。

そこでさらに、電子伝達後の CYP2C19 に供給された電子の消費経路を調べるために電子の浪費となる uncoupling 反応による活性酸素の発生量を定量した。その結果、 $\Delta 60$ -CPR では活性酸素の発生が著しく増加しており、ほとんどの電子が H₂O₂ の生成に消費されていた。この結果より、CPR の膜結合領域は uncoupling 反応の抑制を担っており、CYP へのプロトンの供給を促進して高酸化中間体である compound I を形成させ、基質代謝反応を正常に機能させているのだと結論付けた。

では何故 CPR の膜結合領域はこうした機能を持つようになったのだろうか。CPR はヒト以外の生物でも見られ、哺乳類から植物、微生物にわたって非常に広い分布を持つフラビンタンパク質である。その還元対象には親水性のヘムタンパク質である cyt. *c* なども含まれるが、膜タンパク質である CYP が主である。CYP は緑膿菌のような細菌類では親水性のタンパク質であるが、真核生物では膜結合型のタンパク質として存在している。そのため、CPR も CYP の変化に応じて膜結合性を獲得した可能性が高い。また、真核生物の CYP は細菌類のものに比べてヘムポケットが広く、進化の過程で疎水性が高い様々な基質と結合できる性質を獲得している(29,66,67)。こうして CYP が多種の基質との反応を担うようになり、それに応じて CPR も様々な基質-CYP 複合体と結合できるように適応してきたのではないかと考えられる。

近年、CYP の反応を有機合成などに利用する例が現れている。例えば田中らのサントリーの研究グループは CYP が植物において花卉の青色素であるデルフィニジンの合成に用いられていることに着目し、バラにパンジーの CYP を導入することで青いバラの開発に成功した(68)。このように CYP は単にヒト体内での薬物代謝を司るだけでなく、触媒として応用できる可能性を秘めている。また、本研究で明らかとなった CPR と CYP の複合体形成の仕組みを利用することで、特定の基質と結合した CYP をより強力に活性化できるように CPR の機能を改変することもできるようになるのではないかと考えられる。今後こうした CYP につい

ての研究成果が科学の応用分野に活かされ、私達の生活をより良いものへと進歩させることに繋がると期待したい。

実験の部

試薬

1) DNA の精製、遺伝子組換え及び変異体の調製

•QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
•変異導入プライマー	北海道システムサイエンス
•Minipreps DNA purification system	Promega
•PCRpreps DNA purification system	Promega
•制限酵素 : <i>Nde</i> I、 <i>Bam</i> HI、 <i>Bam</i> HI buffer、×10 BSA	New England Biolabs
•DNA Ligation Kit Ver 2.0	TAKARA
• <i>Dpn</i> I	Promega
•pBEX vector	本研究室で作製
•CYP2C19WT 全合成遺伝子	本研究室で作製
•WT-CPR 遺伝子	千葉大学医学部附属病院薬剤部より恵与
•XL-1 Blue MRF'	Stratagene
•BL-21 GOLD (DE3)	Stratagene
•pCold I	TAKARA

2) アガロースゲル電気泳動

•50×TAE buffer	MILLIPORE
•1.0 % Agarose gel	
Agarose NA (GE Healthcare)	1 g
50×TAE buffer	100 mL
•Loading dye	
Bromophenol Blue (KATAYAMA CHEM)	25 mg
Xylene Cyanole FF (KATAYAMA CHEM)	25 mg
Glycerol (Wako)	3 mg
Milli-Q	10 mL

•Molecular weight marker

1 kb DNA Ladder (GIBCO BRL)	10 μ L
Milli-Q	10 μ L
Loading dye	5 μ L

•染色液

Ethidium Bromide Solution (Bio Rad)	50 mL
1 \times TAE	200 mL

3) DNA 配列の確認

•Thermo Sequenase Primer Cycle Sequence Kit	GE Healthcare
•M13 Forward (-29) / IRD700	ALOKA
•M13 Reverse/ IRD700	ALOKA
•IRD 700 Labeled Custom Forward Primer	ALOKA
•IRD 700 Labeled Custom Reverse Primer	ALOKA
•Stop Solution	LI-COR
•Urea	Wako
•Long Ranger 50% Gel Solution	TAKARA
•Ammonium Persulphate	Amersham Biosciences
•N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Amersham Biosciences
•10 \times TBE buffer	

TRIZMA BASE (SIGMA)	54 g
ホウ酸	27.5 g
EDTA \cdot 2Na (DOJINDO)	4.15 g
<hr/>	
MilliQ	500 mL

4) 大腸菌の大量培養

•Ampicillin	Wako
•5-Aminolevulinic Acid hydrochloride (5-ALA)	COSMO BIO

•前培養用 LB 培地

Bacto™ Tryptone	2 g
Bacto™ Yeast Extract	1 g
NaCl (Wako)	1 g
<u>5 M NaOH (Wako)</u>	<u>40 μL</u>
Elix 水	200 mL

•CPR 本培養用 LB 培地

Bacto™ Tryptone	10 g
Bacto™ Yeast Extract	5 g
NaCl (Wako)	5 g
5 M NaOH (Wako)	40 μL
<u>1 M potassium phosphate buffer (pH 7.7)</u>	<u>200 mL</u>
Elix 水	1 L

•TB 培地

Bacto™ Tryptone	24 g
Bacto™ Yeast Extract	48 g
Glycerol (Wako)	8 mL
<u>1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)</u>	<u>200 mL</u>
Elix 水	2 L

•LB 寒天培地

Agar powder (Wako)	3 g
LB 培地	200 mL

5) タンパク質精製

a) CPR の精製

•Potassium Phosphate	Wako
•Glycerol	Wako
•EDTA・2Na	DOJINDO
•Sodium Chloride (NaCl)	Wako

•Lysozyme	SIGMA
•Deoxyribonuclease I	SIGMA
•Triton X-100	Wako
•CHAPS	DOJINDO
•DTT	Wako
•Imidazole	Wako
•Ni-NTA Agarose	QIAGEN
•2'5'ADP Sepharose	GE Healthcare
•2-AMP	SIGMA
•β-NADP ⁺ -K	Wako
•Trizma	SIGMA
•Sodium Acetate	Wako

b) CYP の精製

•Potassium Phosphate	Wako
•Glycerol	Wako
•EDTA・2Na	DOJINDO
•Lysozyme	SIGMA
•Deoxyribonuclease I	SIGMA
•CHAPS	DOJINDO
•Triton X-100	Wako
•DEAE-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
•Sodium Chloride (NaCl)	Wako
•Octyl-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
•Bio-Gel® HT Hydroxyapatite	Bio Rad

6) SDS-PAGE

•10×Tris/Glycine/SDS buffer	Bio Rad
•2-Mercaptoethanol	SIGMA
•Protein Standard	Bio Rad

- Laemmli Sample buffer Bio Rad
- PAGEL-Compact ATTO

7) Western Blotting

- Methanol Wako
- PVDF membrane MILLIPORE
- Skim milk Morinaga
- 1st Antibody Anti-Human CYP2C9 日本農産工業
- 2nd Antibody Anti-Rabbit Ig, HRP-Linked Whole Ab Amersham Biosciences
- Triton X-100 Wako
- Magic Marker Invitrogen
- iBlot Gel Transfer Stacks Mini Invitrogen
- TBS buffer

Trizma base (SIGMA)	6.1 g
NaCl (Wako)	9 g
<hr/>	
Milli-Q	1 L
- ECL Western Blotting Detection Reagents GE Healthcare

8) 各種測定

- Amitriptyline Wako
- Imipramine SIGMA
- Lansoprazole SIGMA
- Omeprazole Wako
- Potassium Ferricyanide Wako
- Sodium Hydrosulfite Wako
- Acetonitrile Wako
- Methanol Wako
- Acetic Acid (LC/MS 用) Wako
- 1,2-Didodecanoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine SIGMA
- Cytochrome *b*₅ SIGMA
- Glucose-6-Phosphate dehydrogenase Wako

•Glucose-6-Phosphate	Wako
• β -NADP ⁺ -K	Wako
•NADPH generating system	BD Gentest
•Cytochrome <i>c</i> , from horse heart	SIGMA
•Nickel (II) Chloride Hexahydrate	Wako
•Tween 20	SIGMA
•HBS-N (x10 running buffer)	GE Healthcare
•Hydrogen peroxide fluorometric detection kit	Enzo

実験機器

冷却遠心機 7930	KUBOTA
冷却遠心機 7000	KUBOTA
冷却遠心機 3700	KUBOTA
卓上遠心機 centrifuge 5417C	Eppendorf
卓上遠心機 centrifuge 5418	Eppendorf
DNA シークエンサー DNA Analyzer GENE READ IR 4200	LI-COR
DNA 電気泳動装置 Mupid ミニゲル電気泳動装置	ADVANCE
フォトドキュメンテーションシステム TCP-20M	VILBER LOURMAT
サーマルサイクラー TECHNE TC-3000	Barloworld Scientific
超音波発生装置 SONIFIER 450	BRANSON
超遠心機 Optima XL-100K	BECKMAN COULTER
Optima L-90K	BECKMAN COULTER
超遠心用ローター Type 50.2 Ti	BECKMAN COULTER
超遠心用ローター Type 45 Ti	BECKMAN COULTER
フラクションコレクター MODEL 2110	Bio Rad
タンパク質電気泳動装置 COMPACT PAGE AE-7300	ATTO
紫外可視分光光度計 DU-800	BECKMAN
蛍光光度計 FP-6500	JASCO
pH メーター pH METER F-52	HORIBA
pH ガラス電極 LAQUA ELECTRODE	HORIBA
ラマン分光計 NR-1800	JASCO
Kr+ レーザー Innova 302C	Coherent
超高感度冷却 CCD 検出器 BU-120	ANDOR
恒温槽 THERMO MINDER SDmini	TAITEC
卓上型恒温振盪槽 PERSONAL-11	TAITEC
恒温振盪培養器 Innova 4330	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
BioShaker BR-22FP	TAITEC
アスピレータ ASP-13	IWAKI

純水製造装置 Elix 5	MILLIPORE
超純水製造装置 Milli-Q Synthesis A10	MILLIPORE
超純水製造装置 Milli-Q Integral 5L バイオタイプ	MILLIPORE
オートクレーブ SX-500	TOMY
ブロッキング装置 iBlot Gel Transfer Device	Invitrogen
化学発光検出器 ChemiDoc XRS	Bio Rad
HPLC 装置 Agilent 1100 series	Agilent
HPLC カラム TSK-GEL Super-ODS	TOSOH
UPLC 装置 Acquity UPLC-H Class	Waters
ACQUITY UPLC CSHTM C18 1.7 μ m 2.1 \times 50mm Column	Waters
高圧連続式ホモジナイザー	AVESTIN
油回転真空ポンプ	アズワン
Biacore T200	GE Healthcare

実験操作

1) 遺伝子クローニング

Δ60-CPR

Δ60-CPR 遺伝子は高発現用ベクターpET-b15 に挿入された WT-CPR 遺伝子を鋳型として、QuikChange system (Stratagene)を用いて作製した。作製した変異体の DNA 配列は DNA Analyzer Gene ReadIR 4200 (Li-Cor)を用いて確認した後、コールドショック発現系のベクターpCold Iに挿入した。

CYP

野生型 CYP2C19 (WT) 遺伝子は高コピー高発現用ベクターpBEX に挿入された CYP2C19 遺伝子(N末端側の膜結合配列を除去して全合成したもの)を用いた。

2) 大量培養及びタンパク質の精製

WT-CPR

・大量培養

遺伝子を組み込んだ発現用プラスミドである pET-b15 を大腸菌株 (BL21-Gold(DE3) (Stratagene) に形質転換した。それらを 100 μg/mL アンピシリン (Wako) を含む LB 培地中で 37 °C、振盪速度 100 rpm で 12 時間前培養を行った。培養液を 100 μg/mL アンピシリンを含む 50 倍量の本培養用 LB 培地中で 37°C、振盪速度 125 rpm の条件下で培養した。その後、紫外可視吸収分光計 (BECKMAN DU 800)を用いて LB 培地の 600 nm の吸光度を測定し、0.7 になったところで LB 培地を氷浴上で速やかに冷却した。LB 培地の温度が 15 °C になったところで、再び培養器で 15°C、80 rpm の条件下で 6 時間培養を行った。

・破砕・可溶化

以下の実験操作は全て 4°Cで行った。4,000 × g で回収した菌体を-80°Cで冷凍した後、2 時間後に菌体を解凍した。そして約 100 mL の遠心用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で懸濁し、緩衝液 1 mL に対して 1 mg の Lysozyme と微量の Deoxyribonuclease I を加えた。これを overnight で攪拌した後、高圧連続式ホモジナイザー (AVESTIN) を用いてフレンチプレスによって菌体を破砕した。得られた懸濁液に 200 mL の遠心用 20 mM リン酸カリウム緩衝液を加え、Triron X-100 を終濃度 1%になるように添加して 2 時間 4 °Cで攪拌することで WT-CPR を膜画分からはがして可溶化した。その後、超遠心 (30,000 rpm、60 min) により上清を回収した。

・精製

以下の精製は全て 4°Cで行った。超遠心後の上清を 2'5'ADP Sepharose 4B カラムに通して吸着させ、以下に示すカラム用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で洗浄した後、さらに 0.5 mM 2-AMP を加えたカラム用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で再度カラムの洗浄を行った。溶出は 10 mM NADP⁺ を加えたカラム用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で行い、得られたフラクションは Amicon Ultra-15 30,000 MWCO を用いて 3000 × g で濃縮し、緩衝液を 100 mM リン酸カリウム緩衝液に置換した。

・遠心用 20 mM リン酸カリウム緩衝液	終濃度
Potassium Phosphate (pH 7.7)	20 mM
Glycerol	20 %
EDTA	20 μM
NaCl	0.5 M

Milli-Q で調製

・カラム用 20 mM リン酸カリウム緩衝液	終濃度
Potassium Phosphate (pH 7.7)	20 mM

Glycerol	20 %
EDTA	20 μ M
NaCl	0.5 M
CHAPS	8 mM
DTT	200 μ M

Milli-Q で調製

・100 mM リン酸カリウム緩衝液	終濃度
Potassium Phosphate (pH 7.4)	100 mM
Glycerol	20 %
EDTA	100 μ M

Milli-Q で調製

Δ 60-CPR

・大量培養・破砕

WT-CPR と同様の手法で大量培養と菌体の破砕を行った。得られた懸濁液を遠心操作 (37,000 rpm、60 min)で膜画分と分離し、 Δ 60-CPR が入った上清を回収した。

・精製

まず Ni-NTA カラムで一次精製を行った。上記操作で得た Δ 60-CPR をアプライ後、2 mM のイミダゾールを加えた 100 mM リン酸カリウム緩衝液でカラムを洗浄した。250 mM イミダゾールを添加した 100 mM リン酸カリウム緩衝液で Δ 60-CPR を溶出し、得られたフラクションを Amicon Ultra-15 30,000 MWCO を用いて 3000 \times g で濃縮した後、緩衝液を 100 mM リン酸カリウム緩衝液で置換してイミダゾールを除去した。

CYP

・大量培養

CYP2C19 遺伝子を組み込んだ発現用プラスミドである pBEX を大腸菌株 (BL21-Gold(DE3) (Stratagene)) に形質転換した。それを 100 µg/mL アンピシリン (Wako) を含む LB 培地中で 37°C、振盪速度 100 rpm で 12 時間前培養した。培養液を 0.5 mM 5-アミノレブリン酸 (Cosmo Bio)、100 µg/mL アンピシリンを含む 100 倍量の TB 培地中で 30°C、振盪速度 135 rpm の条件下で 48 時間培養した。

・破碎・可溶化

以下の実験操作は全て 4°C で行った。4,000 × g で遠心操作により回収した菌体を -80°C で冷凍した後、2 時間後に解凍した。菌体に緩衝液量 1 mL 当たり 1 mg の Lysozyme、ごく微量の Deoxyribonuclease I を加えて 100 mM リン酸カリウム緩衝液で懸濁後、フレンチプレスで菌体破碎を行い、得られた懸濁液を遠心分離 (37,000 rpm、60 min) した。上清を除いて沈殿に 1% の CHAPS を加えた 100 mM リン酸カリウム緩衝液を加えて懸濁し、6 時間攪拌することで CYP を膜画分から分離して可溶化させた。そして再度超遠心 (37,000 rpm、60 min) にかけて上清を回収し、透析を行って界面活性剤を除去し、カラム操作用の緩衝液に置換した。

・精製

以下の精製は全て 4°C で行った。精製は 3 種類のカラム (DEAE-Sepharose Fast Flow、Octyl-Sepharose、Hydroxy Apatite Bio Gel) を用いて行った。透析後のタンパク質溶液を DEAE-Sepharose Fast Flow カラムに通し、不要なタンパク質を吸着させて除去した。次に、溶出液中の CYP を Octyl-Sepharose カラムに吸着させ、200 mM リン酸カリウム緩衝液で洗浄した後、0.1%~0.5% Triton X-100 の勾配を有する 20 mM リン酸カリウム緩衝液で溶出を行った。溶出後の溶液を Hydroxy Apatite Bio Gel カラムに吸着させ、Triton X-100 を除去するため、カラムの溶出液に 280 nm の吸収が観察されなくなるまで 200 mM リン酸カリウム緩衝液で洗浄した。その後、500 mM リン酸カリウム緩衝液で CYP の溶出を行い、

Amicon Ultra-15 30,000 MWCO を用いて濃縮後 4°C で保存した。

・20 mM, 200 mM, 500 mM リン酸カリウム緩衝液	終濃度
Potassium Phosphate (pH 7.4)	20 mM, 200 mM, 500 mM
Glycerol	20 %
EDTA	100 μ M

Milli-Q で調製

3) タンパク質の濃度測定

CPR

酸化型 CPR のミリモル吸光係数 $\epsilon_{454\text{nm}} = 21.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて濃度を決定した。CPR の酵素活性 (Units/mL) はシトクロム *c* を用いて決定した。反応液 (全量 300 μ L) は 100 mM リン酸カリウム緩衝液、50 μ M シトクロム *c* (Sigma)、NADPH 再生システム (1 mM NADP⁺、2.5 mM グルコース-6-リン酸 (G6P)、2 Units/mL グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH)) (BD Gentest) を含むように調製した。

反応は 37°C で 5 分間プレインキュベートした NADPH 再生システムを加えることで開始し、紫外可視吸収分光計 (BECKMAN DU 800) を用いて 550 nm の吸光度の変化を 37 °C の条件下で 15 秒おきに測定した。得られた吸光度の変化と、550 nm におけるシトクロム *c* のミリモル吸光係数 $\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて比活性を計算した。この時、1 Unit の CPR は pH 7.4、37°C で 1 分間に 1 μ mol のシトクロム *c* を還元すると定義した。

CYP

濃度はヘムタンパク質固有の方法であるピリジンヘモクロム法を用いて算出した。ヘムのアルカリ性溶液 (pH 11~12) にピリジン (最終濃度 10 %) を加えて sodium dithionite で還元すると、プロトヘムに特有な吸収スペクトルを示す。プロトヘムのミリモル吸光係数 $\epsilon_{557\text{nm}} = 34.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて、タンパク質の

濃度を算出した。

4) 紫外可視吸収スペクトル

スペクトルは紫外可視吸収分光計 (BECKMAN DU 800)を用いて測定した。測定用溶液には 100 mM リン酸カリウム緩衝液を用いた。CPR は精製後には還元されたセミキノン型と酸化型が混ざっているため、ごく微量の Potassium Ferricyanide を加えることで酸化型のスペクトルの測定を行った。CO 結合型 CYP2C19 は CO パージの後、ジチオナイトを添加することで調製した。全ての測定は室温で行った。

5) 代謝活性

反応液 (全量 200 μ L)は 100 mM リン酸カリウム緩衝液、30 μ g/mL DLPC (1, 2-Didodecanoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) (Sigma)、2.5 mM $MgCl_2$ 、0.1 μ M CYP2C19、0.2 μ M シトクロム b_5 (Sigma)、0.4 μ M CPR (WT-CPR、 Δ 60-CPR)、NADPH 再生システム (1 mM $NADP^+$ 、2.5 mM グルコース-6-リン酸、2 U/mL グルコース-6-リン酸脱水素酵素) (BD Gentest)と適当な濃度の薬物を含むように調製した。

反応は 37 $^{\circ}C$ で5分間プレインキュベートした NADPH 再生システムを加えることで開始した。適当な時間で氷冷 MeOH (Wako) の添加により代謝反応を止め、遠心 (14,000 \times g、10 min)により沈殿を取り除いた。UPLC により各基質濃度における基質減少の時間変化を測定して代謝速度を算出し、活性パラメーター (K_m 、 V_{max} 、 CL_{int}) を算出した。

6) CYP に対する CPR の結合親和性測定

CYP に対する CPR の結合親和性の測定には Biacore T200 を使用した。Running buffer にはフィルターろ過したものを使用し、CPR をリガンドとして N 末端側

の His₆ tag を利用して 60 秒間流速 5 μL/min で流して NTA センサーチップに固定化した。アナライトとして各濃度の CYP を流速 30 μL/min で 120 秒間流して結合させた後、同様の流速で CYP を含まない Running buffer を流して 180 秒間解離を測定した。その後、センサーチップを再生するため、0.35 M EDTA と 50 mM NaOH を流速 30 μL/min で 30 秒間流して、固定化した CPR を剥がした。

得られたセンサーグラムは Biacore T200 software version 1.0 (GE Healthcare) で解析した。センサーグラムのフィッティングモデルとして two-state reaction model を使用し、 K_D を算出した。

•Running buffer	終濃度
HEPES (pH7.4)	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	50 μM
Tween 20	0.05 %
<hr/>	
MilliQ で調製	1 L

• NTA センサーチップ活性化溶液

500 μM 塩化ニッケル(II) (NiCl₂) in MilliQ

• センサーチップ再生試薬

350 mM EDTA in MilliQ

50 mM Sodium hydroxide

• K_D の算出

$$K_D = k_{d1} k_{d2} / k_{a1}(k_{d2} + k_{a2})$$

7) CYP2C19 に対する CPR の電子伝達速度の測定

CPR による CYP2C19 の還元は CO 雰囲気下で測定した。反応はスクリーセルをゴム栓とパラフィルムで密封した系で行い、先に基質と DLPC (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、100 mM リン酸カリウム緩衝液を入れて真空ポンプ (アズワン) で脱気後、窒素でセル内を置換した。その後、CYP2C19 と CPR、G6PDH をそれぞれ終濃度が 1 μM , 1 μM , 2 U/mL になるようにニードルシリンジで加え、再度脱気と窒素置換を行った後、CO をセル内に吹き付けた。反応溶液は分光器内にセットし、37°C 条件下で 5 min インキュベートした。CYP2C19 の還元反応は、脱気と窒素置換をした終濃度 100 μM の NADPH を加えることで開始し、450 nm における吸光度の時間変化を測定した。反応開始後 1 分間のデータから接線を求め、電子伝達速度を算出した。また、6) CPR の CYP2C19 に対する結合親和性測定と同じ濃度の基質を用いて実験を行った。

Sample solution	終濃度
CPR	1 μM
CYP2C19	1 μM
DLPC	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Substrate	K_d の 10 倍以上の濃度
G6PDH	2 U/mL
NADPH	100 μM
G6P	100 μM
<hr/>	
100 mM リン酸カリウム緩衝液	200 μL

8) CYP2C19 の薬物代謝反応における uncoupling 反応の測定

CYP2C19 の uncoupling 反応によって発生する H_2O_2 を定量した。反応系には CYP2C19 と CPR を $1\ \mu\text{M}$ ずつ加え、 $100\ \mu\text{M}$ NADPH の添加によって基質の代謝反応を開始させた。G6PDH を加えずに NADPH を消費させ、その $340\ \text{nm}$ における吸光度の減少から NADPH の消費を確認した。また、6) CPR の CYP2C19 に対する結合親和性測定と同じ濃度の基質を用いて実験を行った。基質の代謝量は UPLC により定量した。

反応後、 H_2O_2 の定量は蛍光試薬 (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を利用した測定キット (Enzo) を用いて行った。また、shunt 経路から生成される H_2O の量は以下の式により計算した。

$$[\text{H}_2\text{O}] = ([\text{NADPH}] - [\text{Metabolites}] - [\text{H}_2\text{O}_2])/2$$

Sample solution	終濃度
CPR	$1\ \mu\text{M}$
CYP2C19	$1\ \mu\text{M}$
DLPC	$30\ \mu\text{g/mL}$
Substrate	K_d の 10 倍以上の濃度
NADPH	$100\ \mu\text{M}$
100 mM リン酸カリウム緩衝液	$200\ \mu\text{L}$

参考文献

1. De Colibus, L., and Mattevi, A. (2006) New frontiers in structural flavoenzymology. *Curr Opin Struc Biol* **16**, 722-728
2. Joosten, V., and van Berkel, W. J. H. (2007) Flavoenzymes. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 195-202
3. Efremov, R. G., Baradaran, R., and Sazanov, L. A. (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**, 441-461
4. Iyanagi, T. (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: Implications for detoxification. *Int Rev Cytol* **260**, 35-112
5. Williams, C. H., and Kamin, H. (1962) Microsomal Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome C Reductase of Liver. *J Biol Chem* **237**, 587-595
6. Yabusaki, Y., Murakami, H., and Ohkawa, H. (1988) Primary structure of *Saccharomyces cerevisiae* NADPH-cytochrome P450 reductase deduced from nucleotide sequence of its cloned gene. *J Biochem* **103**, 1004-1010
7. Urenjak, J., Linder, D., and Lumper, L. (1987) Structural Comparison between the Trout and Mammalian Hydrophilic Domain of Nadph-Cytochrome-P-450 Reductase. *J Chromatogr* **397**, 123-136
8. Porter, T. D., and Kasper, C. B. (1985) Coding nucleotide sequence of rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase cDNA and identification of flavin-binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 973-977
9. Haniu, M., Iyanagi, T., Miller, P., Lee, T. D., and Shively, J. E. (1986) Complete amino acid sequence of NADPH-cytochrome P-450 reductase from porcine hepatic microsomes. *Biochemistry* **25**, 7906-7911
10. Yamano, S., Aoyama, T., McBride, O. W., Hardwick, J. P., Gelboin, H. V., and Gonzalez, F. J. (1989) Human NADPH-P450 oxidoreductase: complementary DNA cloning, sequence and vaccinia virus-mediated expression and localization of the CYPOR gene to chromosome 7. *Mol Pharmacol* **36**, 83-88
11. Shen, A. L., O'Leary, K. A., and Kasper, C. B. (2002) Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome p450 oxidoreductase. *J Biol Chem* **277**, 6536-6541
12. Gu, J., Weng, Y., Zhang, Q. Y., Cui, H. D., Behr, M., Wu, L., Yang, W. Z., Zhang, L., and Ding, X. X. (2003) Liver-specific deletion of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene - Impact on plasma cholesterol homeostasis and the function and

- regulation of microsomal cytochrome P450 and heme oxygenase. *J Biol Chem* **278**, 25895-25901
13. Fluck, C. E., Tajima, T., Pandey, A. V., Arlt, W., Okuhara, K., Verge, C. F., Jabs, E. W., Mendonca, B. B., Fujieda, K., and Miller, W. L. (2004) Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* **36**, 228-230
 14. Huang, N. W., Pandey, A. V., Agrawal, V., Reardon, W., Lapunzina, P. D., Mowat, D., Jabs, E. W., Van Vliet, G., Sack, J., Fluck, C. E., and Miller, W. L. (2005) Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler Syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* **76**, 729-749
 15. Hart, S. N., Li, Y., Nakamoto, K., Wesselman, C., and Zhong, X. B. (2007) Novel SNPs in cytochrome p450 oxidoreductase. *Drug Metab Pharmacokin* **22**, 322-326
 16. Marohnic, C. C., Panda, S. P., Martasek, P., and Masters, B. S. (2006) Diminished FAD binding in the Y459H and V492E Antley-Bixler syndrome mutants of human cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* **281**, 35975-35982
 17. Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S., and Kim, J. J. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8411-8416
 18. Hamdane, D., Xia, C., Im, S. C., Zhang, H., Kim, J. J., and Waskell, L. (2009) Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *J Biol Chem* **284**, 11374-11384
 19. Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I. L., Huang, W. C., Grossmann, J. G., and Roberts, G. C. (2009) Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J Biol Chem* **284**, 36628-36637
 20. Xia, C., Hamdane, D., Shen, A. L., Choi, V., Kasper, C. B., Pearl, N. M., Zhang, H., Im, S. C., Waskell, L., and Kim, J. J. (2011) Conformational changes of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase are essential for catalysis and cofactor binding. *J Biol Chem* **286**, 16246-16260
 21. Pudney, C. R., Khara, B., Johannissen, L. O., and Scrutton, N. S. (2011) Coupled motions direct electrons along human microsomal P450 Chains. *PLoS Biol* **9**, e1001222
 22. Sundermann, A., and Oostenbrink, C. (2013) Molecular dynamics simulations give insight into the conformational change, complex formation, and electron transfer pathway for cytochrome P450 reductase. *Protein Sci* **22**, 1183-1195

23. Nadler, S. G., and Strobel, H. W. (1991) Identification and characterization of an NADPH-cytochrome P450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* **290**, 277-284
24. Shen, A. L., and Kasper, C. B. (1995) Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J Biol Chem* **270**, 27475-27480
25. Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A., and Deisenhofer, J. (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **3**, 41-62
26. Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y. T., Vakser, I. A., Loew, G., and Waskell, L. (1998) Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* **273**, 17036-17049
27. Reynald, R. L., Sansen, S., Stout, C. D., and Johnson, E. F. (2012) Structural Characterization of Human Cytochrome P450 2C19 ACTIVE SITE DIFFERENCES BETWEEN P450s 2C8, 2C9, AND 2C19. *J Biol Chem* **287**, 44581-44591
28. Kenaan, C., Zhang, H. M., Shea, E. V., and Hollenberg, P. F. (2011) Uncovering the Role of Hydrophobic Residues in Cytochrome P450-Cytochrome P450 Reductase Interactions. *Biochemistry* **50**, 3957-3967
29. Vermilion, J. L., and Coon, M. J. (1978) Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J Biol Chem* **253**, 2694-2704
30. Black, S. D., French, J. S., Williams, C. H., Jr., and Coon, M. J. (1979) Role of a hydrophobic polypeptide in the N-terminal region of NADPH-cytochrome P-450 reductase in complex formation with P-450LM. *Biochem Biophys Res Commun* **91**, 1528-1535
31. Venkateswarlu, K., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., and Kelly, S. L. (1998) The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-cytochrome P450 (CYP) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. *J Biol Chem* **273**, 4492-4496
32. Estabrook, R. W., Shet, M. S., Fisher, C. W., Jenkins, C. M., and Waterman, M. R. (1996) The interaction of NADPH-P450 reductase with P450: an electrochemical study of the role of the flavin mononucleotide-binding domain. *Arch Biochem Biophys* **333**, 308-315
33. Das, A., and Sligar, S. G. (2009) Modulation of the cytochrome P450 reductase redox potential by the phospholipid bilayer. *Biochemistry* **48**, 12104-12112
34. Gilep, A. A., Guryev, O. L., Usanov, S. A., and Estabrook, R. W. (2001) An

- enzymatically active chimeric protein containing the hydrophilic form of NADPH-cytochrome P450 reductase fused to the membrane-binding domain of cytochrome b5. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 937-941
35. Gum, J. R., and Strobel, H. W. (1981) Isolation of the membrane-binding peptide of NADPH-cytochrome P-450 reductase. Characterization of the peptide and its role in the interaction of reductase with cytochrome P-450. *J Biol Chem* **256**, 7478-7486
 36. Gideon, D. A., Kumari, R., Lynn, A. M., and Manoj, K. M. (2012) What is the Functional Role of N-terminal Transmembrane Helices in the Metabolism Mediated by Liver Microsomal Cytochrome P450 and its Reductase? *Cell Biochem Biophys* **63**, 35-45
 37. Huang, R., Yamamoto, K., Zhang, M., Popovych, N., Hung, I., Im, S. C., Gan, Z., Waskell, L., and Ramamoorthy, A. (2014) Probing the transmembrane structure and dynamics of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase by solid-state NMR. *Biophys J* **106**, 2126-2133
 38. Ingelmansundberg, M. (1977) Phospholipids and Detergents as Effectors in Liver Microsomal Hydroxylase System. *Biochim Biophys Acta* **488**, 225-234
 39. Inui, H., Maeda, A., and Ohkawa, H. (2007) Molecular characterization of specifically active recombinant fused enzymes consisting of CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, and cytochrome b5. *Biochemistry* **46**, 10213-10221
 40. Yasukochi, Y., and Masters, B. S. (1976) Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c(cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J Biol Chem* **251**, 5337-5344
 41. Oprian, D. D., and Coon, M. J. (1982) Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH. *J Biol Chem* **257**, 8935-8944
 42. Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) SOSUI:classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378-379
 43. Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D., and Cheng, Q. (2009) Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc* **4**, 1245-1251
 44. Iwata, H., Fujita, K., Kushida, H., Suzuki, A., Konno, Y., Nakamura, K., Fujino, A., and Kamataki, T. (1998) High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in Escherichia coli. *Biochem Pharmacol* **55**, 1315-1325
 45. Attia, T. Z., Yamashita, T., Miyamoto, M., Koizumi, A., Yasuhara, Y., Node, J.,

- Erikawa, Y., Komiyama, Y., Horii, C., Yamada, M., Omar, M. A., Abdelmageed, O. H., Derayea, S. M., and Uno, T. (2012) Comparison of cytochrome p450 mediated metabolism of three central nervous system acting drugs. *Chem Pharm Bull* **60**, 1544-1549
46. Higashimoto, Y., Sakamoto, H., Hayashi, S., Sugishima, M., Fukuyama, K., Palmer, G., and Noguchi, M. (2005) Involvement of NADP(H) in the interaction between heme oxygenase-1 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* **280**, 729-737
47. Guengerich, F. P., and Johnson, W. W. (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: Rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry* **36**, 14741-14750
48. Raag, R., and Poulos, T. L. (1991) Crystal-Structures of Cytochrome-P-450cam Complexed with Camphane, Thiocamphor, and Adamantane - Factors Controlling P-450 Substrate Hydroxylation. *Biochemistry* **30**, 2674-2684
49. Li, T. S., Quillin, M. L., Phillips, G. N., and Olson, J. S. (1994) Structural Determinants of the Stretching Frequency of Co Bound to Myoglobin. *Biochemistry* **33**, 1433-1446
50. Yu, A. E., Hu, S. Z., Spiro, T. G., and Burstyn, J. N. (1994) Resonance Raman-Spectroscopy of Soluble Guanylyl Cyclase Reveals Displacement of Distal and Proximal Heme Ligands by No. *J Am Chem Soc* **116**, 4117-4118
51. Oldfield, E., Guo, K., Augspurger, J. D., and Dykstra, C. E. (1991) A Molecular-Model for the Major Conformational Substates in Heme-Proteins. *J Am Chem Soc* **113**, 7537-7541
52. Imai, M., Shimada, H., Watanabe, Y., Matsushima-Hibiya, Y., Makino, R., Koga, H., Horiuchi, T., and Ishimura, Y. (1989) Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7823-7827
53. Atkins, W. M., and Sligar, S. G. (1988) Deuterium isotope effects in norcamphor metabolism by cytochrome P-450cam: kinetic evidence for the two-electron reduction of a high-valent iron-oxo intermediate. *Biochemistry* **27**, 1610-1616
54. Khatri, Y., Gregory, M. C., Grinkova, Y. V., Denisov, I. G., and Sligar, S. G. (2014) Active site proton delivery and the lyase activity of human CYP17A1. *Biochem Biophys Res Commun* **443**, 179-184
55. Gorsky, L. D., Koop, D. R., and Coon, M. J. (1984) On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome

- P-450. Products of oxygen reduction. *J Biol Chem* **259**, 6812-6817
56. Loida, P. J., and Sligar, S. G. (1993) Molecular recognition in cytochrome P-450: mechanism for the control of uncoupling reactions. *Biochemistry* **32**, 11530-11538
 57. Fang, X., Kobayashi, Y., and Halpert, J. R. (1997) Stoichiometry of 7-ethoxycoumarin metabolism by cytochrome P450 2B1 wild-type and five active-site mutants. *FEBS Lett* **416**, 77-80
 58. Hutzler, J. M., Wienkers, L. C., Wahlstrom, J. L., Carlson, T. J., and Tracy, T. S. (2003) Activation of cytochrome P450 2C9-mediated metabolism: mechanistic evidence in support of kinetic observations. *Arch Biochem Biophys* **410**, 16-24
 59. Wei, L., Locuson, C. W., and Tracy, T. S. (2007) Polymorphic variants of CYP2C9: mechanisms involved in reduced catalytic activity. *Mol Pharmacol* **72**, 1280-1288
 60. Scott, E. E., White, M. A., He, Y. A., Johnson, E. F., Stout, C. D., and Halpert, J. R. (2004) Structure of mammalian cytochrome P4502B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl) imidazole at 1.9-angstrom resolution - Insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding. *J Biol Chem* **279**, 27294-27301
 61. Zhao, Y., White, M. A., Muralidhara, B. K., Sun, L., Halpert, J. R., and Stout, C. D. (2006) Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole: insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction. *J Biol Chem* **281**, 5973-5981
 62. Davydov, R., Macdonald, I. D. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., and Hoffman, B. M. (1999) EPR and ENDOR of catalytic intermediates in cryoreduced native and mutant oxy-cytochromes P450cam: Mutation-induced changes in the proton delivery system. *J Am Chem Soc* **121**, 10654-10655
 63. Nagano, S., and Poulos, T. L. (2005) Crystallographic study on the dioxygen complex of wild-type and mutant cytochrome P450cam. Implications for the dioxygen activation mechanism. *J Biol Chem* **280**, 31659-31663
 64. Tripathi, S., Li, H., and Poulos, T. L. (2013) Structural basis for effector control and redox partner recognition in cytochrome P450. *Science* **340**, 1227-1230
 65. Sjodin, T., Christian, J. F., Macdonald, I. D., Davydov, R., Unno, M., Sligar, S. G., Hoffman, B. M., and Champion, P. M. (2001) Resonance Raman and EPR investigations of the D251N oxycytochrome P450cam/putidaredoxin complex. *Biochemistry* **40**, 6852-6859
 66. Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angova, H. C., Vinkovic, D. M., and Jhoti, H. (2003) Crystal structure of human cytochrome P4502C9 with bound warfarin. *Nature* **424**, 464-468

67. Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vonrhein, C., Tickle, I. J., and Jhoti, H. (2004) Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* **305**, 683-686
68. Tanaka, Y., and Brugliera, F. (2013) Flower colour and cytochromes P450. *Philos T Roy Soc B* **368**

謝辞

本研究を進めるにあたり、素晴らしい御指導並びに研究環境を賜りました大阪大学大学院薬学研究科分子反応解析学分野 宇野公之教授に心より感謝致します。

また本研究を進めるにあたり、有益なる御助言・御鞭撻を下さいました武庫川女子大学 山下沢准教授、大阪大学大学院薬学研究科分子反応解析学分野 辻野博文助教に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、野生型 CPR 遺伝子をご恵与下さいました千葉大学医学部附属病院薬剤部 有吉範高准教授に心より感謝致します。

本研究に取り組むにあたり、様々な実験手法を構築して実験結果を残して下さいった先輩方にお礼申し上げます。そして研究における多くの失敗や成功を共有し、充実した素晴らしい生活を送らせて下さった分子反応解析学分野の皆様へ感謝致します。

最後になりましたが、今まで様々な面で私を支えて下さった家族へ感謝致します。

2015 年 3 月

宮本 正芳