



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

論文内容の要旨

氏 名 (宮本 正芳)

論文題名

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

論文内容の要旨

シトクロムP450還元酵素(CPR)は膜結合型のフラビンタンパク質であり、薬物代謝酵素シトクロムP450(CYP)への電子伝達を触媒することによりCYPを活性化する。CPRは小胞体内膜に存在し、疎水性の膜結合領域がCPRの親水性ドメインを脂質膜に繋いでいるが、この領域がCYPの酵素反応において果たす役割については未だ解明されていない。そこで私は、CPRの膜結合領域がCYPの活性化に関わるメカニズムを解明するため、CYPに対するCPRの結合性や電子伝達活性、及び薬物代謝反応の脱共役(uncoupling)の観点から検討を行った結果、CPRのCYP活性化機構の解明につながる膜結合領域の新規機能を発見した。

実験には野生型の完全長CPR(WT-CPR)、及び膜結合領域であるN末端60残基を欠損したCPR($\Delta 60$ -CPR)を用いた。また、CYPには当研究室で既に調製に成功していたCYP2C19を用いた。まず、cyt. cに対する還元活性についてWT-CPRと $\Delta 60$ -CPRを比較したところ、両者にほとんど差はなかった。紫外可視吸収スペクトルにも違いはなかったことから、CPRのフラビン周辺構造及び電子伝達に関する機能には膜結合領域は関与していないと考えられた。

そこで次に、両CPRを用いてCYP2C19の薬物代謝反応を測定した。CYP2C19に対する基質としてアミトリプチリン(AMT)、イミプラミン(IMP)、オメプラゾール(OPZ)とランソプラゾール(LPZ)を用いた。測定の結果、WT-CPRではどの基質もCYP2C19で代謝されることが確認された。一方、 $\Delta 60$ -CPRではAMTおよびIMPで低いながらも代謝活性が認められたが、OPZとLPZは代謝されなかったことから、 $\Delta 60$ -CPRはCYP2C19を活性化できていないことがわかった。また、WT-CPRを用いた場合には脂質膜の添加がCYP2C19の代謝活性を上昇させたが、 $\Delta 60$ -CPRではほとんど影響しなかった。これは、脂質膜によりWT-CPRとCYP2C19が適切な結合を行いやすくなるが、 $\Delta 60$ -CPRは膜結合領域がないため脂質膜に結合しなかったためだと考えられた。これらの結果より、膜結合領域は脂質膜へCPRを固定するアンカーとしての機能を持つ事が示唆された。しかし、基質の種類によって両CPR間で代謝反応に差が生じたことから、膜結合領域がアンカー以外の機能を担っていることが示唆された。

$\Delta 60$ -CPRがCYP2C19を活性化できない原因として①CYPに結合できない、②CYPに電子伝達ができない、③還元後のCYPのヘム上での反応が正常に起こらない、の3つが考えられたため、それぞれについて検証を行った。まず、表面プラズモン共鳴を用いてCPRとCYP2C19との結合親和性を評価したところ、基質非結合型のCYP2C19に対するWT-CPRと $\Delta 60$ -CPRの解離定数(K_D)は、それぞれ1.99 μ M及び1.54 μ Mであることがわかった。次に各薬物の存在下で測定を行った結果、WT-CPRでは薬物の種類によらず K_D が低下した。これに対し、 $\Delta 60$ -CPRではAMTとIMPについて K_D の低下が見られたが、OPZやLPZではむしろわずかに増加した。このことから、AMTやIMPの存在下では $\Delta 60$ -CPRはWT-CPRと同様にCYP側の構造変化に適合して結合するのに対し、OPZとLPZの場合にはWT-CPRとは異なり、 $\Delta 60$ -CPRはCYPと結合はできても代謝反応が行える複合体が形成できていないように思われた。これらの結果より、OPZやLPZ結合型CYP2C19に対して $\Delta 60$ -CPRはWT-CPRに比べて結合親和性が低下するものの、CPR-CYP複合体を形成できることが分かった。しかし、複合体を形成できても、 $\Delta 60$ -CPRがOPZ、LPZ結合型CYP2C19に電子を伝達できる形で結合しているとは限らない。そこで次に、結合後の電子伝達についての評価を行った。

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かった。基質結合型CYP2C19では、脂質膜存在下でWT-CPRによる電子伝達が最も速く、AMT以外では電子伝達は脂質の影響を受けにくいことがわかった。一方、 $\Delta 60$ -CPRでは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たが、LPZではやや低い程度であった。以上より、 $\Delta 60$ -CPRではOPZとLPZが代謝されなかった原因は、CPR-CYPの結合や電子伝達の過程にではなく、その後の代謝反応過程にある可能性が強く示唆された。CYPの薬物代謝反応にはヘムに配位した酸素に電子が供給される必要があるが、この酸素結合型ヘムにプロトンが供給されないと、酸素がヘムから遊離して H_2O_2 となる(脱共役)。そこで、 H_2O_2 の生成量を指標とし、薬物代謝反応に電子がどれくらい有効に消費されたのか検討した。測定の結果、基質非存在下では両CPRとも約40 μ Mの H_2O_2 が生成したが、WT-CPRでは基質の添加により H_2O_2 生成量が著しく減少した。一方、 $\Delta 60$ -CPRではAMTあるいはIMPを加えた場合には H_2O_2 生成量が半減したが、OPZ、LPZの場合には約40 μ Mのままであった。また、それぞれの条件下での代謝産物量を比較すると、 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ることがわかった。これらの結果より、 $\Delta 60$ -CPRが結合したCYPでは脱共役反応が生じやすく、特にOPZ、LPZ結合型CYPでは $\Delta 60$ -CPRから供給された電子がほとんど脱共役反応により消費されることがわかった。

以上から、私はCPRの膜結合領域は活性酸素を生み出す脱共役反応を抑制し、CYPの代謝反応を効率化する機能を担っていると結論付けた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (宮 本 正 芳)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 宇野 公之
	副 査	教 授 高木 達也
	副 査	教 授 大久保 忠恭

論文審査の結果の要旨

シトクロムP450還元酵素(CPR)は膜結合型のフラビンタンパク質であり、薬物代謝酵素シトクロムP450(CYP)への電子伝達を触媒することによりCYPを活性化する。CPRは小胞体内膜に存在し、疎水性の膜結合領域がCPRの親水性ドメインを脂質膜に繋いでいるが、この領域がCYPの酵素反応において果たす役割については未だ解明されていない。本論文では、CPRの膜結合領域がCYPの活性化に関わるメカニズムを解明するため、CYPに対するCPRの結合性や電子伝達活性、及び薬物代謝反応の脱共役(uncoupling)の観点から検討を行った結果、新たに明らかとなったCPRのCYP活性化機構の解明につながる膜結合領域の新規機能について述べられている。

実験には野生型の完全長CPR(WT-CPR)、及び膜結合領域であるN末端60残基を欠損したCPR(Δ 60-CPR)が用いられた。まず、cyt. cに対する還元活性についてWT-CPRと Δ 60-CPRが比較され、両者にほとんど差はないことが明らかにされた。紫外可視吸収スペクトルにも違いはなかったことから、CPRのフラビン周辺構造及び電子伝達に関する機能には膜結合領域は関与していないことが示された。次に、両CPRを用いてCYP2C19の薬物代謝反応が測定された。CYP2C19に対する基質としてアミトリプチリン(AMT)、イミプラミン(IMP)、オメプラゾール(OPZ)とランソプラゾール(LPZ)が用いられ、測定の結果、WT-CPRではどの基質も代謝されることが確認された。一方、 Δ 60-CPRではAMTおよびIMPで低いながらも代謝活性が認められたが、OPZとLPZは代謝されなかったことから、 Δ 60-CPRはCYP2C19を活性化できていないことが明らかにされた。また、WT-CPRを用いた場合には脂質膜の添加がCYP2C19の代謝活性を上昇させたが、 Δ 60-CPRではほとんど影響しなかった。これは、脂質膜によりWT-CPRとCYP2C19が適切な結合を行いやすくなるが、 Δ 60-CPRは膜結合領域がないため脂質膜に結合しなかったためだと考察された。これらの結果より、膜結合領域は脂質膜へCPRを固定するアンカーとしての機能を持つ事が示された。しかし、基質の種類によって両CPR間で代謝反応に差が生じたことから、膜結合領域がアンカー以外の機能を担っていることが示唆された。

Δ 60-CPRがCYP2C19を活性化できない原因として①CYPに結合できない、②CYPに電子伝達ができない、③還元後のCYPのヘム上での反応が正常に起こらない、の3つが考えられたため、それぞれについて検証された。まず、表面プラズモン共鳴を用いてCPRとCYP2C19との結合親和性が評価された結果、WT-CPRでは薬物の種類によらず K_D が低下した。これに対し、 Δ 60-CPRではAMTとIMPについて K_D の低下が見られたが、OPZやLPZではむしろわずかに増加した。このことから、AMTやIMPの存在下では Δ 60-CPRはWT-CPRと同様にCYP側の構造変化に適合して結合するのに対し、OPZとLPZの場合にはWT-CPRとは異なり、 Δ 60-CPRはCYPと結合はできても代謝反応が行える複合体が形成できていないことが推定された。これらの結果より、OPZやLPZ結合型CYP2C19に対して Δ 60-CPRはWT-CPRに比べて結合親和性が低下するものの、CPR-CYP複合体を形成できることが明らかにされた。しかし、複合体を形成できても、 Δ 60-CPRがOPZ、LPZ結合型CYP2C19に電子を伝達できる形で結合しているとは限らないため、結合後の電子伝達について評価された。

基質非結合型CYP2C19に対する電子伝達速度にはWT-CPRと Δ 60-CPRの間で大きな差はなく、基質結合型CYP2C19では、脂質膜存在下でWT-CPRによる電子伝達が最も速く、AMT以外では電子伝達は脂質の影響を受けにくいことが示された。一方、 Δ 60-CPRでは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たが、LPZではやや低い程度であった。以上より、 Δ 60-CPRではOPZとLPZが代謝されなかった原因は、CPR-CYPの結合や電子伝達の過程ではなく、その後の代謝反応過程にある可能性が強く示唆された。CYPの薬物代謝反応にはヘムに配位した酸素に電子が供給される必要があるが、この酸素結合型ヘムにプロトンが供給されないと、酸素がヘムから遊離して H_2O_2 となる(脱共役)。そこで、 H_2O_2 の生成量を指標とし、薬物代謝反応に電子がどれくらい有効に消費されたのか検討された。測定の結果、基質非存在下では両CPRとも約 $40 \mu M$ の H_2O_2 が生成したが、WT-CPRでは基質の添加により H_2O_2 生成量が著しく減少した。一方、 Δ 60-CPRではAMTあるいはIMPを加えた場合には H_2O_2 生成量が半減したが、OPZ、LPZの場合には約 $40 \mu M$ のままであった。また、それぞれの条件下での代謝産物量を比較すると、 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ることが明らかにされた。これらの結果より、 Δ 60-CPRが結合したCYPでは脱共役反応が生じやすく、特にOPZ、LPZ結合型CYPでは Δ 60-CPRから供給された電子がほとんど脱共役反応により消費されることが明らかにされた。

以上の結果はCYPによる薬物代謝機構の理解に対してきわめて有用な知見を与えるものであり、博士の学位を授与するにふさわしいと判断した。