



研究ノート

チトクローム P-450 解かれた謎と深まる謎

今井嘉郎*

はじめに

ヘム鉄に対する軸配位子の一つがチオレート(S⁻)であるプロトヘム蛋白質の一群はチトクローム P-450と呼ばれており、生体にとって外来性、内在性を問わず脂溶性低分子化合物の代謝に広く関わっている。現在では周知の事実となっているこのような P-450の物質的自体や生理的機能も発見当初(27年前)は全くの謎であった。当時の常識からは一酸化炭素結合物が450nm に吸収極大を示し、一般的な膜の可溶化処理で容易に分解してしまう奇妙な色素がヘム蛋白質であるとは想像がつかなかった。数年後、大村、佐藤は可溶化処理に伴う変性過程の観察を端緒の一つとして、この色素がヘム蛋白質であることを証明し、P-450をめぐる研究の大きな展開の基礎を築いた。

一酸化炭素結合物の吸収スペクトルによって象徴される P-450のヘム化合物としての“異常性”は、その後ヘムの物理・化学者の関心呼び、いろいろの方向から解明へのアプローチが

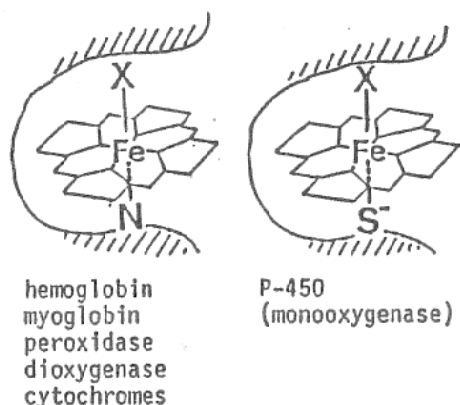


図1 イミダゾール-ヘム蛋白質とチオレート-ヘム蛋白質

試みられた。その結果、現在では P-450蛋白質のシステイン残基の S⁻ が第5配位座を占めていることで結着がついている。今から振り返ってみると P-450以前のヘム蛋白質の“常識”はイミダゾール・ヘム化合物の物性に基いており、チオレート・ヘム蛋白質はその枠からはみ出すことは容易に理解できるであろう。

非特異的な基質特異性

肝ミクロゾームで行われる薬物の酸化代謝反応は P-450の関与が知られる以前から non-specific aromatic hydroxylose と呼ばれており、酵素の常識を超えて基質特異性が広いことが一つの特徴とされていた。しかし、当時はミクロゾーム・レベルで活性が測定されていたので、肝ミクロゾームに多種類の P-450が存在することが判ってくると、基質特異性の再検討が必要となった。図2にウサギの肝ミクロゾームより精製した P-450標品を用いて調べた結果の一部を示す。精製標品で調べても基質特異性はやはり異常に広く、化学構造式の上からは共通部分を見つけ難いような化合物が同一の P-450で代謝される。また、同一の化合物が何種類もの P-450で大差ない速度で代謝されることが多い。多種類の基質に対する活性パターン(相対的な代謝速度)を比較すると確かに各 P-450は区別できるが、調べた限りでは個々の P-450に特有の基質は見つからない。すなわち従来の酵素の基質特異性の概念では整理できない特徴をもっていることが確認できた。このことは見方を変えると P-450蛋白質の基質結合部位の構造がユニークであることを示唆しているようにも受け取れるが、単純に結論を下すのは早計であろう。

P-450の触媒活性は P-450単独では測定できず、NADPH-P-450還元酵素とともにりん脂質

*今井嘉郎 (Yoshio Imai), 大阪大学, 蛋白質研究所, 生理機能部門, 助教授, 理学博士, 生化学

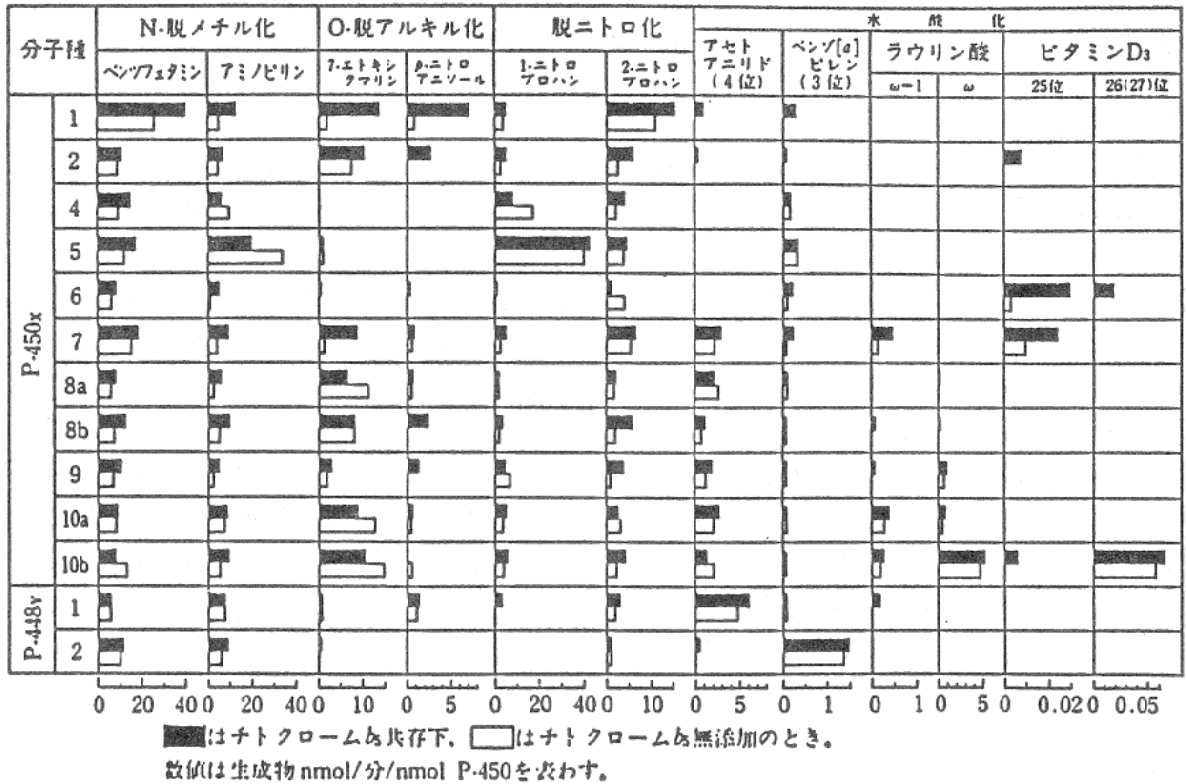


図2 チトクローム P-450 の基質特異性

ミセル（理想的にはリポソーム）の中に埋め込み、還元酵素を経て NADPH からの電子が伝達されるよう再構成して測定しなければならない。さらに、チトクローム b₅ の共存も必要な場合がある。その上、基質は一般に水に不(難)溶であるため反応系への与え方が問題となることもある。このような面倒さのため P-450 の enzymology は不十分にしか行われていないのが現状であり、詳しく調べると各 P-450 の間で違いがもう少し広がるであろう。たとえば図2に示したエトキシマリン脱エチル化活性でも P-450₂、P-450_{8a}、P-450_{8b}、P-450_{10a}、P-450_{10b} は他より3桁 Km が低いことが判っている。

また、ビタミン D₃ は複数ではあるが特定の P-450 のみで代謝され、水酸基の導入される位置にも特徴がある。ステロイド類の水酸化でも同様の特徴が知られており、大きくて複雑な構造の化合物ほど基質特異性は“常識”に近付くようである。肝ミクロゾームの P-450 は触媒活性の面からは薬物代謝酵素として研究が進んできたという背景から基質特異性の検討に用いら

れている化合物は簡単な薬物が多い。P-450 の“もともとの基質”はおそらくそれより大きくて複雑な構造の化合物で、P-450 蛋白には数カ所で接触し捕捉されるのであろう。より簡単な低分子化合物はそのどこか1カ所で捕捉され、ヘムの上で活性化されている酸素分子にうまく配向できれば基質となり得ると考えることはそれ程無理な仮定ではなからう。

しかし、実際に P-450₁ のように他の P-450 と比べるといろいろの薬物に対して強い活性を示す無節操な特異性を示す分子種が存在し、また一方では、薬物に対しては殆んど活性を示さず、特定のステロイドの特定位置のみに働く P-450 も最近精製されている。P-450 の基質結合部位の構造、その部位と基質との相互作用の内容を明らかにすることは P-450 をめぐる今後の重要な課題の一つであるだろう。

深まりゆく分子多様性

肝ミクロゾームに薬物代謝酵素系が複数存在することは P-450 が発見される以前から提唱されていた。これをうけて P-450 が薬物代謝酵素



図3 P-450b と P-450e のアミノ酸配列

(Mizukami, Y. et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80 (1983) 3958 より)

であることが判って間もなく P-450が複数種存在することを示唆する事実がマイクロゾーム・レベルで報告された。この問題はその後大きな論議を呼んだが、1976年ウサギ肝マイクロゾームから複数種の P-450が精製されて一応の結着がついた。しかし、それと同時に P-450は何種類存在するののかという問題が新たに提起され、多くの研究グループがいろいろな P-450の精製を試みた。その結果、現在までにウサギの肝マイクロゾームより20種近くの P-450が精製されており、さらに未精製のもがまだ存在することも確認されている。

精製された P-450は前項で述べたような基質特異性の特徴をもち、みかけの分子量は4.7万から6.0万の間に密接して分布している。また、免疫化学的にもある範囲で交叉がみられ、相互にかなり似通った蛋白であることが推察される。

DNA レベルから P-450を研究する試みは1970年代半ば頃から進められていたが、1981年ラットの肝マイクロゾームの P-450_b の mRNA に相補的な DNA のクローン化が初めて報告され、その塩基配列から P-450_b の一次構造が推定された。次いで cDNA をプローブとして遺伝子 DNA も単離され、構造の解析が行われ

た。現在までにラット4種、マウス2種の P-450の一次構造が推定されている。ウサギでは蛋白の側からの研究も進行し、合計7種(内5種は不完全)が報告されている。これら13種の P-450の一次構造は分子全体としても有意義な類似性が認められるが、特に類似性に富む領域が2カ所存在することが指摘されている。さらに興味を惹くことは P-450_b と P-450。(蛋白的に別個に単離でき、基質特異性も若干異なる)は、いずれも491個のアミノ酸より成り立っており、N末端から303番目までは全く同一、その後C末端までの間にもわずかに14カ所でアミノ酸の置換があるに過ぎない。ウサギではこの分子種に対応する P-450の cDNA が4種得られており、その塩基配列をC末端側200個のアミノ酸部分について調べたところ、わずか7カ所で、相互の間では最多6個のアミノ酸の置換がみられるだけであった。P-450には相互に非常に類似した分子種があることが一次構造の上からも確認できたわけであるが、これまで考えられていた以上に類似性の高いものが複数種存在することを思わせるものである。

おわりに

以上はこれまで20数年間の P-450の研究を通

じて気付いたことのいくつかである。P-450はマイクロゾームレベルから蛋白レベルへ、さらに核酸レベルへと扱える場が変わって来る中で、いろいろの側面で“当時の常識”には収まり切らない姿を見せ、われわれを戸惑わせるとともに

研究を発展させる推進力ともなってきた。今後一つの疑問点の解決はそれまでの予想を超えた新たな問題提起へと発展することを期待しつつ足元を固めてゆきたい。



限りある資源を大切に……
の姿勢を守るDNT

現在は、“鉄の文明”と評され、今日の世界から鉄を無くしたら、恐らく一切の文化は終息するだろうといわれています。
DNTは、創立の礎となった重防食塗料「ズボイド」を通じて既に半世紀近く私たちの大切な鉄を守りつづけてきました。
そして、これからもDNTはズボイドを生みだした重防食技術をベースに、独自の技術開発を進め、さらに、海外の優れた技術と協力しあって、より優秀な重防食システムとして結合させ、限りある資源を守りつづけていきます。

●創造と調和をめざす●

DNT
大日本塗料

●大阪市此花区西九条6-1-124
〒554 ☎(06)461-5371【大代】
●東京都千代田区丸の内3-3-1
〒100 ☎(03)216-1861【大代】