



研究ノート

## オーダーメイド医療に向けた分子論的薬物代謝予測

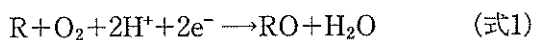
宇野 公之\*

Molecular Approach to the Drug Metabolism Directed to Order-Made Therapeutics

Key Words : Drug Metabolism, Cytochrome P450, Protein Structure, SNPs

## 1. はじめに

生体内に取り込まれた薬物は、酸化・還元・加水分解・包合といった代謝過程を経て体外へと排泄される。代謝反応がうまく進行しないと薬物が体内に滞留することになり、副作用の原因となる。したがって、薬物代謝の理解は副作用の発現を抑えた投与設計のために不可欠である。薬物は主として肝臓にて第1相代謝を受けるが、その主役は肝ミクロソーム分画(主として小胞体)に含まれるシトクロムP450(CYP)である。CYPはヘムタンパク質の仲間であり、ヘム鉄にCOが結合すると450 nm付近に吸収極大を示すことからこの名前が付けられた。CYPの仲間は微生物から植物、動物に至るまで広く分布し、薬物を含めた様々な化合物の代謝に関係しているが、その化学反応は基本的に単一であり、



と書くことができる。この反応式からわかるように、酸素原子のうちの1つが基質Rに導入されるため、CYPは一原子酸素添加酵素(モノオキシゲナーゼ)と呼称される。また、反応には酸素以外に電子とプロトンが必要であり、これらはそれぞれ酸化還元のパートナーとなるタンパク質と溶媒の水分子から供給され

る。CYPと薬物との関わりは、古くから薬学研究者の注目を集めてきたが、近年の分子生物学の隆盛や物理化学的分析手法の発展などによって、この酵素の機能を分子のレベルで議論することが可能となってきた。本稿では、ヒトの薬物代謝に関わるCYPの酵素反応機構と薬物認識について、我々の研究成果を中心に述べたい。

## 2. 可溶性ヒトCYPのクローニング

通常の酵素(enzyme)は特定の基質を認識して反応するのに対して、CYPはきわめて多様な化合物と反応することができるため、diverzymeと呼ばれることもある。このことは、CYPの機能を解析する際の大きな障害となっている。たとえば、肝ミクロソームを用いた研究では、試料中に複数のCYPが含まれているため、ある薬物が複数のCYPで同時に代謝される可能性がある。したがって、薬物がどのCYPで代謝されたのか同定するのは難しい上に、薬物の代謝産物がまた別のCYPで代謝されることもしばしばおこる。この点を克服するため、我々のグループはまず临床上重要なCYP2C9をクローニングし、精製試料を用いて個別に解析することを試みた。ヒト肝のCYPは膜タンパク質であるため、その精製や取扱いに難しさがともなう。そこで、膜貫通領域と考えられているアミノ末端19残基を欠失させた可溶性CYP2C9を調製することにした。さらに、試料を大量に得るため、大腸菌を用いた発現に最適化した塩基配列をもつ遺伝子を試験管内全合成した。すなわち、ヒト由来のものと塩基配列はまったく異なるが、翻訳されたアミノ酸配列はまったく同じタンパク質を得ようという戦略である。まず、80塩基程度の長さを持つDNAオリゴマーを数本混合し、PCRを用いて連結した。末端に導入した制限酵素部位を利用してこれら



\*Tadayuki UNO  
1958年1月生  
1986年東京大学大学院薬学系研究科・博士課程修了  
現在、大阪大学大学院薬学研究科、分子反応解析学分野、教授、薬学博士、生物分析化学、生物物理化学  
TEL 06-6879-8205  
FAX 06-6879-8209  
E-mail : unot@phs.osaka-u.ac.jp

をサブクローニングした後、全長1416塩基対に及ぶ1本のDNAとして連結した。大腸菌を用いて大量発現させることにより、きわめて高純度のCYP2C9標品を大量に得ることに成功した。

### 3. ヒトCYP2C9の活性部位構造

得られた標品を用いて酸化型CYP2C9の共鳴ラマンスペクトルを測定し、活性部位に関する構造的知見を得ることとした。基質として、従来CYP2C9により代謝されると考えられてきた代表的な薬物を選んだ。その結果、薬物の非存在下では水が配位した6配位型構造のヘムが含まれることがわかった。薬物を添加するとスペクトルに変化が認められ、NSAIDの仲間であるイブプロフェンやジクロフェナク(ボルタレン)では水が脱離した5配位型ヘムの出現が新たに観測される一方、糖尿病治療薬トルブタミドを加えてもスペクトルにはほとんど変化が認められなかった。5配位型になるとヘム鉄の酸化還元電位が大きく上昇してヘム鉄が還元されやすくなるという知見に基づけば、薬物の種類によって代謝活性が異なる可能性が強く示唆された。

さらに、CO結合型の共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、Fe-CO伸縮振動に帰属される $468\text{ cm}^{-1}$ のラマン線がイブプロフェンやジクロフェナクの添加により高波数側へシフトしたのに対し、トルブタミドでは変化がほとんど観測されなかった。波数の大きな変化は、ヘム鉄に配位したCOの化学構造に大きな影響を与えるくらい近傍に薬物が結合していることを示す。実際、これまでの研究からイブプロフェンやジクロフェナクに対する酸素添加部位は側鎖のブチル基やフェニル基といった部分であることが示されており、これらの部位がヘムのきわめて近傍に位置するものと考えられる。したがって、構造的観点から、イブプロフェンやジクロフェナクはCYP2C9の良い基質になることが示唆された。

### 4. 酵素活性に対するSNPsの影響

近年のヒトゲノム解析の進展により、病気のかかりやすさや薬物の効果といったヒト個人の体質に関わる問題を遺伝子レベルの問題としてとらえることが可能になってきた。ヒトはすべて同じゲノムを持っているのではなく、数百塩基に1つの割合で出現する一塩基多型(single nucleotide polymorphisms,

SNPs)によりヒトの様々な個性が表れる。薬物代謝酵素自身、あるいはその発現に関係する遺伝子上にSNPsが存在すると、遺伝子産物である代謝酵素に質的・量的な変化が起こり、薬物代謝活性に影響が現れる可能性がある。しかしながら、遺伝型(genotype)の違いが必ずしも代謝活性という表現型(phenotype)として現れない場合も多く、解析を困難なものにしている。SNPsのデータは世界的な規模で収集が進められており、そのデータベースにはインターネットを通じてアクセスできる。SNPsと薬物代謝との関係は医薬品開発の上でも重要であり、製薬会社を中心に検討が進められている。さらには、遺伝子診断に基づいたオーダーメイド医療を可能にするものとして、病院をはじめとした臨床の場でも注目を集めている。

我々のグループは、クローニングした各種CYPを用いて、遺伝型と表現型との関係を分子レベルで解明することを目的として研究を行っている。いわゆるミハエリス-メンテンの式にしたがって薬物代謝活性を解析すると、パラメーターとして $V_{\max}$ (最大速度)と $K_m$ (ミハエリス定数)が得られる。CYPの酵素反応は複雑な素過程からなるが、基質結合過程が反応のトリガーであると考えれば、酸化型CYPに対する薬物親和性の指標である $K_d$ (薬物解離定数)が $K_m$ と対応すると考えられる。そこでまず、野生型CYP2C9を用いて各種薬物に対する酵素活性を測定して $K_d$ と $K_m$ の関係を調べたところ、両者はよく線型相関することがわかった。なかでもジクロフェナクは高い親和性を示し、きわめてよい基質となることがわかった。

そこで、 $K_d$ を指標としてSNPsの影響を探ることとした。CYP2C9の代表的なSNPsであるR144C(CYP2C9\*2)とI359L(CYP2C9\*3)に対しジクロフェナクとイブプロフェンを基質として用いた場合、野生型(WT, CYP2C9\*1)と比べていずれのSNPs変異でも $K_d$ が上昇しており、これに対応して $K_m$ も上昇していた。このことは、SNPsにより薬物代謝活性が低下することを示し、これらのSNPsを持つヒトはPM(poor metabolizer)となるために薬物の血中濃度が増加することを示唆している。したがって、治療効果を上げるためにはPM患者に対してこれら薬物の投与量を減じる必要があると思われる。また、薬物ごとに $K_m$ と $K_d$ の相関は異なっていたことから、SNPsに

よる代謝活性低下の度合いは薬物によって違うことがわかった。

一方、3. で示したように、ヘム鉄に配位した水が追い出される度合いは薬物によって異なっていた。水が配位した6配位型のままであればヘム鉄の酸化還元電位が充分上昇せず、還元酵素から電子を受け取れないためにCYPの酵素活性は低下するはずである。電子を受け取りヘム鉄が還元されれば酵素反応は一気に進むので、水の追い出し具合は酵素活性の $V_{max}$ と相関するはずである。そこで、共鳴ラマンスペクトルから水の解離度 $\alpha$ を見積もり、 $V_{max}$ との関係を調べた結果、薬物ごとに $\alpha$ と $V_{max}$ は線型相関することがわかった。このことから、当初予想した通り水が追い出されるほど酵素活性が高くなることが明らかとなった。

$V_{max}$ と $K_m$ の比 $V_{max}/K_m$ は単位時間当たりに代謝サイクルが何回回転するかを示すパラメーターであり、薬物が体外に排泄される速さの指標となるクリアランス $CL$ とも密接に関係している。すなわち、 $V_{max}/K_m$ は代謝固有クリアランス( $CL_{int}$ )とも呼ばれ、全身クリアランス( $CL_{tot}$ )と相関することが報告されている。CYP2C9が主たる代謝酵素と考えられて

いる薬物について調べたところ、ほとんどの薬物で予想通りの相関が見られたが、例外も認められた。このことは、CYP2C9以外のCYPが例外となる薬物の代謝に関わっていることを示しているのかも知れない。

## 5. おわりに

以上、分子構造的観点からCYPの反応機構について考察し、薬物結合とそれにとりまなうヘム鉄配位水の追い出しが活性発現にきわめて重要であることを示した。また、クローニングしたヒトCYP2C9を用いて、SNPsが分子構造や活性に与える影響を調べることができた。現在我々のグループはCYP2C9, 2C19, 1A2, 2D6, 3A4のクローニングを終え、いくつかについては大量発現にも成功している。これら5種のCYPで市販されている薬物の90%以上が代謝されることから、これらを用いて各薬物に対するSNPsの影響を網羅的に解明できると考えている。得られた知見は、副作用を抑えた薬物の投与設計に大きく資すると期待される一方、分子構造的知見は、SNPsの影響を受けない安全な医薬品の開発にとって有用であると思われる。

この記事をお読みになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。

事務局で著者と日程を調整して、お知らせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2ヵ月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6944-0604 E-mail [seisan@maple.ocn.ne.jp](mailto:seisan@maple.ocn.ne.jp)

必要事項：お名前、ご所属、希望日時(選択の幅をもたせてください)、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に添えない場合もありますので、予めご了承ください。