

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390011

研究課題名（和文） 薬物代謝酵素 CYP を舞台とした薬物間相互作用の網羅的解析

研究課題名（英文） A Comprehensive Study on the Drug-Drug Interactions
in Drug Metabolizing Enzyme CYP

研究代表者

宇野 公之（UNO TADAYUKI）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00183020

研究成果の概要（和文）：シトクロム P450（CYP）はヒト薬物代謝の中心的役割を演じる重要な酵素であり、CYP の基質結合ポケット内における薬物間相互作用は予期せぬ副作用の原因となる。本研究では、薬物間相互作用を引き起こす薬物の組合せと SNP の影響を明らかにするため、薬物結合性と代謝活性の網羅的測定を行った。その結果、基質結合ポケット内における薬物配向性を分光学的に検知できること、さらには2種の薬物が共存することによって活性中心の構造が影響を受けることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cytochrome P450 (CYP) plays a key role in human drug metabolism, and drug-drug interactions in the substrate binding pocket of CYPs often induce unexpected adverse effects of drugs. In this study, drug binding and metabolizing properties of CYP were examined comprehensively, aiming at revealing a set of drugs susceptible to drug-drug interactions and effects of SNPs on the interactions. We could reveal that drug orientation in the substrate binding pocket can be detected spectroscopically, and that the active-site structure of CYPs is affected by the binding of two drugs simultaneously.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：シトクロム P450, 薬物代謝, 一塩基多型, 共鳴ラマン分光, X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 (CYP) はヘムタンパク質の一種であり、薬物代謝の中心的役割を演じていることから従来より薬学研究者の注目を集めてきた。しかしながら、CYP には多くのサブタイプが存在する上、一般的な酵素に比べて基質特異性が低いために、どの CYP がどの薬物に特異性を持つのか同定することがきわめて困難である。さらには、多様

な薬物を収納するための大きな基質結合ポケットを有するゆえ、CYP が同時に2つの薬物を結合する場合がある。その結果、基質となる薬物が高濃度では阻害剤となったり、一方の薬物がエフェクターとして他方の薬物の代謝を促進する場合があり、複雑な薬物間相互作用の原因となっている。

薬物間相互作用の解析をさらに難しくしているのは SNP の存在である。SNP とはヒト

ゲノムの数百塩基に1つの割合で出現する一塩基多型のことであり、薬剤の効き方を含めたヒトの個性を決定している。たとえば、CYP2C9の359位Ile(コドン:ATC)がSNPによりLeu(コドン:CTC)へ変異したケースが日本人の2.6%に認められ、糖尿病薬トルブタミドの代謝能が低下する結果、常用量の投与により副作用が現れる。SNPについては製薬会社を含めた世界的規模のコンソーシアムが設立されており、次々と情報が蓄積されている。しかしながら、SNP情報(遺伝型:ジェノタイプ)のみでは薬物代謝(表現型:フェノタイプ)の実体を知ることができず、両者を結びつける研究が創薬と医療の現場で急務となっている。

2. 研究の目的

前述のように、CYPはヒト薬物代謝の中心的役割を演じる重要な酵素であり、その活性はヒトゲノムの一塩基多型(SNP)により大きく影響を受ける場合がある。医薬品の開発と適正使用に資するべく、申請者はSNPと薬物代謝との関係を網羅的に検討しているが、最近、CYPの基質結合ポケット内に2分子の薬物が収納される例を見出すことができた。このような薬物間相互作用は予期せぬ副作用の原因となるが、その複雑さゆえ解析がほとんど進んでいない。そこで本研究では、CYPによる薬物の結合・認識機序と薬物代謝活性、さらにはこれらに対するSNPの影響を明らかにするため研究を行った。本研究により薬物間相互作用を含めたCYPの薬物代謝機構の解明(フェノタイプ)と遺伝子レベルでのSNP解析(ジェノタイプ)との対応をつけられれば、副作用を低減させる薬物投与設計を可能にするとともに、我が国にとってきわめて重要な医療費の高騰という問題を解決できると期待される。

3. 研究の方法

本研究ではまず、発現・精製は可能であったものの、その収量が少なかったCYP2D6、CYP3A4の精製法を改良した。その上で、報告されているSNPの情報に基づき各CYPの変異体を作製した。これらを用いて、微量平衡透析法や紫外可視吸収滴定法によりCYPに対する薬物の結合親和性を測定した。これらの解析には我々がすでに確立した手法を用いた。また、薬物結合にともなう紫外可視吸収、及び共鳴ラマンスペクトルの変化を観測することにより、活性中心ヘムの構造変化を調べた。解析には、ヘムがその配位構造の変化により特徴的なスペクトルを示すことを利用した。さらに、CYPの薬物代謝活性をHPLCにより評価し、構造変化との関係について考察した。以上の測定には現有の機器を用いた。

4. 研究成果

平成20年度においては、多種の薬物代謝に関わり多数の薬物間相互作用に関する報告がなされているものの、その解析が特に遅れているCYP2D6、CYP3A4を大量調製するため、これらの精製法に改良を加えた。培地に加えるタンパク質安定化剤やヘム合成基質の量を加減することにより、従来法に比べて2倍以上の収量を得ることに成功した。次に、これらのCYPを用い、紫外可視吸収滴定により薬物結合過程を精査した。その結果、CYP3A4ではその基質となるプロゲステロンやテストステロンが2段階の結合過程を示すことを見出した。さらに共鳴ラマン法を用いて検討した結果、これらの基質は第1段階目の結合によりヘム鉄に対する水分子の配位を促進することがわかった。この結果は他のCYP基質とは異なる挙動であり、酵素反応にとってむしろ阻害的な影響を及ぼすと考えられた。このことを逆に考えれば、第2の結合分子がエフェクターとして酵素活性を上昇させることを意味しており、多段階結合を示す薬物の特徴を表す可能性であると思われた。

CYP2D6、CYP3A4の大量調製に成功したことにより、ヒトの主要な5種のCYPすべてが揃ったため、平成21年度においては、すべてのCYPを用いた網羅的解析へと研究を展開した。その結果、これまでCYP2C19の基質であると考えられてきたジアゼパムはCYP2C9にも高い親和性を持つことがわかった。しかしながら、ジアゼパムは2C9によって代謝されず、他の2C9の代謝を強く阻害することがわかった。この結果は、これまで知られていなかったジアゼパムが関わる薬物間相互作用が起りうることを強く示唆している。また、これまで報告されているCYP1A2のSNP変異体をすべて調製した結果、いくつかの変異体はうまく発現しないことがわかった。これは変異によってタンパク質立体構造に大きな変化が起こっているためだと考えられた。発現に成功した変異体について薬物代謝活性を測定した結果、SNPの影響は反応最大速度にはほとんど影響しないものの、ミカエリス定数に対して最大数倍程度の変化が見られることが明らかとなった。

平成22年度においては、薬物間相互作用を引き起こす薬物の組合せとSNPの影響を明らかにするため、薬物結合性と代謝活性の網羅的測定を行った。ヒト薬物代謝に関わる5つの主要なCYP(1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4)をすべて調製し、SNP情報が得られている変異体を作製した。CYP1A2については16種すべてのSNP変異体の発現を試み、8種の発現に成功した。このCYPでは、ある薬物に対する最大代謝速度 V_{max} にはSNPの影響がほとんど見られなかったが、薬物親和性の目安

となるミカエリス定数 Km には最大 5 倍程度の変化が観測された (F186L, 1A2*11)。また, CYP2C19 については既報の 26 種の SNP 変異体のうち, 13 種の発現に成功した。いくつかの薬物に対する代謝活性を測定した結果, 野生型に比べて活性が半分程度に低下する 5 種の SNP 変異体 (R132Q, W120R, P227L, R442C, V113I) を特定することができた。さらに, CYP2D6 の薬物結合性について共鳴ラマン分光法を用いて検討した結果, n(Fe-CO)伸縮振動をプローブとして, 基質結合ポケット内における薬物配向性を分光学的に検知できることが明らかとなった。これらに加え, CYP3A4 の薬物結合性について検討し, 2 種の薬物が共存することによって活性中心であるヘムの構造が影響を受けることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 21 件)

1. Mika Kanamori, Kazuaki Ohkawa, Yusuke Kagawa, Taku Yamashita, Hiroshi Aoyama, Tadayuki Uno
Proton relay system in human CYP2C9 as revealed by site-directed mutagenesis
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010)
Honolulu, Hawaii, USA 2010.12.17
2. Maki Matsumoto, Yumiko Iiga, Sayed M. S. Ali, Ryuichi Sasaki, Taku Yamashita, Hiroshi Aoyama, Tadayuki Uno
SNP variants reveal the crucial region for drug recognition in human CYP2C19
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010)
Honolulu, Hawaii, USA 2010.12.17
3. 宇野公之
個別化医療に向けた医薬品の適正使用
第 42 回大阪大学中之島講座
大阪 2010.9.17
4. Tadayuki Uno, Sakiko Morita, Akihide Tsujimoto, Shinji Murata, Masafumi Egawa, Taku Yamashita, and Hiroshi Aoyama
Effect of Single Nucleotide Polymorphisms on the Drug Metabolizing Properties of Human Cytochrome P450 1A2
39th International Conference on Coordination Chemistry (ICCC39)
Adelaide, South Australia
Australia 2010.7.28
5. Tadayuki Uno, Sakiko Morita, Akihide Tsujimoto, Masafumi Egawa, Taku Yamashita, and Hiroshi Aoyama
Drug Binding and Metabolizing Properties of Human Cytochrome P450 1A2
Sixth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-6)
Santa Ana Pueblo, New Mexico, USA
2010.7.6
6. 宇野公之
共鳴ラマン分光法によるヘムタンパク質の構造・機能解析
岡山大&理研ジョイントシンポジウム
最先端計測技術のトレンド 2010
岡山 2010.6.28
7. 宇野公之, 宮本正芳, 戸山亮, 松本麻希, 金森美果, 山田麻由, 山下沢, 青山浩
Expression and purification of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase
第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 徳島 2010.6.25
8. 宇野公之, 金森美果, 大河万頭, 香川雄輔, 山下沢, 青山浩
Amino acid residues involved in the proton relay system in human CYP2C9
第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 徳島 2010.6.25
9. 宇野公之, 山田麻由, 上村真司, 柳田詩織, 森田早紀子, 松本麻希, 青山浩, 山下沢
Resonance Raman spectroscopy reveals distinct drug orientation in human CYP2D6
第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 徳島 2010.6.25
10. Tadayuki Uno, Maki Matsumoto, Yumiko Iiga, Sayed M. S. Ali, Ryuichi Sasaki, Taku Yamashita, and Hiroshi Aoyama
Effect of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Drug Metabolizing Properties of Human CYP2C19

The 5th Seoul-Kyoto-Osaka Joint
Symposium on Pharmaceutical Sciences
for Young Scientists
Suita, Osaka, Japan 2010.5.20

11. 森田早紀子, 辻本景英, 江川真文, 山下沢, 青山浩, 宇野公之
ヒト薬物代謝酵素 CYP1A2 の一塩基多型と薬物代謝活性との相関
第 59 回日本薬学会近畿支部大会
東大阪 2009.10.24
 12. Tadayuki Uno, Shinji Uemura, Shiori Yanagita, Taku Yamashita, Hiroshi Aoyama
Drug Binding and Metabolizing Properties of Human CYP2D6
14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC XIV)
Nagoya, Aichi, Japan 2009.7.26
 13. 宇野公之, 松本麻希, 飯賀由実子, Sayed M. S. Ali, 佐々木隆一, 山下沢, 青山浩
ヒト CYP2C19 の薬物結合および代謝能における一塩基多型の影響
第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 吹田 2009.6.12
 14. 宇野公之, 上村真司, 柳田詩織, 山下沢, 青山浩
ヒト CYP2D6 の薬物結合および代謝能
第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 吹田 2009.6.12
 15. 宇野公之, 森田早紀子, 辻本景英, 江川真文, 山下沢, 青山浩
ヒト CYP1A2 の代謝活性と一塩基多型との相関
第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 吹田 2009.6.11
 16. 宇野公之, 上村真司, 柳田詩織, 山下沢, 青山浩
ヒト CYP2D6 の薬物結合性及び代謝活性
日本薬学会 129 年会 京都 2009.3.27
 17. 宇野公之, 上村真司, 柳田詩織, 青山浩
ヒト CYP2D6 の発現と薬物代謝活性
日本生物物理学会第 46 回年会
福岡 2008.12.3
 18. 宇野公之, 服部芳明, 野中朋子, Rajamanickam Vijayalakshmi, 鶴田諒介, 山下沢, 青山浩
ヒト薬物代謝酵素 CYP3A4 の基質認識と薬物代謝反応機構
第 58 回日本薬学会近畿支部大会
神戸 2008.10.25
 19. 宇野公之, 上村真司, 柳田詩織, 山下沢, 青山浩
ヒト CYP2D6 の発現と薬物代謝活性
第 58 回日本薬学会近畿支部大会
神戸 2008.10.25
 20. 宇野公之, 大河万頭, 香川雄輔, 渡辺亮介, 繁富輝明, 山下沢, 青山浩
ヒト薬物代謝酵素 CYP2C9 の一塩基多型と薬物代謝活性の相関
第 58 回日本薬学会近畿支部大会
神戸 2008.10.25
 21. 宇野公之, 飯賀由実子, Sayed Ali, 佐々木隆一, 富杉佳計, 青山浩
Effect of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Drug Binding and Metabolizing Properties of Human CYP2C19
第 18 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 名古屋 2008.6.5
- [図書] (計 1 件)
1. 宇野公之
共鳴ラマン分光法によるヘムタンパク質の活性部位構造の解明
薬学分析科学の最前線 (日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編)
pp. 10-11, じほう, 東京 (2009)
- [その他]
ホームページ等
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b006/>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
宇野 公之 (UNO TADAYUKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 00183020
 - (2) 研究分担者
青山 浩 (AOYAMA HIROSHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 60291910