

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790045

研究課題名(和文) 静的および動的アプローチによる薬物代謝酵素の代謝活性メカニズム

研究課題名(英文) The Elucidation on mechanism of drug metabolism by a statistic and dynamics approaches.

研究代表者

山下 沢 (Yamashita, Taku)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・招聘准教授

研究者番号：70398246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：前年度の研究成果から、CYP分子種に関して、三環系抗うつ薬のアミトリプチリンなどで興味深い結果が得られていたことから、アミトリプチリンを主に代謝することを同定した2C19という分子種に関して既報のSNP数種および新たに調製した各種変異体に関し、代謝活性の評価を行った。特に、2C9と2C19が性質の異なる薬物を基質とすることに着目して電荷の異なるアミノ酸をそれぞれ導入した変異体を、新規に調製して測定を行った結果、新たに、72位のアミノ酸であるグルタミン酸が、塩基性の薬物の結合および代謝には重要であることを見出した(T. Z. Attia, T. Yamashita, et al. 2014)。

研究成果の概要(英文)：The result in the last fiscal year suggested that tricyclic antidepressants could be interesting targets which should be investigated on several CYP isoforms. Especially, CYP2C9 and 2C19 had been reported that the two isoforms metabolized opposite properties of substrates in each. In this work, we focused on two reciprocal residues on positions 72 and 241, and two mutants were prepared, respectively; i.e., K72E and K241E for CYP2C9 and E72K and E241K for CYP2C19. These mutants and wild-types on CYP2C9 and 2C19 were evaluated on binding affinities and metabolic activities on three tricyclic antidepressants; amitriptyline, imipramine, and dothiepin. The estimated values implied that an amino acid located on position 72 could contribute to recognize property of substrate, mainly on basic drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：シトクロムP450 代謝活性 時間分解スペクトル測定 基質認識 結合親和性 薬物代謝 部位特異的変異

1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 (CYP) は薬物代謝に関わる重要な酵素であり、現在我が国で市販されている薬物は約 2,800 種類存在し、その約半分の代謝には CYP の分子種の一つである 3A4 が関与している。一方、別の分子種である 1A2 は環境因子を代謝して発癌性を増悪させることが報告されており、いずれも薬物や化合物の結合を分子レベルで詳細に検討することが求められているが、研究は思うように進行していない。これは CYP の薬物代謝能を解析するだけであれば、必ずしも単離精製する必要がなく、肝ミクロソームを用いて評価することが可能であり、事実、近年も同方法に基づく新規解析法に関する報告 (H. Veith, et al., *Nature Biotechnology*, 2009) が注目されており、CYP に関する研究は今日まで肝ミクロソームによるものが主である。このような背景の中、本申請課題と同様に CYP を大量発現系の構築によって単離精製して構造解析を行ったものは研究として非常に興味深く (D. S. Lee, et al., *Nature*, 2008 および D. Ghosh, et al., *Nature*, 2009)、CYP の構造に関する知見を得ることは研究対象として非常に注目されている。一般的に臨床における報告、および動物実験に基づく一塩基多型などの影響が論じられてきたが、その影響は遺伝子レベルの上流で CYP の発現に影響を及ぼす核内受容体の存在など、様々な要因が加味されるべきであり、CYP 単独の変化による影響を比較することは極めて困難であった。また、先に述べた肝ミクロソームを用いた研究においても、夾雑するタンパク質による CYP への影響を考慮すべきであり、CYP の遺伝子レベルでの変化に伴う代謝活性の変化など、分子レベルで機能を詳細に調べるためには、CYP を単離精製して種々の測定を行うことが必要であった。今回、単離精製して各種測定を行う際、申請者がこれまで行ってきた時間分解測定については、過去に異なる蛍光測定の論文が一つ報告されているだけであった。

2. 研究の目的

本研究課題では、従来の静的な測定手法で求めることができる薬物の代謝活性に重要な『結合親和性』や『代謝活性』を、より詳細に検討することを第一とし、さらに、新たに動的な因子として『接近する薬物の時間差』に関する知見を時間分解測定によって獲得し、以上の結果を総合することで、薬物代謝酵素の機能発現機構に関する新たな知見を得ることを目的とした。また、薬物代謝における各分子種間での薬物の認識に関する違いを同定することを目的とした。一方、薬物代謝に重要な CYP の還元酵素にも着目した。CYP の代謝酵素としての活性を評価するため

には、還元酵素の使用が不可欠となることはもちろん、CYP と還元酵素との分子レベルでの関係性を明らかとするためには、CYP のみならず還元酵素も安定に供給する必要があり、またサンプルの状態もきちんと評価されたものである必要があった。しかしながら、購入している CYP の還元酵素は少量で極めて高額であり、酵素活性には用いることが可能ではあるものの、分子レベルでの相互作用を精査するためには、大量に獲得する必要があり、本獲得系の確立および相互作用に関する検討も、本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

CYP 分子種に関して、ヒトにおける主要薬物代謝に関わる五つの分子種のうち、発現量が比較的少なく困難であった 1A2 および 3A4 に関して、いくつかの新規プラスミドベクターを検討し、最終的に、測定に必要な量の 1A2 および 3A4 の獲得に成功した。一方、CYP の還元酵素に関しても種々の精製樹脂を検討した結果、最終的に実験に耐えうる量の獲得にも成功した。そこで、これらを用い、各 CYP 分子種に関して、代謝活性および薬物結合性の評価を行った。

さらに、先に述べた動的な知見を得るために、今日まで報告がない時間分解測定という特殊な手法を、研究協力者であるフランスの Marten H. Vos の装置を用いて測定を行った。時間分解測定で得られた結果から、CYP2C9 と 2C19 は、相同性が約 90% と高いにも関わらず、薬物の結合部位には相反する性質があることが示唆されたため、相反する電荷を有するアミノ酸に着目し、相互に置換するような変異体を調製して、薬物の結合性および代謝活性への影響を、分光光度計および液体クロマトグラフィーを用いて検証した。

4. 研究成果

獲得した CYP 分子種数種に対し、まずは還元酵素である CPR との相互作用に着目して研究を推進してきた。独自に検討を重ねてきた結果、CPR については完全長のもを発現および精製することに成功した。そこで、まずは CPR が既製のものと同じであることを確認するため、CYP の代謝活性の評価へ用いることとした。一方、CYP に関して精製および活性の有無の確認段階において興味深い知見が得られたため、本研究を主に CYP に関するものとした。3A4 の獲得により、代謝される基質としてアミトリプチリンを用いて測定を行った。また、比較対象として、同様にアミトリプチリンを代謝するとされる 2C19 および 2D6 についても測定を行った。精製した CPR においても CYP への電子供給が行われることを示す代謝反応

が確認された。結果、代謝が薬物の化学構造に依存して起こっていることが示唆され、各分子種の貢献度に関する知見が得られたため、論文として印刷公表に至った(T. Z. Attia, T. Yamashita, et al., 2012)。一方、これら三つの分子種 2C19、2D6、および 3A4 について動的な知見を得るためにフランスの Ecole Polytechnique において時間分解スペクトルの測定を行った。この際、主要な分子種として当研究室ですでに発現系が確立されていた 2C9 を用い、2C9 の基質であるジクロフェナクを結合させ、基質存在の有無による一酸化炭素の結合への影響を精査した。その結果、昨年度に見られた有意な差が、2C9 においては基質の存在によって、解離した一酸化炭素がより多く再結合を行うが、相同性が極めて高い 2C19 に対してアミトリプチリンを存在させた条件では負の相関が見られることが明らかとなった。

上記の結果を受け、2C9 と 2C19 に関して、既報の SNP 数種および新たに調製した各種変異体に関し、代謝活性の評価を行った。特に、2C9 と 2C19 が性質の異なる薬物を基質とすることに着目して電荷の異なるアミノ酸をそれぞれ導入した変異体を、新規に調製して測定を行った結果、72 位のグルタミン酸が、塩基性の薬物の結合および代謝には重要であることを見出した (T. Z. Attia, T. Yamashita, et al. 2014)。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

T. Z. Attia, T. Yamashita, M. A. Hammad, A. Hayasaki, T. Sato, M. Miyamoto, Y. Yasuhara, T. Nakamura, Y. Kagawa, H. Tsujino, M. A. Omar, O. H. Abdelmageed, S. M. Derayea, and T. Uno

“Effect of cytochrome P450 2C19 and 2C9 amino acid residues 72 and 241 on metabolism of tricyclic antidepressant drugs.”

Chem. Pharm. Bull. 62(2), pp.176-81 (2014)

T. Z. Attia, T. Yamashita, M. Miyamoto, A. Koizumi, Y. Yasuhara, J. Node, Y. Erikawa, Y. Komiyama, C. Horii, M. Yamada, M. A. Omar, O. H. Abdelmageed, S. M. Derayea, and T. Uno

“Comparison of cytochrome p450 mediated metabolism of three central nervous system

acting drugs.”

Chem. Pharm. Bull. 60(12), pp.1544-9 (2012)

[学会発表](計 2 件)

山下沢, T.Z. Attia, M. A. Hammad, 佐藤匠、早崎瑛紀、宮本正芳、安原由樹、中村隆志、辻野博文、宇野公之

“Contribution of oppositely charged residues to the drug metabolism of cytochrome P450 2C9 and 2C19”

日本薬学会 第 134 年会 (熊本) 2014 年 3 月

T. Yamashita, T. Z. Attia, M. Miyamoto, A. Koizumi, Y. Yasuhara, J. Node, Y. Erikawa, Y. Komiyama, C. Horii, M. Yamada, M. A. Omar, O. H. Abdelmageed, S. M. Derayea, and T. Uno

“Comparison of Cytochrome P450 Mediated Metabolism of Three CNS Acting Drugs.”

50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450 (福岡) 2012 年 12 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 沢 (大阪大学)

研究者番号 : 70398246

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :