

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月 31日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590054

研究課題名（和文）薬物代謝酵素CYP2C9遺伝子多型の構造－活性に関する研究

研究課題名（英文）Structure - activity relationship studies of CYP2C9 genetic variants

研究代表者

前川 京子 (MAEKAWA KEIKO)

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部・室長

研究者番号：70270626

研究成果の概要（和文）：薬物代謝酵素 CYP2C9 において、日本人で見出される多型、CYP2C9*3, CYP2C9*28, CYP2C9*30、が酵素活性及び立体構造に与える影響を検討した。インビトロ機能解析により CYP2C9*3 及び CYP2C9*30 は、グリブライドの代謝活性を有意に低下させること、X線結晶構造解析により CYP2C9*30 は基質結合部位においてロサルタンとの結合に重要な残基のアミノ酸変異であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：To evaluate structure - activity relationship of CYP2C9 genetic variants, CYP2C9*3, CYP2C9*28, CYP2C9*30, found in Japanese, in vitro functional study and X-ray crystallography were performed using recombinant CYP2C9 enzymes. Two variants, CYP2C9.3 and CYP2C9.30 showed decreased catalytic activities toward glyburide. X-ray crystallography revealed that amino acid substitution by CYP2C9*30 might influence the binding of losartan at substrate binding site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
2012年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
総計	3,500,000		3,500,000

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：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

CYP2C9 は現在市販されている医薬品の約15%の代謝に関与する P450 分子種である。その基質としては、治療域の狭い抗凝固薬ワルファリンや抗てんかん薬フェニトイン、常用医薬品である抗高血圧薬ロサルタンや経口糖尿病薬グリメピリド、非ステロイド性抗炎症薬ジクロフェナック等が挙げられる。CYP2C9 には、代謝活性の低下をもたらす遺伝子多型として、*3 (I1e359Leu) が日本人で

約3%のアレル頻度で存在するが、このアレルを有する人では、CYP2C9 で代謝される医薬品の血中濃度が変化し、薬効や副作用発現の個体差の原因となることが知られている。すでに、研究代表者らは、日本人の糖尿病患者、高血圧患者、脳卒中患者及び健常人を対象に CYP2C9 多型の探索を試み、日本人には*3 (I1e359Leu) 以外にも活性低下を引き起こす多型、*13 (Leu90Pro)、*26 (Thr130Arg)、*28 (Gln214Leu)、*30 (Ala477Thr)、*33

(Arg132Gln) が存在することを見出した (Maekawa K, et al, Pharmacogenet Genomics. 2006, 16:497-514 及び Yin T and Maekawa K et al, Hypertens Res. 2008, 31:1549-1557)。さらに、ジクロフェナック、グリメピリド及びロサルタンを基質として用いた場合に、多型によってもたらされる活性低下の程度が、用いる基質により異なることを明らかとした (Maekawa K et al, Drug Metab Dispos. 2009, 37:1895-1903)。しかし、上記以外の基質の代謝に対し、これらの多型が及ぼす影響は不明であった。

X 線結晶構造解析は、P450 分子種と基質との結合様式を明らかにするための手法として広く用いられている。ヒト CYP2C9 の X 線結晶構造解析においては、ワルファリンとの結合体 (PDB ID: 1OG5) 及びフルルビプロフェンとの結合体 (1R90) が報告されている (Williams PA et al., Nature 2003, 424:464-468 及び Wester MR et al., J Biol Chem 2004, 279:35630-5637)。しかし、多様な大きさや構造をもつ種々の CYP2C9 基質の結合様式を上記 2 種の X 線結晶構造解析から、予測するのは困難である。さらに、遺伝子多型を有する CYP2C9 変異型の立体構造解析は、未だ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は下記の 2 点である。

(1) 薬物代謝酵素チトクローム P450 2C9 (CYP2C9) において、日本人から見出される多型、*3 (Ile359Leu)、*28 (Gln214Leu)、*30 (Ala477Thr) が、種々の医薬品の代謝活性に与える影響を、組み換え酵素を用いたインビトロ機能解析系により明らかにする。

(2) X 線結晶構造解析により、これらの医薬品と CYP2C9 の結合様式を同定し、多型によってもたらされる基質依存性の活性変化のメカニズムを解明する。

最終的に、インビトロ機能解析及び立体構造解析の両面から、多型が CYP2C9 タンパクに与える影響を明らかにし、多型の影響を受けにくい医薬品の設計のための基盤的情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CYP2C9 野生型及び変異型タンパクのインビトロ機能解析

活性測定は、ヒト CYP2C9 野生型 (CYP2C9*1) または変異型 (CYP2C9*3, CYP2C9*28, CYP2C9*30) cDNA をヒト NADPH-P450 還元酵素 (POR) cDNA と共にバキュロウイルスに導入し、昆虫細胞 (Sf21) で発現・調製したマイクロソーム (CYP2C9. 1, CYP2C9. 3, CYP2C9. 28, CYP2C9. 30) を試料として用い、CYP2C9 の基質として知られる経口糖尿病薬のグリブ

ド (GLB) の水酸化活性を下記の通り測定した。

酵素反応には、発現マイクロソーム画分 (野生型または変異型 20 pmol) を 40 pmol の cytochrome b5 と混和し、37°C で 5 分間プレインキュベートした後、GLB (0.125-20 μ M) 及び NADPH regenerating system を含む 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) に添加して総容量 1.0 ml とした。反応液は 37°C で 10 分間インキュベートした後、50 mM KCl (pH は HCl で 1.0 に調整) を 1 ml 加えて反応停止し、さらに内部標準物質として 2.5 μ M のグリピジドを 25 μ l 添加した。5 ml のジエチルエーテルを加えて抽出した後、有機層を分取し、窒素風乾した。150 μ l のアセトニトリルを加えて再溶解した後、LC-MS による解析に供した。LC による分離は、移動相として、A 溶媒は 0.06% 酢酸水 (pH3.3) を、B 溶媒は 100% メタノールを用い、0-2.5 分で B 溶媒の割合を 32% から 52% まで直線的に増加させた後、B 溶媒を 52% で 5.5 分間保持し、さらに次の 8 分間で B 溶媒の割合を 95% まで直線的に増加させた。流速は 0.25 ml/分とし、カラムは、Shim-pack FC-ODS (3.0 μ m, 2.0 x 75 mm, Shimadzu) を用い、カラム温度は 40 度とした。検出器として、四重極型 MS を用い、エレクトロスプレー法 (ESI 法) によるイオン化後、selected ion monitoring (SIM) 法により、基質、内標、代謝物を定量した。検量線は、CYP2C9 及び OR を発現していないコントロールマイクロソームに、代謝物標準品を添加して同様の反応、抽出、定量操作を行い、内部標準法により作製した。酵素反応速度論的パラメーター値の統計学的有意差の検定には、Dunnett 検定を用いた。

(2) CYP2C9 野生型及び変異型タンパクの X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析には、大腸菌に発現させた CYP2C9 野生型または変異型の組換えタンパクを用いた。大腸菌での CYP2C9 タンパク発現量の増加と溶解性の向上を目的として、野生型 CYP2C9 cDNA を鋳型とし、PCR により N 末の膜貫通領域に対応する塩基配列を削除し、この部位に新たに塩基性アミノ酸配列を付加するための塩基配列を導入した。さらに酵素の精製を容易にするため、C 末に 4 残基からなる His タグを導入した。得られた cDNA をシーケンシングにて塩基配列を確認後、pKK233-2 ベクターの Trc プロモーター下に導入し、これを用いて、大腸菌 (DH5alpha, BL21, Chaperone Competent Cell pGro7/BL21、及び Rosetta2) にトランスフォーメーションした。得られたコロニーは 100 μ g/ml アンピシリンとそれぞれの大腸菌に必須な抗生物質を含む LB 培地にて、一晚培養した後、その培養液 9 ml を上記と同様の抗生物質を含む TB 培地 150 ml に添加し、600 nm の吸光度が

1.0に達するまで、37°C、250 rpmで培養した。1mM IPTG (Anatrace, Maumee, OH, USA)にてタンパク発現を誘導した後、heme鉄の前駆体である δ -アミノレブリン酸 (Sigma, St. Louis, MO, USA)を80 mg/L加えてさらに30°C、100 rpmで培養し、誘導後66時間後に細胞を回収し、CYP2C9タンパクの精製を行った。

タンパク精製は、全工程を4°Cにて行った。まず、大腸菌ピレットを20%グルセロール、10 mM β -メルカプトエタノール、1 mM PMSFを含む20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH=7.4) に、培養液の10%の容量で懸濁させた後、0.3 mg/mlのリゾチーム (Sigma)を加えて30分反応させ、細胞壁を分解した。集菌後、細胞残骸を20%グルセロール、10 mM β -メルカプトエタノール、0.5 mM PMSFを含む500 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH=7.4) に、培養液5%の容量で懸濁し、超音波破碎した。遠心にて、可溶性画分を回収した後、4.8 mM

5-cyclohexylpentyl- β -D-maltoside (Cymal-5, Anatrace)を添加して1時間反応させ、超遠心にて、脂質と分離した。可溶性画分は、Ni-NTAアフィニティー担体

(HisTrap HP, GE Healthcare, Tokyo, Japan)、続いて、陽イオン交換樹脂であるCM-セファロース担体 (GE Healthcare)を用いて分離した。溶出画分のAbsolute spectra及びCO difference spectraを測定し、CYP2C9タンパク量を算出した。

結晶化のためのスクリーニングは以下の方法で行った。精製したCYP2C9タンパクを20%グルセロール、500 mM塩化ナトリウム、1 mM EDTA、0.2 mM DTTを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH=7.4)で、18 nmol/mlの濃度に希釈した後、リガンドとして、ロサルタンを54 nmol/ml (CYP2B4:ligand=1:3)の濃度で添加した。反応溶液は、タンパク濃度として、30 mg/ml (554 nmol/ml)になるまで濃縮した後、新たに1.665 mMリガンドと4.8 mM Cymal-5を加え、0.2 μ mのフィルターを用いて濾過し、タンパク試料とした。結晶化のための初期の条件検討は、Wizard I & II (Emerald BioSystems, Bainbridge Island, WA, USA)及びPEGRx (Hampton research, Aliso Viejo, CA, USA)を用いてsitting-drop蒸気拡散法にて行った。回折データはつくば放射光にて収集した。位相の決定は、すでに解析済みのCYP2C9の構造 (PDB ID: 1R90)をサーチモデルとし、プログラムPHASERを用いて分子置換法により行った。

4. 研究成果

(1) CYP2C9野生型及び変異型タンパクの機能解析

GLBはCYP2C9野生型酵素により主に4-trans hydroxycyclohexyl GLB (M1)、4-cis hydroxycyclohexyl GLB (M2a)、3-cis

hydroxycyclohexyl GLB (M2b)に代謝された。野生型であるCYP2C9.1によるM1生成のMichaelis-Mentenモデルのパラメーターは、Km値が0.34 μ M、Vmax値が251 pmol/min/nmol P450であり、これよりintrinsic clearance (Vmax/Km)値は740 μ l/min/nmol P450と算出された (図1)。同様に、CYP2C9.1によるM2a、M2b生成のパラメーターは、それぞれKm値が0.38 μ M及び0.40 μ M、Vmax値が190 pmol/min/nmol P450及び43 pmol/min/nmol P450であった。よってCYP2C9野生型によるM1、M2a、M2b生成の立体選択性はM1が最も高く、続いてM2a (M1の70%)、M2b (M1の15%)であった。CYP2C9.3変異型酵素の活性は、野生型酵素と比較してM1、M2a、M2bのすべての代謝物生成に対して、km値で1.8-2.0倍に有意に増加し、Vmax値で0.6-0.7倍に減少し、intrinsic clearance値は、野生型の32-36%に低下した。一方、CYP2C9.28変異型酵素の活性は、M1、M2a、M2bのすべての代謝物生成に対して、km値は野生型酵素と同程度であり、Vmax値は、M1生成に対しては野生型酵素の0.7倍に低下したが、M2b生成に対しては野生型酵素よりの1.6倍に増大した。CYP2C9.30変異型酵素の活性は、野生型酵素と比較してM1、M2a、M2bのすべての代謝物生成に対して、km値で4.4-5.1倍に有意に増加し、Vmax値で1.0-1.5倍に増加し、intrinsic clearance値は、野生型の21-31%に低下した。

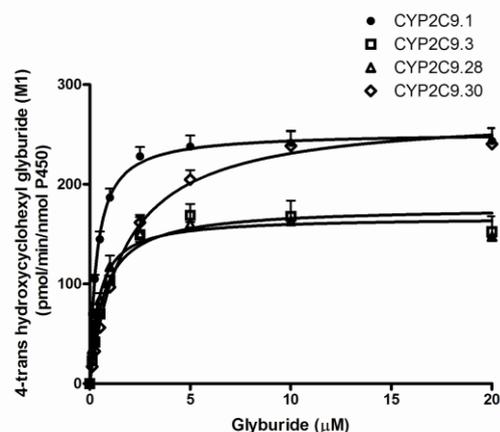


図1 CYP2C9野生型及び変異型タンパクによるM1生成の酵素反応プロファイル

(2) CYP2C9野生型及び変異型タンパクのX線結晶構造解析

CYP2C9野生型プラスミドをDH5alpha, BL21、Chaperone Competent Cell pGro7/BL21、及びRosetta2の4種の大腸菌にトランスフェクションし、CYP2C9タンパク発現量をCO差スペクトルで定量した。Rosetta2を宿主として用いた場合、1Lのカルチャーあたり314 nmolのP450発現量をCO差スペクトルより確認できたが、残りの3種の大腸菌を用いた場

合、発現量は低く、レアコドンが発現量に影響している可能性が示唆された。

一方、タンパク精製系の確立においては、Ni アフィニティクロマトグラフィー、CM セファロースイオン交換クロマトグラフィーを用いた場合、高純度に精製が可能となり、最終的に 1L のカルチャーあたり、Absolute スペクトル及び CO 差スペクトルから算出して純度 98% 以上の CYP2C9 タンパクを 65 nmol 得た。精製タンパクをロサルタンと反応後、反応溶液をタンパク濃度として、30 mg/ml になるまで濃縮し、結晶化溶液として 0.1M HEPES (pH=7.5) 及び 20% (w/v) PEG-8000 を用い、sitting-drop 蒸気拡散法にて結晶を作製した。得られた結晶を、放射光施設にて測定し、分解能 3.1 オングストロームの回折データを収集した。今回データ収集に使用した結晶は、CYP2C9 としてはこれまでに報告例のない空間群に属する結晶であり、ヘム鉄周辺には、ロサルタン由来と考えられる差フリーエ電子密度マップが得られた。Ala477Thr 残基は、活性中心においてロサルタンに近接して位置し、ロサルタンの代謝に対するこの残基の重要性が示唆された。今後は高分解能の回折データを収集するため、結晶化条件の最適化を行い、野生型と変異型タンパクへのロサルタンの結合様式の違いを X 線結晶構造解析により明らかにする予定である。

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 1 件)

- ① Gay SC, Roberts AG, Maekawa K, Talakad JC, Hong WX, Zhang Q, Stout CD, Halpert JR: Structures of cytochrome P450 2B4 complexed with the antiplatelet drugs ticlopidine and clopidogrel. *Biochemistry*, 49, 8709-8720, 2010. 査読有
doi: 10.1021/bi100914z

[学会発表] (計 2 件)

- ① Maekawa K, Gay SC, Roberts AG, Talakad JC, Hong WX, Zhang Q, Stout CD, Halpert JR: CYP2B4 の精製とクロピドグレルをリガンドとした X 線結晶構造解析。日本薬物動態学会第 25 回年会 (大宮ソニックシティ) 2010 年 10 月 8 日
- ② Maekawa K, Harakawa N, Kim SR, Sawada J, Saito Y: Effects of CYP2C9*3, *28 and *30 on CYP2C9 Inhibition profiles and Glyburide metabolism in Vitro. 第 17 回北米薬物動態学会 (アトランタアメリカ合衆国) 2011 年 10 月 17 日

[その他]

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 京子 (MAEKAWA KEIKO)
国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長
研究者番号: 70270626

(2) 研究分担者

斎藤 嘉朗 (SAITO YOSHIRO)
国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・部長
研究者番号: 50215571

(3) 連携研究者

安達 基泰 (ADACHI MOTOYASU)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号: 60293958