

UDP-グルクロン酸転移酵素とのタンパク質間相互作用によるシトクロムP450 3A4活性の制御

宮内, 優

<https://hdl.handle.net/2324/1500656>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

【目的】 シクロム P450 (P450, CYP) 3A4 は医薬品の 50% の代謝を司る主要な薬物代謝酵素の一つである。この P450 にはいくつかの大きな個体差が報告されており、その一つである肝臓における発現量の個体差は 40 倍にも及ぶと言う。一方、*in vivo* における CYP3A4 由来のクリアランスには、10 倍程度の個体差しか報告されていない。このように、CYP3A4 活性はその発現量だけでは十分に説明できない。このような発現量と活性の間のギャップを一塩基多型で説明できる P450 分子種も存在するが、CYP3A4 の場合は活性に影響する多型の報告が少なく、またそれが生じる頻度も低いことから、この機構での説明は困難である。CYP3A4 の個体差を解明する他の方法として microRNA による直接的および間接的な発現量の調節や、P450 に電子を供給する NADPH P450 reductase (CPR) の遺伝的多型などが挙げられるが、いずれも発現量と活性に見られる個体差の大きさのギャップを説明するのには不十分である。

本研究ではこの問題を解決するため、CYP3A4 と異種薬物代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) とのタンパク質間相互作用に着目した。先行研究において、CYP3A4 が UGT の主要分子種である UGT2B7 とタンパク質間相互作用をし、そのモルヒネ抱合活性における位置選択性を変化させることが報告されている (1)。しかし、その逆向きの影響は明らかにされていない。若し、UGT2B7 が CYP3A4 の活性を変化させるならば、これは発現量に依存しない CYP3A4 活性調節機構の一つと考えられる。この機構の解明を目指し、本研究では共発現系を用いて UGT2B7 が CYP3A4 活性に及ぼす影響を検討した。また、UGT2B7 側の相互作用部位の同定と、UGT の P450 触媒サイクルにおける作用部位の推定も併せて行った。

【方法】 バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて、CYP3A4、CPR および UGT2B7 の共発現系を構築した。組換えウイルスを感染させた細胞からマイクロゾームを調製し、酵素源として用いた。各酵素の発現は immunoblotting を中心に確認し、CYP3A4 と CPR に関しては分光学的手法でも検出を行った。この発現系においても CYP3A4 と UGT2B7 間の相互作用を確認するため、C-末端にヘキサヒスチジンペプチド (His-tag) を付加した CYP3A4 (His-CYP3A4) を作製し、Ni²⁺ 結合担体との親和性を利用したプルダウンアッセイを行った。UGT2B7 が CYP3A4 活性に与える影響は、CYP3A4/CPR 二酵素発現系と CYP3A4/CPR/UGT2B7 三酵素発現系とで P450 活性を比較することで検討した。この比較を行う際は、CYP/CPR 比が近いバッチを用いることで CPR が CYP3A4 活性へ与える影響を実質上消去し、UGT2B7 の影響のみを抽出した。CYP3A4 活性の酵素反応速度論的解析 (kinetics) では、得られた活性値を下記のシグモイドの式に非線形回帰することで各パラメータ (V_{max}, S₅₀, n) の算出を行った。UGT の変異体を作製する

上で、C-末領域の構造モデルを新たに構築した。二次構造の推定には公開ソフトウェア JPred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) を、また膜貫通領域となりうる高疎水性の領域の推定には TMHMM v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) を利用した。

$$v = \frac{V_{\max} \times S^n}{S_{50}^n + S^n} \quad (n; \text{Hill coefficient})$$

【結果】 先ず、本研究で用いた発現系での CYP3A4-UGT2B7 相互作用を確認するため、His-CYP3A4 を用いたプルダウンアッセイを行った。UGT2B7 の単独発現系と、His-CYP3A4 と共発現させた系をそれぞれ調製し、コール酸ナトリウムで可溶化を行った。サンプルを超遠心で分離し、上清を可溶化マイクロゾームとして回収した。Imunoblotting により、UGT2B7 および His-CYP3A4 が十分に可溶化されたことを確認した。可溶化マイクロ

ゾームの一部を Ni^{2+} 結合担体と混和したのち、特異的に結合したタンパク質を高濃度のイミダゾールを含んだ溶液で溶出した。His-CYP3A4 は期待どおり担体と特異的に結合したため、溶出分画に検出された。一方、UGT2B7 は単独発現系では担体との親和性を示さなかったが、His-CYP3A4 と共発現させると担体と結合したことから、これらの酵素間の相互作用が確認された。また、対照実験として、UGT2B7 を UGT と同じ膜位相を有する calnexin (CNX) に置換して同様の検討を行った。CNX もコール酸ナトリウムで十分に可溶化されたものの、His-CYP3A4 共発現の有無に依らず溶出分画に得られることはなかった。以上の結果から UGT2B7 と CYP3A4 との選択的な相互作用を確認することができた。次に UGT2B7 が CYP3A4 活性に与える影響を検討した。UGT2B7 が共発現すると CYP3A4 活性は抑制され、kinetics では CYP 活性の V_{max} が有意に低下した。この抑制効果は、相互作用が確認されなかった CNX では認められなかったため、UGT2B7 はタンパク質間相互作用を介して CYP3A4 活性を抑制することが示唆された (Fig. 1)。

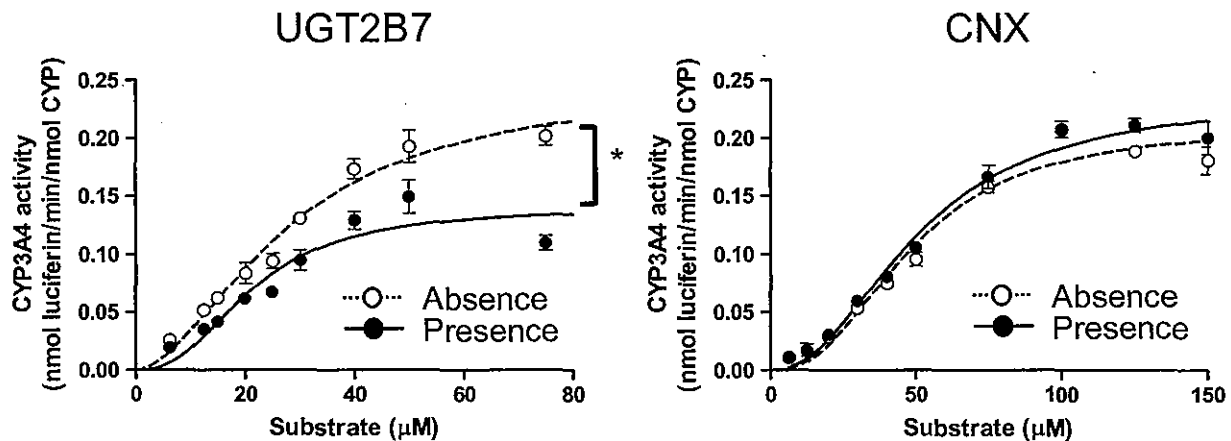


Fig. 1 Effects of UGT2B7 and CNX on the kinetics of CYP3A4 Each plot represents the mean \pm S.D. of triplicate assay. Asterisk shows statistical significance in V_{max} ($p < 0.017$)

このように UGT2B7 の共発現が CYP3A4 活性を抑制したことから、これを指標に UGT 側の相互作用部位の同定を行った。先行研究で、CYP3A4 側の相互作用部位は細胞質側に面する J-helix であることが示唆されており、UGT 側もその近傍に位置する可能性が高いと予想した。そこで UGT の構造のうち、唯一細胞質側に突出すると考えられている cytosolic tail に着目し、変異体の作製を行った。変異を導入した箇所は Table 1 にまとめて示す。Cytosolic tail は UGT の C-末端に位置する、約 20 アミノ酸からなる領域である。まず、この領域を C-末端から 11 アミノ酸を削った変異体 ($\Delta 519-529$) を作製し、CYP3A4 と共発現させると、野生型同様の抑制効果を示した。一方、更に 8 アミノ酸を削除した変異体 ($\Delta 511-529$)、および膜貫通領域と cytosolic tail を全欠失させた変異体 ($\Delta 493-529$) は CYP3A4 活性を抑制できなかった。これらの結果から cytosolic tail の 511-518 番までの領域に相互作用に重要なアミノ酸があると予測されたが、これに反し、この領域だけを欠失させた変異体 ($\Delta 511-518$) は CYP3A4 活性を有意に抑制した。このように UGT2B7 の cytosolic tail が CYP3A4 との相互作用に何らかの役割を担うことが示唆されたものの、この段階では相互作用部位の同定には至らなかった。

Cytosolic tail の欠失変異体を用いた UGT 側相互作用部位の推定が上手くいかなかった理由が、変異体作製時に参考にした UGT の C-末端構造モデルにあると考え、UGT2B7 のアミノ酸配列から二次構造と疎水性の高い領域をそれぞれ公開ソフトウェアで予測し、新規に C-末端モデルの構築を行った。このモデルでは、これまで Val₄₉₃-Thr₅₀₉ の 17 アミノ酸で構成されると考えられてきた C-末端の膜貫通ヘリックスが、

Trp⁴⁸⁵-Ala⁵²⁰ (36 アミノ酸)の小胞体内腔側から細胞質側まで及ぶ長い領域として予測された。また、既存のモデルでは trans-membrane helix/cytosolic tail に分けていた領域を、疎水性領域/親水性末端と再分割することで、よりアミノ酸の疎水性を生かしたモデルを構築することができた。次に、この新規モデルに基づいた疎水性領域と親水性末端のどちらが CYP3A4 との相互作用に必要なのか検討するため、これらの領域にアラニン置換を導入した変異体の作製を行った。親水性末端に含まれる、電荷を帯びうる全てのアミノ酸をアラニンに置換した変異体 (A7) は V_{max} の有意な低下は惹起しなかったが、CYP3A4 活性を抑制する傾向が認められた。しかし、疎水性領域に含まれるアミノ酸をそれぞれ 3 および 5 つアラニンに置換した変異体である 3CA および A8 には CYP3A4 活性の抑制能が認められなかったことから、UGT2B7 の C-末端における疎水性領域が、CYP3A4 との相互作用に重要な役割を果たすことが示唆された。この領域の重要性は、UGT2B7 と CNX とで親水性末端を置換したキメラ変異体 (chimera 1, CNX-UGT tail; chimera 2, UGT-CN X tail) を用いた検討でも支持された。この C-末端領域に加えて、UGT2B7 の内腔側にも CYP3A4 との相互作用部位が存在するのではないかと予測し、その領域の推定も行った。他 UGT 分子種の UGT1A6 では、140-240 番のアミノ酸領域に膜結合領域があると考えられている (2)。そこで UGT2B7 におけるその領域の一部 183-200 番の領域を、カルネキシンの推定膜結合領域(402-422 番)と置換したキメラ (chimera 3, UGT-CN X-UGT tail) の作製を行った。このキメラの C-末端は野生型と変わらないものの、CYP3A4 活性を抑制しなかった。この結果から、UGT2B7 は C-末端の疎水性領域および内腔側の膜結合領域が協調的に機能することで CYP3A4 活性を抑制することが示唆された。

次に UGT2B7 が抑制効果を及ぼす、P450 の触媒サイクルにおける作用点を検討した。CYP3A の代表的な基質である testosterone を用いた代謝活性の測定に加え、NADPH の消費量、副反応 (uncoupling) で生じる H_2O_2 量、および NADPH 非依存的かつ有機過酸化物依存的活性経路 (shunt pathway) による基質の酸化の 4 点における UGT2B7 共発現の影響を調べた。いずれの反応ステップも、UGT2B7 が共発現することで有意にかつ同程度抑制された。また、UGT2B7 は CPR の活性に直接影響しなかったことから、CYP3A4 に直接作用し、抑制効果を与えることが示唆された。

UGT による CYP3A4 活性に与える影響がより普遍的なものであることを示すため、UGT1A9 を用いた検討も行った。UGT2B7 と同様、1A9 も共発現することで CYP3A4 活性を抑制したが、 V_{max} を変化させず、 S_{50} の上昇とヒル係数の減少を通して生じることが明らかになった。また、UGT1A9 でも C-末端の膜貫通ヘリックス以降を欠失させた変異体の作製を行い、CYP3A4 活性に与える影響を調べたところ野生型同様、有意な S_{50} の上昇を伴う抑制が観察された。同様の UGT2B7 の変異体 ($\Delta 493-529$) では CYP 活性の抑制能を失うこと、および kinetics におけるパラメータの変化の仕方が異なることから、UGT による CYP3A4 活性の抑制は分子種によりその機構が異なることが示唆された。

【考察】本研究では、UGT が CYP3A4 の活性を抑制することを見出した。影響を検討した UGT はヒトにおける主要分子種である UGT2B7 と 1A9 だが、いずれも CYP3A4 活性を抑制した。活性抑制の程度自体はあまり大きなものではないが、UGT には CYP3A4 と相互作用する他の分子種も報告されており、これらの効果が集積することで全体として大きな活性の違いになりうる。変異体を用いた検討から、UGT2B7 側の相互作用部位として C-末端の疎水性領域と内腔側の膜結合領域の二か所が示唆され、これらの領域が協調的に作用することが必須と考えられた。一方、UGT1A9 の場合は、C-末端の膜貫通領域以降を欠失させても CYP3A4 の抑制効果が残存したことから、後者の部位だけが必要であるものと考えられる。CYP3A4 でも FG loop 等の膜結合領域が知られており、UGT の内部の膜結合領域は膜内部で CYP3A4 側のこれらの部位と相互作用するものと考えられる。相互作用部位の同定に加え、UGT による抑制が P450 の触媒サイクルの何れのステップ

に作用して生じるのか検討するため、代謝活性以外のステップにおいても UGT2B7 が共発現することの影響を調べた。確認したステップの全てで、代謝活性で認められたものと同程度の抑制が生じたことから、UGT2B7 は P450 触媒サイクルの開始段階、すなわち P450 への基質の結合を妨げることでサイクル全体を低下させると考えられた。*In silico* 解析から、P450 の膜位相の変化は基質チャネルの開閉状態に影響することが報告されており (3)、これは一連の結果から導かれる以下の仮説を支持する。すなわち 1) UGT が膜内部で CYP3A4 と相互作用することで、その膜位相を変化させる; 2) その変化が CYP3A4 の基質チャネルの閉口を介して、以降の触媒サイクル全体を抑制する; の一連の現象が、UGT による CYP3A4 活性抑制の機構と考えられる。代謝により生体異物を排除する CYP3A4 の活性を抑制することは、一見不都合に思われる。しかし、P450 に触媒される酸化反応は有害な活性酸素種の発生を伴うリスクの高いものである。実際に UGT2B7 は触媒サイクル全体を抑制することで活性酸素種の一つである H₂O₂ の生成量を減少させた。このような、副次的に産出される活性酸素種量の軽減が、この相互作用の生理的意義と考えられる。

Table 1 Sequences of mutants of UGT2B7 and 1A9

Carboxyl terminal (except the lower two) and internal membrane-binding (lower two) sequences of mutants are listed. While the trans-membrane region in the classical UGT model is shown by underline, hydrophobic region and trans-membrane helix suspected in novel modeling are represented by shadow and brackets, respectively. Bold letters mean instituted alanine (in A7, 3CA and A8) or sequence of CNX (in chimeras). The superscript and subscript numbers represent the location of the residues of wild-type of CNX and UGT2B7, respectively.

Protein	Sequences
Wild-type UGT2B7	T ₄₈₄ [WFQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVTKCCLFCFWKFA</u>]RKAKKGKND ₅₂₉
Δ519-529	T ₄₈₄ WFQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVTKCCLFCFWK</u> ₅₁₈
Δ511-529	T ₄₈₄ WFQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVTK</u> ₅₁₀
Δ493-529	T ₄₈₄ WFQYHSLD ₄₉₂
Δ511-518	T ₄₈₄ WFQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVTK</u> -----FARKAKKGKND
A7	T ₄₈₄ W[FQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVTKCCLFCFWAFAA</u>]AAAAAGANA
3CA	T ₄₈₄ [WFQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVTKAALFAFWKFAR</u>]KAKKGKND
A8	T ₄₈₄ [WFQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVTKAAAAAAFA</u>]RKAKKGKND
Chimera 1	A⁴⁵⁸EERPWLWV[VYILT]VALPV[FLVILFCC⁴⁸⁴K₅₁₀CCLFCFWKFARK]AKKGKND₅₂₉
Chimera 2	T ₄₈₄ [WFQYHSLD <u>VIGFLLVCVATVIFIVT</u> ₅₀₉ S⁴⁸⁵GKKQTS GMEYKK]TDAP~KPRRE ⁵⁷³
Wild-type UGT1A9	T ₄₇₉ W[YQYHSLD <u>VIGFLLAVVLTVAFITFKCCAYGYRKCL</u>]GKKG[RVKKAH]KSKTH ₅₃₀
Δ488-530	T[WYQYH]SLD ₄₈₇
Wild-type UGT2B7	---EKH ₁₈₃ SGGFIFPPSYVPVVMSE ₂₀₀ LT---
Chimera 3	---EK ₁₈₂ A⁴⁰²IGLELWSMTSDIFFDNFHC⁴²²L₂₀₁T ---

【引用文献】

1. Takeda S. *et al.*, *Mol. Pharmacol.* (2005)
2. Ouzzine M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1999)
3. Berka K. *et al.*, *J. Phys. Chem. B* (2013)