

## 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）

## 論文審査の結果の要旨

シトクロム P450 (CYP, P450) 3A4 は医薬品の 50% の代謝に関わる重要な薬物代謝酵素である。CYP3A4 の肝臓における発現量には 40 倍もの個体差があるのに対し、この P450 による *in vivo* クリアランスにおける個体差は 10 倍程度と言われている。すなわち、CYP3A4 活性の個体差はその発現量だけでは十分な説明が困難である。本研究では、CYP3A4 の活性に影響を与える因子として、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て解析が実施された。論文提出者の研究室ではこれまでに、CYP3A4 が UGT の主要分子種の一つである UGT2B7 の機能を変化させることを報告している。しかし、その逆向きの影響、すなわち UGT が CYP3A4 に与える影響は明らかにされていない。もし UGT が CYP3A4 活性を変動させるならば、発現量に依存しない活性調節機構の一つとなりうる。本研究ではこの仮説の解明が目指され、また、UGT2B7 側の相互作用部位の同定および P450 触媒サイクルにおける作用点の推定にも取り組まれた。

UGT2B7 が CYP3A4 活性に与える影響について検討するため、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた共発現系の構築が行われた。CYP3A4、NADPH-P450 還元酵素 (CPR) および UGT2B7 の cDNA を組込んだバキュロウイルスがそれぞれ作製され、これらを感染させた細胞からマイクロゾームが調製された。UGT2B7 を共発現させたマイクロゾームとさせていないものとの CYP3A4 活性を比較し、UGT2B7 が CYP3A4 活性に及ぼす影響が検討された。

まず、本研究で用いた共発現系における CYP3A4-UGT2B7 相互作用を検証するため、CYP3A4 の C 末端にヒスチジンペプチド (6 個連結) を導入し、Ni<sup>2+</sup> 担体を用いたプルダウンアッセイが実施された。可溶化マイクロゾームを酵素源として用いて検討した結果、CYP3A4-UGT2B7 間の相互作用が確認された。一方、この相互作用は UGT2B7 と同じ膜位相を示す calnexin (CNX) では観察されなかったことから、CYP3A4 と UGT2B7 が選択的に相互作用するとした先行研究の結果が支持された。次に UGT2B7 の共発現が、CYP3A4 活性に及ぼす影響が調べられ、CYP3A4 活性が有意に抑制されることが明らかにされた。この抑制は、CYP3A4 の酵素反応速度論的解析から、V<sub>max</sub> の低下に起因していた。この抑制効果は CNX では確認されず、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ている。次にこの抑制能を指標に、UGT2B7 側の相互作用部位の同定が目指された。CYP3A4 側の相互作用部位としては、既に細胞質側に位置する J-helix が示唆されていることから、UGT の構造の中で唯一細胞質側に突出する C 末端領域 (cytosolic tail) に着目し、その段階的欠失変異体が作製された。その結果、この cytosolic tail が全欠損すると CYP3A4 活性の抑制能が消失するとの結果が得られている。しかし、従来の膜結合モデルに基づく UGT の C 末端の推定構造を基盤とする限り、相互作用に必要なアミノ酸の同定には至らなかった。そこで、新たに *in silico* モデリングを行い、この領域における疎水性領域と親水性末端を再定義が試みられた。新たに設定したこれらの 2 領域のうち、どちらが CYP3A4 との相互作用に重要であるか検討するため、それぞれの領域にアラニン置換を導入した変異体が作製された。その結果、親水性末端に存在する電荷を有するアミノ酸すべてをアラニンに置換した変異体は野生型同様に CYP3A4 活性を抑制したが、疎水性領域の 3 残基のアミノ酸を置換した変異体ではこの効果は消失した。このことから、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であることが示唆された。この領域の重要性は UGT2B7 と CNX とでそれぞれの親水性末端を入れ替えたキメラタンパク質を用いた検討でも支持されている。加えて、UGT2B7 の内腔側にも CYP3A4 との相互作用部位があると予測し、内部の推定膜結合領域を CNX のものと置換

したキメラタンパク質も作製された。このキメラでは C 末部分は野生型と同じであるにも関わらず、CYP3A4 活性を抑制しなかった。一連の結果から、UGT2B7 における C 末端の疎水性領域と内腔側の膜結合領域が協調的に作用することで CYP3A4 活性が抑制されると考えられた。以上の検討は CYP3A4 の基質の酸化のみを観察したものであるが、P450 触媒サイクルの別段階における指標である NADPH の消費量と副反応で生じる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量に関しても UGT2B7 の共発現による影響が検討されている。その結果、いずれの指標においても UGT2B7 が共発現することで基質の酸化と同程度の抑制が生じた。しかし、UGT2B7 は CPR の還元活性には影響を及ぼさない一方、CPR 非依存かつ過酸化物質依存的な酸化反応 (shunt 経路) では UGT2B7 による抑制能が認められた。これらの事実は、UGT2B7 が CYP3A4 に直接作用し、その触媒サイクルの開始段階、すなわち P450 への基質の結合を阻害することにより CYP3A4 活性を抑制することを示唆する。次に、このような抑制効果が UGT の分子種に普遍的な性質か否かを明らかにするため、UGT1A9 でも検討が行われた。UGT1A9 を共発現させることで UGT2B7 の場合と同様に CYP3A4 活性は抑制されたが、酵素反応速度論的解析におけるパラメータへの影響が、有意な S<sub>50</sub> の上昇を伴っていること、および UGT1A9 においては C 末端膜貫通領域以降の 43 残基を欠失させても抑制能が保持されたことから、CYP3A4 機能抑制の機構は UGT の分子種により異なると考察されている。

CYP3A4 の個体差の解明は、その幅広い基質特異性から医薬品の適正使用や個別治療に欠かすことができない。本研究で明らかにされた異種薬物代謝酵素 UGT による CYP3A4 活性の抑制は、今までこの P450 分子種の個体差において説明できなかった発現量と活性の差の幅の大きなギャップの問題を理解し、医薬品適正使用に応用する一助になるものとして期待できる。本研究の成果は学術的新規性が認定できると共に、薬物代謝能の個人差の解明に大きな寄与を果たすものと考えられ、この成果を上げた申請者は博士 (創薬科学) の学位を授与するに相応しいと判定される。