

—平成14年度 岐阜薬科大学特別研究費(奨励)—

薬物カルボニル化合物の還元代謝試験法の確立

宇佐見 則行

1. 緒言

ヒトゲノム解析により生命科学の研究はゲノム構造からゲノム機能解析に向かいつつある。薬学の分野では、オーダーメイド医療に向けてのミレニアム・プロジェクトの中で、薬物の代謝・吸収・排泄に関わる主要な酵素(シトクロム P450、加水分解、抱合酵素など)と輸送体の SNP や相互作用などが研究されている。しかし、これらの研究の対象外になっている遺伝子とその産物の薬物動態における意義の解明もオーダーメイド医療の完遂には必要である。

医薬品の中で、ケトン基を持つ薬物は30種を超え、その多くがケトン基の還元代謝を受けて薬効が出現、減弱し、薬物動態に影響する。個々の薬物の開発段階でケトン還元酵素が研究されたものもあるが、近年、ヒトの薬物ケトン還元代謝にはアルデヒド還元酵素(ALR)、アルドース還元酵素(AR)、カルボニル還元酵素(CR)、3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の4種アインザイム(AKR1C1-AKR1C4)、アフラトキシン還元酵素(AKR7A2)、11 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素1型(11 β -HSD1)が関与すると示唆されてきた。しかし、既存の薬物についてさえ、これらの酵素のいずれがどの薬物のケトン還元代謝に関与するか不明である。また、オーダーメイド医療を志向する新薬開発の一段階として、薬物のカルボニル基がどの酵素種によって還元代謝されるかを明らかにすることは重要である。

著者は、ヒトや哺乳動物の新規遺伝子の単離とその機能の解明を行い、ヒトのD-キシロース脱水素酵素(XDH)、L-キシロース還元酵素(XR)およびペルオキシソーム局在型レチナル還元酵素(PRR)の構造と機能を解析してきた。後者の2つの酵素については、遺伝子導入により過剰発現細胞を作製し、その機能および細胞内局在性を明らかにしている(未発表)。また、これら3種の酵素は比較的基質特異性が広く、いくつかの異物や薬物のケトン基が還元されることを見出した。このことは、上記の既知の酵素も含め、ヒトにおいては計12種の薬物ケトンの還元代謝酵素が存在することを示唆する。従って、上述のような先端医療に向けた研究の中で、これらケトン還元代謝酵素すべてについて系統的にその代謝スペクトルを明らかにすることが重要である。また、これからの新薬開発には、これらのうちのどの酵素が薬物のケトン基の還元代謝に関与するかを明確にできる試験法も必要とされる。

上記の全12種のリコンビナント酵素、その発現細胞、および各酵素抗体を用いた薬物カルボニル化合物の還元代謝試験法を確立することを本研究の最終目標として、リコンビナント酵素の大量調製および各酵素を発現する大腸菌および哺乳動物細胞の作製を検討した。また、薬物カルボニル化合物の還元代謝で生成するアルコール基の立体配置も薬効や動態に影響する場合もあるので、ブチロフェノン系抗精神薬の基

本骨格である*n*-butyrophenone、内因性常成分の isatin および異物の benzil をモデル化合物としてその還元における立体選択性の分析法も検討した。

2. 実験方法

◆**実験材料**: *S*-(+)-Benzoin、*R*-(−)-benzoin、*n*-butyrophenone、*S*-(−)-1-phenyl-1-butanol、*R*-(+)-1-phenyl-1-butanol はシグマ社; 亜鉛ポリフィリン二量体(ZnPD)は和光純薬工業; ヒト肝臓のトータル RNA はクロンテック社よりそれぞれ購入した。組換え DNA 用試薬および大腸菌(BL21、JM109)はギブコ社、ストラタジ社および東洋紡社から購入した。3-Hydroxy-2-oxoindol(3-OH 体)は、isatin を NaBH₄ により還元合成後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製、再結晶した。

◆**cDNA とリコンビナント酵素の調製**: 各酵素cDNA をヒト肝臓のトータル RNA から RT-PCR により増幅し、DNA シーケンスにより塩基配列を確認するとともに、各種発現プラスミドに挿入後、大腸菌に導入した。各リコンビナント酵素は、既報の方法により精製した。精製度は SDS-PAGE で確認した。また、立体選択的還元の分析においては、ヒトの酵素の他に、他の動物由来の PRR (pig PRR, rat PRR, dog PRR, bovine PRR, rabbit PRR)、マウスの肺4量体 CR (MLCR) および 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素(AKR1C14)も調製して比較検討した。

◆**酵素活性**: 還元酵素活性は、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)、0.1 mM NADPH、基質および酵素を加えた全量 2 mL の反応系における NADPH の 340nm における吸光度の減少速度により測定した。

◆**立体選択的還元の分析**: 上記の反応系の基質として、0.1 mM isatin、50 μ M benzil または 0.1 mM *n*-butyrophenone を加え、25℃にて 30 分間の反応により得られた還元代謝物を、3倍量の酢酸エチルで15分間振盪抽出(300min⁻¹)後、その有機層を減圧下濃縮した。得られた残渣は 100 μ L の isopropylalcohol に溶解し、その 10 μ L を HPLC (カラム: Chiralcel OJ-H (5 mm, 4.6 \times 250 mm)、流速: 0.5 mL/min、カラム温度: 25℃、UV 検出器: 242 nm または 254 nm) で分析した。なお、移動相である *n*-hexane と isopropylalcohol の混合比は、isatin と benzil 還元体の分離には 90/10 (v/v)、*n*-butyrophenone 還元体の分離では 95/5 とした。

◆**円二色性(CD)による絶対配置の決定**: Isatin の還元で合成したラセミ混合物の 3-OH 体を isopropylalcohol に溶解させ、HPLC により分離した Peak1 と Peak2 を分取し、減圧下濃縮した。分取・濃縮した試料を ZnPD に溶解し、その CD スペクトルを、J-720WI 型円二色性分散計(JASCO)を用いて 200–500 nm の範囲でスキャン速度: 50 nm/min、バンド幅: 1 nm、応答時間: 0.5 sec で測定した。

3. 結果および考察

①リコンビナント酵素の大量調製:CR、ALR、AR、AKR1C1、AKR1C2、AKR1C3、AKR1C4、XR、PRR および XDH の 10 種のリコンビナント酵素は大量調製が可能となった。AKR7A2 とミクロソーム酵素の 11 β -HSD1 については、今後検討する予定であるが、得られた 10 種の酵素を用いて臨床で使用されているナロキソンなどの薬物を試験した結果、その還元代謝に関与する主要な酵素が異なることが判明した。

②発現細胞の調製:上記の 10 種の酵素を発現する大腸菌、XR を過剰発現する細胞を調製できたが、他の酵素の発現大腸菌および哺乳動物細胞の調製にはまだ成功していない。

③立体選択的還元の分析法:

Isatin の立体選択的還元:Isatin の 3-OH 還元体の異性体を HPLC で分離でき、その絶対配置について ZnPD 形成後の CD スペクトルを分析した結果、先に溶出する peak 1 は S-体、後に溶出する peak 2 は R-体であることが判明した。CR と MLCR は R-還元体、AKR1C1、AKR1C14 および XDH は逆の S-還元体をより多く生成し、PRR ではいずれの異性体もほぼ等量産生された。Table 1 にはこれらの酵素を 3 つのタンパク質ファミリー(short-chain dehydrogenase/reductase, aldo-keto reductase および GFO/DD)に分類して示すが、同一ファミリーに属する酵素でも isatin の立体選択的還元が異なった。

Benzil の立体選択的還元:Isatin と同様にジカルボニル化合物であるが、その構造が対称的である benzil についても還元生成物 benzoin の R-、S-体の生成比を検討した。CR と MLCR は R-体を産生したが、PRR では動物種により異なり、ヒトとラットの酵素は R-体を産生するのに対して、ウサギとブタの酵素は S-体をより多く生成した。また、AKR1C1 は S-還元体のみを産生した。

n-Butyrophenone の立体選択的還元:*n*-Butyrophenone は PRR によってのみ還元代謝された。上記の 2 つの基質と異なると、どの動物種の PRR も *n*-butyrophenone を S-体絶対選択的に還元した。

なお、以上の HPLC によるキラル分離した生成物量は NADPH の吸光度減少速度より分光学的に算出した還元酵素活性とほぼ一致し、本法による定量分析も可能である。

還元代謝物による阻害:動物種により PRR による benzil 還元の立体選択性が異なったので、*K_m* とその還元生成物の R-、S-体による阻害を調べた。ヒト PRR の *K_m* 値は 6 μ M と他の動物の PRR より著しく低く、またこのヒトの酵素だけが S-benzoin により強く阻害された。化学的にはほぼ対称なこの基質も還元される 2 つのケトン基の配位が異なる。他の動物と異なり、ヒト PRR の基質結合部位には一方向から配向するため、高い立体選択性を示すと考えられた。

4. まとめ

本研究の最終目標である薬物カルボニル化合物の還元試験法を確立するために必要な酵素と発現細胞の調製をほぼ終えることができ、またこの試験法に加える立体選択的還元分析法の基礎的データも得ることができた。特に、基質となる薬物の構造および酵素の種類によって、還元反応における立体選択性がかかなり異なることは、個々の薬物について還元の立体選択性も含めた代謝パターンを系統的に明らかにすることが重要であることを示している。今後、本研究成果を踏まえて、より簡便に代謝酵素が同定可能な試験法を確立していく予定である。なお、本研究の一部は *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, 353-361 (2003) に公表した。

5. 謝 辞

本研究は、岐阜薬科大学平成 14 年度特別研究費(奨励研究)により遂行されたものであり、ここにこの助成に対して心より感謝致します。今後、これまでに得られた結果に基づき新たな研究を進展させるべく、これからも暖かいご支援を賜りますようお願い申し上げます。ここに心より深謝致します。

Table-1 Stereoselective reduction of isatin, benzil and *n*-butyrophenone by the enzymes of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR), aldo-keto reductase (AKR) and GFO/DD families.

Enzyme	Isatin			Benzil			<i>n</i> -Butyrophenone		
	S-form (Peak 1)	R-form (Peak 2)	%ee	S-form	R-form	%ee	S-form	R-form	%ee
1. SDR family									
CR	1	4.0	60	1	6.2	72	n.d.	n.d.	—
MLCR	1	8.8	80	1	2.7	46	n.d.	n.d.	—
Human PRR	1	1.7	26	1	55	96	100	0	100
Rat PRR	1.8	1	29	1	7.6	77	100	0	100
Dog PRR	1.3	1	13	1.6	1	23	100	0	100
Bovine PRR	1.2	1	9	1.8	1	29	100	0	100
Rabbit PRR	1	1.4	17	5.5	1	69	n.d.	n.d.	—
Pig PRR	1.7	1	26	3.5	1	56	100	0	100
XR	25	1	92	4.2	1	62	n.d.	n.d.	—
2. AKR family									
AKR1C1	19	1	90	0	100	100	n.d.	n.d.	—
AKR1C14	21	1	91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	—
3. GFO/DD family									
XDH	119	1	98	n.d.	n.d.	—	n.d.	n.d.	—

n.d., not determined because of no detectable reductase activity for the substrate.