

シトクロムP450による天然型ビタミンD およびビタミンD誘導体の代謝

富山県立大学工学部生物工学研究センター 教授 榎利之



1 はじめに
活性型ビタミンD₃はビタミンD受容体(VDR)のリ

ガンドとして種々の遺伝子の発現制御を司り、骨形成、細胞分化、免疫といった重要な生命現象に深く関わっている。1960年代に入って動物個体を用いたビタミンD₃代謝研究が盛んに行われ、1970年には活性型ビタミンD₃が1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃(以下1 α ,25(OH)₂D₃と略す)であることが明らかになった。その後、種々の動物を用いた膨大な代謝研究によって、生体内におけるビタミンD₃の複雑な代謝経路が明らかになり、1981年に1 α ,25(OH)₂D₃に細胞分化誘導作用があることが報告されて以来、ビタミンD₃代謝物の生理作用に関する研究結果が次々と発表された¹⁾。また、VDRの発見以来、作用メカニズムの解明が急速に進展し、リガンドが結合することにより起こるVDRの構造変化が、VDRと種々の転写共役因子の相互作用に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。この事実は、1 α ,25(OH)₂D₃が併せ持つ強力なカルシウム代謝調節作用と強力な細胞分化誘導作用のどちらか一方のみを持つビタミンD誘導体のデザインが可能であることを示唆している。実際に、いくつかのビタミンD誘導

体において両作用の分離が見られている。これらの研究結果を踏まえ、骨粗鬆症をはじめとする骨疾患、白血病、乳癌、前立腺癌、結腸癌などを主な対象とする癌疾患、乾癬などの皮膚疾患、アルツハイマー等の脳神経疾患など、幅広い疾患への適用が展開されようとしている。

2 ビタミンD水酸化酵素のcDNAクローニングと発現

動物個体あるいは臓器を用いたビタミンD₃の代謝研究から、40種近い代謝産物とそれらの代謝経路が明らかにされた。しかし、ビタミンD₃の代謝を司る酵素に関する研究は驚くほど遅れており、生合成された活性型ビタミンD₃(図1)の複雑な代謝経路に何種類の酵素が関わっているのかという疑問は未解決であった。

一方、1990年にビタミンD₃25位水酸化酵素(CYP27A1)、1991年に24位水酸化酵素(CYP24A1)、1997年に1 α 位水酸化酵素(CYP27B1)のcDNAが相次いでクローニングされ、大腸菌、酵母および動物培養細胞など、異種細胞発現系を用いた解析や遺伝子の発現制御に関する研究が活発に行われた。しかし、これらの酵素はいずれもミトコンドリア内膜結合型のシトクロムP450で(図2)、不安定で精製が困難な上、活性測定にも技術を要し、基質特異性や反応特異的性に関する知見はきわめて不十

著者略歴

- 1978年 京都大学大学院理学部生物物理学科卒業
- 1980年 京都大学大学院理学研究科生物物理学専攻修士課程修了
- 1980年 住友化学工業株式会社入社 宝塚総合研究所
- 1986年 理学博士(京都大学)
- 1994年 住友製薬株式会社 総合研究所
- 1997年 京都大学大学院農学研究科 助教授
- 2004年 富山県立大学工学部生物工学研究センター 教授

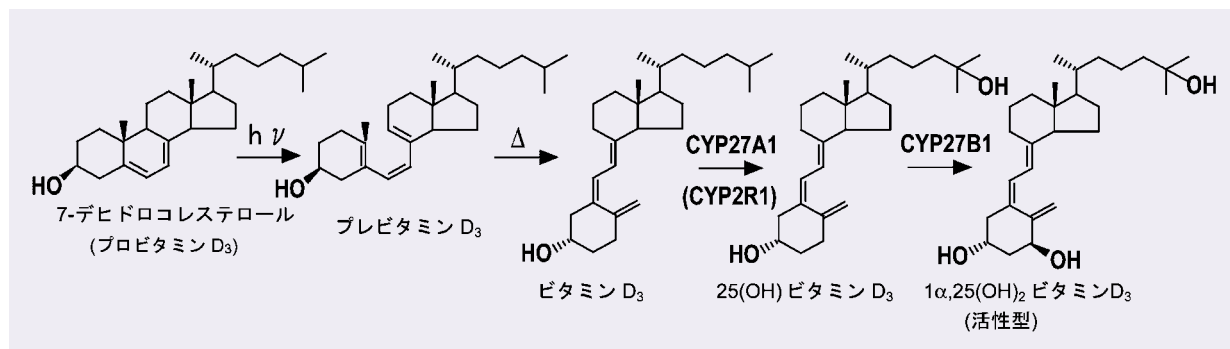


図1 活性型ビタミンD₃の生合成経路

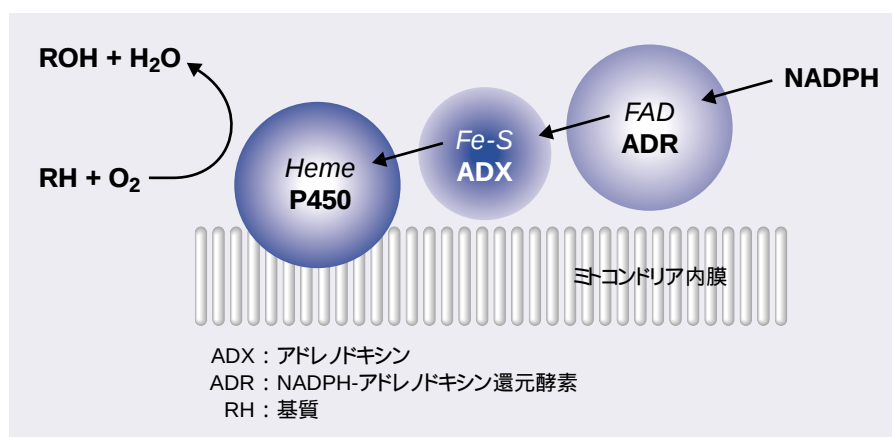


図2 ミトコンドリア型シクロクロムP450の電子伝達系

酵素である。筆者らは大腸菌発現系を用いてマウスおよびヒト由来のCYP27B1を発現させ、酵素学的性質を明らかにした³⁾⁴⁾。また、多数のくる病患者由来の変異体CYP27B1の解析から、各変異箇所のアミノ酸の機能を明らかにした⁵⁾。さらに、GroEL/ESとの共発現系を用いることにより、マウスCYP27B1およびその変異体を大腸菌内で大量に発現させることに成功し、分光学的性質や酵素学的性質を詳細に解析した⁶⁾⁷⁾。その結果、CYP27B1は1α位を特異的に水酸化するが、わずかながら25位水酸化活性を有することがわかった。すなわち、CYP27B1もCYP27A1と同様、1α位水酸化活性と25位水酸化活性の両活性を有するのである。コンピューターモデリングの結果から、ビタミンD₃は同じ基質ポケットに逆向きに入ることが可能で、両活性が密接に関連していることが示唆された。

分であった。筆者らは大腸菌発現系を用いて、これら3種のP450の酵素化学的性質を詳細に解析した。

3 CYP27A1 (25位水酸化酵素) の酵素学的性質

CYP27A1を大腸菌内で大量発現させ、ビタミンD₃に対する代謝を調べたところ、主要代謝物である25(OH)D₃を含め、少なくとも8種類の代謝物が検出された²⁾。

HPLC分析および質量分析により、これらの代謝物は25(OH)D₃、26(OH)D₃、27(OH)D₃、24R,25(OH)₂D₃、1α,25(OH)₂D₃、25,26(OH)₂D₃、27-oxo-D₃、およびビタミンD₃脱水素体であること

がわかった。驚くことに、この酵素は側鎖だけでなく1α位を水酸化し、ビタミンD₃から1α,25(OH)₂D₃を生成することができるのである。1α位水酸化酵素として生理的に意味があるのはCYP27B1であることがわかっているが、CYP27B1遺伝子欠損型くる病患者の血中にもある程度の1α,25(OH)₂D₃が存在するのはCYP27A1の活性に依ると考えられる。

4 CYP27B1 (1α位水酸化酵素) の酵素学的性質

CYP27B1は生体内での産生量がきわめて微量で不安定であるため、いまだに精製法が確立されていない

5 CYP24A1(24位水酸化酵素)の酵素学的性質

CYP24A1については反応特異性において興味深い性質が明らかになった。ヒト由来CYP24A1を含む反応系に $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を基質として代謝物を分析したところ、24R位水酸化に始まりカルシトロン酸に至るまでのC-24経路の代謝物6種と、23S位水酸化に始まりラクTONの生成に至るまでのC-23代謝経路の代謝物4種が検出された(図3)⁹⁾。また、反応中の各代謝物濃度の経時変化から、反応産物が基質結合部位から離れることなくさらに反応が進む“連続反応”が起こることが示唆された。還元酵素系による電子伝達効率が高いほどCYP24A1による連続反応の頻度は高くなった。すなわち、反応産物が基質結合部位から離れる前に電子が伝達され、次の反応が起こるのである。生体内ではその連続反応は不完全で、最終段階まで到達しないため、多くの中間代謝物が検出されると考えられる。さら

に、筆者らは、ヒトCYP24A1において、23位の水素を引き抜いたラジカル再配列により $\text{C}_{24}-\text{C}_{25}$ 結合が切断される反応が起こることを見出した(図3)⁹⁾。反応産物にはビタミンD受容体(VDR)結合能がほとんどなく、VDR結合能を失わせるという意味においてはきわめて効率の良い反応である。CYP24A1の反応特異性には動物種差があることがわかった。ヒトCYP24A1においてはC-24経路とC-23経路の比は4:1であるが、ラットCYP24A1ではC-23経路はほとんど見られず¹⁰⁾、逆にモルモットではC-23経路が主である。これら代謝パターンの違いは、それぞれの動物種でビタミンD₃代謝産物の利用法が異なることを意味しているのかも知れないが、現在のところ不明である。

6 CYP24A1(24位水酸化酵素)によるビタミンD誘導体の代謝

CYP24A1による代謝様式に動物

種差が存在するという事実は、ビタミンD誘導体を医薬品として開発する際、動物実験だけではヒト体内での代謝を正確に予測できないことを意味し、開発の初期にヒトCYP24A1を用いた代謝研究が必須になると考えられる。筆者らはこれまでに、A環ジアステレオマー(図3)¹¹⁾、ヘキサフルオロ体¹²⁾、20-エピ体(図4)¹³⁾、2 α -(3-hydroxypropoxy)体¹⁴⁾の代謝についてヒトCYP24A1とラットCYP24A1の代謝様式を比較した。その結果、これらすべてのビタミンD誘導体の代謝において、種差が認められた。さまざまな薬物の代謝において動物種差があることは周知の事実であり、医薬品の開発において実験動物からヒト体内での代謝を予測することを困難にしている。多くの場合、薬物代謝に関わるシトクロムP450の発現制御機構や酵素学的性質が動物によって異なることに基づくことがわかっている。しかし、CYP24A1はいわゆる薬物代謝型とは異なり、内在性基質

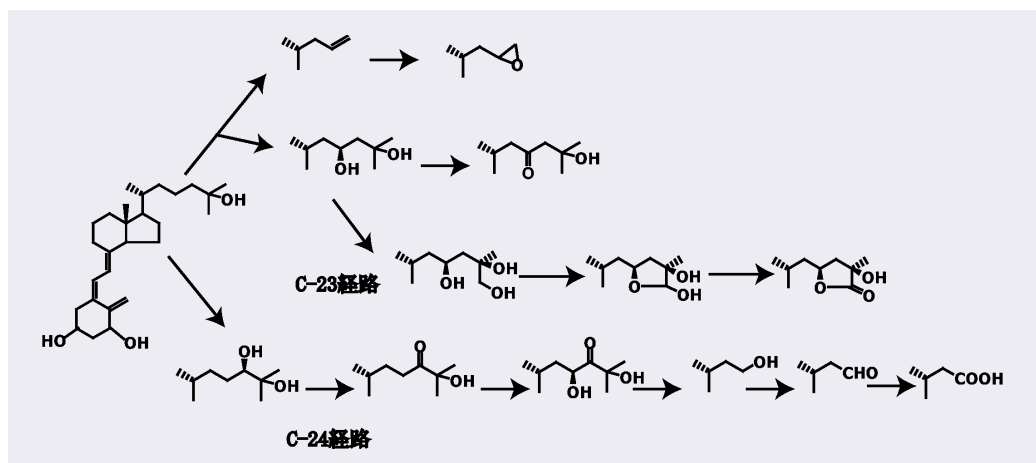


図3 ヒトCYP24A1による活性型ビタミンD₃ A環ジアステレオマーの代謝

である $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を基質とするにもかかわらず、反応特異性が動物種によって異なっているのである。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を代謝してVDRに結合できない物質に変換させることが重要で、そのためには少々、代謝様式が異なっても構わないと

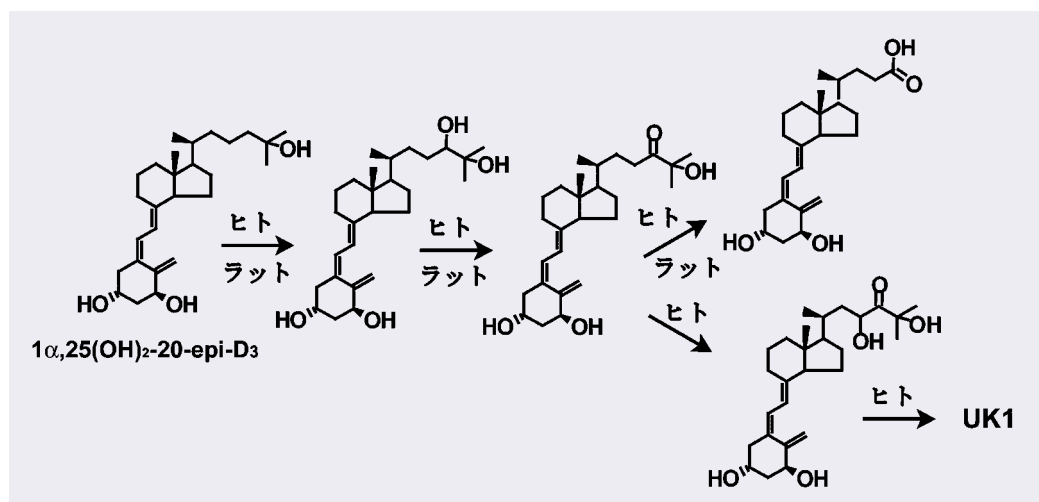


図4 CYP24A1による活性型ビタミンD₃ 20-エピマーの代謝における種差

考えれば不思議ではない。最近、筆者らはラットCYP24A1の1アミノ酸置換体を作製し、その酵素学的性質を調べた結果、2種の変異体がヒトCYP24A1の反応特異性を示した(論文投稿中)。したがって、進化の過程で生じたわずか1アミノ酸の置換がCYP24A1の反応特異性を変換させ得ることを証明した。ビタミンD誘導体の代謝においてCYP24A1は中心的な役割を大きな役割を果たしており、VDR結合能が高く、CYP24A1による代謝を受けにくいビタミンD誘導体ほど、血中カルシウム濃度上昇作用が高いという結果を得ている。したがって、ビタミンD誘導体の開発においてヒトCYP24A1による代謝を調べることはきわめて重要である。

7 おわりに

CYP27A1, CYP27B1およびCYP24A1によるビタミンD₃代謝物は少なくとも27種に及び、多種

類の酵素が関わっていると考えられていた複雑な代謝経路の多くは、これら3種類のP450に依存することがわかったのである。特に、CYP24A1による代謝は特筆すべきである。代謝物のすべてに重要な生理的役割があるとは考えられないが、少なくとも一部の代謝物には未知の役割が潜んでいると推測され、今後の研究課題である。最近、ミクロソーム型のビタミンD₃ 25位水酸化酵素としてCYP2R1の重要性が示唆され(図1)¹⁵⁾、また、CYP3A4にも1α,25(OH)₂D₃代謝能があり、CYP3A4を誘導する薬剤を長期にわたり投与されている患者に起こる骨粗鬆症との関連が示唆されている。また、22位が酸素に置換されたビタミンD誘導体の代謝にはCYP3A4の寄与が大きい。ビタミンDおよびその誘導体の代謝において複数のP450分子種による代謝研究が必要であり、ヒトP450発現系の応用はきわめて有効である。CYP

24A1およびCYP27B1は腎臓のミトコンドリアに存在するが、ヒト腎臓ミトコンドリア画分が市販されることは考えにくく、発現系の重要性はきわめて高い。今後、骨疾患、癌疾患、皮膚疾患、脳神経疾患など、幅広い疾患への適用が期待されるビタミンD₃誘導体の開

発において、これらP450発現系の応用がますます重要になってくことは間違いない。

文 献

- 1) R. Bouillon, W. H. Okamura & A. W. Norman: *Endocrine Rev.*, 16, 200 (1995)
- 2) Sawada, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 977-984 (2000)
- 3) Sakaki, T., et al., *Eur. J. Biochem.* 259, 731-738 (1999)
- 4) Sawada, N., et al., *Eur. J. Biochem.* 265, 950-956 (1999)
- 5) Sawada, N., et al., *Eur. J. Biochem.* 268, 6607-6615 (2001)
- 6) Uchida, E., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 505-511 (2004)
- 7) Yamamoto, K., et al., *J. Biol. Chem.* 280, 30511-30516 (2005)
- 8) Sakaki, T., *Eur. J. Biochem.* 267, 6158-6158 (2000)
- 9) Sawada, N., et al., *Biochemistry* 43, 4530-4537 (2004)
- 10) Sakaki, T., et al., *Eur. J. Biochem.* 262, 43-48 (1999)
- 11) Kusudo, T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321, 774-782 (2004)
- 12) Sakaki, T., et al., *Biochem. Pharmacol.* 262, 43-48 (1999)
- 13) Kusudo, T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309, 885-892 (2003)
- 14) Abe, D., et al., *Drug Metab. Disp.* 33, 778-784 (2005)
- 15) Shinkyo, R., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324, 451-457 (2004)