

ヒト・チトクロムP450組換え酵母を用いた医薬品代謝物の生産

医薬事業本部 ファーマ事業所 堤 正弘
 医薬事業本部 バイオ技術センター 熊谷 真希 / 鈴木 隆

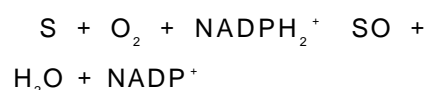
1 はじめに

酵素ヒト・チトクロムP450 (cytochrome P450, 以下CYP) には数十種類の分子種が存在し、医薬品は体内で化合物毎に特定の分子種のCYPによって代謝されて解毒、ときには活性化される。

医薬品の薬理効果と安全性の評価、すなわち、薬理効果と毒性の発現、およびこれらに対する性、年齢、個人差、人種差の影響あるいは複数の医薬品を併用したときの副作用の発現等の理解には医薬品とその代謝物の体内動態（吸収、分布、代謝、排泄）の解明が必須である。

医薬品そのものは当然として代謝物標品は、その薬効と毒性の評価やヒトの血中代謝物濃度分析等における標準品として多くの場で必要とされる。代謝物標品は通常、有機合成によって得られるが、有機合成では長い工程を要することが多く、光学活性な代謝物はしばしば合成が困難である。

CYP反応は一般に以下の反応式で示される。



すなわち基質Sは、分子状酸素 O_2 と還元型助酵素 $NADPH_2^+$ と反応

し、基質に1酸素原子が添加された代謝物SOが生成する。この反応は酵母のホモジネートから得られるミクロソーム画分で起こるが、ミクロソーム画分を用いると反応が比較的短時間（数十分間）で停止するため反応率が低く（通常0.001～1%、当社データによる）、医薬品と酵母を培養しても代謝物を大量に、例えば数mgを得ることは困難とされていた。

また、代謝が起こるためには基質が酵母細胞内に取り込まれねばならないが、酵母の厚い細胞壁が基質の細胞内への浸透を阻止し、このこと

も代謝が起こらない要因となると考えられていた。

しかし、或る基質を組換え酵母と培養する機会があり、その結果とその後への検討から、上記の予想を覆して代謝が強く起きており、mgオーダーは当然としてgオーダーの代謝物の入手も可能と考えられるようになった。

当社は11種類のCYP遺伝子組み換え酵母を所有しているが、この組換え酵母を使用することにより、多種類の医薬品について代謝物を大量かつ迅速に供給できる可能性が開かれたと考え得るに至った。

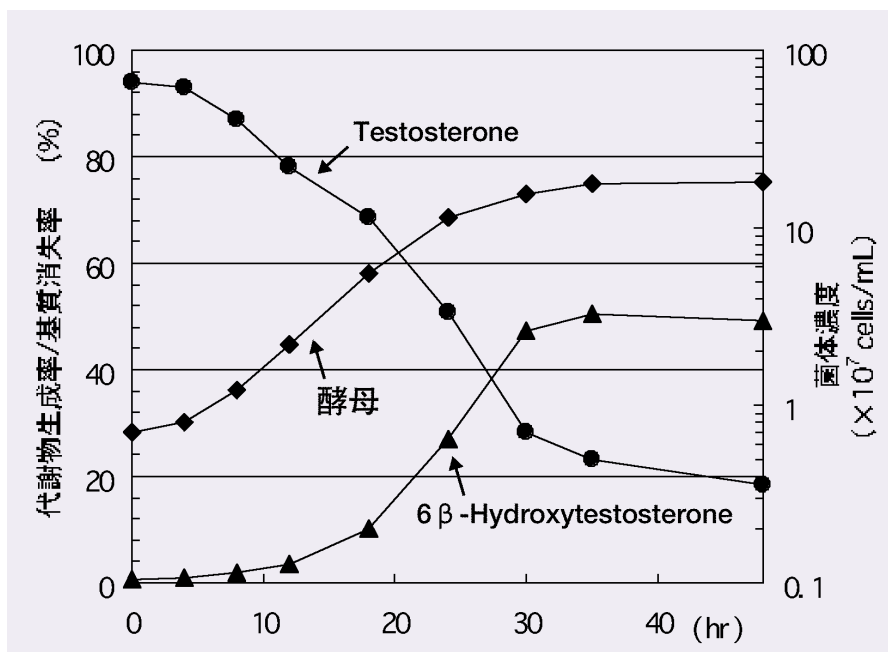


図1 TestosteroneのCYP3A4組換え酵母による代謝

2 いくつかの事例

ヒトの体内では数十種類のCYPが医薬品の代謝に関与していることが知られているが、薬物代謝から見て主要なCYPは限られており、CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 の5種類のCYPがヒトで起こる全代謝反応の95%を司るとされている¹⁾。

これらのCYP遺伝子を組み込んだ酵母を用いて表1に示す基質と培養した。代謝物の同定と定量は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)における合成標品のクロマトグラムと比較して行った。

図1にTestosteroneをCYP3A4組換え酵母と培養したときの酵母、基質、代謝物の各濃度についての経時的挙動を例示する。基質の種類により代謝物の生成率は異なっていたが、最大の酵母濃度と代謝物濃度を与える培養時間は約30時間で、どの基質とCYPの組み合わせでもほぼ同じであった。

基質により代謝物の生成率は0.4~44%の幅を示し、ミクロソームの場合と比較すると10倍以上の代謝物が生成した。酵母との培養ではCYPが長時間に亘って働き続けるため高反応率で代謝物が生成したと考えられる。

このCYP組換え酵母を用いた代謝物の大量調製を行っている。すなわち医薬品を100 μmol/Lで培養後、固相抽出あるいは有機溶媒を用いる液/液抽出を行い、以後HPLCによる精製を行う。精製代謝物につ

いてNMR, 質量分析等による化学構造の確認を行う。

或る事例では約940mgの基質を用い約22LのCYP2C9組換え酵母培養液中に生成した代謝物448mg(反応率48%)から、328mgの精製代謝物を得ている。

3 医薬品の酵母細胞内への移行性

単に医薬品をCYP組換え酵母と培養するだけでは代謝されない場合があることが判ってきた。その原因を解析した結果、医薬品の酵母細胞内への移行性に問題点があると考えられた。その事例を以下で紹介する。

3.1 分配係数(logPo/w)²⁾

CYP2D6の基質であるBufuralolをCYP2D6組換え酵母のミクロソームと試験管内で反応させると代謝物Hydroxybufuralolが生成する。しかし、CYP2D6組換え酵母との

培養による代謝物の生成量は他の基質と比較して少なかった(表1)。その原因として、酵母の培養液のpHは培養開始時には5付近であるが培養とともに低下し終期には2付近になること、及びBufuralolのpKaは8.9であることから、培養時の酸性条件下ではプロトン化が起こり、logPo/w値が低いため細胞膜を通過せず、そのため代謝されにくい可能性が考えられた。そこで、通常の培養条件で酵母を増殖させた後、培養液をリン酸緩衝液(pH7.4)に置換してからBufuralolを添加し、電荷を持たないBufuralolが多い条件下で培養した。その結果、代謝物の生成率が大幅に増加した(表2)。pKaが酸性側にあるTolbutamide等では酸性条件下でlogPo/wが大きくなり高い反応率が得られた。

表1 各基質の代謝物生成率

分子種	基質 / 反応	代謝物生成率(%)	
		培養液量: 5mL	培養液量: 1.6L
CYP1A2	7-Ethoxyresorufin / O-脱エチル化	6	-
CYP2C9	Tolbutamide / 水酸化	33	34
CYP2C19	S-Mephenytoin / 4'位水酸化	13	17
CYP2D6	Bufuralol / 1'位水酸化	0.4	-
CYP3A4	Testosterone / 6位水酸化	44	54

100 μmol/L, SDH培地中, 30 で48時間培養

表2 代謝物生成に対するpHの影響

分子種	基質 / pKa	代謝物生成率(%) / logPo/w	
		通常法(pH2)	緩衝液置換(pH7.4)
CYP2D6	Bufuralol / 8.9	0.6 / -3.54	54.8 / 1.81
CYP2C9	Tolbutamide / 5.4	31.4 / 2.34	2.4 / 0.68
CYP2C9	Diclofenac / 4.0	57.1 / 4.05	26.5 / 0.95

100 μmol/L, SDH培地中, 30 で48時間培養

3.2 分子量²⁾

Paclitaxelは特異的にCYP2C8により代謝される。ところがPaclitaxelをCYP2C8組換え酵母と培養しても、酵母を増殖後にPaclitaxelを添加して培養しても、あるいは酵母を増殖後に培養液をリン酸緩衝液(pH7.4)に置換しPaclitaxelと培養してもまったく代謝されない。

この化合物の分子量(853.9)は比較的大きいので化合物が細胞膜/細胞壁を通過せず、細胞内に移行しないため代謝されない可能性が考えられた。そこで細胞壁を酵素で溶解し細胞膜だけを残してPaclitaxelと培養したが、やはり代謝は起こらなかった。

分子の大きさが酵母細胞内への移行を制限する要因である可能性が考えられる。このような分子量が大きい化合物の代謝物を得る方法として、細胞膜/細胞壁を持たない系での反応を考えた。

すなわち酵母をホモジナイズして細胞を破壊し、9000gで遠心した上清を酵素液として、NADPH産生系存在下、30℃で1時間反応させた。その結果、添加Paclitaxel(100μmol/L)の60%が6-α-Hydroxypaclitaxelに変換していた(図2)。

酵母との培養だけでなく9000g上清との反応により代謝物を得る方法も化合物によっては有効と考えられる。

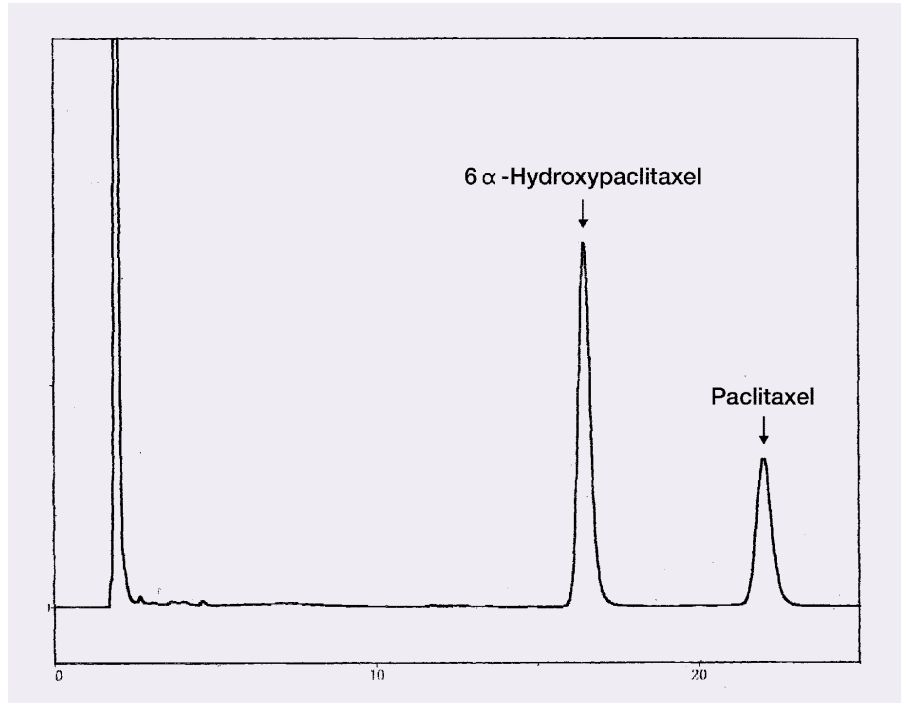


図2 CYP2C8組換え酵母の9000g上清によるPaclitaxelの代謝反応後のクロマトグラム

4 おわりに

CYP組換え酵母を用いる医薬品代謝物の生産は、当社で開発された新規な方法である。その特長は有機合成とは異なり、1段階の反応によりヒトから得られる代謝物と同じものが効率良く迅速に得られることである。

今後、反応率の向上、および当社が持つ分取、精製、構造解析技術の一貫化による回収率の向上と納期の短縮等を検討し、より良いサービスの提供に努めたい。

文献

- 1) 千葉 寛, 薬物動態, 10, 391 - 402 (1995).
- 2) 特許出願中



堤 正弘
(つつみ まさひろ)
医薬事業本部
ファーマ事業所



熊谷 真希
(くまがい まき)
医薬事業本部
パイオ技術センター



鈴木 隆
(すずき たかし)
医薬事業本部
パイオ技術センター