第12回 日本臨床薬理学会 1991年10月24~25日 仙台市民会館

ヒト肝におけるトルブタミド、S-メフェニトイン
水酸化活性と P-450 human-2 含量の相関—トル
ブタミドの基質濃度の差—

山 添 康* 安 盛 俊 雄*
陳 来 舜* 加 藤 隆 一*

ヒト肝におけるメフェニトイン (MP) 水酸化酵素は遺伝的多型を示すことが知られている。MP の主代謝経路である芳香環の水酸化には立体選択性があり、S-体の水酸化に高い代謝能を示す EM (extensive metabolizer) と低い PM (poor metabolizer) が存在する。日本人では 20% 以上がメフェニトイン水酸化の PM であり、白人の 2~5% に比べて著しく多いことが報告されている^{1,2)}。本活性は数種の肝チトクローム P-450 により触媒されるとされている。演者らは、MP 水酸化酵素 P-450 human-2 酵素の同定、cDNA クローニング、cDNA の酵母内での発現を行い、クローニングされた P-450 human-2 cDNA 由来の蛋白が種々薬物に活性を示し、MP を水酸化することを明らかにした^{3~5)}。また、ヒト肝ミクロソームおよび P-450 human-2 cDNA 由来の蛋白を用いて MP の立体選択的水酸化を検討し、P-450 human-2 が EM における S-体水酸化の主代謝酵素であることを明らかにした^{6,7)}。ところでトルブタミド (TB) の主代謝経路は芳香環に結合したメチル基の水酸化であるが、この水酸化についても P-450 human-2 の属する CYP2C 分子種の関与が示唆されており、MP 水酸化の遺伝的多型と関連性があるとされているが、詳細は不明である。そこで本研究では MP 水酸化における 13 例の EM と 5 例の PM の肝ミクロソームおよび酵母で発現

した P-450 human-2 を用いて、TB の水酸化活性を測定し、TB 水酸化と MP 水酸化そして P-450 human-2 との関連性について調べた。

方法：肝ミクロソーム中の P-450 human-2 含量は精製蛋白を標品として抗 P-450 human-2 IgG を用いたイムノブロットにより定量した。TB 水酸化活性は HPLC により定量した⁵⁾。

結果：MP 水酸化における 13 例の EM と 5 例の PM の合わせて 18 例の日本人の肝ミクロソームを用いて、TB 水酸化活性を測定した。その結果肝ミクロソーム中の P-450 human-2 含量と TB 水酸化活性との間に、TB の基質濃度が低いとき (0.1 mM) には良い相関 ($r=0.76$) が認められたが、基質濃度が高いとき (2.4 mM) の相関は弱かった (Fig.)。また、基質濃度が低いときには TB 水酸化活性と S-MP 水酸化活性の間にも良い相関が認められた。抗 P-450 human-2 IgG を用いて EM と PM のミクロソームについて TB 水酸化活性の阻害実験を行ったところ、EM においては強い阻害が認められたが、PM においては阻害の程度は弱かった。また EM において TB の基質濃度の低いときは高いときに比べてさらに強い阻害が認められた。TB 水酸化の K_m 値は EM と PM の間で大きく異なっていた。また P-450 human-2 には、そのアミノ酸配列上 2 アミノ酸置換型 (MP-8) と 2 アミノ酸欠損型 (Δ hPA 6) の変異型が報告されているが、P-450 human-2 cDNA とこれら二つの変異型 P-450 human-2 cDNA を

* 慶応義塾大学医学部薬理学教室
〒160 東京都新宿区信濃町 35

Fig. 肝ミクロソーム中の P-450 human-2 含量とトルブタミド水酸化活性の相関.

酵母内で発現させて TB 水酸化活性を測定したところ 3 者のいずれにも高い活性が認められた。3 者の中では P-450 human-2 cDNA 由来の発現タンパクがもっとも高い活性を示した (P-450 human-2; 2.07 ± 0.05 , 1hPA 6; 0.71 ± 0.05 , MP-8; 0.61 ± 0.02 nmol/min/nmol P-450)。

考察：肝における TB の水酸化についてはいくつかの CYP 2C 分子種の関与が示唆されている。しかし、その代謝を担う主要な分子種についてははっきりしていなかった。本研究の結果により基質濃度が低いとき、すなわち *in vivo* における代謝に近い条件においては P-450 human-2 がその代謝に主要な役割を果たしていることが明らかになった。そして MP 水酸化における EM においては TB 水酸化と MP 水酸化の多型性が密接に関係していることが示唆された。

結論：肝における TB 水酸化と S-MP 水酸化は P-450 human-2 と基質濃度が低いときには密接に関係しており、肝における TB の水酸化は MP 水酸化多型の一つの指標になるものと考えられる。

文 献

1) Nakamura, K., Goto, F., Ray, W. A. et al.: Inter-ethnic differences in genetic polymorphism of

debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **38**: 402-408 (1985).

- 2) Jurima, M., Inaba, T., Kadar, D. et al.: Genetic polymorphism of mephenytoin p 4'-hydroxylation: Difference between Orientals and Caucasians. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **19**: 483-487 (1985).
- 3) Kawano, S., Kamataki, T., Yasumori, T. et al.: Purification of human liver cytochrome P-450 catalyzing testosterone 6 β -hydroxylation. *J. Biochem.*, **102**: 493-501 (1987).
- 4) Yasumori, T., Kawano, S., Nagata, K. et al.: Nucleotide sequence of a human liver cytochrome P-450 related to the rat male specific form. *J. Biochem.*, **102**: 1075-1082 (1987).
- 5) Yasumori, T., Murayama, N., Yamazoe, Y. et al.: Expression of a human P-450 IIC gene in yeast cells using galactose-inducible expression system. *Mol. Pharmacol.*, **35**: 443-449 (1989).
- 6) Yasumori, T., Murayama, N., Yamazoe, Y. et al.: Polymorphism in hydroxylation of mephenytoin and hexobarbital stereoisomers in relation to hepatic P-450 human-2. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**: 313-322 (1990).
- 7) Yasumori, T., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Cytochrome P-450 human-2 (P-450 IIC 9) in mephenytoin hydroxylation polymorphism in human livers: Differences in substrate and stereoselectivities among microheterogeneous P-450 IIC species expressed in yeasts. *J. Biochem.*, **109**: 711-717 (1991).