

綜 説

薬 物 代 謝 酵 素 系

中 西 穎 央
信州大学医学部薬理学教室

MICROSOMAL DRUG-METABOLIZING ENZYME SYSTEM

Suehiro NAKANISHI

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Key words: 薬物代謝酵素系(drug-metabolizing enzyme system), cytochrome P-450, cytochrome P₁-450, ミクロゾーム電子伝達系(microsomal electron transport system), NADPH cytochrome P-450 reductase

肝ミクロゾームには2つの主な機能がある。1つはタンパク質の生合成、いま1つは薬物代謝である。本総説においては、後者についてのべたい。

肝ミクロゾームには2つの電子伝達系の存在することが知られている。1つはNADPH酸化に共軛したものであり、一般には少くとも2つの構成要素、すなわちNADPH-cytochrome P-450 reductase (このものはflavoprotein NADPH-cytochrome c reductaseと密接な関係にある)と、cytochrome P-450よりなるとされている。Luら(1)(2)によればさらに熱安定因子が第3の構成要素として、この系に関与しているという。この系は脂溶性物質の水酸化をおこなうことは後述のごとくである。他の1つの電子伝達系はNADHを電子供与体とするもので、NADH-cytochrome b₅ reductaseおよびcytochrome b₅よりなるものである(3)。この系は肝ミクロゾームによる脂肪酸のoxidative desaturationに関与することが知られている。両電子伝達系ともミクロゾーム膜に局在しているが、その局在様式は現在までのところよく分っていない。すなわち、肝ミクロゾームをtrypsinで処理することによって、NADPH-cytochrome c reductaseおよびcytochrome b₅は可溶化できるが、NADH-cytochrome b₅ reductaseおよびcytochrome P-450は可溶化されない(4)(5)(6)。

生体に投与された脂溶性薬物の多くは、さきにも触れたごとく肝細胞の小胞体、とくに滑面小胞体によって水酸化される(7)。このことは、発癌性色素を動物に投与したさい、このものの酸化がNADPHの

存在下で著しく増大するという事実に端を発している(8)(9)。ついで肝ミクロゾームのNADPH-共軛酵素系が、種々の薬物ならびに芳香族化合物の水酸化の一般経路であり、この水酸化によって薬物の極性が増し、より水溶性となり、体内からの排泄が容易になることが知られてきた(10)(11)(12)。したがって、薬物排泄の速度は、このミクロゾームの酵素量ならびに酵素活性に依存する。さらに多くの薬物のほか、ステロイドホルモンの水酸化(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)、あるいは発癌性多環炭化水素(13)などが肝ミクロゾームによって水酸化されることが明らかになった。この肝ミクロゾームの薬物代謝酵素系は基質特異性が少ないことが特徴とされてきたが、最近では後述のごとく、単一の薬物代謝酵素の単一の活性部位で薬物が代謝されるとは考え難い成績が出されてきている。

もちろん肝ミクロゾームによらない薬物の酸化もおこなわれる。たとえば、アルコール類ならびにアルデヒド類はそれぞれ肝ホモジネートの上清分画のアルコール脱水素酵素ならびにアルデヒド脱水素酵素によって酸化される。p-nitrobenzylalcoholならびにp-nitrobenzylaldehydeは、それぞれ上記酵素によって酸化される(20)。プリン誘導体、たとえば6-mercaptopurine, theophylline, caffeineなどはxanthine oxidaseによって酸化される(21)。アミン類のmonoamine oxidase(22)およびdiamine oxidaseによる酸化(23)、DDTのDDEへの脱ハロゲン化反応(24)などもその例である。

肝ミクロゾームによる薬物の水酸化を触媒する酵素系は、いわゆるmixed function oxidaseであ

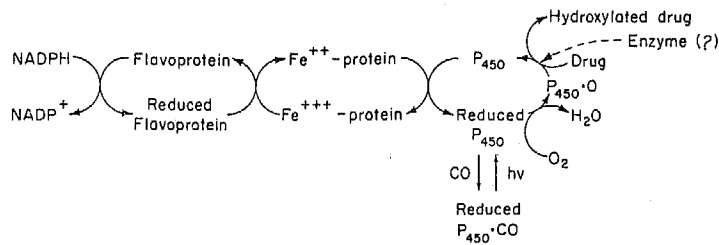


図1 肝ミクロゾームの電子伝達系(26)

って、NADPHと分子状酸素の存在下で、ミクロゾームのCO-binding cytochromesを利用して、薬物ならびにステロイドの水酸化、あるいは脂肪酸の ω -水酸化がおこなわれる(1)(12)(25)(26)。この反応式はつぎのように要約される。

$RH + NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow ROH + NADP + H_2O$
そしてこの反応は肝ミクロゾームの電子伝達系に依存するわけである(図1)。この系の末端酸化酵素、hemoprotein(s)を総称して、cytochrome P-450とよんでいる。このものはCO-sensitiveである。COは基質とcytochrome P-450との結合を阻害するが、すでにミクロゾームに結合した薬物をも遊離させる(27)。また現在cytochrome P-450はたんに薬物水酸化のcatalystであるのみならず、ミクロゾーム膜における基質の結合部位でもあり、また酸素分子の活性化に関与すると考えられている(28)。しかしながら、これら酵素反応の機序に関してはいまだ解決されていない問題が多く残されている。たとえば特異性の問題、酸素の活性化の機序、誘導形成現象などである。

ミクロゾーム懸濁液に種々の薬物を加えて差スペクトルを研究してみると、2種類のスペクトル変化に分けられる。通常この2つをそれぞれtype Iスペクトル変化ならびにtype IIスペクトル変化と呼んでいる。type Iスペクトル変化はピークが385-390m μ 、谷が420-422m μ 、であり、type IIスペクトル変化は390m μ に谷、430m μ にピークを示す(29)(図2)。type Iスペクトル変化を生ぜしめる薬物は、aminopyrine, phenobarbital, hexobarbital, DDT, chlorpromazine, testosterone, β -estradiol, SKF 525Aなどである。type IIスペクトル変化を生ぜしめる薬物は、nicotine, aniline, nicotinamide, pyridine, p-aminophenolなどである。なおcortisol, corticosterone, acetanilide, ethylisocyanide, cyanideなどはtype IIと類似のいわゆるmodified type IIスペクトル変化を生じしめること

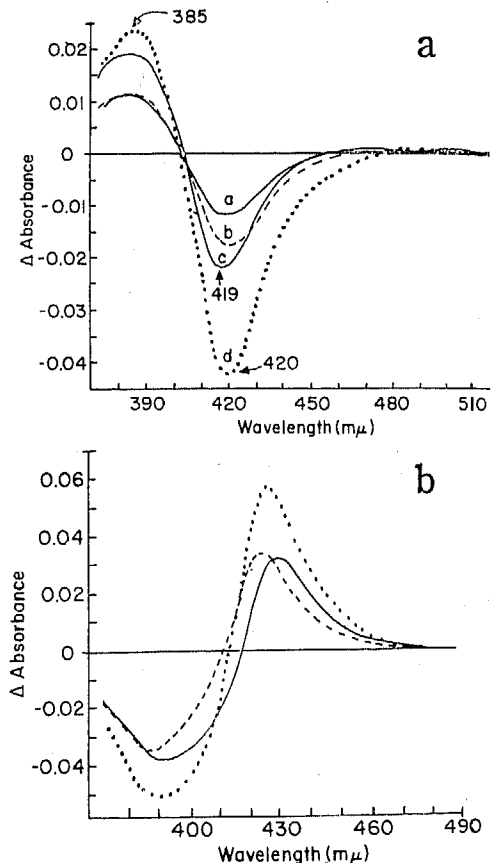


図2 種々の薬物を加えたさいのスペクトル変化(29)

a : type I スペクトル変化
b : type II スペクトル変化

が知られている。

さきにも触れたごとく、末端酸化酵素 cytochrome P-450 が複数の存在形態をとって存在するのいかどうかも、現在各研究者間で意見の一致をみていない。1種ではないことを思わせる成績と、薬物代謝酵素とはすなわち cytochrome P-450 そのもの

であって、P-450 の存在形態によって基質特異性が表現されるという考えもある。

動物を多環炭化水素で処置すると、CO-差スペクトルに変化が生じ(30)(31), また sodium dithionite による還元 hemoprotein の ethyl isocyanide-差スペクトルも変る(32)。ラットを 3-methylcholanthrene (3-MC) で処置すると cytochrome P-450 の variant, いわゆる cytochrome P_r-450 が生じる(33)(34)(35)(36)。cytochrome P_r-450 は正常動物の肝にはほとんど見出だされないし、また type I 結合部位を欠いているようにみえる(35)。cytochrome P_r-450 はしばしば cytochrome P-448 と呼ばれるが、これはこのものが還元され CO と結合すると、450m μ よりもむしろ、448mm μ に最大吸収ピークを生じることからきている(30)。以上の事実から2つの考えが生まれてきている。cytochrome P_r-450 は 3-MC またはその cytochrome P-450 の type I 結合部位と非可逆的に結合した結果生じたものであるという考え、もう1つは cytochrome P_r-450 は P-450 とは無関係に合成され、3-MC あるいはその代謝物を含むものではないというものである(35)(37)(38)(39)。cytochrome P-450 の酸化型は 420m μ に吸収ピークをもつが、hexobarbital あるいは多環炭化水素のような基質をこの酸化型に加えると、394m μ にバンドが出現する。一方 3-MC 処置ラットの microsomal P-448 の酸化型は基質を加えなくても 394m μ にバンドを示す。このことは多環炭化水素処置後、CO あるいは ethylisocyanide 差スペクトルに変化が生じるのは、異った性質の hemoprotein の合成によるというよりは、多環炭化水素あるいはその代謝物の存在によるとの考えを支持している(40)。これに対し、phenobarbital と 3-MC とを同時投与すると、cytochrome P-450 hemoprotein のミクロゾームでのレベル、hexobarbital および aniline のこの hemoprotein への結合、ならびにミクロゾームの 3-methyl-4-methylaminoazobene N-demethylase 活性は、いずれも、それぞれの薬物を単独に投与したさいのほぼ相加になる。もし cytochrome P_r-450 がたんに安定な cytochrome P-450-polycyclic hydrocarbon complex によるものであれば、phenobarbital と 3-MC 同時投与後の P-450 hemoprotein は cytochrome P_r-450 であるはずである。この成績は cytochrome P-450 と P_r-450 の induction は 2 つの hemoproteins がお互に独立に合成されるものであるという考え方を支持している(41)。またラットを phenobarbital および 3-MC で処置したのち、肝ミクロゾームを rate-

zonal 遠沈法を用いて細分画してみると、ミクロゾームベジクル内の cytochrome P-450 の分布に全く異なる影響を及ぼすことが見出だされた。さらに 3-MC によって変化した分布は、thioacetamide および ethionine によって抑制される。このことは 3-MC 処置後に生じた P-450 は、正常あるいは phenobarbital によって誘導形成されたさいの P-450 を含むベジクルとは異ったところに結合することを推測させる(42)。

microsomal cytochromes の他の 1 つ、cytochrome b₅ の機能に関しては、このものが脂肪酸の oxidative desaturation に関与することが知られているが、最近肝ミクロゾームについての分光学的な研究から、このものが、還元 cytochrome P-450 の oxygenated form への電子の donor として働く可能性が報告されている(43) (図 3)。

これまで肝ミクロゾームの cytochrome P-450 の性質については、主として差スペクトルの面より研究されており、一応の成果はえられてきているが、その分子レベルでの性質を確立するためには、より直接的なアプローチが望まれる。多くの研究者が、この cytochrome P-450 の可溶化を試みている。たとえばラット肝ミクロゾームの mixed function oxidase を可溶化し、このものが脂肪酸の ω -水酸化をおこないうること、また特徴的な electron paramagnetic resonance ならびに CO および基質によって差スペクトルを示すことが報告されている(1)。したがって複雑なこの一連の mixed function oxidation の機序の詳細な解明も少しづつではあるが、進んでいる。

肝ミクロゾームによる薬物水酸化の機序は前述のごとく、その詳細は解明されていないが、NADPH が直接あるいは間接に NADPH cytochrome reductase によって cytochrome P-450 を還元し、ついでこの還元 cytochrome P-450 は分子状酸素と反応して "active oxygen" complex を形成し、このものが薬物あるいはステロイドホルモンを水酸化すると考えられてきた(11)(25)(26)(44)。しかし cytochrome P-450 による "oxygen activation" の機序についてはいまだ実験的根拠が少なく、推測の域を出ていない。一方種々の基質は、NADPH のない状態でも肝ミクロゾームの suspension に吸光スペクトルの変化をおこさせる事実から(45)、基質は酸化型 cytochrome P-450 とまず complex をつくることが推測され、このものが NADPH-cytochrome P-450 reductase によって還元され、ついで還元型 cytochrome P-450:

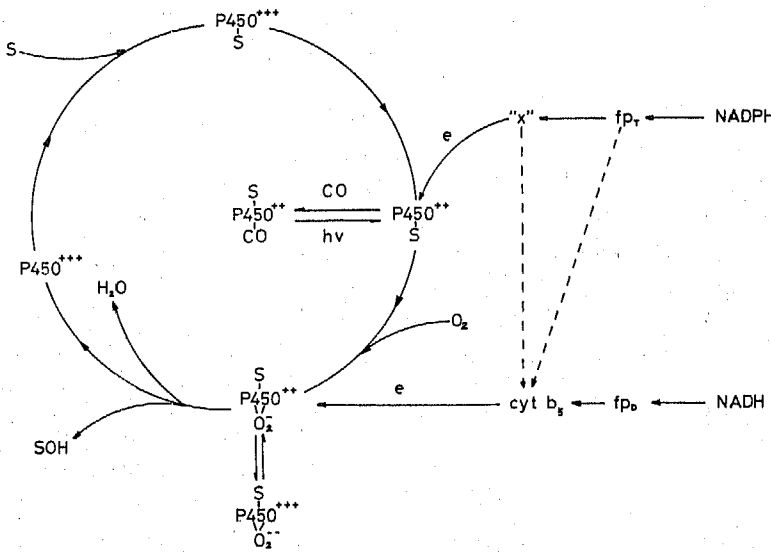


図3 肝ミクロゾームの電子伝達系と薬物水酸化(43)

基質の complex が O_2 と反応すると考えられるに至った。したがって一連の反応の律速段階は、酸化型 cytochrome P-450: 基質 complex の還元であり、肝ミクロゾームによる薬物の水酸化は、cytochrome P-450 量、差スペクトルの大きさ、さらには NADPH cytochrome c reductase の活性よりも、NADPH-cytochrome P-450 reductase の活性により律せられるとの見解が正しいものと思われる(46)(47)。

ミクロゾーム分画における NADPH-dependent な酵素活性をしらべてみると、ethylmorphine N-demethylase, aniline hydroxylase その他、大体において、滑面小胞体(SER)/粗面小胞体(RER)比は5-6である。一方 NADPH cytochrome c reductase 活性、あるいは microsomal suspension に基質を加えたさいの最大スペクトル変化の SER/RER 比は、それぞれ2.2および1.2である。NADPH cytochrome P-450 reductase 活性のみが SER/RER 比5.5で薬物代謝酵素活性についての値と一致する。さらに肝ミクロゾームにおける薬物代謝酵素活性の種差と、そのさいの電子伝達系の各 components との関係をしらべてみると、ethylmorphine N-demethylase 活性が最も種差が大であり、これに対応して、ミクロゾームの P-450 量、NADPH cytochrome c reductase 活性、microsomal suspension に ethylmorphine を加えたさいの最大スペクトル変化の差は、ethylmorphine N-demethylase にみられるこの大きな種差を説明出来ないが、NADPH cytochrome P-450 reductase 活性はほぼ、ethyl-

morphine N-demethylase 活性に比例する。しかしながら、薬物代謝酵素活性の性差に関しては、NADPH cytochrome P-450 reductase 活性では説明出来ない(46)(48)(49)。前述のごとく、phenobarbital 処置ラット肝ミクロゾームについての分光学的な研究から還元 cytochrome P-450 の oxygenated form の存在が確かめられ、従来の NADPH \rightarrow cytochrome c reductase \rightarrow cytochrome P-450 への電子伝達のほかに、NADH \rightarrow cytochrome b_5 よりの電子伝達の可能性が考えられている。

肝ミクロゾームによる薬物の水酸化が、基質によって異なることも興味深い。aniline の p-水酸化は、aminopyrine の N-demethylation あるいは hexobarbital の側鎖の酸化と多くの点で異っている。aniline の p-水酸化は sex-independent であるのに対し、aminopyrine の N-demethylation, hexobarbital の側鎖の酸化は sex-dependent である。すなわち雄ラットでは72時間の絶食により、aminopyrine, hexobarbital の代謝が低下し、逆に雌ラットでは増大するが、一方 aniline の水酸化は雌雄ラットとも増大する(50)(51)(52)。さらに type II スペクトル変化を生ぜしめる物質は P-450 の還元を抑制し、type I のスペクトル変化を生ぜしめる物質は、この cytochrome の還元に影響しないか、あるいは促進させることも興味深い(47)(48)(53)。しかし、これらの事実の機序の詳細は現在のところ分っていない。また種々のストレス条件下における薬物代謝酵素活性についても、aniline の p-水酸化は、aminopyrine, hexobarbital の代謝とは態度を異にする(54)。

aniline は cytochrome P-450 との結合にさいし、hexobarbital および aminopyrine とは異った部位に影響を及ぼすと考えられている(29)。最近の phospholipase C を用いた研究から、type I の結合部位は、P-450 の疎水部位、あるいはミクロゾーム膜の lipids と考えられ、一方 type II の結合部位は P-450 の CO-binding site と考えられている(55)。

さらに最近ラット肝ミクロゾームを isooctane で処置した成績から cytochrome P-450 の type I binding form は hemoprotein と phospholipids との結合、あるいは phospholipids と何か他のミクロ

ゾーム構成因子との相互関与によることをさらに強く推測させる(56)。

薬物とミクロゾームとの相互関係の結果、たんに酵素-基質複合体を構成するのみならず、ミクロゾーム膜の物理化学的性状、量、組成、ターンオーバーが変ることが知られてきていることも、つねに考えておかなくてはならない(57)(58)。

文 献

- 1) Lu, A.Y.H., Junk, K.W. & Coon, M.J. : J. biol. Chem., 244 : 3714, 1969
- 2) Lu, A.Y.H., Strobel, H.W. & Coon, M.J. : Mol. Pharmacol., 6 : 213, 1970
- 3) Oshino, N., Imai, Y. & Sato, R. : 7th Internat. Congress Biochem. (Tokyo), abstr., 725, 1967
- 4) Strittmatter, P. & Velick, S.F. : J. biol. Chem., 221 : 253, 1956
- 5) Omura, T., Siekevitz, P. & Palade, G.E. : J. biol. Chem., 242 : 2389, 1967
- 6) Orrenius, S., Berg, A. & Ernster, L. : European J. Biochem., 11 : 193, 1969
- 7) Gram, T.E., Roger, L.A. & Fouts, J.R. : J. Pharmacol. exper. Therap., 155 : 479, 1967
- 8) Mueller, G.C. & Miller, J.A. : J. biol. Chem., 180 : 1125, 1949
- 9) Brown, R.R., Miller, J.A. & Miller, E.C. : J. biol. Chem., 209 : 211, 1954
- 10) Brodie, B.B., Gillette, J.R. & La Du, B.N. : Ann. Rev. Biochem., 27 : 427, 1958
- 11) Gillette, J.R. : "Advances in Pharmacology", Vol. 4 pp. 219, Eds. Garattini, S. & Shore, P.A., Academic Press, New York, 1966
- 12) Conney, A.H. : Pharmacol. Rev., 19 : 317, 1967
- 13) Conney, A.H. & Klutch, A. : J. Chem., 238 : 1611, 1963
- 14) Kuntzman, R., Lawrence, D. & Conney, A.H. : Mol. Pharmacol., 1 : 163, 1965
- 15) Talalay, P. : Ann. Rev. Biochem., 34 : 347, 1965
- 16) Conney, A.H., Levin, W., Ikeda, M., Kuntzman, R., Cooper, D.Y. & Rosenthal, O. : J. biol. Chem., 243 : 3912, 1968
- 17) Conney, A.H., Levin, W., Jacobson, M. & Kuntzman, R., Cooper, D.Y. & Rosenthal, O. : "Microsomes and Drug Oxidations", pp. 279, Eds. Gillette, J.R. et al., Academic Press, New York, 1969
- 18) Voigt, W., Thomas, P.J. & Hsia, S.L. : J. biol. Chem., 243 : 3493, 1968
- 19) Wada, F., Shibata, H., Goto, M. & Sakamoto, Y. : Biochim. biophys. Acta, 162 : 518, 1968
- 20) Gillette, J.R. : J. biol. Chem., 234 : 139, 1959
- 21) Elion, G.B., Callahan, S., Rundles, R.W. & Hitching, G.H. : Canc. Res., 23 : 1207, 1963
- 22) Blaschko, H. : "Amine Oxidase", The Enzymes, 2nd ed., Vol. 8, pp. 337, Eds. Boyer, P.D. et al., Academic Press, New York, 1963
- 23) Zeller, E.A. : "Dimaine Oxidases", The Enzymes, 2nd ed., Vol. 8, pp. 313, Eds. Boyer, P.D. et al., Academic Press, New York, 1963
- 24) Sternburg, J., Kearns, C.W. & Moorfield, H. : Agr. Food Chem., 2 : 1125, 1954
- 25) Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O. & Estabrook, R.W. : Science, 147 : 400, 1965
- 26) Omura, T., Sato, R., Cooper, D. Y., Rosenthal, O. & Estabrook, R.W. : Fed. Proc., 24 : 1181, 1965
- 27) Orrenius, S. & Ernster, L. : Life Sci., 6 : 1473 : 1967 , .
- 28) Imai, Y. & Sato, R. : Biochem. biophys. Res. Commun. 22 : 620, 1966
- 29) Schenkman, J.B., Remmer, H. & Estabrook, R.W. : Mol. Pharmacol., 3 : 113, 1967
- 30) Alvares, A.P., Schilling, G.R., Levin, W. & Kuntzman, R. : Biochem. biophys. Res. Commun. 29 : 521, 1967
- 31) Hildebrandt, A., Remmer, H. & Estabrook, R. W. : Biochem. biophys. Res. Commun., 30 : 607, 1963
- 32) Sladek, N.E. & Mannering, G.J. : Biochem. biophys. Res. Commun., 24 : 668, 1966
- 33) Sladek, N.E. & Mannering, G.J. : Mol. Pharmacol., 5 : 186, 1969
- 34) Sladek, N.E. & Mannering, G.J. : Mol. Pharmacol., 5 : 174, 1969
- 35) Shoeman, D.W., Chaplin, M.D. & Mannering, G.J. : Mol. Pharmacol., 5 : 412, 1969
- 36) Parli, C.J. & Mannering, G.J. : Mol. Pharmacol., 2 : 1971

- macol., 6 : 178 , 1970
- 37) Alvares, A.P., Schilling, G., Levin, W. & Kuntzman, R. : J. Pharmacol. exper. Therap., 163 : 417, 1968
 - 38) Jefcoate, C.R.E. & Gaylor, J.L. : Biochemistry, 8 : 3436, 1969
 - 39) Gnosspelius, Y., Thor, H. & Orrenius, S. : Chem. Biol. Interaction, 1 : 125, 1969—1970
 - 40) Schenkman, J.B., Greim, H., Zange, M. & Remmer, H. : Biochim. biophys. Acta, 171 : 23, 1969
 - 41) Bidleman, K. & Mannering, G.J. : Mol. Pharmacol., 6 : 697, 1970
 - 42) Murphy, P.J., Van Frank, R.M. & Williams, T.L. : Biochem. biophys. Res. Commun., 37 : 697, 1969
 - 43) Estabrook, R.W., Hildebrandt, A.G., Baron, J., Netter, K.J. & Leibman, K. : Biochem. biophys. Res. Commun., 42 : 132, 1971
 - 44) Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. & Rosenthal, O. : Biochem. Z., 338 : 741, 1963
 - 45) Remmer, H., Schenkman, J.B., Estabrook, R.W., Sasame, H., Gillette, J.R., Cooper, D.Y., Narasimhulu, S. & Rosenthal, O. : Mol. Pharmacol., 2 : 187, 1966
 - 46) Holtzman, J.L., Gram, T.E., Gigon, P. & Gillette, J.R. : Fed. Proc., 27 : 838, 1968
 - 47) Gigon, P.L., Gram, T.E. & Gillette, J.R. : Biochem. biophys. Res. Commun., 31 : 558, 1968
 - 48) Gigon, P.L., Gram, T.E. & Gillette, J.R. : Mol. Pharmacol., 5 : 109, 1969
 - 49) Strip, B., Greene, F.E. & Gillette, J.R. : J. Pharmacol. exper. Therap., 170 : 347, 1969
 - 50) Kato, R. & Gillette, J.R. : J. Pharmacol. exper. Therap., 150 : 279, 1965
 - 51) Kato, R. : Jap. J. Pharmacol., 17 : 181, 1967
 - 52) Gram, T.E., Guarino, A.M., Schroeder, D.H., Davis, D.C., Reagan, R.L. & Gillette, J.R. : J. Pharmacol. exper. Therap., 175 : 12, 1970
 - 53) Sasame, H.A. & Gillette, J.R. : Pharmacologist, 9 : 202, 1967
 - 54) Nakanishi, S., Masamura, E., Tsukada, M. & Akabane, J. : Med. J. Shinshu Univ., 15 : 71, 1970
 - 55) Chaplin, M.D. & Mannering, G.J. : Mol. Pharmacol., 6 : 631, 1970
 - 56) Leibman, K.C. & Estabrook, R.W. : Mol. Pharmacol., 7 : 26, 1971
 - 57) Conney, A.H. & Burns, J.J. : Nature, 184 : 363, 1959
 - 58) Remmer, H. & Merker, H.J. : Science, 142 : 1657, 1963

(1971. 7. 17 受稿)