

## 綜 説

ワクシニアウイルスベクターによるチトクローム  
P450の生合成とその利用

青山 俊 文

信州大学医学部生化学教室

Biosynthesis of Cytochrome P450 by Vaccinia Virus Vector  
and Its Application

Toshifumi AOYAMA

Department of Biochemistry, Shinshu University School of Medicine

**Key words:** cytochrome P450, vaccinia virus, cDNA expression

チトクローム P450, ワクシニアウイルス, cDNA 発現

## はじめに

チトクローム P450はOmuraとSato<sup>1)</sup> (大阪大学蛋白質研究所) により発見および命名されたヘム蛋白であり, ミクロゾームまたはミトコンドリアの電子伝達系末端酵素として生体内で非常に重要な役割を担っている。その働きは脂溶性物質の酸化的代謝であり, 触媒反応にあずかる基質の種類は既知のものだけでも数千種に及んでいる。その多くは外来性異物であり, きわめて多種の薬物・毒物 (化学発癌物質の9割以上) がP450により代謝され, その後の抱合反応等を経て体外に排泄される。化学発癌物質の多くはP450によりさまざまな代謝産物になるが, その一部はDNAに強固に結合する能力を付与されるため発癌のイニシエーターとして働くことになる。外来性異物代謝ほどの多様性はないが, P450は多くの内在的物質の合成・代謝に関係している。肝臓ミクロゾームのP450はビタミンD<sub>3</sub>の25位水酸化反応, ラノステロール脱メチル反応 (コレステロールの合成系), 胆汁酸合成反応を触媒する他, ほとんど全てのステロイドホルモンの水酸化, プロスタグランジンや各種脂肪酸の $\omega$ 酸化を触媒する。副腎等のミトコンドリアおよびミクロゾーム

に局在するP450はコレステロールから各種ステロイドホルモンを合成する諸反応を触媒する。これら多種の反応は多種のP450により触媒されるが, P450の分子種数は触媒反応の種類よりもはるかに少なく, ヒトを例にあげれば50種程度と推定される (図1)。このことはすなわち一種のP450が多種の反応を触媒することを意味し, 肝臓ミクロゾームに局在するP450は特に低い基質特異性を示すことが知られている。II B1という分子種は100種以上の構造に類似性のない基質を代謝することが知られており, このような異常に低い基質特異性はP450以外の酵素にはまったく見当たらず, 酵素学上の大きな謎として興味深い研究課題を提供している。

P450の研究は構造および機能の両面にわたり行われてきたが<sup>2)-6)</sup>, 初期においては実験動物の臓器のミクロゾーム等が使われ次いで精製標品が使われた。実験動物を用いて得られたデータはヒトのP450にあてはまらない場合がよくあり, ヒトのP450の性質を正確に調べることは後述の理由から大きな困難を伴うものと考えられた。すなわち, P450は膜蛋白であるため分離精製技術が限定されており, 類似した性質を持つ分子種をおのおの高度に精製することが難しい。さ

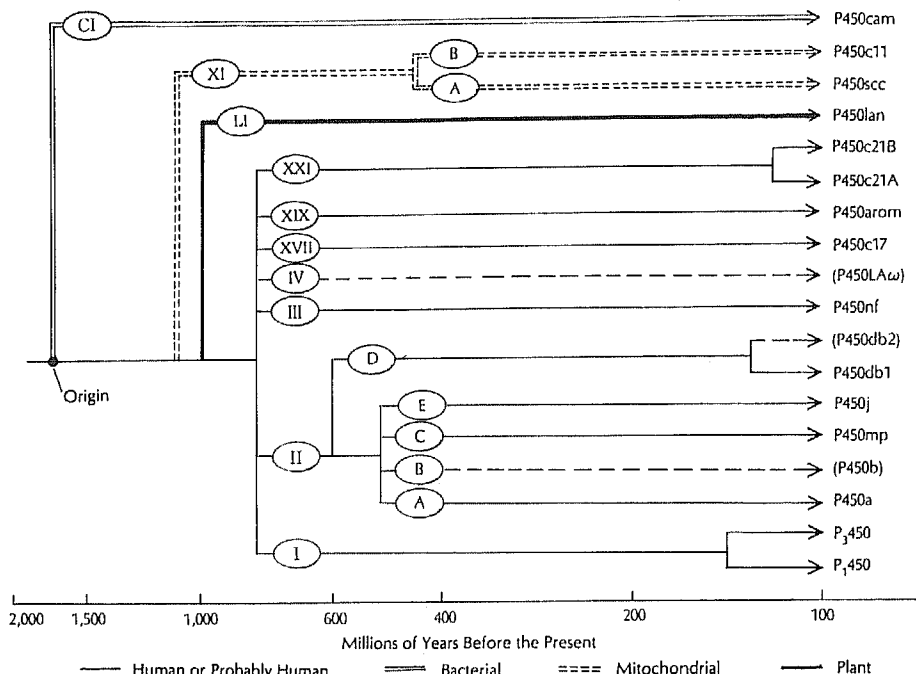


図1 Classification of P450 superfamily  
The figure demonstrates genealogical differentiation of respective subfamily indicated in ○. A typical species of subfamily member is shown at right side.

らに肝臓ミクロゾームに含まれるP450の分子種と存在量は個人差が著しく大きく、精製の再現性に問題がある。また、P450はかなり不安定な酵素であるため新鮮な臓器が必要であり、当然原料供給上の難点を伴う。以上の難点に加えて、P450の研究対象となる触媒反応の種類がきわめて多いので、量の著しく限定される精製標品を用いて広範な研究を行うことは不可能であろう。このような困難にもかかわらずヒトP450の分離精製を基盤とする研究が散発的に行われてきた<sup>7)-10)</sup>。筆者は1986年頃のこのような状況に満足できず、ヒトP450を用いた広範な研究を行える実験系を作成することを夢見てアメリカ国立癌研究所に留学し、以来4年間にわたる研究を続けた結果、所期の目標を超える実験系を作ることができた。以下に述べる内容は得られた知見を示すとともにこの領域の現状と未解決の問題点を簡潔にレビューしたものである。

### I P450 cDNA 発現法の検索

前節で述べたように純粋なヒトP450を大量に得ることは非常に難しいが、最近の遺伝子工学の急速な進

歩がそれを可能にした。1984年頃からいくつかの研究グループによりその試みが行われてきた。初期においてはバクテリアを宿主とするcDNA発現系が用いられたが、この系により合成されるP450蛋白はヘムがまったく結合しておらず、当然のように触媒活性を示さなかった。次いで、イースト細胞にプラスミドを組み込んで安定なP450生産株を作る方法が開発された。この発現系により合成されるP450蛋白はバクテリア発現系の場合と同様にほとんどがアポ蛋白であるが、わずかにホロ酵素が存在するため触媒活性を示すことが明らかになった<sup>11)</sup>。この発現系は安価に大量のP450を合成できるため、かなり多くの研究グループにより利用されている<sup>12)-15)</sup>。しかし本発現系には重大な欠陥があることが明らかになった。その1つは、あるP450分子種は大量に合成されるが他の分子種は微量しか合成されないという分子種依存的な発現力のむらがあることである。単一分子種の発現に関しては問題は少ないが、似かよった分子種の発現および機能の比較を行う場合、実験結果の信頼性に疑問が生じることは明白である。別の欠陥として、一度構築された

P450生産株の生産力が変化することが掲げられる<sup>12)</sup>。これはイースト細胞内に存在するエピゾーム粒子の個数が細胞外への放出や消失に伴って変化するためであり、制御不能の短所である。さらに、イースト細胞はヘム供給力が弱いため、合成されたP450のホロ酵素含量が不定である。また、合成されたヒトP450にNADPH由来の電子を供給する還元酵素はイースト細胞由来であるため、ミスマッチによる電子伝達の非効率化が懸念される。このようなイースト細胞発現系の多くの欠陥を克服するために哺乳動物由来の培養細胞を宿主とするP450発現系の開発がいくつかの研究グループにより行われた。1986年にサル腎臓由来のCOS細胞を用いた発現系がウシ副腎P450に適用された。以後多くの研究グループがこの方法を利用している<sup>10)-18)</sup>。本法はcDNAを含む組み換えプラスミドをCOS細胞にトランスフェクションするだけで数日後に合成されたP450を回収できるので簡便である。しかし発現力が常に弱いためP450の大量合成にはまったく向いていない。しかも発現力はP450分子種により大きく異なり、かつトランスフェクションの効率に著しく影響されるので、発現の安定性の点で信頼性に欠ける。また、発現させるたびに宿主細胞にプラスミドをトランスフェクションする必要があるため著しい手間を要する。COS細胞発現系に次いでチャイニーズハムスターV79細胞を用いる安定的発現法が適用された<sup>19)</sup>。この方法はP450 cDNAがクロモソームDNAに打ちこまれても細胞が増殖能力を維持しているため安定した永続的な発現が実現された。反面P450 cDNAの挿入される位置により発現力が著しく異なり(位置効果)、概して発現力は弱く大量合成には向いていない。またP450生産株の構築に2カ月程度かかるため便利な発現法とは言い難い。上述の発現法はいずれも宿主細胞の選択が著しく限定されている点で不便であるが、ウイルスを用いる発現法の適用により宿主選択における問題点は解決された。ウイルス発現系としてはレトロウイルス系とワクシニアウイルス\*系が知られている。レトロウイルス系は細胞が増殖能力を保持している安定的発現法であるが、V79細胞発現系の場合と同様に位置効果が存在する点で非常に扱いにくい。さらに発現力にP450分子種依存的な著しいむらがあり(1細胞あたり $10^2 \sim 10^6$ 分子)、多

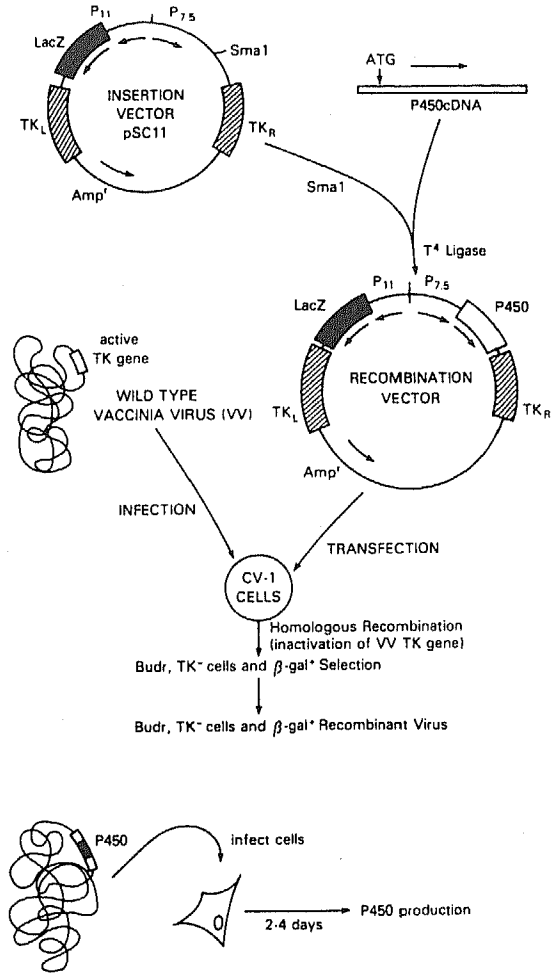


図2 Construction of recombinant vaccinia virus. P450 cDNA is inserted in pSC11 vector. The cDNA is then introduced into virus DNA by recombination in CV-1 cell. The recombinant virus is isolated by means of TK<sup>-</sup> cell.

くのP450分子種について発現力が極端に弱く、分子種間の比較を行う上では使いものにならないと考えられる。ワクシニアウイルス系は細胞が増殖能力を持たない一過的発現法である点を除けば最良の発現法であると考えられる。筆者は種々の発現法を検索した結果、上述したようなP450合成にかかわる多くの問題点があることを認識した。これらの問題点はワクシニアウイルス発現法の適用によりほとんど解決した。すなわ

\* ワクシニアウイルス：牛痘から分離された弱毒化されたウイルス。ヒトに対して病原性を示さない。

表1 Substrate specificity of human IA2: Comparison with mouse P450 IA2\*

Substrate	Reaction	Catalytic activity (pmol/min/mg lysate)	
		Human IA2	Mouse IA2
Aniline	<i>p</i> -hydroxylation	35.5	26.4
Ethoxyresorufin	O-deethylation	7.2	49.4
Pentoxyresorufin	O-depentylation	1.4	11.0
7-Ethoxycoumarin	O-deethylation	2.7	19.7
7-Propoxycoumarin	O-depropylation	0.3	12.8
Testosterone	6 $\beta$ -hydroxylation	< 0.1	< 0.1
	16 $\alpha$ -hydroxylation	< 0.1	< 0.1
	16 $\beta$ -hydroxylation	< 0.1	< 0.1
	17 keto formation	< 0.1	< 0.1

\* Cell lysate protein containing 50-80 pmol of P450 were assayed. Results represent the average of duplicate determinations.

ち、本法による発現力は他法に比べて著しく強く（1細胞あたり10<sup>7</sup>分子）、培養細胞の総蛋白量の約0.1%を合成されたP450が占める。また、試みられた27種類のP450の全てが同程度に発現され、分子種間の比較がきわめて容易になった。さらに、宿主細胞の選択範囲が著しく広く、ほとんど全種類の哺乳動物培養細胞が使用できる。また、合成されたP450の90%以上がホロ酵素であり、正常な触媒機能を持っている。加えて、図2に示した発現機構にみられるように、発現がウイルス固有の強力なプロモーターに支配されており、細胞に感染して12~16時間の間にP450合成が完了するため最高純度の非常に新鮮な状態の標品が得られる。ワクシニアウイルス発現法を用いることにより、信頼性の高い触媒反応解析システムを無限に利用することが可能となった。

図2に示したオーソドックスなワクシニアウイルス発現法は十分に強いP450合成能力を示すが、これよりさらに5~100倍ほど発現能力の強いワクシニアT7高度発現ベクターが開発されている<sup>20)21)</sup>。アメリカ国立衛生研究所のMoss博士のグループにより開発された最強の発現法の詳細は別の論文に詳述したが<sup>22)</sup>、この方法を用いると使用した哺乳動物培養細胞の総蛋白量の約10%が合成されたP450で占められるようになり、発現力としては究極のレベルに達したものと思われる。

## II ヒトとネズミのP450の触媒機能の差

ヒトとラット・マウス・ハムスターのP450の触媒機能を比較すると相当な違いが見出される。実際に、新しく合成された薬剤の実験動物系での代謝産物はヒトでのそれと一致しないことがよくあり、安全性評価を行ううえでの弱点となっている。これは主としてヒトと実験動物の肝臓に存在するP450の分子種およびそれらの存在量の違いに由来すると考えられる。それだけでなく、共通の祖先から進化したヒトと実験動物の対応するP450分子種の機能についても大きな差が存在する可能性があり、筆者はその点について詳しく研究を行った。ヒトとマウスの肝臓P450には少なくとも3つの対応する分子種があることが知られているが、その中でも条件検討がよく行われてきたP450 IA2について比較してみた。両者のcDNA配列は96%のホモロジーがあり、分子量およびスペクトルの性質に関しては差がない。ワクシニアウイルス法により両者を生合成するとほぼ同じ濃度の標品が得られ、それらを利用して触媒機能を比較した<sup>23)</sup>。表1に示されたように、アニリンP水酸化反応に関してはあまり差がないが、レゾルフィン類およびクマリン類の脱アルキル反応に関してはマウスP450 IA2の方が圧倒的に高い活性を示した。次いで表2に示されたように、17種の発癌物質の活性化についてAmesテストを用いて両者を比較した。5種の芳香族アミンを基質とした場

表2 Mutagen activation by human IA2 and comparison with mouse IA2\*

Substrate	Revertant/mg (N=4)				
	Dose (μg)	S-9	vv-WT	Human IA2	Mouse IA2
<i>Aromatic amines</i>					
2-aminoanthracene	2.5	182	8	2,020	1,428
2-aminofluorene	5	444	6	1,962	1,386
2-naphthylamine	200	162	5	20	58
2-acetylaminofluorene	5	108	5	20	58
4-aminobiphenyl	5	115	3	20	114
<i>Heterocyclic amines</i>					
Trp-P-1	25	1,765	27	353	2,698
Trp-P-2	25	6,230	20	1,732	5,850
Glu-P-1	25	1,160	10	2,992	3,016
Glu-P-2	25	2,125	5	165	725
Dimethyl IQx	25	186	17	2,060	1,440
<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>					
Benzo[a]pyrene	50	334	9	51	36
Benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol	5	599	4	67	325
7,12-dimethylbenz[a]anthracene	50	120	6	5	36
<i>Nitrosamines†</i>					
N-nitrosodiethylamine	1,000	57‡	0	0	0
N-nitrosopyrrolidine	500	1,007‡	0	0	0
N-nitroso-2,6-dimethyl morpholine	50	513‡	0	3	1
N-nitrosooxopropyl allylamine	100	5,130‡	2	15	6

\* Cell lysate protein (3 mg) from vaccinia-infected cells was incubated with the promutagen or procacino-gen at the dose indicated and in the presence of *Salmonella typhimurium* strain TA-98.

‡ TA 1530 was used as tester strain.

‡ PCB-treated hamster liver S-9.

合、2-アミノアントラセンと2-アミノフルオレンに関しては両者の活性化に差がなかったが、その他の3種に関してはマウス P450 IA2の方がヒトよりも強く活性化した。ヘテロサイクリックアミン\*を基質とした場合も同様の結果となり、ヒト P450 IA2は Glu-P-1やジメチル IQx を基質にした場合はマウス P450 IA2と同様の活性化能を示すが、他の3基質については著しく低い値を示した。芳香族炭化水素を基質とした場合も、ヒト P450 IA2はベンツピレンに関してマウスより高い活性化能を示すが他の2基質につい

ては著しく低い値を示した。表1および表2の結果からヒト P450 IA2はマウス P450 IA2と多くの点で異なる触媒能を示すことが明らかとなり、対応する分子種でさえもヒトとマウスでは大きな差があることが証明された。当然の帰結として、薬物や毒物のヒトに対するリスクを検索するうえでは、ヒトの酵素を用いなければ正しい判定が得られないことになる。図3に発癌物質である IQ 類および IQx 類の濃度を変化させた場合のヒト肝臓および生合成されたヒト P450による変異原性の活性化能を示した<sup>24)</sup>。マウスやラットの

\* ヘテロサイクリックアミン：芳香族化合物のような炭化水素環中で1個以上の炭素原子が窒素原子に置換したものの。加熱食品の焼け焦げ部分や煙中に多く含まれる。トリプトファンやグルタミン酸を加熱すると容易に得られ、Trp-P-1(または2)、Glu-P-1(または2)と称され変異原性を持つ。一部の化合物は肝臓に対して癌原性を示

す。焼肉中にはクレアチンおよびクレアチニンの変性縮合物である IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline) やメチル IQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline) 等が含まれ Glu-P-1同様の変異原性・癌原性を持つ。

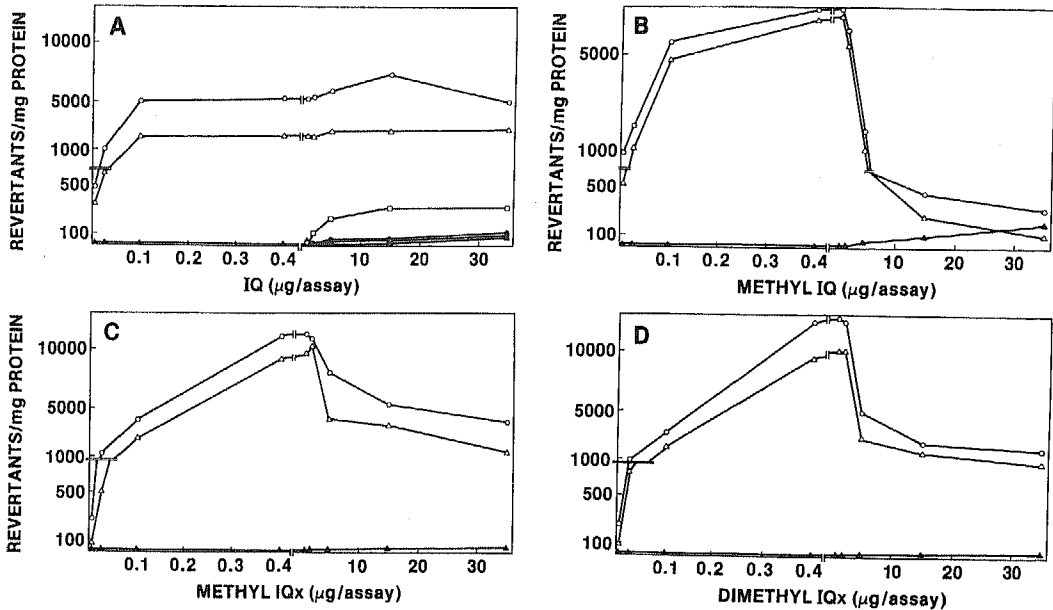


図3 Activation of IQ (A), methyl IQ (B), methyl IQx (C), and dimethyl IQx (D)  
 Bacteria were incubated in the presence of promutagen alone (▲), with promutagen and human liver S-9 (○), or vaccinia-expressed IA2 (△), IIIA4 (□), IIB7 (●), and IIC8 (■).

肝臓および合成されたP450 IA2はヒトの場合より数倍強い活性化能を示すが、これらの基質に対するP450 IA2の親和性はヒトとネズミで差がなく著しく高い。この傾向はTrp-P-2やGlu-P-1にも共通しており<sup>23)</sup>、加熱食品の焼け焦げや煙の中に含まれる一連の発癌物質類は微量でも変異原性を発揮する危険な物質群である。図3においてヒト肝臓S<sub>9</sub>画分と生合成されたP450 IA2の示すdose-responseカーブはほぼ平行であり、これらの発癌物質の活性化はヒト肝臓内でP450 IA2により支配的に触媒されることを示唆する。

### III ヒトP450による変異原物質活性化反応 および薬物・脂質の酸化反応

前項で述べたように、ヒトを対象として変異原物質の活性化や薬物・毒物の代謝に関する知見を得る際には、ヒトの臓器やそれに由来する精製標品を用いなければ正確な結果を得難いであろう。しかし材料の質的制限や精製技術の未熟さ等の点で実現が難しいものと思われる。事実、膨大な数のP450による触媒反応のごく一部分を著名な物質・反応に関してのみ実験が成されてきた。しかし前述したウイルスによるヒトP450生合成法を用いれば最高純度の新鮮な標品

が大量に得られるので、人手と予算と時間の許される限りにおいて広範な反応の検索を行えるばかりか、未知の基質・反応についても容易に調べられる。手始めに、著名な物質の代謝についてヒトP450の役割分担を決定してみた。表3に簡単に結果をまとめてみたが、単一の反応が多分子種のP450により触媒され、単一分子種のP450が多種の反応を触媒する(基質特異性が低い)ことが明らかになった。P450の役割分担に関する複雑さは、各分子種の存在割合が個体により著しく異なる事実を加味すると非常に高レベルとなる。従来のように、ヒト肝臓マイクロゾームを材料とする研究では明瞭な結果が得られなかったのは当然であると思われる。表3に示した個々の結果について詳述することはできないので、この中から特に著名な3種の反応を選んで簡単に説明を加えてみた。

カビ毒であるアフラトキシンB<sub>1</sub>はダイオキシンと並ぶ最強の発癌物質の1つであり、熱帯産の穀類・香辛料中に広く混在している危険な物質である。この物質はそのままではDNAに対する結合力は弱いですが、肝臓中のP450によりエポキシ化されることにより著しく効率良くDNAアダクトを形成する性質を帯びる。このエポキシ化反応は調べられた13分子種のヒト

表3 Promutagen activation and drug and lipid oxidation by human P450

P450	Activated promutagen	Oxidized drug and lipid
I A1	Benzo[ <i>a</i> ]pyrene 2-Acetylaminofluorene	—
I A2	Aromatic amines Heterocyclic amines Aflatoxin B <sub>1</sub>	Palmitic acid 7-Ethoxycoumarin Estradiol
II A3	Aflatoxin B <sub>1</sub>	Coumarin
II B7	Aflatoxin B <sub>1</sub>	7-Ethoxycoumarin
II C8	—	Tolbutamide
II C9	—	Tolbutamide Mephenytoin Warfarin
IID6	—	Debrisoquine Bufuralol Spartine
II E1	Nitrosamines	Ethanol
II F1	—	7-Ethoxycoumarin
III A3	Aflatoxin B <sub>1</sub>	Estradiol Testosterone Cyclosporine Progesterone Lidocaine
III A4	Aflatoxin B <sub>1</sub> Benzo[ <i>a</i> ]pyrene-7,8-dihydrodiol	Same as above
III A5	Aflatoxin B <sub>1</sub>	Same as above
IV B <sub>1</sub>	—	Estradiol

P450のうち6分子種により触媒され、しかもこれら6分子種はIA, IIA, IIBおよびIIIAの4つのサブグループに属している<sup>25)</sup>。このように多くのサブグループに属していることはヒトにとって不運なことであろう。ヘテロサイクリックアミンの活性化のように単一分子種(サブグループ)により触媒される場合は、この分子種の存在量の小さいヒトはこの物質によるDNAへの傷害が少なくすむし、オレンジ中の $\alpha$ -ナフトフラボンのようなP450 I A2に対する無害な競争基質を多く摂取すれば害を和らげられるかもしれない。筆者らは欧米人を中心に30例以上の正常な肝臓を調べてきたが、アフラトキシン B<sub>1</sub>活性化を触媒するP450が存在しない例は皆無であり、全てのヒトが十分に強い活性化能を持つものと思われる。したがって唯一の予防法はアフラトキシンを摂取しないことであるが、トウモロコシ等のカビによる汚染状況の調査結果を見ると唯一の予防法すら存在しないことになる。

筆者らの研究に先立ち、ラットP450に対して調製された各種抗体とヒト肝臓を用いてアフラトキシン B<sub>1</sub>の活性化を調べた研究が発表された<sup>26)</sup>。この論文によるとヒト肝におけるアフラトキシン B<sub>1</sub>活性化反応はP450 IIIA3またはIIIA4により支配的に触媒されることになる。筆者らはこれらの他に4分子種に強い活性化能を見出したが<sup>25)</sup>、この様な大きな差異は前項で述べたように実験動物を用いた結果が必ずしもヒトの場合のそれと一致しないこと、さらに純粋なP450を用いた実験系が最も正確な結果を導くことに由来するものと思われる。

臓器移植で多用される免疫抑制剤の1種であるサイクロスポリンは分子量のかなり大きい環状構造物質であるが、その代謝の律速酵素がP450であることが知られている。ヒト肝臓を用いた代謝研究によると、サイクロスポリンは主として3種(M1, M17, M21)の酸化された代謝物に転換され生理的活性を失う。こ

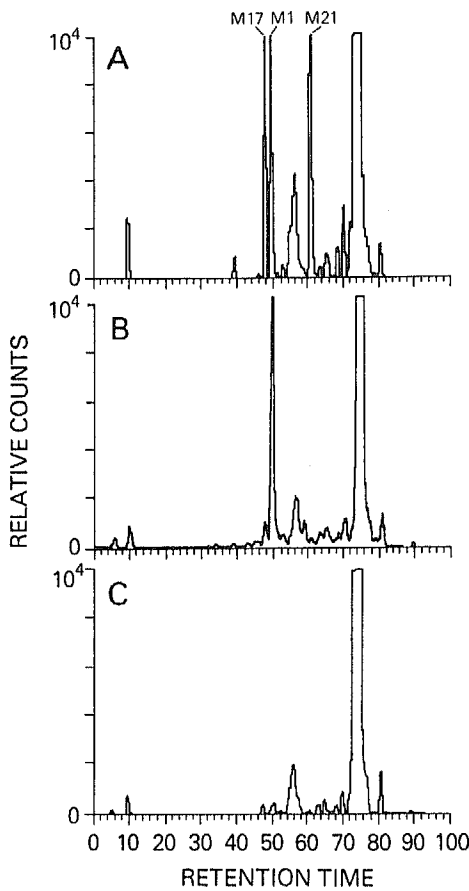


図4 HPLC chromatogram of cyclosporine and the three major oxidized metabolites (*M1*, *M17*, and *M21*) produced by cell extracts from Hep G2 cells infected with vPCN1 (A), vPCN3 (B), and vWT (C)

The chromatograms are 40 times magnified. The minor peaks are unidentified contaminants.

れを支配的に触媒する酵素は IIIA のサブファミリーに属する P450 であり、図 4 に示されたように IIIA3 または IIIA4 (hPCN1) は 3 種全ての代謝物を等量ずつ生産する。さらに IIIA5 (hPCN3) は M17 のみを生産する<sup>27)</sup>。他の P450 分子種は触媒能を持たない。13 個の正常なヒト肝臓における P450 IIIA サブファミリーの含量を調べたところ個人差が著しく大きく、また

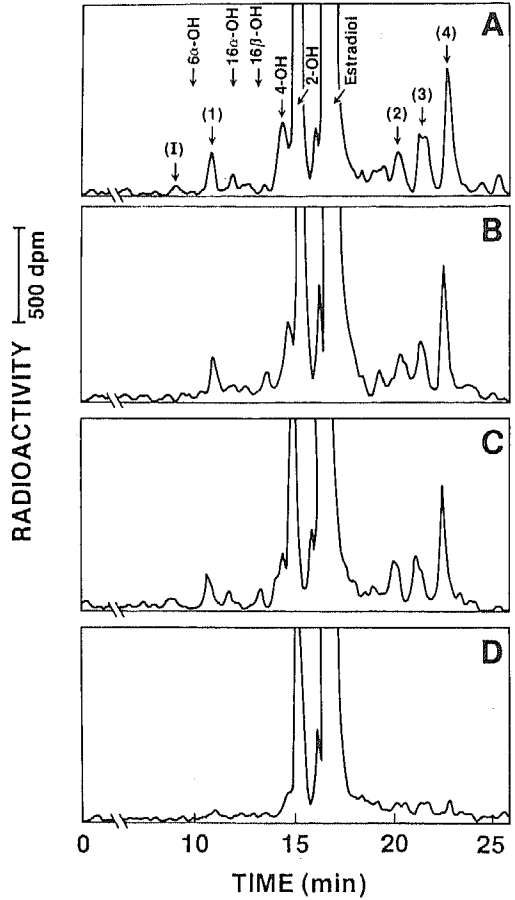


図5 HPLC chromatogram of estradiol and its metabolites produced from incubation with human liver microsomes (A) plus antirat IIB1 IgG (B), antirat IA2 IgG (6), and antirat IIIA1 IgG (D)

The positions of elution of estradiol, 2-hydroxyestradiol (2-OH), 4-hydroxyestradiol (4-OH), 16 $\alpha$ -hydroxyestradiol (16 $\alpha$ -OH), 16 $\beta$ -hydroxyestradiol (16 $\beta$ -OH), and 6 $\alpha$ -hydroxyestradiol (6 $\alpha$ -OH) are indicated by *vertical arrows*. The impurity in the substrate (I) and unknown metabolites (1-4) are also marked by *vertical arrows*.

多くの個体において IIIA5 はほとんど検出されなかった。これに反して 1 個体のみにおいて IIIA3 および IIIA4 が欠失していた。上述の結果はサイクロスポリンの使用量および投与期間に関して難しい問題点があることを示唆している。すなわち IIIA サブファミリー含量の多い個体は所定量の基質をたやすく失活させるが、含量の低い個体および IIIA3 や IIIA4 を欠失し



ている個体は同量の基質を与えられた場合により長い失活時間を要し、より大きな副作用をこうむることになる。また、所定量を長期間投与した場合はP450独特の誘導現象がおこる可能性があり、それに伴う IIIA サブファミリー含量の増加は基質を急速に失活させるため適正投与量の水準を上方修正する必要が生じるかもしれない。IIIA サブファミリー含量は個体のおかれた生理的薬理的条件により大きく変化し、そのメカニズムも不明の点が多いので人為的制御は難しい。したがってサイタロスポリンの適正投与に関しては当分の間経験に基づく処置に頼らざるを得ないであろう。

エストラジオールはその生合成過程においてA環が共役構造となる重要なステップがある。この反応を触媒するのはアロマターゼと称されるP450であり、生体内反応中で唯一のベンゼン環を合成する反応である。エストラジオールの血中濃度が上昇すると肝臓において分解または代謝させることにより適正濃度が保たれる機構が存在するが、その律速酵素もまたP450である。エストラジオールは肝臓P450よりA環の2位または4位に水酸基を導入され活性に富んだジオールとなる。このジオールは尿中に排泄される他に蛋白と結合することが知られている。エストラジオールをヒト肝ミクロゾームにより代謝させたところ上記のジオール以外に3種以上未知の代謝産物に転換された(図5)。これらの物質はA環が開裂したものと推定されるが、P450により生じるジオール体を中間体とすることが示された<sup>28)</sup>。A環への水酸基の導入はおもにIA2, IIIA3, IIIA4により触媒される。エストラジオールは乳癌と密接に関連していることが知られているので、代謝産物のDNAに対する付加物形成能を培養細胞レベルで調べたところほとんど付加物形成が検出されなかった。この結果はエストラジオールが乳癌形成のイニシエーターではないことを示し、別のステップにおいて関与していることを示唆するものである<sup>29)</sup>。

上述したように、ウイルス法により生合成されたヒトP450は様々な代謝反応に適用され成果をあげてきた。多種の既知の反応を調べることで、生合成されたヒトP450の集団が示す代謝データはヒト肝臓を用いて得たデータにきわめて近いものであることが明らかになった<sup>29)-40)</sup>。ヒト肝臓を用いた代謝データは個体差に由来したバラツキが大きいのでその扱いに苦慮することが多いがその点に関しては本法のシステムの方が優れていると思われる。今後もこのシステムを多くの反応に適用してゆき、薬物・毒物代謝に関して

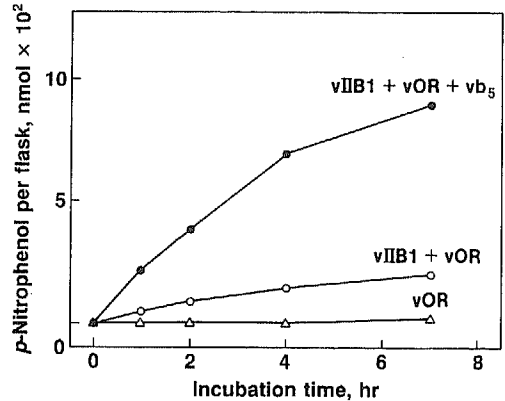


図6 Metabolism of *p*-nitrophenetole *in situ* by cells infected with recombinant vaccinia viruses

Cells were infected with the various recombinant viruses shown above each curve in the figure. Eighteen hours after infection, *p*-nitrophenetole was added to a final concentration of 0.4mM, and the nmol of *p*-nitrophenol produced per flask was determined as a function of time. The results are the average of three flasks per time point.

は人体実験の代用と成りうるレベルまで到達することを目標としている。また、新しく開発される薬品の代謝実験は実験動物を用いているのが現状であるが、それに加えてこのシステムを利用することによりヒトに関するデータを得ればより正確にヒトに対する安全性の検定を行うことができると思われる

#### IV 多種遺伝子の定量的同時発現

動物培養細胞を宿主とする遺伝子発現システムが数多く開発されてきたが、そのほとんどにおいて目的の蛋白の生合成量を人為的に調節することは難しい。COS細胞法やバキュロウイルス法を用いるとある程度の制御が可能であるが、前者は発現力の弱さについて、後者は発現の定量性・安定性に関する不備について重大な欠陥を持つ。現在のところ、定量性にすぐれかつ強力な発現力を示すワクシニアウイルス法が多種遺伝子の定量的同時発現を行い得る唯一のシステムと考えられる。

予備的に2種のミクロゾーム電子伝達系酵素であるP450とNADPH-P450還元酵素をコードするcDNAを発現させた<sup>41)</sup>。この場合1種ずつを別々の細胞群中で発現させた後に活性測定時に混合すれば同一細胞中で2種を同時発現したのと同じことになると予想されたが、まったくこの予想とは逆の結果になった。すな

わち、シャーレ1枚の細胞中でP450を発現させてマイクロゾーム画分を回収したものとNADPH-P450還元酵素を発現させてマイクロゾーム画分を回収したものを単に混合しても微細なマイクロゾーム粒子間での衝突や融合がめったにおこらず、したがってP450と還元酵素は別々のマイクロゾーム粒子上に存在するので相互間の電子伝達が行われない。ゆえに発現酵素間の相互作用を行わせるには両者を同一細胞中で発現させることが必須条件となる。マイクロゾーム電子伝達系にはさらにNADH系の酵素群が存在し、その中でもチトクローム  $b_5$  はP450に直接作用して電子を供与することが知られている。そこで前述の2種の酵素に加えてチトクローム  $b_5$  を同一細胞中で同時発現させ、それらの間の相互作用について調べてみた<sup>42)</sup>。図6に示されたように、P450 IIB1により触媒されるp-ニトロフェニール脱エチル反応はチトクローム  $b_5$  の存在により数倍以上活性化されることが明らかになった。酵素間の相互作用は従来精製標品を人工リボソーム上で再構成させる技法により調べられてきたが、どの程度まで人為的操作の影響が及んでいるか不明であった。図6のデータは3種の酵素間の相互作用が細胞内の小胞体膜上で起こり得ることを直接証明するものである。

ワクシニアウイルス法を用いて多種の遺伝子を同時発現させる場合、各遺伝子産物の生成量は組み換えウイルス量比を調節するだけで任意に変えられるため非常に便利である。また宿主細胞の選択範囲が非常に広いことため実験的に適した細胞を選べる点でもすぐれており、今後需要の高まりそうな多種遺伝子同時発現の実験において威力を発揮するものと思われる。

### V P450バイオリクター

P450は基質特異性が低くきわめて多種の反応を触媒しうる特徴を持つため、化学合成の難しい種々の化合物を生合成するのに利用されることが期待された。しかしP450は容易にへムを失いやすく不安定であり、触媒としての反応継続時間も数十分間程度の場合が多く不可逆的に失活する。過去にP450を樹脂に固定化し、還元酵素とNADPHを供給するかわりに過酸化水素やクメンハイドロパーオキシドをオキシダントとして与えるバイオリクターを作成する試みが行われたがまったく実用性に乏しいものであった。cDNA発現法の発展に伴いバイオリクターとしての利用が可能となった。P450を発現する酵母株が人工的に作られたが、厚い細胞壁を持つため物質通過効率が低い

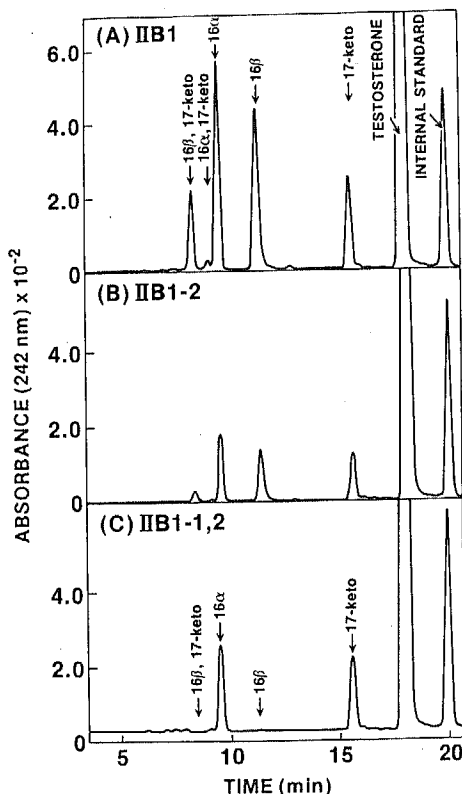


図7 HPLC chromatogram of testosterone metabolites produced by vaccinia virus expressed IIB1 (panel A), IIB1-2 (panel B), and IIB1-1,2

The positions of migration of authentic steroid standards are denoted by vertical arrows.

ことが多く、また前項で述べた理由から酵母を宿主とするP450発現法は欠陥が多く、満足すべきものができていないのが現状である。さらに数十kgの単位で合成する必要のある物質でP450による触媒反応が必要な場合は少ないので、たとえ効率の良いP450バイオリクターができたとしても利用価値が低いものと思われる。しかし、数十mg単位で使われる物質の種類はきわめて多く、その中には化学合成が著しく難しくP450による生合成が有用なものが少なくない。そこで筆者は少量の化学物質をできるだけ安価に合成するシステムを追求してみた。種々の予備実験を行った結果、ウイルス法で大量のP450を発現させた細胞の培養液に直接基質を加える方法が最もコストが低くなることを見出した<sup>42)</sup>。その理由は、培養細胞の細胞膜に対して基質および生成物の通過効率は素通り同然に高く、細胞を破碎してマイクロゾーム画分を集める必要

がまったくなくないこと、P450の反応に必要な NADPH は細胞の再生系が強く働くため初めから加える必要も補充する必要もまったくなくないこと、図 6 に見られるように P450 による反応継続時間が細胞を壊した場合に比べて10倍以上長くなること、代謝回転数が精製標品に比べて数倍高くなること等による。この方法を用いると7-エトキシマリンを基質として P450 II E1 を用いた場合に175cm<sup>2</sup>サイズのフラスコあたり生成物の7-ヒドロキシマリンが1.2mg 合成された。少し規模をあげれば10mg 以上を合成・抽出・精製することが可能である。種々のステロイド・テルペノイド・脂肪酸類等の内在的基質および各種薬物・毒物の誘導体合成にきわめて有用な手段となるであろう。また、このシステムは開発中の薬剤のようにヒト P450 による代謝産物がまったく不明の基質の場合、その代謝産物を合成・分析・同定することが可能であろう。また、mg 単位で誘導体を合成して毒性試験等に利用することも誘導体が安定であれば可能であろう。非常に広範にわたる応用が期待され、しかも低コストで実験ができるので関連分野の研究者の参入を期待して止まない。

## VI P450の構造活性相関

P450は基質特異性が低いという酵素学上特筆されるべき特徴を持つ。この特徴を決定する要因は基質結合部位上にあり、その解明は学問上きわめて重要な意義を有している。医学の面でも特定薬剤の遺伝的な代謝不全やステロイドホルモン合成能の欠失に基づく遺伝的疾患等が存在することが知られている<sup>43)</sup>。P450遺伝子上での変異が原因であることが1例について解明されており<sup>44)</sup>、今後数多くの報告が続くものと予想される。P450の基質結合部位上の変異と活性の変化については多くの研究が行われ急速に進歩しつつある領

域であるが、その解説には別の総説を著す予定なので、本稿においては筆者が行ったワクシニア法を用いる構造活性相関についての研究<sup>45)</sup>を簡単に紹介するにとどめたい。

P450 II B1 はテストステロンを基質とした場合4種の代謝物(図7A)を生成する。114番目のアミノ酸であるイソロイシンがフェニルアラニンに変わるアリーリックバリエーションが見出され、触媒能は60%程度減少するが代謝物の生成比(図7B)は変化しない。114番目の他に58番目のロイシンがフェニルアラニンに変わったダブルバリエーションが新たに見出され、触媒能は前出のバリエーション\*と同程度であるが2種の代謝物しか生成しない(図7C)。この場合16β-ヒドロキシ、および16β-ヒドロキシ、17-ケトテストステロンがまったく生成されず、16β位に水酸基を導入する能力がなくなり、明瞭な基質特異性の変化が生じたことになる。この変化は基質が3つの位置でP450に結合する場合、その1つがアミノ酸の変化に基づき結合できなくなったことを示唆する。基質をアンドロステンジオンに変えた場合も16β位への水酸基導入能がまったくなくなることが見出され、ステロイド環を持つ化合物に対して共通した変化であると推量される。この研究においてウイルスによる発現法の果たした役割は大きく、その強力で定常的な発現力のおかげでこの類の研究の中では断然定量的にすぐれた研究を展開することができた。

## おわりに

筆者が行った研究は全てアメリカ国立癌研究所分子発癌部門において行われたものであり、終始指導を賜った Frank J. Gonzalez 博士に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem*, 239: 2379-2385, 1964
- 2) Black, S.D. and Coon, M.J.: Comparative structures of P-450 cytochromes. In: Montellano, P.R.O. (ed.), *Cytochrome P-450: Structure, mechanism, and biochemistry*, pp. 161-216, Plenum Publishing Corp., New York, 1986
- 3) Gonzalez, F.J.: The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev*, 40: 243-288, 1989
- 4) Gonzalez, F.J.: Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmac Ther*, 45: 1-38, 1990

\* バリエーション: 正常の遺伝子配列の一部が変化した変異体(ミュータント)のこと。

相補的 DNA の一方のみに変異が生じている場合はアリーリックバリエーションと言われる。

- 5) Sato, R., Aoyama, T. and Imai, Y.: Multiple forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of drug-untreated rabbits: Purification and characterization. In: Nozaki, M., Yamamoto, Y., Ishimura, Y., Coon, M. J., Ernster, L. and Estabrook, R. W. (eds.), *Oxygenases and oxygen metabolism*, pp. 321-332, Academic Press, New York 1982
- 6) 今井嘉郎, 青山俊文: 肝ミクロソームのチトクロム P-450 の分子的多様性, 生化学, 54: 232-239, 1982
- 7) Shimada, T., Misono, K. S. and Guengerich, F. P.: Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism: Purification and characterization of two similar forms involved in the reaction. *J Biol Chem*, 261: 909-921, 1986
- 8) Guengerich, F. P.: Oxidation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450. *Mol Pharmacol*, 33: 500-508, 1988
- 9) Guengerich, F. P.: Biochemical characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 29: 241-264, 1989
- 10) Guengerich, F. P., Martin, M. V., Beaune, P. H., Kremers, P., Wolff, T. and Waxman, D. J.: Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem*, 261: 5051-5060, 1986
- 11) Oeda, K., Sakaki, T. and Ohkawa, H.: Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA*, 4: 203-210, 1985
- 12) Hardwick, J. P., Song, B. J., Huberman, E. and Gonzalez, F. J.: Isolation, complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic lauric acid  $\omega$ -hydroxylase: Identification of a new cytochrome P-450 gene family. *J Biol Chem*, 262: 801-810, 1987
- 13) Shimizu, T., Hirano, K., Takahashi, M., Hatano, M. and Fujii-Kuriyama, Y.: Site-directed mutageneses of rat liver cytochrome P-450d: Axial ligand and heme incorporation. *Biochemistry*, 27: 4138-4141, 1988
- 14) Nagata, K., Matsunaga, T., Gillette, J., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J.: Rat testosterone 7 $\alpha$ -hydroxylase: Isolation, sequence, and expression of cDNA and its developmental regulation and induction by 3-methylcholanthrene. *J Biol Chem*, 262: 2787-2793, 1987
- 15) Higashi, Y., Tanae, A., Inoue, H., Hiromasa, T. and Fujii-Kuriyama, Y.: Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase deficiency in man: Possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 7486-7490, 1988
- 16) Zuber, M. X., Simpson, E. R. and Waterman, M. R.: Expression of bovine 17 $\alpha$ -hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science*, 234: 1258-1261, 1986
- 17) Zuber, M. X., Mason, J. I., Simpson, E. R. and Waterman, M. R.: Simultaneous transfection of COS-1 cells with mitochondrial and microsomal steroid hydroxylases: Incorporation of a steroidogenic pathway into nonsteroidogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 699-703, 1988
- 18) Gonzalez, F. J., Matsunaga, T., Nagata, K., Meyer, U. A., Nebert, D. W., Pastewka, J., Kozak, C. A., Gillette, J., Gelboin, H. V. and Hardwick, J. P.: Debrisoquine 4-hydroxylase: Characterization of a new P-450 gene subfamily: Regulation, chromosomal mapping, and molecular analysis of the DNA polymorphism. *DNA*, 6: 149-161, 1987
- 19) Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, H. and Oesch, F.: Stable expression of rat cytochrome P-450 IIB1 cDNA in chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 5769-5773, 1988
- 20) Aoyama, T., Gonzalez, F. J. and Gelboin, H. V.: Mutagenic activation by cDNA-expressed P<sub>1</sub>450, P<sub>3</sub>450, and P450a. *Mol Carcinog*, 1: 253-259, 1989
- 21) Aoyama, T., Korzekwa, K., Nagata, K., Gillette, J., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J.: cDNA-directed

- expression of rat testosterone 7 $\alpha$ -hydroxylase using the modified vaccinia virus, T7-RNA-polymerase system and evidence for 6 $\alpha$ -hydroxylation and  $\Delta$ 6-testosterone formation. *Eur J Biochem*, 181 : 331-336, 1989
- 22) 青山俊文：ワクシニアウイルスベクターによる多種遺伝子の定量的同時発現と改良ワクシニア T7高度発現ベクター。村松正美, 岡山博人 (編), 実験医学, 遺伝子工学ハンドブック, pp. 309-312, 羊土社, 東京, 1991
  - 23) Aoyama, T., Gonzalez, F. J. and Gelboin, H. V. : Human cDNA-expressed cytochrome P450 IA2 : Mutagen activation and substrate specificity. *Mol Carcinog*, 2 : 192-198, 1989
  - 24) Aoyama, T., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Mutagenic activation of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline by complementary DNA-expressed human liver P-450. *Cancer Res*, 50 : 2060-2063, 1990
  - 25) Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P. S., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Five of twelve forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P-450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 4790-4793, 1990
  - 26) Shimada, T. and Guengerich, F. P. : Evidence for cytochrome P-450, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 462-465, 1989
  - 27) Aoyama, T., Yamano, S., Waxman, D. J., Lapenson, D. P., Meyer, U. A., Fisher, V., Tyndale, R., Inaba, T., Kalow, W., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J Biol Chem*, 264 : 10388-10395, 1989
  - 28) Aoyama, T., Korzekwa, K., Nagata, K., Gillette, J., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Estradiol metabolism by cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Endocrinology*, 126 : 3101-3106, 1990
  - 29) Aoyama, T., Korzekwa, K., Matsunaga, T., Nagata, K., Gillette, J., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : cDNA-directed expression of rat P450s IIA1 and IIA2 : Catalytic activities toward steroids and xenobiotics and comparison with the enzymes purified from liver. *Drug Metab Dispos*, 18 : 378-382, 1990
  - 30) Aoyama, T. and Sato, R. : High pressure liquid chromatography methods for separation of  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxy fatty acids. *Anal Biochem*, 170 : 73-82, 1988
  - 31) Aoyama, T., Hardwick, J. P., Inaoka, S., Funae, Y., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Clofibrate-induced rat hepatic P450s IVA1 and IVA3 catalyze the  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxylation of fatty acids and the  $\omega$ -hydroxylation of prostaglandins E<sub>1</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub> . *J Lipid Res*, 31 : 1477-1482, 1990
  - 32) 青山俊文：cDNA発現によるヒトP450の大量合成と薬物・毒物・脂質代謝への応用。実験医学, 9 : 79-83, 1991
  - 33) 青山俊文：P450の遺伝子工学による合成と薬物・毒物・脂質代謝への利用。蛋白質核酸酵素, 36 : 1633-1643, 1991
  - 34) Relling, M. V., Aoyama, T., Gonzalez, F. J. and Meyer, U. A. : Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther*, 252 : 442-447, 1990
  - 35) Crespi, C. L., Steimel, D. T., Aoyama, T., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Stable expression of human cytochrome P450 IA2 cDNA in a human lymphoblastoid cell line. *Mol Carcinog*, 3 : 5-8, 1990
  - 36) Bargetzi, M. J., Aoyama, T., Gonzalez, F. J. and Meyer, U. A. : Lidocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450 IIIA4. *Clin Pharmacol Ther*, 46 : 521-527, 1989
  - 37) Yamano, S., Nhamburo, P. T., Aoyama, T., Meyer, U. A., Inaba, T., Kalow, W., Gelboin, H. V., McBride, O. W. and Gonzalez, F. J. : cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 II B1. *Biochemistry*, 28 : 7340-7348, 1989

- 38) Matsunaga, E., Zeugin, T., Zanger, U. M., Aoyama, T., Meyer, U. A. and Gonzalez, F. J.: Sequence requirements for cytochrome P-450 IID1 catalytic activity. *J Biol Chem*, 265 : 17197-17201, 1990
- 39) Howard, P. C., Aoyama, T., Bauer, S. L., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J.: The metabolism of 1-nitropyrene by human cytochromes P450. *Carcinogenesis*, in press
- 40) Gonzalez, F. J., Aoyama, T. and Gelboin, H. V.: Expression of mammalian cytochrome P450 using vaccinia virus. *Methods Enzymol*, in press
- 41) Yamano, S., Aoyama, T., McBride, O. W., Hardwick, J. P., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J.: Human NADPH-P450 oxidoreductase: Complementary DNA cloning, sequence and vaccinia virus-mediated expression and localization of the CYPOR gene to chromosome 7. *Mol Pharmacol*, 35 : 83-88, 1989
- 42) Aoyama, T., Nagata, K., Yamazoe, Y., Kato, R., Matsunaga, E., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J.: Cytochrome b<sub>5</sub> potentiation of P450 catalytic activity demonstrated by a novel vaccinia-mediated in situ reconstitution system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 5425-5429, 1990
- 43) Gonzalez, F. J., Skoda, R. C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U. M., Nebert, D. W., Gelboin, H. V., Hardwick, J. P. and Meyer, U. A.: Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 331 : 442-446, 1988
- 44) Tusie-Luna, M. T., Traktman, P. and White, P. C.: Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem*, 265 : 20916-20922, 1990
- 45) Aoyama, T., Korzekwa, K., Nagata, K., Adesnik, M., Reiss, A., Lapenson, D. P., Gillette, J., Gelboin, H. V., Waxman, D. J. and Gonzalez, F. J.: Sequence requirement for cytochrome P450 IIB1 catalytic activity: Alteration of the stereospecificity and regioselectivity of steroid hydroxylation by a simultaneous change of two hydrophobic amino acid residues to phenylalanine. *J Biol Chem*, 264 : 21327-21333, 1989

(3. 2. 7 受稿)