

氏名（本籍） 安 部 康 司

学位の種類 博 士（薬 学）

学位記番号 薬 第 4 9 1 号

学位授与年月日 平 成 1 7 年 1 月 1 9 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 新規プロドラッグ活性化酵素としての  
プログルタミルアミノペプチターゼ I に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 山 添 康

教 授 後 藤 順 一

助教授 永 田 清

## 論文内容要旨

本研究において、生化学的および分子生物学的手法を用いて、プロドラッグ活性化酵素としてのピログルタミンアミノペプチダーゼI (PAP-I) の特性解析を行った。

新規有機硝酸薬系狭心症治療薬、4(R)-N-(2-nitroxyethyl)-2-oxothiazolidine-4- carboxamide (RS-7897) は、L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (L-OTCA) とニトロ基を有する側鎖であるアミノエチルナイトレート (AEN) がアミド結合した構造を持ち、200有余の化合物を合成した中で見出された化合物である。ニトログリセリンなどの有機硝酸薬の持つ問題点の一つは耐性発現であり、その機序の一つとして薬効本体である Nitric oxide の遊離に必要な細胞内グルタチオンの枯渇が考えられていることから、RS-7897 は、システイン前駆物質として知られる L-OTCA を付与し、生体内におけるシステインおよびグルタチオン供給を意図したプロドラッグである。

期待されたように、RS-7897 は *in vitro* においてニトログリセリンなど他の有機硝酸薬と比べて硝酸薬耐性を惹起しなかった。実際に RS-7897 を薬効評価動物であるイヌに静脈内投与すると、血漿中に L-OTCA の生成が観察され、RS-7897 はアミド開裂反応を受けることが示された。同時に RS-7897 から強力な血管拡張作用を有する AEN の生成が観察された。AEN の薬効は RS-7897 よりも強かったが、RS-7897 の薬効は AEN よりも持続的であった。RS-7897 を静脈内投与後の AEN の消失半減期は AEN 自身を静脈内投与するよりも約 2.5 倍長く、薬効の持続パターンに符合した。RS-7897 の光学異性体は加水分解反応を受けず、AEN が全く生成されないため、イヌにおける薬効は RS-7897 よりも 6 倍以上弱かった。これらの知見から、RS-7897 のアミド開裂反応がその薬効発現および体内動態に重要な役割を担うことが示された。すなわち RS-7897 加水分解酵素は、持続的な RS-7897 からの AEN の放出および潜在的チオール基ドナーである L-OTCA の生成を、同時にもたらすプロドラッグ活性化酵素として機能することが明らかとなった。

イヌおよびラット組織における RS-7897 加水分解活性は、一般的な加水分解酵素の存在部位であるミクロソーム画分ではなく、サイトソール画分に局在していた。阻害試験の結果、チオール基ブロック剤で阻害されるシステイン含有酵素であることが判明したが、その酵素を特定するには至らなかった。そこでラット肝より RS-7897 加水分解酵素の精製を行った。精製画分には SDS-PAGE 上 2 本の蛋白バンドを含んだが、活性を有すると考えられた蛋白バンドの部分ペプチド情報をデータベース検索することにより、PAP-I が RS-7897 加水分解酵素である可能性を見出した。PAP-I はペプチドや蛋白質の N 末端に存在する L-ピログルタミン基を認識し、L-ピログルタミン酸 (L-pGlu) を加水分解的に遊離させる酵素である。

ラットの PAP-I に関してはクローニング情報が欠如していたため、そのクローニングを初めて行った。ラット PAP-I の cDNA 情報から得られたアミノ酸配列は、マウスおよびヒト PAP-I と 90% 以上の高い相同性を示した。これら PAP-I のアミノ酸配列を、生化学的性質の最も良く調べられているバクテリア PAP と比較すると、活性中心および活性部位に存在する疎水ポケットの構成アミノ酸残基も良く保存されていることが判明した。これらの知見から、ラット、マウスおよびヒト PAP-I は構造的に高い類似性を保存していることが示された。ラット、マウスおよびヒト PAP-I を *Escherichia coli* に単一蛋白として大量発現させ

たところ、これらの蛋白はRS-7897加水分解活性を有したことから、PAP-Iが薬物代謝酵素およびRS-7897の代謝活性化酵素として機能することを初めて証明した。PAP-Iの本来の認識部位はL-pGlu基であるが、RS-7897の有するL-OTCA基は構造的にL-pGluに類似しているために、PAP-IがRS-7897を認識しうる可能性が考えられた。リコンビナントラットPAP-Iをウサギに感作して作製したポリクローナル抗体は、ラット、マウスあるいはイヌ肝サイトソール中のRS-7897加水分解活性を完全に阻害したことから、PAP-IはRS-7897の加水分解を担う唯一の酵素であることが示された。

次に免疫組織学的検討を行い、PAP-Iは脳、小脳および下垂体でも細胞質内に分布することを確認した。調べた組織の中では腎近位尿管および下垂体のある細胞群に特異的に分布し、何らかの生理学的および病理学的なPAP-Iの機能が存在することが示唆された。PAP-I活性は多くのペプチドの異化組織である腎に高く、肝、脳および骨格筋などの機能的性質の異なる組織にも広く分布することから、PAP-Iはペプチドからアミノ酸への最終異化代謝に関して重要な役割を担うと考えられる。

続いてRS-7897およびPAP-Iの代表基質L-pGlu *p*-nitroanilide (L-pGlu-*p*NA)を用いてPAP-Iの特性解析を行った。リコンビナントPAP-Iの生化学的性質は、用いた基質に因らずラット肝より精製したPAP-Iとはほぼ一致し、種差は観察されなかった。すなわちPAP-Iは分子量約23 kDaの単量体で、セリン酵素阻害剤や金属キレート剤による影響を受けず、システイン酵素阻害剤により強力に阻害されるチオール依存性酵素であり、至適pHは8~8.5であった。なおRS-7897に対する $K_m$ 値は0.41~0.58 mM、L-pGlu-*p*NAに対する $K_m$ 値は0.030~0.054 mMであり、L-OTCA基はL-pGlu基に比べPAP-Iへの認識性が低いことが示唆された。

そこで、L-pGlu基の化学構造を変換し、PAP-Iの基質特異性について検討した。活性はL-pGlu基の2位の立体配位や3位および5位の部分構造を変換することにより消失したが、L-pGlu基の4位の炭素原子を硫黄原子(L-OTCA)、酸素原子あるいは窒素原子に置換しても、PAP-Iへの認識性は保たれており、PAP-IはL-pGlu基4位の炭素原子の置換に寛容であることを見出した。ただし、L-pGlu基の4位ヘテロ原子置換体を有する化合物のPAP-Iへの認識性は、L-pGlu基を有する化合物よりも低下する傾向にあった。L-pGlu基の4位の炭素原子はPAP-Iの構造上疎水ポケット付近に位置することから、4位ヘテロ原子置換体は疎水ポケットには入り得るが、4位置換原子の原子サイズや性質によって、酵素への親和性に影響することが示唆された。

L-OTCA基はL-pGlu基よりも脂溶性が大きいため、L-OTCA基を含むプロドラッグは吸収性および細胞膜透過性の面では優れていると考えられる。実際RS-7897の吸収率は80%以上であった。また、どの動物種においてもL-OTCA基を有する化合物の方がL-pGlu基を有する化合物に比べてPAP-Iによる加水分解は遅く、固有クリアランスは低かった。さらにL-OTCA基を有する化合物のPAP-Iに対する $K_m$ 値は0.1 mM以上と高く、加水分解活性は飽和しにくいものと考えられた。これらの傾向はL-OTCA基と結合する側鎖の構造を換えても維持され、側鎖に対するPAP-Iの基質特異性は広がった。なおL-OTCA自身ヒトに高用量投与されており、非常に安全な化合物であることも証明されている。このようにL-OTCAを脱離基として用いたプロドラッグは、良好な吸収性を持ち、全身循環に移行した後にPAP-Iによって徐々に活性代謝

物を放出できる可能性が示唆された。この着想は、今回示したAENなどのアミノ基を有する低分子水溶性化合物、種々のペプチド系化合物や抗癲癇薬 L-Dopa などのアミノ酸系薬物のプロドラッグ化の手段として適用できる可能性がある。

以上、本論文では、従来薬物の代謝に関与することが知られていなかったPAP-Iが、薬物代謝酵素およびプロドラッグ代謝活性化酵素として *in vivo* において機能することを証明した。PAP-Iは本来の認識部位である L-pGlu 基以外に L-OTCA 基を認識することを明らかにした。またプロドラッグ用修飾基として、L-OTCA が応用できる可能性を示した。

## 審査結果の要旨

本研究は、プロドラッグ活性化酵素としてのピログルタミルアミノペプチダーゼI (PAP-I) の特性を解析したものである。新規狭心症治療薬、4(R)-N-(2-nitroxyethyl)-2-oxothiazolidine-4- carboxamide (RS-7897) は、L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (L-OTCA) とニトロ基を有するアミノエチルナイトレート (AEN) がアミド結合した構造を持ち、システイン前駆物質のL-OTCAを付与して耐性発現の原因とされるグルタチオンの枯渇を防止することを意図したプロドラッグである。期待されたように、イヌに静脈内投与すると、血漿中にL-OTCAの生成が観察され、RS-7897はアミド開裂反応を受けることが示された。これらの知見から、RS-7897のアミド開裂反応がその薬効発現および体内動態に重要な役割を担うことが示された。すなわちRS-7897加水分解酵素は、AENの放出および潜在的チオール基ドナーであるL-OTCAの生成を、同時にもたらすプロドラッグ活性化酵素として機能することが明らかとなった。RS-7897加水分解活性は、一般的な加水分解酵素の存在部位であるミクロソーム画分ではなく、サイトソール画分に局在していた。そこでラット肝よりRS-7897加水分解酵素の精製を行った。活性を有すると考えられた蛋白バンドの部分ペプチド情報をデータベース検索することにより、PAP-IがRS-7897加水分解酵素である可能性を見出した。さらにクローニングを行い、ラット、マウスおよびヒトPAP-Iは構造的に高い類似性を保持していることを示した。ラット、マウスおよびヒトPAP-Iを *Escherichia coli* に単一蛋白として大量発現させたところ、これらの蛋白はRS-7897加水分解活性を有したことから、PAP-Iが薬物代謝酵素およびRS-7897の代謝活性化酵素として機能することを初めて証明した。以上、本論文では、従来薬物の代謝に関与することが知られていなかったPAP-Iが、薬物代謝酵素およびプロドラッグ代謝活性化酵素として *in vivo* において機能することを証明した。PAP-Iは本来の認識部位であるL-pGlu基以外にL-OTCA基を認識することも明らかにした。またプロドラッグ用修飾基として、L-OTCAが応用できる可能性を示した。したがって本研究は博士論文に十分に値すると判断した。