

免疫抑制剤ミゾリビンの血中濃度を測定する酵素を開発

— 短時間で簡便な血中濃度測定の実現に期待 —

平成 20 年 11 月 20 日

独立行政法人 産業技術総合研究所

旭化成ファーマ 株式会社

■ ポイント ■

- ・ ミゾリビンの血中濃度測定に使用できる酵素を発見し、酵素の効率的な製造方法も開発した。
- ・ 血中濃度を短時間で正確に測定できるので、適正な投与量のコントロールが可能になる。
- ・ 現在は 1 時間に 3 検体程度の測定しかできないが、600 検体程度の測定も可能となる。

■ 概要 ■

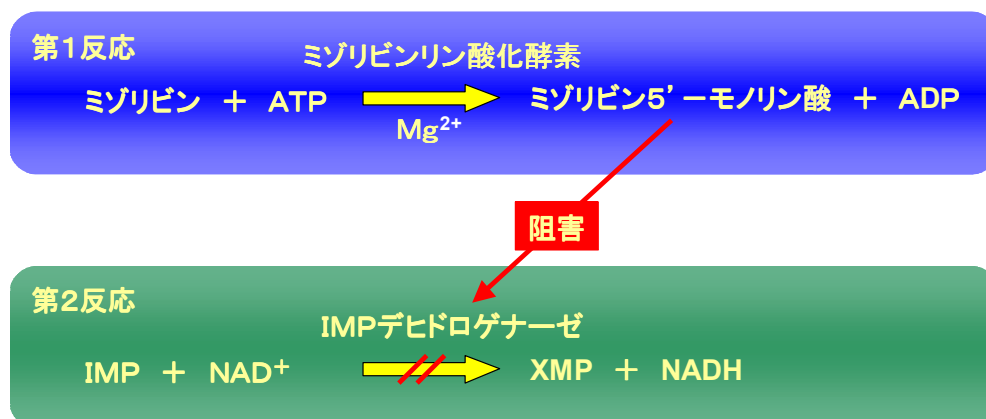
独立行政法人 産業技術総合研究所【理事長 吉川 弘之】（以下「産総研」という）ゲノムファクトリー研究部門【研究部門長 鎌形 洋一】遺伝子発現工学研究グループ 田村 具博 研究グループ長は、旭化成ファーマ株式会社【代表取締役社長 稲田 勉】と共同で、免疫抑制剤として使用されているミゾリビン（MZR）の血中濃度測定に使用できる酵素（ミゾリビンリン酸化酵素）を見つけ、その効率的な製造方法を開発した。

ミゾリビンは、腎移植における拒否反応の抑制・ループス腎炎・慢性関節リウマチ等の治療などに広く用いられている低分子化合物（分子量 259）である。しかし、ミゾリビンの効果と治療の安全性を確保するための至適量に関しては不明な点があり、個人ごとの最適な投与量を把握するためには、血中濃度を測定しながら投与量を調整することが必要であると指摘されている。

現在、ミゾリビンの血中濃度は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって測定できるが、手間と時間がかかる。今回開発した酵素を用いると、短時間で簡便な測定が可能となる。

本技術の詳細は、2008 年 11 月 27 日～30 日に名古屋国際会議場で開催される「第 55 回日本臨床検査医学会学術集会」で発表される。

_____は別紙【用語の説明】参照



今回発見されたミゾリビンリン酸化酵素によるミゾリビン濃度の測定原理

NAD⁺:酸化型補酵素、NADH:還元型補酵素

第 2 反応で生成する NADH 濃度は、波長 340 ナノメートルの吸光度から容易に計測できるので、ミゾリビン濃度を算出できる。

■ 開発の社会的背景 ■

ミゾリビン（MZR）は、腎移植における拒否反応の抑制・ループス腎炎・慢性関節リウマチ等の治療などに広く用いられている低分子化合物（分子量 259）である。しかし、ミゾリビンの効果と安全性を確保するための至適量に関しては不明な点がある。ミゾリビンは同様の薬効を示す他の薬と比べて、白血球減少などの血液系障害が少ないものの、主として腎臓から排泄されるため、腎障害のある患者では排泄が遅延し、骨髄機能抑制等の重篤な副作用が起こることがある。そのため血中濃度測定による投与量の調整が必要であることが近年指摘されている。

現在、ミゾリビンの血中濃度は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による測定が可能である。しかし、HPLCによる測定は、（i）装置に限られた施設にしか配備されていない、（ii）検体の前処理が必要である、（iii）測定に時間を要すると共に多検体同時測定が出来ない、（iv）血液の他の成分分析に比べて試料の必要量が多い（最低でも 0.8 ミリリットル）、などの問題点がある。そこで、より短時間で簡便な測定を実現するために、汎用自動分析機で測定可能なミゾリビンの血中濃度測定法の開発が望まれている。

■ 研究の経緯 ■

産総研ゲノムファクトリー研究部門遺伝子発現工学研究グループでは、ロドコッカス属放線菌 (*Rhodococcus erythropolis*) による化学物質やタンパク質の生産系を構築する研究を行ってきた。特に放線菌によるタンパク質の生産は、既存技術である大腸菌による生産が困難なタンパク質の生産を可能にする特徴がある。一方、旭化成ファーマ株式会社診断薬製品部では、診断薬用酵素の開発や、酵素を用いた診断薬の開発を行っている。そこで、産総研は旭化成ファーマ株式会社と共同で、ロドコッカス属放線菌を用いた診断薬用酵素製造技術の開発に取り組んできた。

■ 研究の内容 ■

本技術によるミゾリビン濃度の測定原理は図 1 に示すような 2 つの反応からなる。

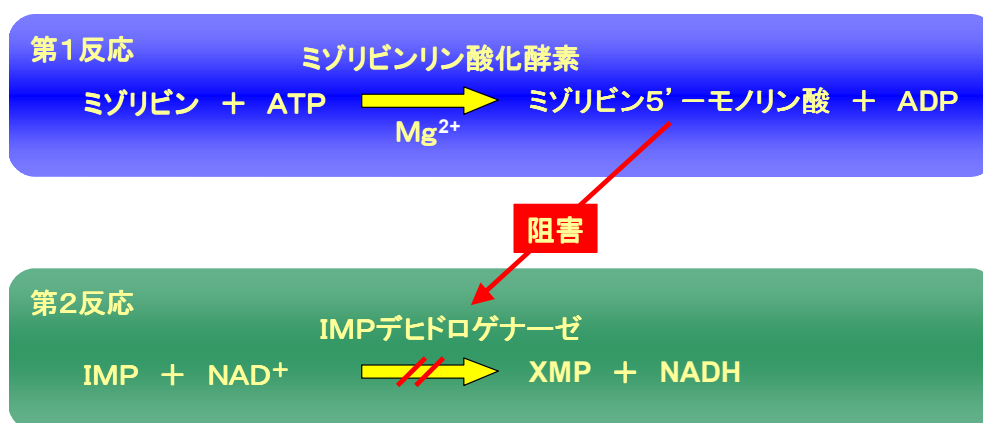


図 1 今回発見されたミゾリビンリン酸化酵素によるミゾリビン濃度の測定原理

NAD^+ : 酸化型補酵素、 NADH : 還元型補酵素

第 2 反応で生成する NADH 濃度は、波長 340 ナノメートルの吸光度から容易に計測できるので、ミゾリビン濃度を算出できる。

第 1 反応では、ミゾリビンリン酸化酵素の働きで、ミゾリビンにリン酸が結合してミゾリビン 5'-モノリン酸（MZR-P）になる。この MZR-P が IMP デヒドロゲナーゼ という酵素の働きを阻害するので、第 2 反応ではその阻害の程度を測定することによって MZR-P 濃度、すなわちミゾリビン濃度が算出される。IMP デヒドロゲナーゼという酵素は化合物 IMP（イノシンーリン酸）を化合物 XMP（キサントシンー

リン酸)に変換する酵素であり、この時化合物 NAD^+ (補酵素酸化型) が化合物 NADH (補酵素還元型) になる。 NADH の濃度は波長 340 ナノメートルの吸光度を測定することによって容易に測定できる。これによって IMP デヒドロゲナーゼの酵素活性の阻害の程度が算出され、MZR-P 濃度からミゾリビン濃度が算出される。

第1ステップのミゾリビンをリン酸化する酵素は、ヒト生体内においてどの酵素がその役割を担っているか明らかになっていないので、ゲノム情報が登録されているデータベースの中から、予想される遺伝子を検索した。候補とした複数の遺伝子を組み換えタンパク質として大腸菌で発現させ、生産されたタンパク質がミゾリビンのリン酸化能力を有するかどうかの探索を行った。ところが、それらの酵素を大腸菌内で生産すると、生産された酵素により、細胞内の核酸やリン酸化された核酸の濃度バランスが崩されるために、大腸菌が死んでしまうことが多く、探索が進まなかった。

そこで、産総研のロドコッカス属放線菌(*Rhodococcus erythropolis*)を用いたところ、菌が死ぬことなく、探索が容易になった。さまざまな微生物由来の酵素遺伝子をこの放線菌で発現した。その結果、ミゾリビンをリン酸化する酵素遺伝子を発見した。さらに、その遺伝子を用いて放線菌でミゾリビンをリン酸化する酵素の効率的な製造方法も開発した。詳細に解析した結果、本酵素はバクテリアでは世界で初めて発見された核酸のリン酸化酵素(ヌクレオシドキナーゼ)であり、学術的にも価値の高い酵素である事が明らかになった。

本酵素を用いて、ミゾリビン血中濃度測定のための酵素法を開発した。第1反応でこの酵素によるリン酸化反応の様子を HPLC で解析した結果を図2に示す。反応途中なので未反応の ATP とミゾリビンも残っているが、ATP が ADP に変化され、ミゾリビンが MZR-P に変換されていることが確認された。この第1反応は、5分間で完結する。

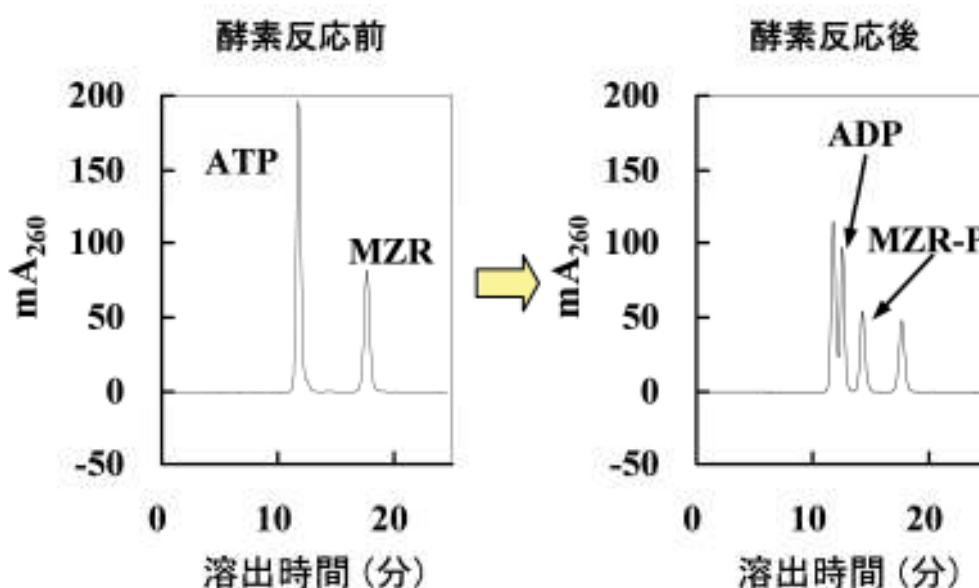


図2 HPLCにより解析した本酵素によるミゾリビンのリン酸化反応(第1反応の確認)

第1反応の反応液を第2反応の試験液(IMPと NAD^+ とIMPデヒドロゲナーゼを含む)に加えて第2反応を行い、波長340ナノメートルの吸光度の測定を行った。吸光度からIMPデヒドロゲナーゼの酵素活性の阻害の程度が算出され、MZR-P濃度、ミゾリビン濃度の算出を行った。その結果、図3のようにHPLCを用いた濃度測定結果と一致することから、正確に血中に存在するミゾリビン濃度の測定ができることが確認された。

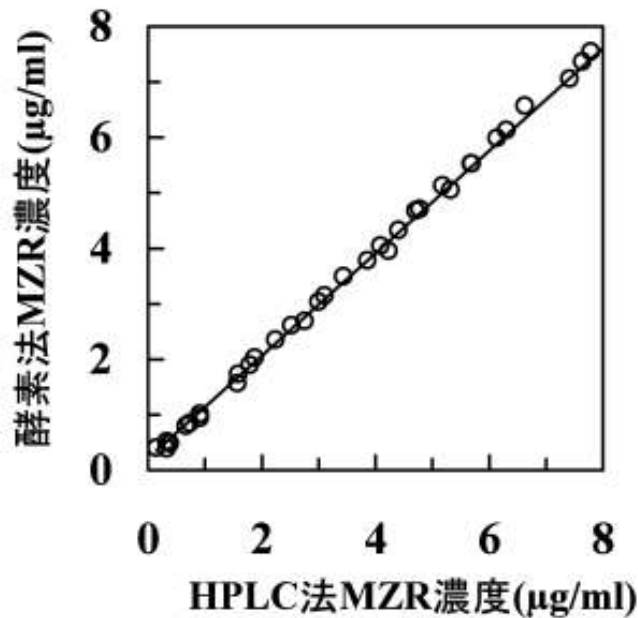


図3 酵素法ミゾリビン（MZR）血中濃度測定結果と HPLC 法との比較

現在、ミゾリビン血中濃度測定は、検体の前処理時間を除いた HPLC 測定だけでも 18 分必要で 1 時間に 3.3 検体しか測定できない。このミゾリビン血中濃度測定酵素法を利用すれば汎用の生化学自動分析機による多検体同時測定が可能で、1 時間に 600 検体測定できるようになる（汎用生化学用自動分析機、日立 7080 形自動分析機を使用した場合）。

■ 今後の予定 ■

この研究成果をもとに、産総研はミゾリビン（MZR）をリン酸化するヌクレオシドキナーゼの機能解析をさらに進め、旭化成ファーマ株式会社はミゾリビン血中濃度測定試薬を開発する予定である。

■ 本件問い合わせ先 ■

独立行政法人 産業技術総合研究所

ゲノムファクトリー研究部門 遺伝子発現工学研究グループ

研究グループ長 田村 具博 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1
TEL: 011-857-8938 FAX: 011-857-8980
E-mail: t-tamura@aist.go.jp

旭化成ファーマ株式会社

総務グループ

〒101-8101 東京都千代田区神田神保町1丁目105番地
TEL: 03-3296-3600 FAX: 03-3296-3680
E-mail: pharma-soumu@om.asahi-kasei.co.jp

【プレス発表／取材に関する窓口】

独立行政法人 産業技術総合研究所

北海道産学官連携センター 広報担当 中川啓子

〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号

TEL: 011-857-8428 FAX: 011-857-8901

E-mail: sgk.contact.hokkaido@m.aist.go.jp

用語の説明

◆免疫抑制剤

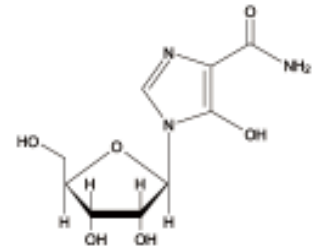
臓器移植における拒絶反応や自己免疫疾患における異常免疫反応の抑制に用いる薬剤。

◆ミゾリビン (MZR : Mizoribine)

免疫抑制剤として、腎移植における拒否反応の抑制・ループス腎炎・慢性関節リウマチの治療などに広く用いられている低分子化合物。

分子式 $C_9H_{13}N_3O_6$ 分子量 259.22

今回発見された酵素により図の一番左側の HO-にリン酸が結合する。



◆ループス腎炎

膠原病の一つである全身性エリテマトーデスの腎合併症で、核成分を抗原とする免疫複合体糸球体腎炎。

◆慢性関節リウマチ

関節に炎症が起こり、関節がはれて痛む病気。炎症性自己免疫疾患。

◆骨髓機能抑制

骨髓の造血細胞生成機能が低下すること。感染や出血が引き起こされることがある。

◆放線菌

放線菌は、細菌類を色素によって染色・分類する方法を用いた際に、染色によって染まる性質をもつ菌類(グラム陽性菌)に分類され、細胞が菌糸(体を構成する、糸状の構造)を形成して細長く増殖する特徴を示す。菌糸が放射状に伸びるため付けられた名ではあるが、遺伝子の塩基配列による現在の分子系統学では、もはや形態だけで特徴づけることは困難である。抗生物質生産菌の大部分が放線菌に属する。

◆ロドコッカス属放線菌

放線菌 *Rhodococcus* (ロドコッカス) 属に分類される菌で、遺伝子の塩基配列による分子系統学により更に約 40 種に分類される。ロドコッカス属放線菌 (*Rhodococcus erythropolis*) は温度 $4^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 前後まで幅広い温度域での増殖が可能で、有機溶媒に耐性を示すといった特徴をもつ。同族細菌の中には、難分解性の環境汚染物質に対する分解能をもつ菌など多様な能力を持つ菌が多数見ついている。物質生産の観点からは、汎用化学品(アクリルアミド)の製造・実用化に世界ではじめて成功した微生物としても知られる。

◆イノシン 5' -モノリン酸脱水素酵素 (IMP デヒドロゲナーゼ)

イノシン 5' -モノリン酸をキサントシン 5' -モノリン酸に変換する酵素。

◆ヌクレオシドキナーゼ

ヌクレオシドをリン酸化する酵素。