

## 《若手研究者紹介》



## UDP-グルクロン酸転移酵素と出会って

藤 原 亮 一\* Ryoichi Fujiwara

北里大学薬学部薬剤学教室

## 1. はじめに

筆者は2004年3月に北里大学薬学部を卒業した。2日間の薬剤師国家試験が3月28日に終わり、その翌日に軽自動車で鎌倉から金沢へ向かった。4月1日に横井毅教授（現・名古屋大学教授）が主宰されていた金沢大学大学院薬物代謝化学研究室を訪問した。国立大学における厳しい研究生活のスタートを覚悟していたが、横井教授の口からは「今週中はしっかりと生活準備をするように」と意外な言葉が出てきた。優しい言葉を真に受け、兼六園を訪れるなど数日間はゆっくりと過ごした。結局金沢には4年半住んだが、このようなのんびりとした時間は二度と訪れなかった。

## 2. 想像を超える研究生活のスタート

外部から横井ラボに入った2人の大学院生に対し研究テーマは2つ準備されており、1つはシトクロムP450 (CYP)、もう1つはUDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) に関する研究であった。もともとCYPに興味を持って進学を決めたので、もちろんCYPの研究を手掛けたかった。しかし、もう1人の院生がどうしてもCYP研究を行いたいと言うため、筆者は(渋々と)UGTの研究を引き受けた。それか

ら12年経った現在もUGTについての研究を続けることになるとは、その時は想像もしていなかった。

UGT研究は中島美紀准教授（現・教授）に指導していただいたが、ピペットマンの扱い、バッファの調製、HPLCの操作など、実験面で面倒を見てくださったのは1つ上の学年の山中洋幸先輩であった。最初の課題はヒトUGT発現ベクターの構築であったため、PCRで増幅した産物を精製しては大腸菌に組み込む作業が長く続いた。最初に行った際は全ての作業が遅れてしまい、PCR産物の精製が終わったのは夜11時を過ぎていた。今日はここまでと思って実験室を出たが、山中先輩は「続けてライゲーションとトランスフォーメーションをしましょうか」と言って実験室へ戻ってしまった。たしかに、オーバーナイトのインキュベーションが必要なトランスフォーメーションを翌日に持ち越すのは非効率的ではあるが、当時はそのようなことを知らなかったため山中先輩の発言を理解するのに苦しんだ。深夜2時過ぎにようやく作業が終わったが、さすがに他の院生は皆帰宅していた。このように毎日夜遅くまで嫌な顔ひとつせず指導して下さった山中先輩に、筆者は非常に感謝している。

同級生は次々と学会発表や論文発表を行っていたが、筆者の最初の研究テーマがまとまったのは博士課程に進学してからであった<sup>1)</sup>。ここで、この時の研究成果について簡単に紹介させていただきたい。古くよりUGTはホモダイマーやホモテトラマー等のホモ多量体を形成する可能性が示唆されていたが、ヒトUGTが異なる分子間でダイマー等の多量体を形成するの否か、またそのような異分子種間のタンパク相互作用が酵素活性に影響を与えるか

\*2004年、北里大学薬学部卒。2008年、金沢大学大学院自然科学研究科博士課程修了、博士号（薬学）取得。2008～2012年、カリフォルニア大学サンディエゴ校博士研究員。2012～2015年、北里大学薬学部助教。2015年～現在、同講師。2016年、日本薬物動態学会奨励賞受賞。研究テーマ：薬物代謝酵素、毒性の予測、皮膚。趣味：ハーフマラソン、テニス。連絡先：〒108-8641 東京都港区白金5-9-1  
E-mail: fujiwarar@pharm.kitasato-u.ac.jp

否かは不明であった。そこで、ヒト肝臓における主要分子種である UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, および UGT1A9 の発現ベクターを構築し、2つの分子種を同時に発現する UGT 異分子種共発現 HEK293 細胞を樹立した。UGT 分子種特異抗体を用いた免疫沈降, Native-PAGE, また酵素の耐熱性解析により、ヒト UGT がヘテロ多量体を形成することを明らかにした。さらに、それぞれの分子種を単独で発現する細胞と共発現細胞における酵素活性は異なることが明らかとなった。例えばプロポフォルは UGT1A9 の特異基質であるが、UGT1A9 によるプロポフォルグルクロン酸抱合反応の  $V_{\max}$  値は、UGT1A4 や UGT1A6 共発現時に顕著に上昇することが示された。これらの結果より、ヒト UGT はヘテロ多量体を形成し、この異分子種間のタンパク相互作用は酵素活性に影響を与えていることを明らかにした。

### 3. 大学院で学んだこと

大学院において幅広い研究手法を学び、論文の読解、執筆能力も身につけたが、特に横井教授・中島准教授が熱心に指導してくださったのは、ミーティング時に積極的に質問する等の、発言し意見交換をする重要性であった。筆者は小学校～高校と、クラスメートの前で発言することを苦手としており、大学では教室内に 300 人近くの学生がいたため、発言する機会はほとんど無かった。横井ラボでは週に 2 回のミーティングで研究報告や論文紹介が行われていたが、他の学生が発表する内容についていくことができず、質問できないでいる時期が続いた。次第に質問しないことに慣れてしまい、研究室内のミーティングのみならず、他大学や企業の研究者による講演の際も、質問することは無かった。修士 2 年になった頃、筆者を含む特に質問数が少なかった学生数人は横井教授に名指しで注意された。叱られることに慣れていなかったため内心で反発したが、注意は至って正当なものであったため、これを機にミーティングに対する考えが変わっていった。ミーティングで質問することを心がけると、自然と発表をより注意深く聞くようになり、ミーティングが有意義で楽しいものになった。的外れな質問かもしれない、と心配し質問することを躊躇うことは今もあるが、似たようなことを疑問に思う人は他にもいるは

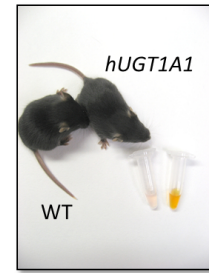
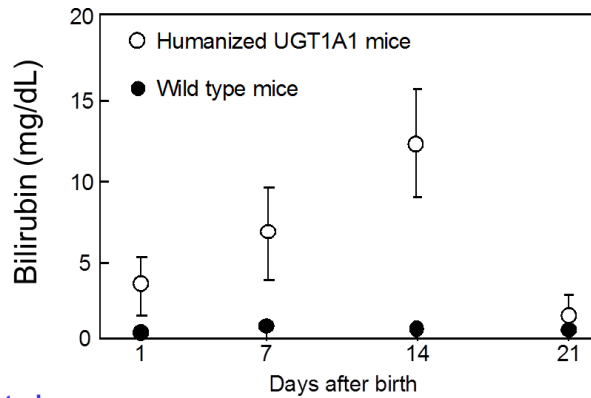
ず、と思い込むことも大事である。現在も研究室内のミーティングに加え、学内の外部研究者による講演や学会等で積極的に質問し、発表者と意見交換を行うよう心がけている。

### 4. Tukey 博士と出会いカリフォルニアへ

博士課程に進学した 2006 年に初めて国際学会に参加した。論文でよく目にする名前のタグを付けた研究者を見つけては、非常に興奮したのを今でもよく覚えている。その中の 1 人がカリフォルニア大学サンディエゴ校で教授を務め、古くより UGT の研究を手掛ける Tukey 博士であった。懇親会の会場で Tukey 博士を見かけ、自分も UGT 研究者であること、またポスター発表を見に来て欲しいと片言の英語で伝えた。ポスター発表日、約束通りに Tukey 博士は筆者のポスターに足を運んでくれた。研究内容の説明はぎこちないものであったが、要点は伝わっていたと思う。握手をした後、Tukey 博士はポスドクとしてカリフォルニア大学に来ないかと誘ってくれた。なんとなく海外での研究経験を得たいと思っていたが、当時は博士課程の 1 年目であったため、修了は 2 年以上も先のことであった。ポスドクという言葉の意味も理解していなかった。帰国し、再び研究に没頭する日々に戻った。

博士課程 3 年目となり、将来について具体的に考える時期となった。大学教員となって教壇に立つことを夢見ていたが、それと同時に海外で研究を行いたい希望も強く持つようになっていた。そこで 2 年前に会った Tukey 博士にメールを送り、ポスドクになりたいと伝えた。1 カ月経っても返信は無かったため、学会時に言われたことは社交辞令であったかと残念な気持ちでいたが、その後突然「OK」と非常に短いメールが送られてきた。後から聞いた話であるが、どうやら送ったメールはジャンクメールと判断されていたようであった。博士論文発表を終え、2008 年 9 月にアメリカへ飛び立った。

金沢大学における大学院時は主に薬物代謝という薬学的な視点で UGT の研究を行ったが、カリフォルニア大学では UGT の基質となる内因性物質の代謝に着目した研究を手掛けることになった。ここで簡単に留学時の研究内容を紹介させていただきたい<sup>2)</sup>。UGT 分子種の 1 つである UGT1A1 は神経毒性を有するビリルビンの主要な代謝酵素である。ヒ



## UGT1A1 protein

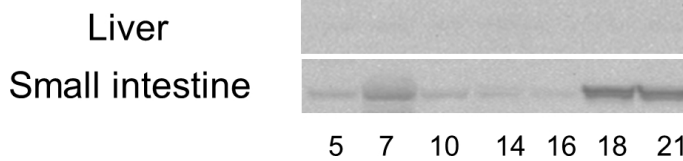


Fig. 1 ヒト化 *UGT1A1* マウスにおける血中ビリルビン値と *UGT1A1* 発現  
 野生型マウス (WT) の血清は透明であり、ビリルビン値は低値を示した。その一方で、ヒト化 *UGT1A1* (*hUGT1A1*) の血清はビリルビン特有の黄色を呈し、ビリルビン値は高値を示した。新生児ヒト化 *UGT1A1* マウスの肝臓には *UGT1A1* タンパクの発現はほとんど認められなかったが、小腸には高く発現していた。

トの新生児は血中ビリルビン値の上昇 (黄疸) が生理的に認められる。黄疸が重度の場合は血中に存在するビリルビンが脳へ到達し、核黄疸と呼ばれる脳障害を引き起こす。従って、ビリルビン値が高値を示す新生児は核黄疸の発症を予防する目的で、光線療法等の治療を受ける必要がある。古くより、ヒト新生児の生理的な黄疸は肝臓の *UGT1A1* によるビリルビン代謝能が低いために発症すると考えられていたが、これまでに実験的にそれを証明するデータは得られていなかった。同じ哺乳類のマウスやラットは新生児黄疸を発症しないことから、新生児期のビリルビン代謝には種差が存在すると考えられた。そこで、*Ugt1a1* を欠損するマウスとヒト *UGT1A1* トランスジェニックマウスを交配し、ヒト化 *UGT1A1* マウスを作製した。この *UGT1A1* 遺伝子のみヒト型となったヒト化 *UGT1A1* マウスは、ヒトと同様に新生児期のみ生理黄疸を発症した (Fig. 1)。生後 5~21 日のヒト化 *UGT1A1* マウスから組織を単離し *UGT1A1* タンパク発現を調べたところ、新生児期の肝臓には *UGT1A1* がほとんど発現していないことが明らかとなった。また興味深いことに、血中ビリルビン値の推移と小腸における *UGT1A1* 発現パターンが逆相関していることが明らかとなった。例えば、ビリルビン値が高い生後 14 日目は小

腸における *UGT1A1* 発現量は低く、ビリルビン値が低い生後 21 日目はその発現が高い傾向が認められた (Fig. 1)。この他にも、数種類の誘導剤で小腸特異的に *UGT1A1* を誘導すると、どれも血中ビリルビン値を減少させる結果となった。これらの結果から、肝臓における *UGT1A1* の発現不全が新生児黄疸の発症原因であり、また新生児期のビリルビン代謝は主に小腸 *UGT1A1* が担っていることが明らかとなった。

## 5. 北里大学薬学部に着任し、初めての講義と研究指導

2012 年 4 月より、伊藤智夫教授が主宰される北里大学薬学部薬剤学教室にて助教をさせていただいている (2015 年より講師)。これまでと大きく変わるの、大学で講義を受け持つことと、学生の研究を指導することである。まず、講義に対する取り組みを少し紹介したい。

初めての講義は生物薬剤学の薬物間相互作用についてであった。薬物による CYP の可逆的、不可逆的な阻害、酵素誘導、グレープフルーツジュースや喫煙による酵素阻害や誘導について説明した。非常に緊張した 75 分間であったが、残念なことに一番よく覚えているのは、居眠りしている学生が少し多



かったことである。せっかくわかり易いスライドや資料を準備したのに、と腹を立てる気持ちもあったが、筆者自身も学生の頃に居眠りした経験を持つため、その原因について考えた。講義後に回収したアンケートに隔々まで目を通し、学内の他の教員にも相談した。その結果、学生にとって講義内容が難しかったこと、また講義に工夫が必要であることがわかった。そこで、翌年の講義はよりわかり易く、講義スピードも遅く、配布資料も重要な部分は空欄にし学生に書かせるようにした。アンケート結果は概ね好評であった。その一方で、新しく取り入れたアクティブラーニングは空振りした。何度か講義中に学生に質問を投げかけたが、回答は得られなかったのである。自分が学生の立場だったら回答していただろうか？ おそらく、答えが正しいか自信を持つことができず、回答していなかったであろう。どのように工夫すれば学生が自信を持って講義中に発言できるか考えた結果、おそらく小グループで相談して導いた答えであればある程度自信を持てるだろうという発想に至った。そこで、今度は学生に質問を投げかけた際に、近くに座っている学生同士で話し合う時間を設けた。講義室を歩いて様子をうかがうと、みなよく考え、それぞれ答えを導いている様子であった。1、2分経った後に数人の学生に聞いてみると、面白いようにすぐに回答してくれた。現在もこのアクティブラーニングを取り入れて講義を行っている。アンケート結果を見る限り、学生も楽しんでいるようである。

教室に配属となる学生が多いことは私立大学の特徴であると思われる。いくつか新しい研究課題を考えていたがそれ以上に指導する学生が多かったため、次第に学生と一緒に研究課題を考えるようになった。ある学生が、スティーブンス・ジョンソン症候群について研究をしたいと言った。それまで筆者は薬物代謝酵素について研究を行っており、薬物代謝の主要な組織と言えば肝臓や小腸、腎臓等であった。一緒に文献を調べると、皮膚にも特定の薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが発現していることが明らかとなった。皮膚における薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現に個体差が認められる場合は、それが皮膚特異的な薬物や活性代謝物の蓄積に繋がり、スティーブンス・ジョンソン症候群を含む薬物性皮膚障害の原因となる可能性が考えられ

た。Solute carrier (SLC) トランスポーターや ATP binding cassette (ABC) トランスポーターの皮膚における発現を網羅的に調べた結果、薬物の輸送に関与するトランスポーターの多くは皮膚にも発現していること、またその発現量には著しい個体差が存在することが明らかとなった<sup>3)</sup>。さらに UGT1A1 も、知られていた肝臓、小腸、腎臓等の組織に加え、皮膚にも比較的高く発現しており、新生児期のビリルビン代謝に貢献していることが明らかとなった<sup>4)</sup>。

## 6. おわりに

以上、大学院における研究から始まった筆者のこれまでの研究生活を紹介させていただいた。日曜日にもかかわらず中島准教授が RNA の抽出を個別指導してくださったこと、横井教授が海外出張に出かけられる前夜にご自宅を訪問し論文の原稿を手渡したこと、Tukey 博士のご自宅で開催されたパーティーに何度も招待され、その都度おいしいサーモンをご馳走になったこと、また学部生や大学院生の頃、そして教員となってからも、伊藤教授にお忙しい中親身に相談に乗っていただいたこと等、紹介したいエピソードは他にもたくさんあったが、スペースの都合で本稿で紹介することができないのは非常に残念である。

現在も多くの大学院生、学部生らと研究を進めている。上記の皮膚の研究に加え、海馬や嗅球等の脳内における薬物代謝酵素や、UGT による甲状腺ホルモンの代謝、新規 non-CYP 酵素を調べる研究は、学生の発言がきっかけとなって始めたものである<sup>5)</sup>。学生に感謝すると同時に、今後も学生と協力し、医療の向上に貢献する研究成果を出せるよう尽力したい。十分な研究指導は学生の問題解決能力の育成に繋がり、彼ら彼女らが研究意識を持った社会人となることに期待したい。

最後に、研究に対し終始厳しく、そして温かくご指導していただきました、伊藤智夫教授、横井毅教授、中島美紀教授、Tukey 教授に深く感謝申し上げます。また、国内外の共同研究者の皆様、研究を共に進めてくれた大学院生、学部生の皆様に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) R. Fujiwara, M. Nakajima, H. Yamanaka, A. Nakamura, M. Katoh, S. Ikushiro, T. Sakaki, T. Yokoi, Effects of coexpression of UGT1A9 on enzymatic activities of human UGT1A isoforms, *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 747–757 (2007).
- 2) R. Fujiwara, N. Nguyen, S. Chen, R. H. Tukey, Developmental hyperbilirubinemia and CNS toxicity in mice humanized with the UDP glucuronosyltransferase 1 (UGT1) locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5024–5029 (2010).
- 3) R. Fujiwara, S. Takenaka, M. Hashimoto, T. Narawa, T. Itoh, Expression of human solute carrier family transporters in skin: possible contributor to drug-induced skin disorders, *Sci. Rep.*, **4**, 5251 (2014).
- 4) K. Sumida, M. Kawana, E. Kouno, T. Itoh, S. Takano, T. Narawa, R. H. Tukey, R. Fujiwara, Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 expression in skin and its induction by UVB in neonatal hyperbilirubinemia, *Mol. Pharmacol.*, **84**, 679–686 (2013).
- 5) Y. Kutsuno, R. Hirashima, M. Sakamoto, H. Ushikubo, H. Michimae, T. Itoh, R. H. Tukey, R. Fujiwara, Expression of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1) and glucuronidation activity toward endogenous substances in humanized UGT1 mouse brain, *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 1071–1076 (2015).