

Clarithromycin 代謝物の蛋白質合成阻害機作

懸 川 友 人・廣 瀬 聖 雄

千葉大学薬学部生化学研究室*

(平成元年6月29日受付・平成元年12月8日受理)

Clarithromycin (CAM) の主な代謝物である N-Demethyl 体 (M-1) および (14 R)-14-Hydroxy 体 (M-5) による蛋白質合成阻害の機作を検討し、次の結果を得た。

1) *Escherichia coli* の無細胞蛋白質合成に対する阻害の強さは、ポリアニデル酸依存のポリリジン合成および MS 2 フェージ RNA 依存のポリペプチド合成において CAM=M-5>M-1 の順であった。

2) 無細胞系を用いた MS 2 フェージ RNA 依存のコート蛋白質合成は M-5 \geq CAM>M-1 の順に阻害され、その阻害はいずれも N 末端から 2 番目と 3 番目のアミノ酸の取り込みにおいて認められた。

3) [¹⁴C] CAM と *E. coli* リボソームとの結合に対する影響を調べたところ、M-1 と M-5 は拮抗的に結合を阻害し、その強さは、CAM \geq M-5>M-1 の順であった。

4) ラット初代培養肝細胞の高分子合成に対する阻害の強さは、[³H] メチオニンの蛋白質画分への取り込みおよび [³H] チミジンの DNA 画分への取り込みにおいて CAM \geq M-1>M-5 の順であった。

1), 2) および 3) の結果から、これらの代謝物は CAM と同様の機作で蛋白質合成を阻害すると考えられた。さらに、4) の結果から、ラット等に大量の CAM を投与したときに現われる毒性が主として M-1 あるいは M-1 と CAM による可能性が示唆された。

Key words : Clarithromycin, 蛋白質合成阻害機作, 肝細胞毒性

Clarithromycin (CAM) は erythromycin A (EM) の 6 位の水酸基をメチル化した誘導体¹⁾、EM に比べて、経口投与した場合に胃酸による分解が少なく、血中や臓器中で高濃度を得易い²⁾。CAM を経口投与したラットおよびイヌの尿中³⁾またはヒトの尿中⁴⁾に 8 種の代謝物 (M-1 ~ M-8) が確認され、この中で N-Demethyl 体 (M-1) と (14 R)-14-Hydroxy 体 (M-5) は強い抗菌作用を有することが報告されている⁵⁾。著者らは、CAM による蛋白質合成阻害の機作を EM と比較検討し、原核細胞系無細胞ポリペプチド合成に対する阻害の程度が CAM と EM でほぼ等しく、また、両者が *Escherichia coli* リボソームの同一部位にほぼ等しい強さで結合すること、さらに、ラット初代培養肝細胞のミトコンドリア画分への移行性は CAM の方が EM に比べ大きいことを報告した⁶⁾。

今回は、CAM の代謝物のうちで強い抗菌作用をもち、ラットおよびイヌの主代謝物である M-1 およびヒトの主代謝物である M-5 について、CAM と比較しつつ、それらによる原核細胞系無細胞ポリペプチド合成に対する阻害

の強さ、MS 2 フェージ RNA 依存のコート蛋白質合成における N 末端からのアミノ酸の順位によるオリゴペプチドへの取り込みの阻害の違い、*E. coli* リボソームとの親和性およびラット初代培養肝細胞に与える影響を調べた。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

Escherichia coli Q 13, *E. coli* S 26 および *Bacillus subtilis* 168 M を用いた。

2. 使用薬剤等

Clarithromycin (CAM), [6-O-methyl-¹⁴C] CAM (比放射能 2.04 GBq/mmol) および CAM の各代謝物 [M-1 : N-demethyl CAM : M-2 : N,N-didemethyl CAM : M-4 : decladinosyl CAM : M-5 : (14 R)-14-hydroxy CAM] は大正製薬⁷⁾より供与された。L-[3, 4, 5 (n)-³H] リジン (4.37 TBq/mmol), L-[2, 3-³H] アラニン (2.18 TBq/mmol), [2,3-³H] セリン (1.85 TBq/mmol) および [6-³H] チミジン (920 GBq/mmol) は COMMISSA-

*千葉県千葉市弥生町 1-33

RIATA L'ENERGIE ATOMIQUE より購入した。L-[methyl- ^3H]メチオニン (3.07 TBq/mmol) および L-[4, 5- ^3H]ロイシン (5.77 TBq/mmol) はアマシャム・ジャパン(株)より購入した。ポリアデニル酸はヤマサ醤油(株)より、ビルビン酸キナーゼはペーリンガー・マンハイム山之内(株)より購入した。その他の薬品はナカライテスク(株)より購入した。

3. *E. coli* および *B. subtilis* リボソーム, *E. coli* 100,000×g 上清蛋白質および *E. coli* tRNA の調製

E. coli および *B. subtilis* リボソームおよび *E. coli* 100,000×g 上清蛋白質は IGARASHI の方法⁷⁾に従って調製した。*E. coli* tRNA は *E. coli* 抽出液の 100,000×g 上清より ZUBAY の方法⁸⁾に従ってフェノール抽出して調製した。

4. MS2 ファージ RNA の調製

無細胞ポリペプチド合成においてナチュラル mRNA として用いた MS2 ファージ RNA は, *E. coli* S26 に感染増殖させた後に塩化セシウム平衡密度勾配法で分離したファージ粒子からフェノール抽出⁹⁾により調製した。

5. 無細胞実験系によるポリペプチド合成

1) ポリリジン合成は, 反応液 (0.05 ml) 中に 50 mM ヘベス/KOH (pH 7.6), 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM ジチオスレイトール, 1.5 mM ATP, 0.5 mM GTP, 2 mM ホスホエノールビルビン酸, 2.5 μg のビルビン酸キナーゼ, 30 μg の *E. coli* tRNA, 20 μg のポリアデニル酸, 10 μg [^3H]リジン (37 GBq/mmol), 0.17 A₂₀₀ユニットの *E. coli* または *B. subtilis* リボソームおよび 80 μg の *E. coli* 100,000×g 上清蛋白質を含むように調製し, 30°C において 15 分間反応を行なった。反応液の 0.04 ml をろ紙 (Whatman 3 MM, 直径 2.5 cm) 上に移し, 90°C で 30 分間飽和タングステン酸-5%トリクロロ酢酸 (ろ紙一枚当たり 10 ml) 中で加熱した。ろ紙をエタノール:エーテル (1:1) およびエーテルで洗浄した後, ろ紙上に残った不溶性の放射活性を 10 ml のトルエン系シンチレーター (0.6%ジフェニルオキサゾール/トルエン) 中で Beckman LS-5800 液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

2) MS2 ファージ RNA 依存のポリペプチド合成は, 5-1) の反応液からポリアデニル酸および [^3H]リジンを除き, 代わりに 10 μg の MS2 ファージ RNA, ロイシン以外の 19 種類の蛋白質構成アミノ酸 (各 30 μM) および 3 μM [^3H]ロイシン (122 GBq/mmol) を反応液に加え, さらに, 酢酸マグ

ネシウムの濃度を 6 mM として反応を行なった。反応液の 0.04 ml を 5-1) と同様にろ紙上に移し, 飽和タングステン酸-5%トリクロロ酢酸の代わりに 5%トリクロロ酢酸を用いて以下 5-1) と同様に放射活性を測定した。

3) MS2 ファージのコート蛋白質の開始から 3 番目のアミノ酸までのペプチド合成は, 5-2) の 5 倍量の反応液中に Table 1 に記した ^3H -アミノ酸 (3 μM , 370 GBq/mmol) および非放射性アミノ酸 (各 30 μM) を含むように調製して反応を行なった後, その 0.2 ml を 10~30%のショ糖密度勾配遠心分離法により分離した。モノソーム画分をニトロセルロースフィルターでろ過し, リボソームと共にフィルターに吸着した放射活性を 5-1) と同様に液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

6. *E. coli* リボソームと [^{14}C]CAM の結合度の測定
反応液 (0.25 ml) 中に 50 mM トリス/塩酸 (pH 7.5), 10 mM 酢酸マグネシウム, 100 mM 塩化アンモニウム, 1 mg *E. coli* Q13 リボソーム, [6-0-methyl- ^{14}C]CAM (1.17 KBq/ml) および Fig. 3 に記した濃度の CAM または代謝物を含むように調製し, 30°C で 5 分間加熱した後, 4°C における [^{14}C]CAM と *E. coli* リボソームの結合量を Bio-Gel P-10 カラムを用いた平衡ゲルろ過法¹⁰⁾により測定した。

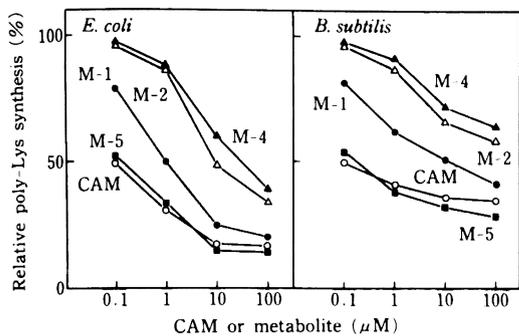
7. 使用動物および肝細胞の初代培養

高杉実験動物(株)より入手した Wistar 系雄ラット (160~180 g) より肝細胞を SEIGLEN の方法¹¹⁾に従い分離し, WILLIAM'S medium E 中で初代培養を行なった。肝細胞が培養フラスコに着床 (6 時間) 後培養液を除き, 新たな培養液に終濃度 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で CAM, M-1 あるいは M-5 を添加して培養を行なった。対照として終濃度 0.1%のエタノールを添加した。CAM 等の添加 0, 6, 12 および 18 時間後に 400 KBq の [^3H]メチニオンあるいは [^3H]チミジンを添加し 2 時間標識した。培養細胞をコラゲナーゼを用いて集めた後分離し, 蛋白質画分への [^3H]メチニオンの取り込みおよび蛋白質量ならびに DNA 画分への [^3H]チミジンの取り込みおよび DNA 量を測定した¹²⁾。

II. 実験結果

1. 無細胞ポリペプチド合成に対する阻害効果

E. coli の無細胞実験系によるポリリジン合成に対する CAM とその代謝物の阻害の強さは, 0.1~10 μM の範囲において CAM=M-5>M-1>M-2 \geq M-4 の順であった (Fig. 1-A)。リボソームを *B. subtilis* から調製したものに代えても, CAM とその代謝物による阻害の強さの順序は変わらなかった



E. coli: *Escherichia coli*, *B. subtilis*: *Bacillus subtilis*

Fig. 1. Effect of clarithromycin and its metabolites on polylysine synthesis with *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* ribosomes

CAM: clarithromycin, M-1: N-demethyl CAM, M-2: N,N-didemethyl CAM, M-4: decladinosyl CAM, M-5: (14R)-14-hydroxy CAM.

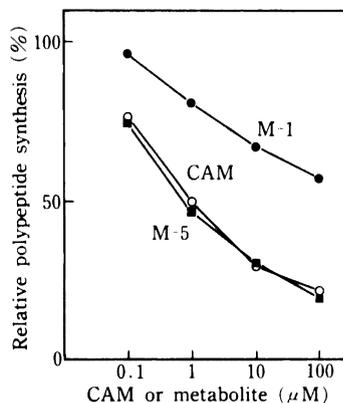


Fig. 2. Effect of clarithromycin, N-demethyl clarithromycin, and (14R)-14-hydroxy clarithromycin on MS2 phage ribonucleic acid-directed polypeptide synthesis in an *Escherichia coli* cell-free system

CAM: clarithromycin, M-1: N-demethyl CAM, M-5: (14R)-14-hydroxy CAM

Table 1. The relation between the ranking of amino acids from the N-terminal and the inhibition of their incorporation into a peptide chain by clarithromycin, N-demethyl clarithromycin and (14R)-14-hydroxy clarithromycin in MS2 phage ribonucleic acid-directed oligopeptide synthesis

fMet and oligopeptide	³ H-Amino acid incorporation in the absence of CAM and metabolites (pmol)	Relative ³ H-amino acid incorporation in the presence of CAM or metabolites (%)		
		CAM*	M-1	M-5
f[³ H] Met	6.28	91.8	92.0	90.5
fMet-[³ H] Ala	4.41	56.9	72.2	52.3
fMet-Ala-[³ H] Ser	2.42	47.5	66.3	43.9

* CAM: clarithromycin, M-1: N-demethyl clarithromycin, M-5: (14R)-14-hydroxy clarithromycin

(Fig. 1-B)。さらに、MS2 ファージ RNA 依存のポリペプチド合成に対する CAM とその代謝物による阻害効果を調べたところ、阻害効果は CAM=M-5>M-1 の順であった (Fig. 2)。

2. ポリペプチド合成におけるアミノ酸の N 末端からの順位と取り込み阻害率の比較

MS2 ファージ RNA 依存のポリペプチド合成を行なうと主としてコート蛋白質が合成されることを利用して、ポリペプチド合成における N 末端からのアミノ酸の順位と取り込みの阻害率に CAM, M-1 および M-5 によって違いがみられるか否かを調べた。その結果、CAM, M-1 および M-5 のすべてにおいて、

コート蛋白質の N 末端から 2 番目と 3 番目のアミノ酸の取り込みが阻害され、その阻害の強さは M-5 ≥ CAM > M-1 の順であった (Table 1)。

3. *E. coli* リボソームと [¹⁴C] CAM の結合に対する影響

[¹⁴C] CAM と *E. coli* リボソームの結合に対する M-1 および M-5 の影響を検討した。対照としては非放射性的 CAM を用いた。非放射性 CAM, M-1 および M-5 を 0.2 μM で添加すると、[¹⁴C] CAM (0.2 μM) の結合量がそれぞれおよそ 50, 75, および 50% に減少した (Fig. 3)。さらに、M-1 あるいは M-5 による [¹⁴C] CAM と *E. coli* リボソームの結

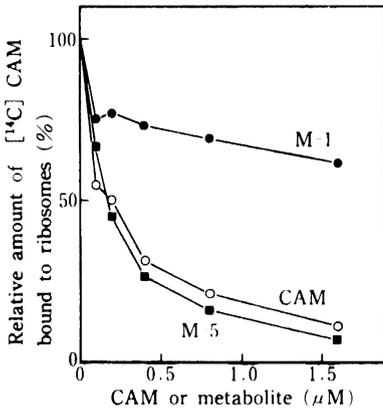


Fig. 3. Effect of clarithromycin, N-demethyl clarithromycin, and (14 R)-14-hydroxy clarithromycin on binding of [6-O-methyl-¹⁴C] clarithromycin to *E. coli* ribosomes
CAM: clarithromycin, M-1: N-demethyl CAM, M-5: (14 R)-14-hydroxy CAM

合の阻害形式を M-1 あるいは M-5 と [¹⁴C] CAM の濃度を変えて得た値の両逆数プロットにより調べた結果、M-1 および M-5 は [¹⁴C] CAM と *E. coli* リボソームの結合を拮抗阻害することが解った (Fig. 4)。

4. ラット初代培養肝細胞への影響

ラット肝細胞を CAM, M-1 あるいは M-5 存在下 (150 μg/ml) および非存在下に初代培養し、さらに、Fig. 5 に示した時間に [³H] メチオニンあるいは [³H] チミジンを用いて 2 時間標識した細胞を分画した後、蛋白質量、DNA 量および各画分への放射活性の取り込み量に対するそれらの影響を調べた。CAM, M-1 あるいは M-5 と同時 (0 時間) に [³H] メチ

オニンを培地に添加した場合の蛋白質画分への放射活性の取り込み量は、対照に比べ培養面積当たりそれぞれおよそ 25, 20 および 50% に減少した (Fig. 5-A)。このとき、蛋白質画分の蛋白質量は培養面積あたり CAM, M-1 の添加で対照のおよそ 50% に、M-5 の添加で 75% に減少した (Fig. 5-C)。対照の蛋白質画分への放射活性取り込み量は培養 18 時間まで増加したのに対し、CAM および M-1 存在下の蛋白質画分への放射活性取り込み量は、培養 12 時間から減少し培養 18 時間では培養 0 時間と比べおよそ半減した (Fig. 5-A)。一方、M-5 存在下の蛋白質画分への放射活性取り込み量は培養 12 時間で対照のおよそ 75% まで増加し、培養 18 時間では培養 0 時間のおよそ 120% であった。また、CAM あるいは M-1 存在下に培養した細胞の蛋白質量は培養 6~8 時間わずかに増加が見られたが、培養 18 時間ではどちらも培養 0 時間とほぼ同量であった、これに対し M-5 存在下に培養した細胞の蛋白質量は培養 0~6 時間で対照の 75% であり、培養 12 時間から対照とほぼ同等であった (Fig. 5-C)。CAM, M-1 あるいは M-5 と同時に [³H] チミジンを培地に添加した細胞の DNA 画分への放射活性取り込み量は培養面積当たりそれぞれおよそ対照の 30, 25 あるいは 50% に減少した (Fig. 5-B)。さらに、CAM および M-1 存在下での DNA 画分への放射活性取り込み量は、どちらも培養 18 時間まで変化は認められず (Fig. 5-B)、DNA 量はいずれも対照のほぼ 50% であった (Fig. 5-D)。M-5 存在下での DNA 画分への放射活性取り込み量は培養時間と共に増加し、培養 18 時間で対照のおよそ 85% であり (Fig. 5-B)、また、DNA 量は培養 0 時間では対照の 75% であったが培養 6 時間

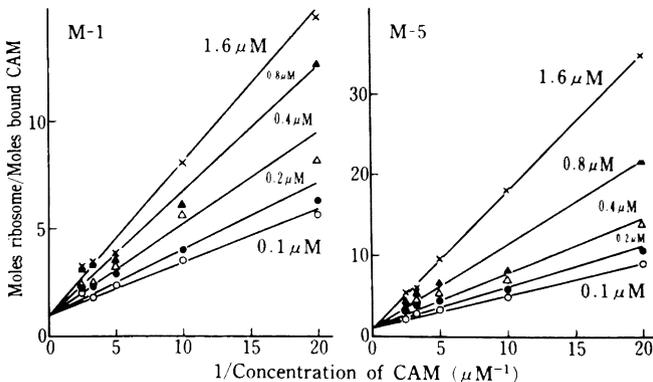


Fig. 4. Double reciprocal plot of binding of clarithromycin to ribosomes in the presence of N-demethyl clarithromycin or (14 R)-14-hydroxy clarithromycin
CAM: clarithromycin, M-1: N-demethyl CAM, M-5: (14 R)-14-hydroxy CAM

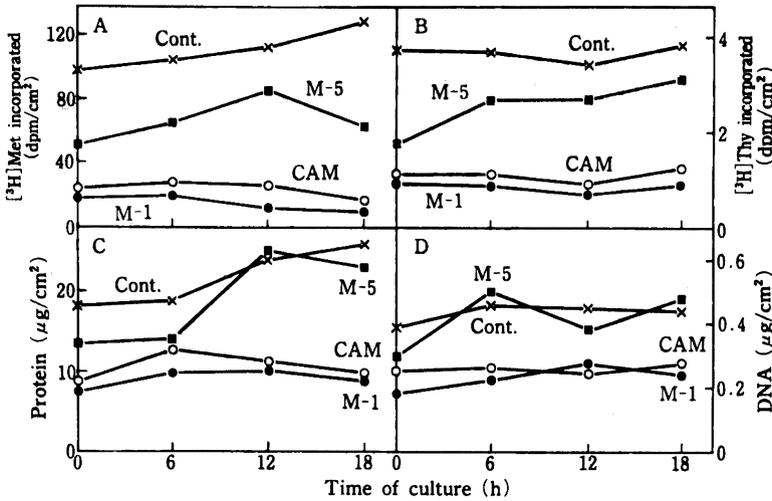


Fig. 5. Effect of clarithromycin, N-demethyl clarithromycin and (14R)-14-hydroxy clarithromycin on incorporation of [³H] methionine and [³H] thymidine into acid-insoluble fractions and on protein and DNA contents of primary cultured rat hepatocytes

Rat hepatocytes were primary cultured in the absence or presence of CAM: clarithromycin, M-1: N-demethyl CAM, and M-5: (14R)-14-hydroxy CAM. [³H] Methionine (400 KBq; 747 MBq/mmol) (A) or [³H] thymidine (400 KBq; 925 GBq/mmol) (B) was added to 15 ml of culture medium at 0, 6, 12, or 18 h after the hepatocytes adhered to the culture dishes (75 cm²) and the incorporation of radioactivity into protein and DNA fractions during the next 2 h and protein (C) and DNA (D) contents were measured

CAM: clarithromycin, M-1: N-demethyl CAM, M-5: (14R)-14-hydroxy CAM

からほぼ対照と同等であった (Fig. 5-D)。以上のことから、高濃度の CAM によるラット初代培養肝細胞への毒作用の発現は M-1 あるいは M-1 と CAM による可能性が示唆された。

III. 考 察

E. coli の無細胞系ポリペプチド合成および *B. subtilis* リボソームを用いたポリリジン合成に対する阻害の強さ、MS2 フェージ RNA 依存のコート蛋白質合成におけるアミノ酸の順位と取り込み阻害率および [¹⁴C] CAM と *E. coli* リボソームの結合に対する阻害率は、CAM と M-5 はほぼ等しく、M-1 はこの2つに比べて作用が弱かった。以上の結果は長手ら⁹⁾による CAM の代謝物の抗菌スペクトルにおける CAM, M-1 および M-5 の抗菌力の順位とよく一致した。以上のことから、CAM, M-1 および M-5 の蛋白質合成阻害の機構は同一であると考えられた。一方、ラット初代培養肝細胞の蛋白質合成および DNA の修復を阻害する程度が、ラットおよびイヌの主代謝

物である M-1 と CAM とで同程度であったのに対して、ヒトの主代謝物である M-5 による影響は CAM より小さかったことから、M-5 はラットで肝毒性が低いと思われる。著者らは前報⁹⁾で、培養液への [¹⁴C] CAM 添加後のラット初代培養肝細胞ミトコンドリア画分への放射能の移行が [¹⁴C] EM 添加の場合のおよそ 3.5 倍であったことを報告した。また、CAM をラットに投与するとそのおよそ 3 分の 1 が未変化のまま、2 分の 1 が M-1 に代謝された後に排泄されることが知られている⁹⁾。今回、M-5 存在下での培養面積当たりの DNA 量が培養 6 時間では対照のレベルまで回復したことから、M-5 がさらに代謝されたと予想され、M-5 はラット肝細胞内で不安定なため M-1 がラットの主代謝物になると考えられる。したがって、過量の CAM をラット初代培養の肝細胞の培地中に添加した場合には、CAM ばかりでなく M-1 に代謝されてからミトコンドリアに移行してその蛋白質合成に影響を与える可能性が考えられた。ある

いは、M-5はM-1やCAMに比べてミトコンドリアへの移行性が小さいか、またはM-5がミトコンドリアにおける蛋白質合成を阻害しにくい可能性が考えられ、これらの点については今後検討する予定である。

謝 辞

当研究室大学院生、松本隆之君ならびに安倍浩昭君による本研究への協力に対し感謝します。また、本実験に使用したCAM、CAMの代謝物、および ^{14}C CAMを供与いただいた大正製薬株式会社に感謝いたします。

文 献

- 1) MORIMOTO S, TAKAHASHI Y, WATANABE Y, OMURA S: Chemical modification of erythromycins I. Synthesis and antibacterial activity of 6-O-methyl-erythromycins A. I. *Antibiot.* 37: 187 ~ 189, 1984
- 2) 諏訪俊男, 河野喜郎, 吉田英生, 福島清実: TE-031の体内動態 (第2報)。ラットにおけるN-methyl- ^{14}C 標識体を用いたTE-031とエリスロマイシンの比較。 *Chemotherapy* 36 (S-3): 205 ~ 212, 1988
- 3) 諏訪俊男, 吉田英生, 吉富幸代, 亀井慶子: TE-031の体内動態 (第4報)。ラットおよびイヌにおける ^{14}C -TE-031の代謝。 *Chemotherapy* 36 (S-3): 227 ~ 237, 1988
- 4) 安達 孝, 森本繁夫, 渡辺慶昭, 曾田 馨: TE-031のヒト尿中代謝物の単離同定。 *Chemotherapy* 36 (S-3): 264 ~ 273, 1988
- 5) 長手尊俊, 小野武夫, 杉田和彦, 明石 敏, 森川悦子, 宮崎真奈美, 竹市千恵, 大村貞文: TE-031の主要代謝物M-5の抗菌作用について。 *Chemotherapy* 36 (S-3): 156 ~ 169, 1988
- 6) 懸川友人, 小川達洋, 廣瀬聖雄: TE-031の蛋白質合成阻害機作。 *Chemotherapy* 36 (S-3): 123 ~ 128, 1988
- 7) IGARASHI K, KAKEGAWA T, HIROSE S: Stabilization of 30S ribosomal subunits of *Bacillus subtilis* W 168 by spermidine and magnesium ions. *Biochim. Biophys. Acta* 697: 185 ~ 192, 1982
- 8) ZUBAY G: Isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid (S-RNA). I. *Mol. Biol.* 4: 347 ~ 356, 1962
- 9) WATANABE Y, IGARASHI K, HIROSE S: Differential stimulation by polyamines of phage RNA-directed synthesis of protein. *Biochem. Biophys. Acta* 656: 134 ~ 139, 1981
- 10) IGARASHI K, SAKAMATO I, GOTO N, KASHIWAGI K, HONMA R, HIROSE S: Interaction between polyamines and nucleic acids or phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 219: 438 ~ 443, 1982
- 11) SEGLE P O: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology.* 13: 29 ~ 83, 1976
- 12) SEYFORD C E, MORRIS D R: Methods for the study of the physiological effect of inhibitors of polyamine biosynthesis in mitogen-activated lymphocytes. *Methods in Enzymol.* 94: 373 ~ 389, 1983

MODE OF INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS BY
METABOLITES OF CLARITHROMYCIN

TOMOHITO KAKEGAWA and SEIYU HIROSE

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Chiba, Japan

We studied the mode of inhibition of protein synthesis by two major metabolites of clarithromycin (CAM), N-Demethyl CAM (M-1) and (14 R)-14-Hydroxy CAM (M-5). The results are summarized as follows:

1. The degree of inhibition of *Escherichia coli* cell-free polypeptide synthesis by CAM and its metabolites was in the order $CAM = M-5 > M-1$ in both polyadenylate and MS 2 phage RNA-directed polypeptide synthesis.

2. The degree of inhibition of MS 2 phage RNA-directed cell-free synthesis of coat protein was in the order $M-5 \geq CAM > M-1$. They all inhibited the incorporation of the second and third amino acids after the initiation of polypeptide synthesis.

3. Cold CAM and its metabolites competitively inhibited the binding of [^{14}C] CAM to *E. coli* ribosomes in the order $CAM \geq M-5 > M-1$.

4. The degree of inhibition of the incorporation of [3H] methionine and [3H] thymidine into the protein and DNA fraction of primary cultured rat hepatocytes was in the order $CAM \geq M-1 > M-5$.

Our results (1, 2, and 3) demonstrate that these metabolites inhibit polypeptide synthesis by the same mode of action as that of CAM. They also suggest (4) that the toxicity of CAM administered in extremely high doses to rats could be caused by M-1 or by CAM and M-1.