

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月18日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590050

研究課題名（和文） 薬物代謝酵素シトクロム P450 による代謝物の予測法に関する研究

研究課題名（英文） A study on the method of prediction of metabolites produced by cytochrome P450

研究代表者

畑 晶之（HATA MASAYUKI）

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：50241972

研究成果の概要（和文）：シトクロム P450（CYP）による代謝物の簡便な予測法の開発を目指し、本課題では、その基礎理論を構築するための研究を行った。代謝物既知の化合物をコンピュータ上で CYP にドッキングさせ、反応に必要な活性化エネルギーを量子化学的に求めることで代謝物を予測する。それを、実験で得られた代謝物と比較し、予測の当否や方法論の検討に生かした。その結果、一部の医薬分子については、代謝物の理論的な予測を可能とする結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Aiming at development of the simple and easy method for the prediction of the metabolite by cytochrome P450(CYP), a study for the establishment of basic theory was performed. Metabolites were predicted by docking known compounds with CYP in silico and by estimating activation energies for metabolism by means of quantum chemistry. The theoretical prediction was examined the right or wrong by comparing it with experimental results. As a result, metabolites originated in some pharmaceuticals were able to predict theoretically.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：物理化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：シトクロム P450、薬物代謝、ドッキングスタディ、酵素-薬物複合体、密度汎関数法、ONIOM法、酸化反応、活性化エネルギー

## 1. 研究開始当初の背景

CYPは薬物代謝酵素ともよばれ、多くの医薬品の代謝に関与する酵素である。医薬品の

薬効、毒性を規定する一要因となっており、医薬品の適正使用や新規医薬品の開発において避けて通れない酵素である。今日までにCYPには多数の種類があることがわかっており、一部については三次元構造も解明されている。21世紀に入り、ヒト由来CYPの三次元構造が次々と明らかにされ、医薬品開発を念頭に置いた構造生物学的な研究を行うための基盤ができつつある。

研究代表者らはこれまで、理論計算によりCYPの作用機序の解明を精力的に行い、その成果を多くの学会で発表し、また、Journal of the American Chemical Societyなどの学術雑誌に投稿し、掲載を認められた。CYPが反応を起こすためには基質だけでなく、酸素分子、2電子還元、2個のプロトンが必要であることがわかっているものの、基質に酸素原子が添加されるメカニズムの詳細は、反応が極めて短時間で進行するため、確定的な結論が得られていない。基質に酸素原子を供給する活性種（最終活性種）として compound I が広く受け入れられている。compound I を経由する反応メカニズムの解明に取り組み、基質に酸素原子が添加される反応は四段階素反応により進行することを明らかにした。また、酵素活性部位内で基質と酸素分子が相互作用している状態につき理論計算を行った結果、compound I とは異なる別の最終活性種の存在が示唆された。この最終活性種は一重項酸素原子を有するため、C-H 結合に酸素原子を挿入すること、さらにCYPの一種であるP450camでは $\alpha$ カンファーの5位炭素の特異的水酸化を説明できる。

研究代表者の他に、国内外の複数のグループがCYPの作用機構を理論計算により求めており、基質への酸素原子添加メカニズムの理論的予測はほぼできているものと思われる。ただし、単なる酸化装置としての観点からのものが多い。

そこで、研究代表者らは、薬物代謝の観点から作用機構の解明を理論計算により行い、その成果を学会や学術雑誌に発表した。CYPにより代謝される薬物が内因性ステロイドと活性部位内で共存し、代謝プロファイルに影響を及ぼすことを理論計算により証明した。また、抗てんかん薬カルバマゼピンはCYP3A4により10-11位二重結合のエポキシ化のみを受けるとされているが、エポキシ化体は水酸化体に比べエネルギーが高い。その理由を理論計算により求めた結果、エポキシ化体生成の活性化エネルギーが水酸化体のそれに比べ低いことを選択性が生じ、エポキシ化体のみが生成されることを明らかにした。以上のことは、CYPの活性部位構造と医薬分子立体構造の関係、および反応部位の酸化されやすさが薬物代謝に重要であることを示している。この2点がわかれば、新規医薬分子の

被酸化部位の予測が十分可能であると考えた。本研究はこれまでの成果を生かし、CYPについての理解をさらに深める研究である。

## 2. 研究の目的

本研究は、CYP（特にCYP3A4）による代謝部位が既知の化合物を用い、代謝物予測法の基礎理論確立を目的としている。CYP3A4は現在臨床使用され、CYPで代謝される医薬品の半数以上の代謝に関与するといわれており、非常に重要な酵素である。

最初は代謝物予測法の基礎の基礎として、取り扱いが比較的容易な2つの基質を用い、予測に取り組む。次いで、大型の分子や、鎖状化合物など、構造のフレキシビリティが高く、予測が難しいと思われる分子を中心に行えるだけ多くの基質について取り組む。そして、結果を総括し、1種類（場合によっては複数通り）の予測法をまとめ上げる予定である。

## 3. 研究の方法

### (1)CYPによる代謝物予測法の基礎の基礎

本研究で用いるCYPは、多くの医薬品代謝に関与するとされているCYP3A4である。CYP3A4はX線結晶解析により既に明らかとなっており、Protein Data Bankから利用可能である。基質として、ここでは抗エイズ薬であるネビラピンと内因性ステロイドの一種であるアンドロステンジオンを使用する。両者とも酸化部位が既知であり、かつ、比較的小型の基質で環構造を持つため構造のフレキシビリティが低く、取り扱いが容易である。また、両者とも、代謝実験の対象として用いられている化合物であり、実験データの蓄積が豊富であるという利点もある。

#### ① CYP3A4への基質のドッキング

CYPによる薬物酸化機構は、

(i)薬物の結合によるヘム鉄のスピン状態変化

(ii)一電子還元

(iii)酸素分子の取り込み

(iv)一電子還元

(v)薬物への酸素原子添加反応

(vi)酸化薬物が活性中心から脱離し、初期状態へ戻る

の順で進行するとされているが、本研究では(v)に焦点を当てる。(v)において、添加される前の酸素原子は活性中心のヘム第六配位座に存在しており、薬物（基質）はその酸素原子の近傍に存在している。まず、そのような

酵素-薬物複合体構造をドッキングスタディによりコンピュータ上で構築する。CYP3A4の活性部位は非常に広いため、複数通りの配置が理論上では可能であり、それらは順位付けられた形で結果として得られる。実際の代謝物から予測される配置のみならず、他の可能な配置を全て汲み上げ、候補配置とする。配置に若干の問題がある場合は、分子力場計算によるエネルギー極小化や分子動力学計算によるシミュレーションを行い、複合体構造を精製する。

## ② 量子化学計算による酸素原子添加反応の検討

①で得られた各候補配置につき、活性部位近傍のアミノ酸残基、ヘムおよび基質を抜き出し、薬物酸化反応をよく表現できるモデルを組み立てる。次にこれらのモデル反応系(小モデル)を用い、薬物酸化反応機構を密度汎関数法による量子化学計算により求める。反応に必要な活性化エネルギー、反応が起こるために必要な原子構造の変化、反応後に得られる安定構造を求める。

これまでの研究により、CYPによる薬物酸化反応は大きく分けると、

(1)ヘム第六配位座の酸素原子による基質からの水素原子引き抜き反応あるいは、その酸素原子が基質の被酸化部位に結合する反応による基質ラジカルの生成

(2)基質ラジカルとその酸素原子との再結合による酸化基質の生成

の2段階反応であることがわかっている。このうち、反応の律速段階は(1)であるため、各候補配置につき、(1)における反応の活性化エネルギーがわかれば、その値の大小から酸化反応の起こりやすさが比較でき、それが代謝物の予測につながることになる。したがって、最初の反応のみを理論計算により求める。また、得られた結果を酵素全体のモデルに組み込み(大モデル)、ONIOM法によるQM/MM計算においても、反応(1)の活性化エネルギーを求める。

小モデルの場合、大モデルの場合それぞれにつき、各候補配置から生じる反応(1)の活性化エネルギー値を比較し、基質のどの部分が酸化反応を受けやすいかを明らかにする。つまり、理論計算により予測された主代謝物が得られることになる。小モデルと大モデルで結果が異なった場合、大モデルの方を優先する。

理論計算により得られた代謝物と実験でわかっている代謝物を比較し、予測法の当否を判断する。合わない場合には計算の精度を上下させるなどして、方法の調整を行う。

## (2)CYPによる代謝物予測法の基礎

(1)で固めた予測法を他の基質にも適用し、改良する。特に、鎖状の主鎖や側鎖を持つ化合物(HIV-1プロテアーゼ阻害剤やHMG-CoA還元酵素阻害剤など)は構造のフレキシビリティが大きく、予測が難しいものと思われる。また、CYP3A4による代謝物が既知の化合物の情報を取得し、できるだけ多くの基質について試す。

### ① 予測法の総括

できるだけ多くの基質について予測を行い、改良を重ねながら、方法を一般化できるような形に持っていく。一般化できない場合は、基質の傾向に応じ、方法を数種類に収束できるようにする。このようにして、代謝物の予測法をまとめる。

## 4. 研究成果

### (1)CYPによる代謝物予測法の基礎の基礎

#### ① CYP3A4への基質のドッキング

CYP3A4はX線結晶解析により既に明らかとなっており、Protein Data Bank (PDB)には8種類のデータが登録されている。これらは基質の結合の有無や結合している基質の種類などが異なっており、そのため、活性部位の大きさも異なっている。基質として抗エイズ薬であるネビラピンと内因性ステロイドの一種であるアンドロステンジオンを使用し、これら8種類の酵素構造に対し(元々基質が結合しているものについてはそれを取り除いて)ドッキングスタディにより酵素-薬物複合体構造の構築を試みたところ、両基質につき十分な数の複合体構造が得られたものは1種類(PDB ID:2HI4)のみであった。得られた複合体構造を精査し、ネビラピンについては4か所、アンドロステンジオンについては7か所の酸素原子添加部位が考えられ、それぞれを候補配置とした。

#### ② 量子化学計算による酸素原子添加反応の検討

各候補配置につき、酸素原子添加反応をよく表現できるモデルを組み立て、その反応機構を密度汎関数法により求めた。反応が起こるために必要な原子構造の変化から活性化エネルギーを算出し比較したところ、アンドロステンジオンについては実験で得られる代謝物に基づく酸素原子添加部位は、そうでないものに比べ、その値が小さくなった。また、酵素全体のモデル(大モデル)を用い、ONIOM法によるQM/MM計算により、代謝物の予測を試みたところ、両者とも、小モデルのときと同様の結果が得られた。

以上の結果は理論計算により、シトクロム

P450 による代謝物の予測が可能であることを示しており、他の薬物での代謝物予測につながる結果であるといえる。

## (2) CYP による代謝物予測法の基礎

CYPによる代謝物予測法の基礎をさらに発展させることを目標とし、モデル反応系（小モデル）と酵素全体のモデル（大モデル）の両方につき、それぞれ密度汎関数法、ONIOM法によるQM/MM計算を用いて代謝物の予測を試みた。(1)と同様、ドッキングスタディによって求められた各候補配置から生じる反応の活性化エネルギー値を量子化学計算により比較し、基質のどの部分が酸化反応を受けやすいかを明らかにするという方法で行った。基質として、HMG-CoA還元酵素阻害剤（アトルバスタチン）、HIV-1プロテアーゼ阻害薬（ネルフィナビル、リトナビル）や精神疾患の薬（カルバマゼピン、トリアゾラム）を検討したところ、精神疾患の薬については理論的予測が可能なる結果を得ることができた。

### ① 予測法の総括

良い結果が得られた薬は比較的、小型の分子であり、いくつかの配置を容易に取ることができた。そして、この医薬分子について、実験で得られる代謝物に基づく酸素原子添加部位は、そうでないものに比べ、反応の活性化エネルギー値が小さくなった。つまり、これは、CYP3A4による代謝物を理論的に予測することができたという結果である。

これまでの結果と併せ、一部の医薬分子についてはドッキングスタディとそれに続く量子化学計算により、シトクロムP450による代謝物の予測が可能となったが、予測できる範囲は非常に狭く、これを広げていくことが今後の課題である。

この研究が進展すれば、新規医薬品など、代謝経路が未知の化合物について、代謝物の構造予測が可能となり、医薬品開発において不可欠な有効性、安全性の考察、それに続くコストダウン、効率化に寄与する。また、遺伝子多型などで生じた変異CYPに適用すれば個人レベルでの代謝の程度が予測でき、オーダーメイド医療にも寄与する。そして、この研究で用いる手法は理論計算であるため、どのような化合物においても適用可能である。単に「CYPによる薬物代謝」に限らず、他の酵素による薬物代謝、さらには薬物代謝以外の酵素作用（例えば薬剤耐性）や受容体タンパク質の作用にも応用でき、応用範囲が広い。このように、可能性のある研究であるため、今後も発展させていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

①Hitomi Yuki, Teruki Honma, Masayuki Hata, Tyuji Hoshino, Prediction of sites of metabolism in a substrate molecule, instanced by carbamazepine oxidation by CYP3A4, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 20, 775-783, 2012, 査読有, doi:10.1016/j.bmc.2011.12.004

〔学会発表〕（計4件）

①畑 晶之、友永祥代、シトクロムP450による一酸素原子添加反応における酸素活性化機構、日本薬学会第133年会、2013年3月29日、横浜

②畑 晶之、石井伊都子、CYP3A4が触媒するカルバマゼピン酸化反応について、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、札幌

③畑 晶之、石井伊都子、Monooxygenation Mechanism of Carbamazepine by CYP3A4、第21回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2011年5月30日、千葉

④畑 晶之、石井伊都子、CYP3A4が触媒するカルバマゼピン酸化反応機構、日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畑 晶之 (HATA MASAYUKI)  
松山大学・薬学部・准教授  
研究者番号：50241972