

平成21年 6月20日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590137  
 研究課題名（和文） シトクロムP450 3A4の薬物酸化部位選択性に関する研究  
 研究課題名（英文） Research of Site Selectivity for Substrate Oxidation Catalyzed by CYP3A4  
 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：シトクロム P450 (CYP) は薬物を代謝する酵素として生体内で機能する。その一種、CYP3A4 は、抗てんかん薬カルバマゼピン (CBZ) に対し、通常の水酸化反応ではなく、エポキシ化反応を触媒する。この理由を解明するため、理論計算により、反応機構および酵素-基質複合体の生体内条件下における時間変化を求めたところ、CYP3A4 の反応活性部位構造と医薬分子立体構造の関係、および基質の被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唆する結果が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：物理化学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：CYP3A4、密度汎関数法、分子動力学計算、カルバマゼピン、エポキシ化反応、水酸化反応、活性化エネルギー、活性部位

## 1. 研究開始当初の背景

シトクロムP450 (CYP) は動物、植物、細菌を含め広く自然界に分布し、代謝において非常に重要な役割を果たしている酵素である。この酵素は多くの芳香族および脂肪族の基質に対し酸化（水酸化）を行うことで代謝に寄与する。CYPは多くの医薬品も代謝し、医薬品の効果、毒性を規定する一要因となるため、医薬品の適正使用や新規医薬品の開発

においても欠かせない酵素である。CYPによる代謝物を調べてみると、CYPにより酸化を受ける部位は基質によりほぼ一定であることがわかる。しかし、構造が似ている基質同士でも酸化部位が全く異なる場合もある。このことは、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。これら2つの因子さえわかれば、新規

医薬分子の被酸化部位の予測が十分可能であると思われる。

これまで、CYPに限らず、医薬品の代謝部位は実験的研究によって明らかにされてきた。しかし、なぜその部位が代謝されるのかについての明快な答は、未だない。また最近、CYPにより代謝を受ける部位の予測が行われるようになってきたが（Metaboloexpertなど）、それらは知識ベースでの予測であり、ポテンシャルエネルギーが高い代謝物の予測は困難である。しかも、その手法は酵素反応において重要な、基質と酵素の相互作用は考慮されていない。これに対し本研究は、基質と酵素の相互作用を考慮し、酵素反応活性部位における医薬品の状態および代謝反応を原子レベルで知ることができるため、薬物酸化部位選択性が生じる理由について議論することができる。このような研究はほとんど前例がなく、コンピュータの性能向上とタンパク質の構造解析（予測）技術の向上により、今後進展する可能性を秘めている。

## 2. 研究の目的

本研究はCYPの薬物酸化部位選択性を原子レベルで明らかにして、医薬品の代謝部位を予測するための指針確立を目的としている。今日までにCYPには多くの種類が存在していることがわかっているが、その一種、シトクロムP450 3A4 (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。また、抗てんかん薬カルバマゼピン (CBZ) 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おり、非常に面白い研究対象である。本研究ではCYP3A4によるCBZエポキシ化反応を例にとり、薬物酸化部位の選択性が生じる理由を理論計算により原子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) CYP3A4による薬物酸化機構-分子力場計算による検討

CYPによる薬物酸化機構は、

- ①薬物の結合によるヘム鉄のスピン状態変化
- ②一電子還元
- ③酸素分子の取り込み
- ④一電子還元
- ⑤薬物への酸素原子添加反応
- ⑥酸化薬物の脱離

の順で進行するとされている。本研究ではCYPによる薬物酸化反応を考えるために、反応⑤

での酵素-薬物複合体構造を検討する。CYP3A4の構造はX線結晶解析により既に明らかになっている。CYP3A4の構造をコンピュータグラフィックスで表示して酵素活性部位近傍を精査し、薬物と相互作用しそうなアミノ酸残基を推定する。このことと薬物酸化部位を考慮に入れ、CYPの活性部位に薬物 (CBZ) を配置し、分子力場計算によりエネルギー極小化を行う。これにより、CYP-薬物複合体構造が構築できる。

(2) CYP3A4による薬物酸化機構-量子化学計算による検討

(1) で得られた構造を基に活性部位近傍のアミノ酸残基、ヘム及びCBZ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、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。また、計算においては、スピン二重項状態とスピン四重項状態を考慮する。

(3) CYP3A4による薬物酸化機構-量子化学計算による検討

CYP3A4はCBZの10-11位の二重結合しか酸化しないことが実験によりわかっているが、理論計算を用いれば他の部分に対し酸化反応を起こすこと自体は可能である。(2) と同じく、密度汎関数法による量子化学計算を行い、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。そして、これらの反応をまとめ、CYP3A4はCBZの10-11位の二重結合しか酸化しない理由を明らかにする。

(4) CYP3A4による薬物酸化機構-分子動力学計算による検証

分子動力学計算により、活性中心におけるCBZの挙動を調べ、同時に、活性部位内のアミノ酸残基がCBZエポキシ化を安定に進めるためにどう寄与しているかを解析する。また、CYP3A4がCBZの10-11位の二重結合しか酸化しない理由を時間経過的な観点から明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) CYP3A4による薬物酸化機構-分子力場計算による検討

まず、CYP3A4のX線結晶解析データ (PDBコード 1TQN) を用い、酵素活性部位を精査し

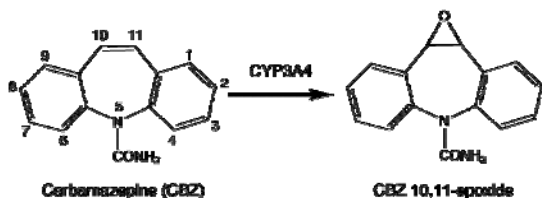


図 1. CYP3A4 による CBZ エポキシ化反応。

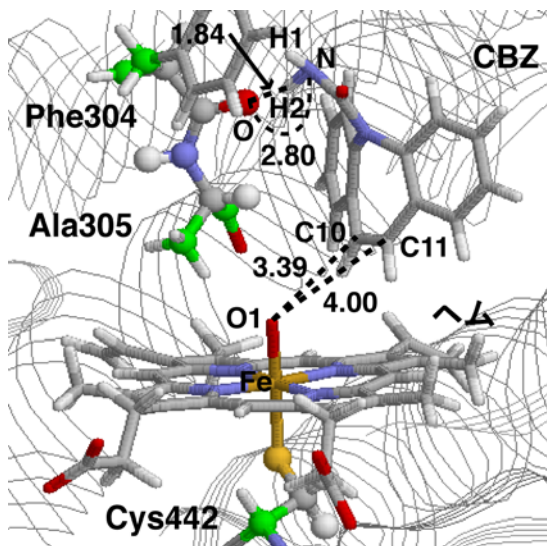


図 2. 分子力場計算によるエネルギー極小化により求められた CYP3A4-CBZ 複合体の活性部位。図中の数字は原子間距離 (Å) を示す。

た。その結果、304 位のフェニルアラニン (Phe304) と 305 位のアラニン (Ala305) が薬物 (CBZ) を保持する役目を果たすのではないかと推定された。このことと、CBZ が酸化を受ける部位 (10-11 位、図 1) を考慮して、活性部位に CBZ を配置、活性部位のヘム鉄に酸素原子を結合させ、分子力場計算によりエネルギー極小化を行った。その構造を図 2 に示す。Phe304 が CBZ を保持し、ヘム鉄の酸素原子 (基質に挿入される) は CBZ の 10, 11 位と相互作用していた。すなわち、CYP3A4 が CBZ に対し、エポキシ化を実行するための構造が得られた。

## (2) CYP3A4 による薬物酸化機構—量子化学計算による検討

(1) の結果を基に、Phe304、Ala305、Compound I (ヘム鉄に酸素原子が結合した活性種) が結合した 442 位のシステインおよび CBZ を抜き出して、計算のためのモデルを作成した。これを用い、密度汎関数法 (B3LYP/3-21G\*\*ただし、C、N、O 原子は 3-21G) により、CBZ に対する酸化反応の機構を求めた。スピン二重項状態およびスピン四重項状態における反応の進行によるポテンシャル

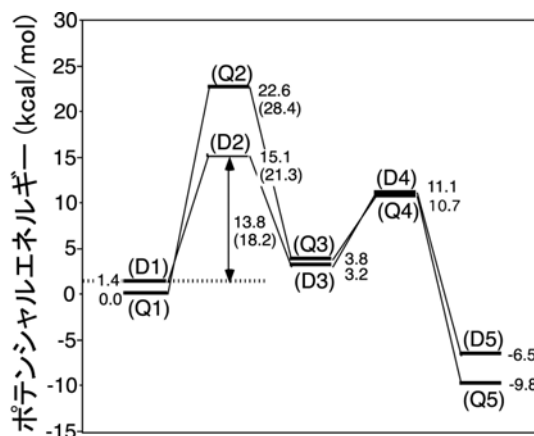


図 3. CYP3A4 による CBZ エポキシ化反応におけるポテンシャルエネルギー変化。D1-D5 はスピン二重項による反応、Q1-Q5 はスピン四重項による反応である。括弧内の数字は B3LYP/6-31G\*\*レベルのエネルギー値である。

エネルギー変化を図 3 に示す。反応は D1 (もしくは Q1) から順に進行し、2 つの素過程から成る。まず、Compound I の酸素原子が CBZ の 10 位と結合 (図 3 の D1-D3 もしくは Q1-Q3 の過程) して中間体をつくり、次いで 11 位と結合 (図 3 の D3-D5 もしくは Q3-Q5 の過程) して酵素から脱離するという 2 段階反応で進行する。反応の律速段階は最初の素反応である。また、反応初期状態においてはスピン四重項状態の方がスピン二重項状態より安定であるが、反応の進行過程でスピン二重項状態とスピン四重項状態間の交叉が生じ、中間体 (D3、Q3) においてはスピン二重項状態の方が安定であることがわかった。このことを考慮に入れ、反応の律速段階における活性化エネルギーは B3LYP/6-31G\*\*レベルで 21.3 kcal/mol (Q1→D2→D3) であった。また、反応中、CBZ は Phe304 により保持されていた。

## (3) CYP3A4 による薬物酸化機構—量子化学計算による検討

まず、CYP3A4 の Phe304 と Ala305 が CBZ を保持するという条件で、CBZ の 10-11 位以外に酸化され得る部位があるかどうかを調べた。その結果、CBZ の 8 位と 9 位 (図 1 参照) が該当し、分子力場計算によって、その可能性が確かめられた。分子力場計算の結果を基に (2) で行ったのと同様のモデルを作成し、密度汎関数法により CBZ に対する酸化反応の機構を求めたところ、律速段階における活性化エネルギーは、9 位酸化の場合は 26.9 kcal/mol、8 位酸化の場合は 27.0 kcal/mol であった (B3LYP/6-31G\*\*レベル)。この値は 10-11 位のエポキシ化の場合 (21.3 kcal/mol、同レベル) に比べて大きく、10-11 エポキシ

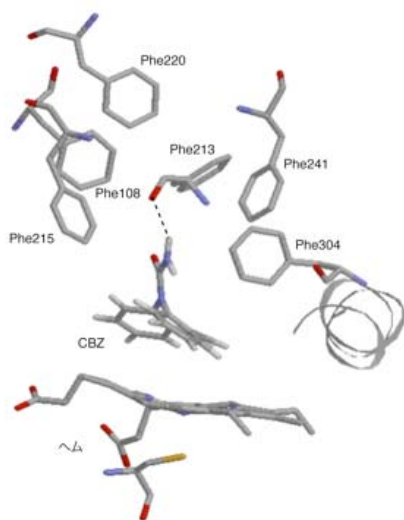


図 4. 分子動力学計算により得られた CYP3A4-CBZ 複合体における活性中心。点線は水素結合を示す。

化反応に比べ、芳香環水酸化は起こりにくいことがわかった。

#### (4) CYP3A4 による薬物酸化機構—分子動力学計算による検証

分子動力学計算により、CYP3A4 の活性部位内における CBZ の挙動を解析した。CYP3A4 の活性部位にはフェニルアラニンクラスターとよばれる領域 (Phe304 を含む、図 4 上方) があり、CBZ はその領域と、水素結合のみならず、 $\pi/\pi$  相互作用によっても保持されることがわかった (図 4)。また、シミュレーション中、CBZ の 10 位は CYP3A4 による酸化を最も受けやすい位置に留まっていた。このことは、CYP3A4 の活性部位は CBZ が 10-11 位のエポキシ化を受けるに適した形状になっていることを示唆している。

#### (5) まとめと今後の展望

(1) ~ (4) の結果より、CYP3A4 による薬物酸化部位の選択性は、反応の活性化エネルギーの大小と活性部位の形状により生じるのではないかと考えられる。

CYP3A4 による CBZ エポキシ化の場合、反応の活性化エネルギーが芳香環水酸化よりも小さいことが量子化学計算の結果より明らかとなった。また、分子動力学計算により、CBZ が活性部位内でエポキシ化を受けやすい位置にすることがわかった。これは、CYP3A4 の活性部位構造と CBZ の構造の適合関係により、エポキシ化を受けやすい位置をとると考えられる。つまり、反応の活性化エネルギーと活性部位の形状という二つの因子により、基質のどの部分に作用するかが決まるのである。このことを理論計算の面から証明でき

たことは CYP による代謝物の *in silico* 的予測において重要な意味をもち、後で示すように、原著論文、学会発表という形で公表することができた。

今後は、本研究で得られた知見を生かし、代謝物予測法の理論を確立していきたいと考えている。この研究が進展し、医薬品の代謝部位を予測するための方法が定まれば、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、テーラーメイド医療にも寄与する。そして、理論計算による予測であるため、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る。発展性があり、かつ国内外に強いインパクトをもたらす研究になると思われる。

#### 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)

① Masayuki Hata, Yoshikazu Tanaka, Naoko Kyoda, Taisuke Osakabe, Hitomi Yuki, (他 4 名), An epoxidation mechanism of carbamazepine by CYP3A4, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 5134-5148, 2008, 査読有

〔学会発表〕 (計 1 件)

① 畑 晶之、CYP3A4 によるカルバマゼピン酸化反応機構、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、国立京都国際会館

#### 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

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし