

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19850019
 研究課題名（和文） 遺伝多型を持つ薬物代謝酵素のリガンド認識機構についての
 計算機的研究
 研究課題名（英文） Computational studies for ligand binding mechanisms of drug
 metabolizing enzymes with genetic polymorphism
 研究代表者
 小田 彰史 (ODA AKIFUMI)
 東北薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：50433511

研究成果の概要: 遺伝多型を持つ薬物代謝酵素 N-アセチルトランスフェラーゼ 2 と UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 についてその立体構造を予測・精密化し、立体構造形成上重要な要素に関する知見や、リガンド認識機構についての知見などを得た。また、それらの計算に必要なプログラムおよびパラメータの開発・評価についても行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,170,000	0	1,170,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,520,000	405,000	2,925,000

研究分野：計算化学

科研費の分科・細目：化学・物理化学

キーワード：薬物代謝酵素・分子シミュレーション・ドラッグデザイン

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において、薬物の吸収・分配・代謝・排出および毒性 (ADME/T) の検討は非常に重要である。これまで、多くの医薬候補化合物が開発され、臨床試験が行われてきたが、多くの候補化合物が ADME/T における問題を原因としてドロップアウトしている。その理由として、近年特に薬効あるいは ADME/T に個人差を引き起こす遺伝多型の問題が取り上げられている。遺伝多型は遺伝子中の 1 つあるいは少数の塩基に変異が発生し、その遺伝子によってコードされている遺伝子産物の発現量が変化したり（あるいは全く発現しない場合もある）、遺伝子産物の性質が変

化したりといった影響を及ぼす。ADME/T に関連する遺伝子に遺伝多型が発生した場合、薬物の体内動態に影響を与え、結果として薬物の速やかな排出を阻害したり、あるいは逆に薬物が体内に留まらなかったり、さらには代謝活性化に異常が起こったりといった問題が引き起こされる。

これまでに、ADME/T、特に代謝に関連した酵素で多くの遺伝多型が発見されており、抱合に関連した代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) や N-アセチル転移酵素 (NAT) などがある。UGT は内在性物質・外来性物質の両方の代謝に関与する代謝酵素であり、肝細胞などの小胞体膜に局在している。UGT は様々な化合物にグルクロ

ン酸を付加するグルクロン酸抱合反応を触媒する。グルクロン酸は水溶性が高いため、グルクロン酸抱合を受けた化合物は水溶性が上昇し、代謝されやすくなる。

UGTには複数のアイソザイムがあるが、ヒトにおいてはUGT1ファミリーとUGT2ファミリーの2つのファミリーに分類される。薬物およびその関連化合物では、抗がん剤CTP-11（イリノテカン）の活性代謝物SN-38の代謝においては主にUGT1ファミリーに属するUGT1A1およびUGT1A7が関与し、アセトアミノフェンは主にUGT1A6による抱合を受ける。また、UGT1ファミリーにおけるアミノ酸置換や欠損はCrigler-Najjar I型、II型、Gilbert's症候群といったビリルビンの代謝異常を引き起こすことが知られており、この代謝異常は特にUGT1A1のみのアミノ酸変異や欠損でも発生する。また、UGT1A1の遺伝多型は日本人の新生児黄疸にも検出されており、乳がんの発症率への影響なども指摘されている。さらにUGT1A1は前述の通り抗がん剤CTP-11の活性代謝物SN-38などの代謝に対しても触媒として働くため、UGT1A1の遺伝多型は薬物代謝に対しても影響を及ぼす。UGTの立体構造はほとんど実験的に解明されておらず、ヒトのUGTについては唯一UGT2B7のみリガンドを含まない構造が実験によって解析されているが、これについてもC末端側のUDP-グルクロン酸(UDPGA)結合部位のみについて解かれており、N末端側の基質認識部位については不明のままである。また、遺伝多型が重要となるUGT1A1はもちろんのこと、UGT1ファミリーのアイソザイムについては全く立体構造が解明されていない。

一方NATは多くの薬物の代謝に関与する薬物代謝酵素であり、NAT1とNAT2の2つのファミリーに分類される。いずれもアリルアミンなどのN-アセチル抱合反応を触媒する酵素であるが、NAT1、NAT2のいずれについても遺伝多型を持つことで知られている。特にNAT2は抗結核薬イソニアジド(INH)のアセチル抱合に関与していることから、古くからその遺伝多型について研究されてきた。NAT2の遺伝多型によってINHの代謝速度に個人差が生じ、代謝の遅い群をslow acetylator(SA)、速い群をrapid acetylator(RA)と呼ぶ。日本人に比べて白人ではSAの割合が多く、白人の薬物代謝を考慮する際にはNAT2は重要な酵素となる。NAT2のリガンド結合部位にはアセチル補酵素A(アセチルCoA)が存在し、基質のアセチル化において重要な役割を果たしている。また、活性部位中のシステイン(Cys68)が代謝活性に影響を与えることが知られている。近年、ヒトNAT2の立体構造がX線結晶回折によって解明されているものの、報告された立体構造においては、補酵素としてアセチルCoAではなく補酵素A

(CoA)が含まれており、補酵素がアセチルCoAとなった場合には異なった立体構造をとることが予想される。

このように、UGT、NATともにADME/Tの個人差を検討する際に重要な役割を果たす酵素でありながら、いずれもその精密な立体構造が得られておらず、構造生物学的検討ひいてはStructure-Based Drug Designには限界がある状態であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝多型の影響の大きい代謝酵素であるUGTおよびNATについて、その精密な立体構造を推定し、リガンド認識についての知見を得ることである。分子種としては、特に薬物代謝と遺伝多型の関連で重要となるUGT1A1およびNAT2の立体構造に関する知見を得ることを目的としている。これらの酵素について、リガンド認識に関与しているアミノ酸残基・補酵素は何かを推定し、また酵素の立体構造の保持において重要な役割を果たしている要因等についても考察する。

また、これら代謝酵素の計算を可能とするためのツールの開発・評価についても行う。報告者らのチームでは既にブラウン運動を元にした分子シミュレーションのためのブラウン動力学法(BD)プログラム**brownian**を開発していたが、本研究の一環として**brownian**の生体分子に対する有効性の評価を行い、代謝酵素の計算に適用可能かどうか判断することも目的とした。BDは現在広く使用されている分子動力学法(MD)と比較して高速に計算が可能であるため、その有効性が確立されることは、大量の計算を要する創薬研究などにおいて非常に重要となる。

分子シミュレーションを行う上でしばしば問題となる点として、パラメータの不備が挙げられる。分子シミュレーションには分子の構造を扱うためのパラメータが必要となるが、既存のソフトウェアでは主にアミノ酸のパラメータのみが用意されており、リガンドのパラメータについては不十分であることが多い。特にNAT2において補酵素として働くアセチルCoAなどのような硫黄含有系については十分にパラメータが用意されておらず、それどころか硫黄を扱うための量子化学計算手法すら十分に検討されているとは言い難い状態にある。そこで生体分子や医薬品にしばしば登場する硫黄含有系のパラメータについて算出することも本研究の重要な目的の一つである。このようにして得られたパラメータは、NATはもちろんのこと、多くのタンパク質の計算において重要になるものと考えられる。

3. 研究の方法

まず UGT1A1 については、フォールド認識法を用いたメタサーバである protein homology/analogy recognition engine (phyre) を使用して立体構造を予測した。テンプレートとしては PDB ID が 2IYA、2IYF、2PQ6、2C1Z、2ACV、2VCU、1IIR、1RRV、2O6L、2P6P の構造を使用された。このようにして得られた構造に対して、Cys127 に関与したジスルフィド結合を繋いだモデルと繋がずにチオール体のままとしたモデルの 2 種類を作成した。

このようにして作成したモデルに対して、分子力学計算による構造最適化および MD シミュレーションによる構造精密化を行った。これらの計算はすべて水分子の箱中で行っている。分子力学計算、MD シミュレーションともに古典的分子力場を使用しているが、本研究では AMBER の ff99SB 力場を使用した。構造最適化については、まず付加した水の最適化のみを行った後、系全体の最適化を行った。最適化された構造に対して、引き続き系の温度を上昇させる MD シミュレーションを行った。30 ps かけて系の温度を 0 K から 300 K まで上昇させた。その後 300 K で平衡化のための MD シミュレーションを 2 ns 行った。

得られた構造に対してリガンド結合部位探索を行い、構築したモデルの構造的特徴を検討した。リガンド結合部位探索には Q-SiteFinder を使用した。Q-SiteFinder はそれ自身に水素を付加するルーチンが組み込まれているため、水素を外して計算を行った。リガンド結合部位探索については、phyre によって得られた予測構造そのもの、ジスルフィド結合を形成して MD を行った後の構造、ジスルフィド結合を形成せずに MD を行った後の構造の 3 つすべてに対して実行した。

NAT2 の構造については PDB より得た PDB ID が 2PFR の構造を使用した。2PFR には N 端に 4 残基が付加されており、またいくつか原子が欠損しているが、これらを修正し、かつ水素原子についても付加した。その際、近接している CoA と Cys68 の間にはジスルフィド結合はないものと考え、いずれの硫黄原子も通常のチオールとして水素を付加した。この構造に対して構造最適化を行った後、CoA をアセチル CoA に変換した。その後アセチル CoA 部分のみの最適化および全体の最適化を行った。これら構造最適化には AMBER9 を使用し、一般化 Born (GB) 法による溶媒とモデルを使用した。また cutoff は使用していない。これら最適化によって得られた構造に対して、0 K から 300 K までの昇温 MD を行った。溶媒は最適化と同様に GB 法を用いた。その後 300 K の条件下において 1 ns の MD シミュレーションを行っている。こうして得られた

構造に対してドッキングソフトウェア GOLD を用いて INH をドッキングさせた。また比較のために、補酵素として CoA を含んだ場合の NAT2 についてもドッキングを行った。これらの計算には AMBER の ff99 力場を使用した。

BD ソフトウェア *brownian* の評価には、野生型および変異型のウシ膵臓トリプシンインヒビターを使用した。BPTI の立体構造については PDB より入手した (PDB ID: 6pti)。

計算に際しては BD と MD の両方を行い、野生型、変異型の構造の安定性を評価した。BPTI の構造だけではなく、計算時間についても比較を行った。BD、MD ともに、1 ns のシミュレーションを行った。また、系の温度は 300 K である。すべての計算において、AMBER の ff03 力場を使用した。BD では *brownian* の機能により自動で誘電率および粘度を計算した。MD では GB 法による連続体溶媒下で計算を行った。また、計算時間の比較のため、最大 16 CPU core を用いた並列化計算も行った。計算時間に関しては、BPTI 以外の 6 種類の系 (PDB ID: 1DT4、1NKL、1D60、2FJY、1MHQ、1P38) を用いた確認も行った。

硫黄含有系の量子化学計算およびパラメータ決定については、スルホンアミド誘導体では 6 種類の系について計算を行い、チオエステルについては *S*-メチルチオ酢酸をモデルとして使用した。量子化学計算手法として半経験的分子軌道法、*ab initio* 分子軌道法、DFT 法を使用した。基底関数についても 3-21G から cc-pVQZ まで様々なセットを使用し、比較を行った。また比較のため GAFF 力場を用いた古典的分子力学法についても計算を行った。スルホンアミド誘導体については結晶構造とのデータの比較も行ったが、その際にはケンブリッジ結晶構造データベース (CSD) に収載された構造を利用した。また、窒素原子がピラミッド型構造となっているか平面構造となっているかについても評価した。計算に使用したソフトウェアは、半経験的分子軌道法については MOPAC2002 を、*ab initio* MO 法および DFT 法については Gaussian03 を使用した。また、参照のための分子力場計算には AMBER9 を使用した。

4. 研究成果

図 1 に、phyre によって予測された UGT1A1 の構造を示す。アミノ酸配列が比較的保存されている C 末端領域の UDPGA 認識領域だけではなく、N 末端領域についても予測がなされている。また、ジスルフィド結合を持つ可能性があることを知られている Cys127 の予測構造中での位置についても図 1 に示している。図に示したように、Cys127 は Cys156 と近接した位置にあり、2 つの残基の硫黄原子間距離は 5.84 Å となっている。この距離はジス

ルフィド結合を行うには遠いものの、もし Cys127 がジスルフィド結合に関与するとすれば、結合の相手となる残基としては Cys156 の可能性が高いのではないかと考えられる。この Cys127 と Cys156 の間にジスルフィド結合について、結合のあるモデルとないモデルを作成し、それら両方に対して MD シミュレーションを行った。

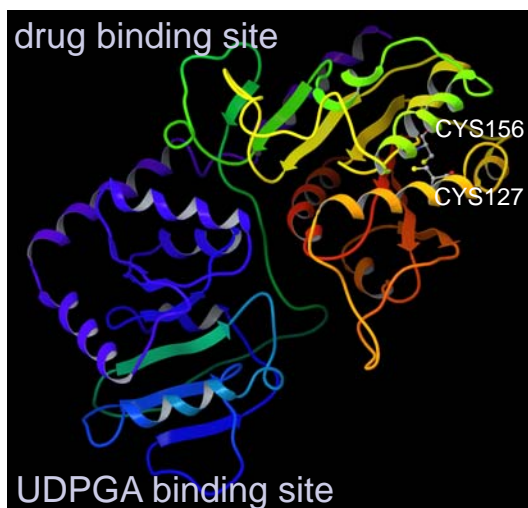


図1 UGT1A1の予測構造

MD シミュレーションにおける偏差二乗平均平方根 (RMSD) の変化を見てみると、ジスルフィド結合の有無にかかわらず 2 ns のシミュレーションによって構造が収束した。また、両者ともにそれほど大きく構造が崩壊していないものの、ジスルフィド結合のあるモデルのほうがわずかながら RMSD が大きくなる傾向があった。また、それぞれの構造に対して Q-SiteFinder でリガンド結合ポケット候補を探したところ、MD を行う前の予測構造とジスルフィド結合なしのモデルでは N 末端側と、N 末端ドメインと C 末端ドメインの境界領域の 2 つの領域に結合サイト候補が発見されているのに対して、ジスルフィド結合ありのモデルではドメイン間の境界領域にのみ結合サイト候補が見いだされている。またサイトの体積を見ても、最もリガンド結合サイトである可能性の高いサイト 1 の体積が phyre による予測構造やジスルフィド結合なしのモデルと比較してジスルフィド結合ありのモデルでは小さくなっている。これらの結果は、予測構造にジスルフィド結合を加えた結果、構造が変化したことを意味している。特にサイトの体積が狭くなっていることから、ジスルフィド結合がないモデルのほうがリガンドの結合において有利であることが示唆される。上述の RMSD の結果と併せて、ジスルフィド結合を形成しない構造が UGT1A1 のモデルとして妥当ではないかと推

測される。この結果は Cys127 のジスルフィド結合が UGT1A1 の活性発現に重要ではないという実験結果と対応している。今回作成したモデルにおいては、Cys127 と Cys156 以外に 10 Å 以内に 2 つのシステイン残基の硫黄原子が近接したペアは存在せず、Cys127 と Cys156 についても上述の通り 5.86 Å の距離であった。すべてのシステインのペアがジスルフィド結合可能な距離にないという計算結果から、UGT1A1 については Cys127-Cys156 に限らず、いかなるジスルフィド結合も活性発現において重要ではないことが示唆されており、これも実験結果と一致している。これは本研究で作成したモデルの妥当性を間接的に示唆しているのではないかと考えられる。

UGT1A1 について配列相同性の高いヒトの UGT2B7 をテンプレートとして構造を推測した例は他になく、かつ薬物結合ドメインに対しても構造を得られており、本研究で得られた UGT1A1 の立体構造は薬物代謝の構造生物学的検討において重要な役割を果たすものと期待できる。この構造を利用して、実際の医薬候補化合物設計に ADME/T 予測を組み込むといった研究に取り組むことを計画している。

NAT2 についても、構造に修正を加えて MD によって構造精密化した構造を図 2 に示す。球を使用したモデルで、補酵素のアセチル CoA を示している。



図2 NAT2の精密化構造

ここに見られるように、補酵素を CoA からアセチル CoA に変換しても構造は大きく崩れておらず、安定したシミュレーションが実行できたことが示される。また、MD のトラジェクトリに対する RMSD 計算から、1 ns で構造がおおよそ収束していることが示された。また、シミュレーション終了後の構造を補酵素としてアセチル CoA ではなく CoA を含んだ場

合の NAT2 の構造と比較すると、補酵素周辺の空間が広がっており、この部分がリガンド認識部位として機能していることが示唆された。

この精密化構造に対する INH のドッキングの結果を見ると、補酵素として CoA を含んだ NAT2 では解が得られなかった。これはリガンド認識部位として推定される空間の体積が、ソフトウェア GOLD で設定される値より小さかったためである。すなわち、そもそも CoA を含んだ構造ではリガンド結合部位自体が十分に形成されていないことを示している。それに対してアセチル CoA を補酵素とした場合にはこの空間部位に INH がドッキングされた複合体構造が得られており、補酵素（ここではアセチル CoA）と Cys68 が離れることで INH の結合が可能となる程度にリガンド結合部位が広がることを示している。これは補酵素の構造が NAT2 のリガンド認識機構に大きく影響することを示唆している。

ヒト NAT2 については立体構造が得られたのがごく最近ということもあって、立体構造について補酵素を含めて詳細に検討した研究が得られておらず、本研究で示された補酵素およびシステイン残基の役割は、NAT2 の構造生物学的検討において重要となると考えられる。また、ここで得られた NAT2 の構造は UGT1A1 と同様に薬物代謝を考慮した Structure-Based Drug Design への応用が期待できる。さらに本研究の結果が、補酵素として CoA 誘導体を含んでいる酵素に対してその硫黄原子の働きを検討するための 1 つの指針となるのではないかと考えている。

BD プログラム *brownian* の評価では、おおむね実験的に立体構造を保持することが判明している BPTI 変異体では BD を通じて構造が保持されており、実験的に立体構造が崩れることが示唆されている変異体では BD によっても構造が崩れるといった結果になった。これは MD においてもほぼ同様の結果となっており、BD、MD を問わず、分子シミュレーションによって BPTI の立体構造の安定性を評価できることを示している。一方構造が変化する速さについては、BD では 100 ps 程度のシミュレーションで構造が大きく壊れているのに対して MD では 200 ps 程度が必要となっており、BD のほうが迅速に構造緩和を行っていることがわかる。これは BD のタンパク質の立体構造を変化させる能力が高いことを意味しており、分子シミュレーションのみならず構造最適化計算や配座探索などへの応用が可能であることを示唆している。また、計算時間について見た場合、BD は MD の 3 分の 1 以下の時間で計算が終了している。並列化計算においても、BPTI が非常に小さなタンパク質であり、並列化効率が悪くなることが予想される系であるにもかかわらず、BD は

MD と比較して 12 CPU core で 3 倍以上、16 CPU core でも 2.5 倍以上高速に計算が可能となっている。これは他のタンパク質でも同様であったが、系が大きくなるほど高速化の効率は高くなっており、351 残基からなる 1P38 では BD が MD の 10 倍以上高速になる場合もあった。このように、*brownian* が生体高分子系の分子シミュレーションに対して精度・速度の両面で有用であることが示された。このプログラムを利用することで、従来より高速かつ高精度に生体分子の構造・機能予測が可能となることが期待できる。

硫黄含有系の計算のうち、スルホンアミド誘導体の計算では、半経験的手法では結合長・結合角・二面角のいずれか（あるいは複数）において結晶構造と大きく異なった結果しか与えることができず、*ab initio* 法あるいは DFT 法の必要性が示された。また、GAFF においてもいくつかの構造的特徴においてあまり望ましくない値が得られており、スルホンアミドのための新規な力場パラメータを求める必要があるのではないかと考えられる。一方、*ab initio* 法や DFT 法においても、3-21G や 4-31G のようなシンプルな基底関数や、あるいは *f* 型の分極関数を含まないような基底関数ではスルホンアミドの構造を正しく表現できないことがわかった。一方で *split valence* 型の基底関数において、*double* ζ と *triple* ζ とを比較すると、*triple* ζ 型の基底関数のほうが良好な結果を与えることが多いものの、*f* 型の分極関数ほど大きな影響を与えておらず、計算機資源に応じて基底関数を選択するべきではないかと考えられる。一方のチオエステル系については、DFT 法での結果が使用した手法中で最も高精度な CCSD(T)/aug-ccpVTZ と異なっており、この系に対しては DFT 法が十分に機能しない可能性が示唆された。また基底関数については、スルホンアミド誘導体で見られた *f* 型分極関数の重要性は表れておらず、こちらの系に対しては必ずしも *f* 型の分極関数が重要であるとは考えられない結果となった。ただし *f* 型の分極関数を入れることで結果が不正確になることもなかったため、初期の選択としては硫黄含有系では *f* 型の分極関数を入れたほうが誤りを避けることができる可能性が高い。また、結果が基底関数に依存する度合いは *ab initio* HF 法に比べて CCSD(T)法のほうが大きく、高精度手法を用いる際には基底関数にも十分な注意が必要であることが示唆された。これらの結果を利用して、チオエステルに対する力場パラメータを算出した。硫黄含有系に対しては量子化学計算手法の検討が不十分な場合が多く、分子力場パラメータについてもごく一般的な手法を用いて算出するにとどめられている場合が多いが、本研究によって硫黄を扱う際の注意点が明

確となり、より精密なパラメータの算出が可能となった。これを利用することで、生体系において重要な硫黄含有分子の正確な計算が実行できるものと期待している。

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 2 件)

- ① Akifumi Oda, Noriyuki Yamaotsu, Shuichi Hirono, Ohgi Takahashi, Brownian dynamics simulations of a wild type and mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitors, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31, 2182-2186 (2008) 査読有.
- ② 小田彰史, 小林佳奈, 高橋央宜, ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素 1A1 の立体構造予測, *東北薬科大学研究誌* 55, 85-90 (2008) 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 小田彰史, 鷹野優, 中村春木, 山乙教之, 広野修一, 高橋央宜, 松崎久夫, タンパク質-リガンド複合体予測構造の分子シミュレーションによる評価, 日本生物物理学会第 45 回年会, 横浜, 2007 年 12 月 21 日.
- ② 小田彰史, 高橋央宜, 松崎久夫, 鷹野優, 計算化学手法によるスルホンアミド誘導体の立体構造解析, 日本化学会第 88 春季年会, 東京, 2008 年 3 月 28 日.
- ③ 小田彰史, 高橋央宜, 松崎久夫, N-アセチルトランスフェラーゼ 2 のリガンド認識機構の計算機的検討, 日本薬学会第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月 28 日.
- ④ 小田彰史, 高橋央宜, N-アセチルトランスフェラーゼ 2 の基質認識部位に関する計算化学的検討, 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム, 札幌, 2008 年 5 月 26 日.
- ⑤ Akifumi Oda, Kana Kobayashi, Ohgi Takahashi, Computational studies for the role of the disulfide bond in UGT1A1 by using homology modeling and molecular dynamics simulations, CBI Annual Meeting 2008 International Symposium, 東京, 2008 年 10 月 23 日.
- ⑥ 小田彰史, 高橋央宜, NAT2 の補酵素およびアミノ酸残基がイソニアジドのドッキングに果たす役割についての計算機的研究, 第 36 回構造活性相関シンポジウム, 神戸, 2008 年 11 月 2 日.
- ⑦ Akifumi Oda, Kana Kobayashi, Ohgi Takahashi, Computational Studies for Ligand Recognition Mechanisms of Drug

Metabolizing Enzymes by Using Molecular Simulations, The 2nd Taiwan-Japan Young Researchers Conference on Computational and Systems Biology, 東京, 2008 年 11 月 5 日.

- ⑧ 小田彰史, 高橋央宜, 鷹野優, チオエステル基周辺の構造変化に伴ったエネルギーの変化に関する量子化学的研究, 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡, 2008 年 12 月 4 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/yakuhinb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 彰史 (ODA AKIFUMI)
東北薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 50433511

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者