

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 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510229

研究課題名（和文）

代謝酵素の基質認識機構解明および医薬候補化合物の代謝予測システムへの応用

研究課題名（英文）

Mechanism of substrate recognition by cytochrome p450s and application to *in silico* prediction system of metabolites of drug candidates

研究代表者

赤松 美紀 (AKAMATSU MIKI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70183134

研究成果の概要（和文）：医薬品の薬物代謝に関与する酵素系は主に cytochrome P450 (CYP) スーパーファミリーであり、数種の重要なヒト CYP 代謝酵素が存在する。本研究では、ヒトの主要な CYP による多様な構造の化合物の代謝物を *in silico* 予測できるシステムを構築することを目的とした。結果として、ドッキングシミュレーションより代謝物の構造が、水素原子の引き抜きエネルギー計算より生成する代謝物の生成比順序が予測され、代謝物予測システム構築が可能となった。

研究成果の概要（英文）：To clarify the substrate recognition mechanism, we identified the metabolite structures of an insecticide, tebufenozide, as a model compound, and other compounds by major human CYP isozymes: CYP3A4, 2C19, 1A2, 2C9, 2D6 and 2E1, which are used as indicators of drug development. Then, docking simulation and hydrogen-abstraction energy calculation have been carried out to predict metabolites of the compounds. It was clarified that these methods were useful for the *in silico* prediction system of drug candidates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2013 年度	0	0	0
2014 年度	0	0	0
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：代謝酵素・CYP・ケミカルゲノミクス・基質認識・代謝物予測システム・構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

多くの医薬品は経口投与により腸管から吸収され、ヒト体内に取り込まれた後、肝臓などに存在する代謝酵素により代謝されて体外へ排出される。薬物代謝に関与する酵素系は、主に cytochrome P450 (CYP) スーパーファミ

リーであり、中でも、CYP3A4 は医薬の 50% 以上の代謝に関わると言われている。CYP3A4 以外では、2D6, 2C9, 2C19, 1A2, 2E1 が重要である。これらのさまざまな代謝酵素が、化合物のどのような構造的特徴を認識して代謝反応を引き起こすかを知ることは、「医薬の効き

目の持続性と残存性」に関わるため、創薬科学においてきわめて重要である。しかし、代謝酵素は多種多様な化学物質を代謝・分解することが要求されるため、その基質認識は広範に及ぶ結果、個々の化合物が主としてどの代謝酵素で分解されるかを予測することは現時点では困難である。

医薬候補化合物の ADME (吸収, 分布, 代謝, 排泄) を開発の初期段階で予測する試みは、近年、国内外で盛んに行われている。しかし、先に述べたように CYP 類の分子が多様であり、しかも、それぞれの CYP に対し、非常に多様な薬物が相互作用することから、大規模な解析はほとんど行われてこなかった。現存しているソフトウェアはまだ実用的な面で十分とは言えず、より高精度で実用に耐えるソフトウェアの開発が望まれている。

2. 研究の目的

ケミカル・ゲノミクスとは、ゲノム解析から明らかになった生体分子 (遺伝子・タンパク質) の機能を、さまざまな化学物質を加えて相互作用させた時の応答に基づいて同定し、それを生物や疾病の理解、および創薬などに利用するという方法論である。本研究では、CYP3A4, 2D6, 2C9, 2C19, 1A2, 2E1 に焦点を当て、これらの代謝酵素の基質認識の解明にケミカル・ゲノミクスの手法を応用し、医薬品の候補としてデザインされた化合物がどの代謝酵素の基質となり得るか、また、どの程度代謝されるかを予測できるシステムを構築することを目的とする。

本研究により、医薬候補化合物の代謝予測システムが構築できれば、次のことが期待される。

- (1) 創薬段階の初期に候補化合物の代謝に関与する CYP およびその代謝の程度をコンピュータで予測することによって、探索に費やす時間の短縮と経費の節約が期待できる。
- (2) 本システムでは、ヒト CYP による代謝物の予測も目指すため、代謝物による毒性発現の予測・メカニズム解明などに利用できる。

3. 研究の方法

代謝酵素として、CYP3A4 などのリコンビナント種を用いる。認識機構の対象となる基質には、代表的な医薬化合物に加えて、農薬およびその誘導体も用いる。代表者は農学研究科に所属しており、これまでから農薬研究に携わってきたため、農薬のライブラリーは豊富である。医薬についてはこれまでにヒト CYP による代謝データが多数蓄積されているが、農薬に関する代謝データはほとんどない。農薬には、医薬と類似構造を持つ化合物に加え

て、過去の医薬にはない興味深い構造を持つ化合物が多数含まれている。さらに、農薬の場合、登録の際に必ずラット代謝物のデータが報告されているので、代謝物推定が容易である。その結果、構築されたシステムは多様な化合物データに基づくため、広範な構造の医薬候補化合物に対して応用できると期待される。数種の CYP と数種の基質の組合せ、すなわち、「多対多」の「酵素-基質」の組合せを用いるケミカル・ゲノミクスのアプローチにより、代謝酵素の分子認識を総合的に理解する。

具体的な方法は以下の通りである。

- (1) さまざまな農薬および誘導体がそれぞれの CYP (市販品を購入) により代謝されるかどうかのスクリーニングを行う。
- (2) スクリーニングの結果、代謝された化合物について、その代謝物を大量に得るため、CYP 発現酵母菌体を利用する。CYP 発現酵母菌体は分担者である榊教授の研究室が所蔵している。CYP 発現酵母菌体を大量培養し、化合物を基質として加えてさらに培養し、代謝物を得る。これまでの研究において、この方法である種の高疎水性農薬の代謝物が、比較的大量に得られることがわかっているが、化合物を変えたときにうまくいかない場合は、化合物を溶かす溶媒、培養条件などを検討し、最適な条件を用いる。
- (3) 溶媒抽出により代謝物を単離し、順相、逆相カラムで精製し、最終的には HPLC (高速液体クロマトグラフ) により分取して純品を得る。その化学構造を NMR, LC/MS, UV で同定する。
- (4) 現在、PDB データベースには数種のヒト CYP-基質複合体の X 線三次元構造座標が含まれている。座標がある場合はその構造を採用、ない場合はアミノ酸配列の相同性からコンピュータ上で三次元構造モデリングを行い、構造を構築する。そして、代謝酵素と基質のドッキングを行う。得られた複数のドッキングポーズのそれぞれにおいて、酵素反応部位であるヘム鉄にもっとも近い基質の水素が構造変換を受けると考える。
- (5) ドッキングシミュレーションと基質における水素原子引き抜きのエネルギ計算に基づき、各 CYP による基質酸化部位の予測を行う。

P450 による酵素の還元的活性化機構を図 1 に示す。

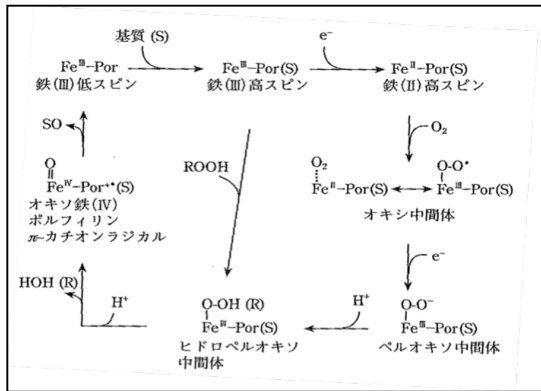


図 1. P450 による酵素の還元的活性化機構

4. 研究成果

(1) CYP3A4 および CYP2C19 によるモデル化合物 tebufenozide 代謝物の同定

まず、ヒトの主要代謝酵素である CYP3A4 および遺伝子多型で日本人に欠損の多い CYP2C19 を取り上げ、農薬（殺虫剤）の一つ tebufenozide (図 2) をモデル化合物として、その代謝物の同定を行った。

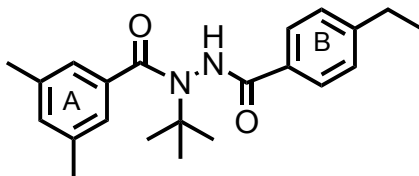


図 2. モデル化合物 tebufenozide の構造

その結果、ヒト CYP3A4 ではそれぞれ B 環エチル基 1 位 (M1), A 環メチル基, *tert*-ブチル基が水酸化された 3 種の代謝物が得られた。一方、CYP2C19 の場合、M1 を含む B 環エチル基のみが変化した 3 種の代謝物が得られた。

両酵素の主要代謝物である M1 が不斉炭素を持つことから、代謝物 M1 構造を持つ化合物のラセミ体を合成し、キラルカラム HPLC 分析による両光学異性体の分離条件を検討した。次に、*R* 体を合成し、先の条件下による *R* 体および *S* 体の溶出順序を決定した。そして、M1 の立体異性体比を求めた。また、*R* 体の旋光度を測定して両異性体の比旋光度を求めた。各 CYP により生成した M1 のキラルカラム HPLC 分析に基づき、それぞれの立体異性体比を求めた。そして、その立体選択性について検討した。M1 の *RS* 比率は、それぞれ、CYP3A4 の場合 *R*:*S*=33:67, CYP2C19 の場合 *R*:*S*=2:98 であった。異性体比から、CYP2C19 は CYP3A4 より立体選択的に tebufenozide の B 環エチル基 1 位を代謝することがわかった。代謝物生成の反応速度定数も求めた。図 3, 4 に CYP3A4 および CYP2C19 による M1 代謝物の酵素反応速度と tebufenozide 濃度との関係を示す。

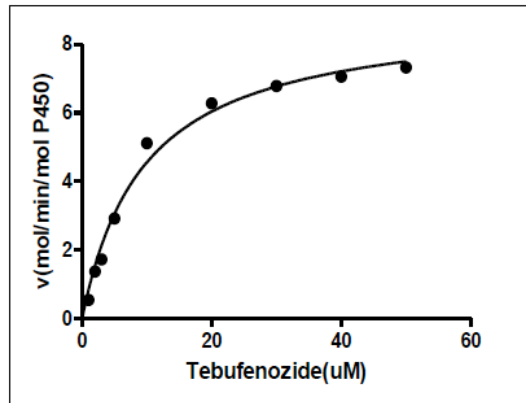


図 3. ヒト CYP3A4 による M1 の酵素反応速度と Tebufenozide 濃度の関係

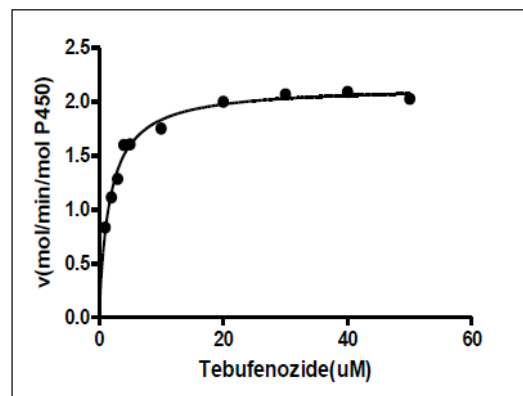


図 4. ヒト CYP2C19 による M1 の酵素反応速度と Tebufenozide 濃度の関係

CYP3A4 と CYP2C19 による M1 の K_m を比較すると、CYP2C19 の方が CYP3A4 より小さく、M1 を生成する結合様式の親和性が高いことが考えられた。一方で、M1 生成に対する最大反応速度は CYP3A4 の方が CYP2C19 より 6 倍大きいことがわかった。

(2) CYP2D6, 2C9, 1A2, 2E1 による tebufenozide 代謝物

CYP2D6 および CYP1A2 は Tebufenozide の B 環エチル基のみを酸化した。CYP2C9 では、B 環エチル基の酸化物が主要代謝物であったが、*tert*-ブチル基が水酸化された代謝物も得られた。CYP2E1 では代謝物は生成しなかった。

(3) Tebufenozide 代謝物の *in silico* 予測

ドッキングシミュレーションと tebufenozide における水素原子引き抜きエネルギー計算に基づき、各 CYP による tebufenozide 酸化部位の予測を行った。

CYP2C19 の結晶構造は解明されていないので、92%の相同性を示す CYP2C9 (PDBID: 1R90) を鋳型として、PDFAMS ソフトウェアを用いて

ホモロジーモデリングを行い、CYP2C19 の構造を構築した。他の CYP については以下の結晶構造を用いた：3A4 (PDBID: 2JOD)；2C9 (PDBID: 1R90)；1A2 (PDBID: 2HI4)；2D6 (PDBID: 3QM4)。当研究室では、ドッキングソフトウェアとして GOLD および FRED が使用可能であったが、FRED の方が実験結果をより良く再現することがわかった。Tebufenozide の代謝物が生成しなかった CYP2E1 については、報告されているいずれの結晶構造を用いても FRED で活性部位ファイルが作成できなかったため、今回はドッキングを行わなかった。本研究のドッキングシミュレーションでは 5 種類のスコア関数を用いたコンセンサススコアリングを行った。コンセンサススコアが高いほど、エネルギー的に安定なドッキングポーズであることを示す。スコアが高い順に 50 位までのドッキング構造を算出した。

図 5, 6 に CYP3A4, CYP2C19 の結合部位構造を示す。

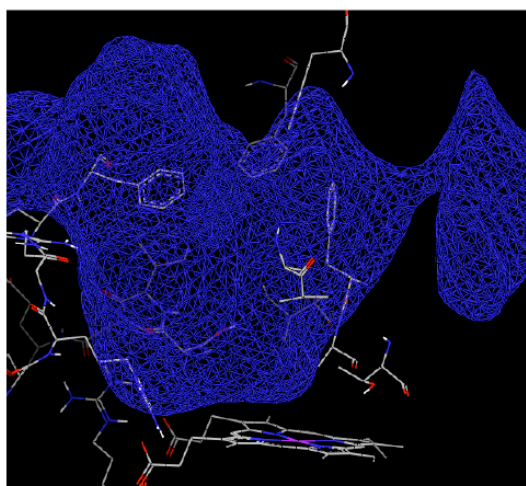


図 5. ヒト CYP3A4 の活性部位

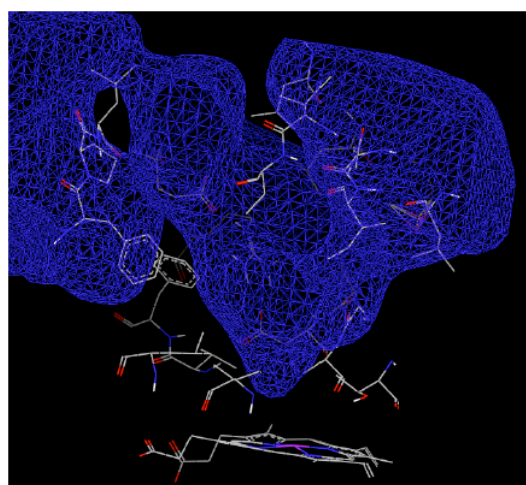


図 6. ヒト CYP2C19 の活性部位

CYP3A4 ではヘム近傍の活性部位が広いのに対し、CYP2C19 では狭くなっていることがわかる。従って、CYP3A4 では tebufenozide はさまざまなドッキングポーズをとるのに対し、CYP2C19 では限られたポーズしか得られなかった。

CYP3A4 と tebufenozide のドッキングシミュレーションでは酸化部位が *tert*-ブチル基、メチル基、エチル基の順にスコアが高かった。いずれもスコアの順位は比較的高く、CYP3A4 が 3 ヲ所のいずれも酸化しようという実験結果を予測できることが示された。これは、CYP3A4 の基質結合部位が広く、さまざまな方向から基質が結合できるためであると考えられる。しかし、実際に同定した代謝物の生成比とスコア順位は一致しなかった。CYP2C19, CYP1A2, CYP2D6 と tebufenozide のドッキングでは、得られたすべての酸化部位がエチル基であったことから、これら 3 種の分子種ではエチル基しか酸化されないと予想された。これは同定した代謝物と一致していた。だが一方で、CYP2C19, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 のコンセンサススコアは実験で生成しなかったエチル基 2 位が酸化された代謝物について最も高い値を示し、さらに CYP2C9 では、実際には生成しなかったメチル基が酸化された代謝物も予測された。

また、エネルギー計算では、分子軌道法 MNDO/AM1、および密度汎関数法 (DFT 法) の B3LYP を用いて基底関数 6-31G* で水素原子の引き抜きエネルギーを計算した。図 7 に P450 の一原子酸素添加反応機構を示す。

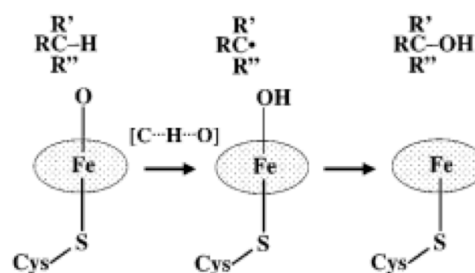


図 7. P450 の一原子酸素添加反応機構

図の上部が基質、下部が P450 のヘム鉄 [C...H...O] は水素原子の引き抜きの遷移状態

水素原子の引き抜きエネルギー計算より、AM1, DFT 法いずれの手法を用いてもエチル基 (1 位)、メチル基、エチル基 (2 位)、*tert*-ブチル基の順に水素原子が引き抜かれやすい、すなわち酸化されやすいことがわかった。この結果から、CYP2C19, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 によりエチル基 1 位のみが酸化された代謝物が優先的に生成したことが説明される。

エチル基 2 位の自由度が高いこともこの部位が酸化されない理由かもしれない。CYP2C9 のメチル基代謝物については、スコア順位は低いもののさらに検討する必要がある。

本結果に基づき、ドッキングシミュレーションより代謝物の構造が、水素原子の引き抜きエネルギー計算より生成する代謝物の生成比順序の予測される可能性が示された。

(4) Tebufenozide 類縁体および他の化合物の代謝物 *in silico* 予測の検証

Tebufenozide 類縁体の代謝物を同定し、(3)と同様の方法で代謝物の *in silico* 予測を行った。また、これまでに蓄積されている医薬の代謝データベースに基づき、多様な構造を持つ化合物の代謝物予測を行い、*in silico* 予測方法を検証した。

(5) 総合考察および今後の展望

本研究により、「多対多」の「代謝酵素-基質」の組合せをドッキングとエネルギー計算の手法を用いて解析し、より予測能にすぐれて精度よく代謝予測できるシステムの構築が可能となった。システムをソフトウェア化するには至らなかったが、方法論そのものの有用性を証明することができた。

一つの問題点はドッキングシミュレーションにおいて、特定のソフトウェアを用いていることである。誰もが利用できるシステムを構築するためにはソフトウェアに依存しない方法を考える必要がある。代表者が専門とする構造活性相関の手法をうまく用いて、現在のシステムをさらに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 4 件)

①Yasuda K, Ikushiro S, Kamakura M, Ohta M, and Sakaki T, Metabolism of sesamin by cytochromes P450 in human liver microsomes, Drug Metabolism and Disposition, 査読有り, 38, 2010, 2117-2123, DOI:10.1124/dmd.110.035659

②Yamazaki K, Sakaki T, 他 8 名, Structural basis of species differences between human and experimental animal CYP1A1s in metabolism of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, Journal of Biochemistry, 査読有り, 149, 2011, 487-494, DOI: 10.1093/jb/mvr009.

③Uchihashi, S., Ikushiro, S., Sakaki, T., 他 3 名, Metabolism of the c-Fos/Activator Protein-1 Inhibitor T-5224 by Multiple Human UDP-Glucuronosyltransferase

Isoforms,

Drug Metabolism and Disposition, 査読有り, 39, 2011, 803-813,

DOI:10.1124/dmd.110.037952

④Yasuda, K, Ikushiro, S., Sakaki, T. 他 6 名, Human cytochrome P450-dependent differential metabolism among three 2 α -substituted-1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 査読有り, 133, 2012, 84-92. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2012.09.006

[学会発表] (計 11 件)

①城谷直紀、榊 利之、生城真一、赤松美紀、他 7 名, ヒト代謝酵素 CYP3A4 と CYP2C19 の基質認識機構における差異- Tebufenozide を例として -, 日本農薬学会第 35 回大会, 2010/5/29, 札幌, 北海道大学。

②城谷直紀、榊 利之、生城真一、赤松美紀、他 4 名, Difference of substrate recognition between human CYP3A4 and CYP2C19 based on metabolite identification and *in silico* prediction, 第 18 回ヨーロッパ構造活性相関シンポジウム, 2012/9/20, ギリシャ、ロードス島, ロードスパレス国際コンベンションセンター。

③城谷直紀、榊 利之、生城真一、赤松美紀、他 4 名, 代謝物同定および *in silico* 予測を用いた CYP3A4 と CYP2C19 における基質認識機構の差異, 第 38 回構造活性相関シンポジウム, 2010/10/30, 徳島, 徳島大学。

④藪 未来、榊 利之、他 7 名, ラットおよびヒト CYP1A1 による 3,3',4,4'-テトラクロロビフェニルの代謝能の比較, BMB2010 (日本分子生物学会・日本生化学会合同会議), 2010/12/8, 兵庫, 神戸。

⑤城谷直紀、榊 利之、生城真一、赤松美紀。他 4 名, ヒト CYP3A4 および CYP2C19 の Tebufenozide 代謝における立体選択性の差異, 日本農薬学会第 36 回大会, 2011/3/17, 東京, 玉川大学。

⑥赤松美紀, 代謝・排泄に関する分子モデリング, 第 305 回細胞工学研究会講演会 (招待講演), 2012/1/20, 島根, 島根大学。

⑦藪 未来、榊 利之、他 9 名, ラットおよびヒト CYP1A1 によるポリ塩化ビフェニルの代謝と 3 次元構造の比較, 第 20 回環境化学討論会, 2011/7/16, 熊本, 熊本県立大学。

⑧安田佳織、生城真一、榊利之、他 5 名, セサミンおよびエピセサミンのヒト体内における代謝予測, 第 84 回日本生化学会大会, 2011/9/21, 京都, 国立京都国際会館。

⑨Yagawa, M., Akamatsu, M. 他 7 名 (赤松美紀), Difference of Substrate Recognition Between Human CYP Isozymes Based on

Metabolite Identification and *In Silico* Prediction, 第9回薬物の分子設計と開発に関する日中合同シンポジウム, 2012/9/22, 中華人民共和国桂林市.

⑩矢川勝太, 赤松美紀, 他7名 (赤松美紀), ヒト主要P450分子種によるモデル化合物 Tebufenozideの代謝物同定およびIn Silico 予測, 第40回構造活性相関シンポジウム, 2012/11/29, 愛知, 岡崎.

⑪Yagawa, M., Akamatsu, M. 他7名 (赤松美紀), Identification and *In Silico* Prediction of Tebufenozide Metabolites b.

[その他]

ホームページ等

研究内容についてのWebページ:

<http://www.fsao.kais.kyoto-u.ac.jp/cas/index.php?%E8%B5%A4%E6%9D%BE%E3%80%80%E7%BE%8E%E7%B4%80>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤松 美紀 (AKAMATSU MIKI)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 70183134

(2) 研究分担者

榊 利之 (SAKAKI TOSHIYUKI)
富山県立大学・工学部・教授
研究者番号: 70293909

(3) 研究分担者

生城 真一 (IKUSHIRO SHINICHI)
富山県立大学・工学部・准教授
研究者番号: 50244679