

生理活性物質の構造活性相関

Structure-Activity Relationships of Bioactive Compounds

農学研究科比較農業論分野 赤松美紀

[背景と目的]

私たちは日常生活の中でさまざまな化学物質に曝露されており、それらの中には人体にとって有害なものが存在する。これら有害物質をシトクロム P450 (CYP) により代謝無毒化することなどにより、私たちはその悪影響を軽減している。CYP は薬物代謝の約 8 割に関与する代謝酵素で、ヒトにおいて CYP 分子種の遺伝子多型が存在する。そのため、各ヒト CYP 分子種における化学物質の代謝を検証することは重要である。また、CYP による代謝研究により各 CYP 分子種の基質認識機構を解明できれば、ヒトに対する化学物質のリスク評価に役立てるとともに、医薬品や農薬の開発効率の向上に貢献し得る。

本研究では、モデル化合物として殺虫剤 Tebufenozide (図 1) を選択し、それを基質とした場合のさまざまなヒト CYP による代謝物同定を行っている。対象とする CYP はヒトのもつ主要な 6 種の CYP 分子種、3A4、2C19、2C9、1A2、2D6、2E1 である。CYP3A4 は全 CYP 中最大の約 30-50% を占め、薬物代謝の 30% 以上に関与する重要な分子種である。CYP2C19 は遺伝子多型の問題があり、特に日本人の約 20% が欠損している分子種である。CYP2C9 はフェニトイン(抗てんかん薬)やトリプルタミド(糖尿病治療薬)などの代謝に大きく関与する一方で、シメチジン(H₂ 受容体遮断薬)などに阻害されるなどの問題がある。CYP1A2 は肝のみに存在し、全肝中 CYP の 10% 以上を占め、遺伝子多型としては通常型、低活性型などがあり、エストロゲン代謝に関与しているため医薬品による女性化乳房の原因と考えられている。CYP2D6 も遺伝子多型の問題が注目されており、白色人種の約 90% が低活性型とされている。CYP2E1 はヒトの胎児肝にも発現が確認されており、ベンゼン、アニリンなどを代謝して反応性の高い中間代謝物を生成する。一昨年度は、CYP3A4 および CYP2C19 による Tebufenozide の代謝物同定を行い、ヒト CYP3A4 の場合、A 環メチル基、B 環エチル基 1 位、*tert*-ブチル基が水酸化された 3 種の代謝物が得られ、一方、CYP2C19 の場合、B 環エチル基のみが変化した 3 種の代謝物が得られたことを報告した。昨年度は、両 CYP による主要代謝物が、B 環エチル基 1 位が水酸化された M1 (図 1) で、M1 が不斉炭素を持つことから、それぞれの CYP により生成した M1 の立体異性体比に基づき、その立体選択性について報告した。今年度は、CYP 3A4、2C19 以外の 2C9、1A2、2D6、2E1 による Tebufenozide 代謝物の検討を行った。

また、ドッキングおよび水素原子引き抜きエネルギー計算を用いて、各 CYP による代謝物の *in silico* 予測が可能かどうかについても検討した。

[検討内容]

それぞれのミクロソームで Tebufenozide を代謝させ、LC/MS 分析により生成する代謝物を確認した。CYP3A4 および CYP2C19 による代謝物以外の代謝物は見出されなかったため、LC の保持時間と MS のパターンから代謝物を同定した。

ヒト 6 種の CYP により得られた Tebufenozide 代謝物が *in silico* 予測可能かどうか検討した。すなわち、各酵素と Tebufenozide のドッキングを行い、スコアリングの結果から引き抜かれる水素原子の予測を試みた。また、水素原子引き抜きエネルギー計算を行い、酸化されやすい水素原子の順序を決定した。

ホモロジーモデリングには PDFAMS Pro (ver. 2.1, インシリコサイエンス社)を用いた。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: 1R9O) を鋳型とし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: 1R9O); 1A2 (PDBID: 2HI4); 2D6 (PDBID: 3QM4)。

コンフォーマ構築プログラム OMEGA(ver. 2.3.2, Openeye 社)を用いて、ドッキングに使用可能な Tebufenozide の多コンフォーマデータベース (比較的安定なコンフォーマ群) を作成した。また、FRED RECEPTOR(ver. 2.2.5, OpenEye 社)により、ドッキングに必要な酵素の活性部位を定義した。すなわち、各 CYP に対して活性部位を指定し、リガンドが結合すると予測されるタンパク質のおおまかな位置を定義した。そして活性部位の形状を設定し、レセプター活性部位ファイルを作成した。代謝物がまったく生成しなかった 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。

Tebufenozide の多コンフォーマデータベースとレセプター活性部位ファイルを用いて、FRED(ver. 2.2.5, OpenEye 社)でドッキングシミュレーションを行った。ドッキングにおいて、リガンドとヘム鉄との距離を考慮して、リガンドの少なくとも 1 つの重原子がヘム鉄から 5.0 Å 以内に存在するような拘束条件を設定した。本研究のドッキングシミュレーションでは Shapegauss、PLP、Chemgauss3、OEChemscore、Screenscore の 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い、スコアが高い順に 100 位までのドッキング構造を算出した。

水素原子の引き抜きエネルギー計算には、ソフトウェア SYBYL(ver. 7.1, Tripos 社)を用いて、Tebufenozide から酸化部位の水素を 1 原子取り除き、計 20 個のラジカル体を作成した。次に、これらのラジカル体および Tebufenozide のエネルギーを密度汎関数法(B3LYP、基底関数 6-31G*)により計算した。ラジカル体についてはエネルギー値を計算した後、酸化部位ごとにその平均値を計算した。各酸化部位における水素原子引き抜きエネルギー値が低いほど、その酸化部位の酸化が ocorrência やすいと考えた。

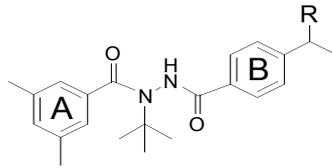
[結果および考察]

ドッキングシミュレーションの結果、ヘム鉄に最も近い基が酸化されると考えた(以下、酸化部位という)。Tebufenozide の酸化部位をエチル基(1 位)、エチル基(2 位)、メチル基、*tert*-ブチル基の 4 つに分類した。ドッキングシミュレーションにより、それぞれの酸化部位のスコアが最も高いものを選択し、実際の代謝物の酸化部位とそのスコア順位を比較した。表 1 にドッキングによる各分子種のコンセンサススコアの順位と実際の代謝物を示した。

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する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。実際に、3 つの分子種は Tebufenozide のエチル基のみを酸化した。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。

水素原子の引き抜きエネルギー計算より、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。

以上の結果から、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る可能性が示された。



R=H : Tebufenozide

R=OH: M1

図 1 殺虫剤 Tebufenozide および代謝物 M1 の構造

表 1 各 CYP 分子種スコアリング結果 [コンセンサスコア順位]

	CYP3A4	CYP2C19	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6
酸化部位	* <i>tert</i> -ブチル基[1] *メチル基[10] *エチル基(1位)[31]	エチル基(2位)[1] *エチル基(1位)[7]	エチル基(2位)[1] *エチル基(1位)[2]	エチル基(2位)[1] *エチル基(1位)[2] * <i>tert</i> -ブチル基[9] メチル基[37]	エチル基(2位)[1] *エチル基(1位)[2]

*は実験で実際に生成した代謝物

[発表論文]

なし。

[参考論文]

なし。