

論文の内容の要旨

論文題目 モデリングによるヒト型シトクロム P450 酵素の
リガンド結合部位に関する研究

氏名 田 中 稔 祐

1. 緒言

シトクロム P450 (CYP) は多くの生物に分布するヘム蛋白であるが、ほ乳類では肝臓や副腎に多く発現し、薬物の代謝やステロイドホルモンの生合成に関与している。なかでもヒトの CYP3A4 は肝ミクロソームで高発現しており 50%以上の薬物の代謝に関与していることから、薬物相互作用における最も重要な酵素である。化合物の CYP 阻害を予測する方法を確立する、あるいは、CYP 阻害を回避する方法を一般化することを目的にした研究の一環として、本研究では、ホモロジーモデリングにより CYP におけるリガンド結合部位の解析を行った。創薬研究の早期段階で CYP 阻害に関する問題を解消することは、新薬創製の効率化と低コスト化に繋がるものと期待される。

2. ホモロジーモデリング

ほ乳類のシトクロム P450 は膜結合型蛋白であるため結晶化が難しく、数年前までは可溶性である微生物の CYP 数種が結晶解析されたのみであった。近年、ウサギ CYP2C5 の結晶構造が報告され、その立体構造を利用することによって、従来の P450-BM3 を用いた場合よりも、ヒト CYP での精度の高いモデリングが可能と予想された。しかし、CYP3A4 に関しては CYP2C5 とのアミノ酸配列の相同性が低いため、慎重なモデリングを行う必要性を余儀なくされた。そこで、アミノ酸配列のアライメントは、立体構造が判明している CYP では立体構造の類似性に、また、ヒトの CYP では配列の類似性に基づいて行い、その後、4カ所の CYP に特徴的な配列が一致する様に2つの結果を統合した。さらに、複数の蛋白で二次構造

が保持されている部分 (SCR) とそれ以外の領域に分離し、SCR では CYP2C5 の結晶構造を鋳型としてアライメントの結果に従い、それ以外の領域では全ての結晶構造を参考にモデル構築を行った。

3 . CYP3A4 モデルに関する解析

CYP2C5 を鋳型にして構築した CYP3A4 モデルのポケットは、P450-BM3 を鋳型にした場合 (450 \AA^3) に比べ容積が非常に大きく (950 \AA^3)、3つのサイトに分かれていた。すなわち、CYP3A4 のリガンド結合部は、ヘム近傍のサイト (proximal site) とヘムから離れた 2 つのサイト (distal sites 1 と distal sites 2) で構成された。このうち distal site 2 は CYP2C5 には存在しないサイトであり、これが CYP3A4 でポケットの容積が大きい要因の 1 つであると推定された。一方、主鎖の二面角 Phi と Psi を解析すると (Ramachandran plot) Gly, Pro 以外のアミノ酸の 98% が許容領域に存在し、基質の結合に重要と報告されるアミノ酸の大部分はポケットを構成することが確かめられた。また、ヘム鉄に配位結合を形成するタイプの阻害薬であるアゾール系抗真菌薬や methylenedioxyphenyl 誘導体のドッキングを行った結果、約 18 の分子長を持つ化合物がポケットの長さとも一致して安定に結合することが分かった。これは、ketoconazole よりも分子長の大きいまたは小さいアゾール系抗真菌薬で CYP3A4 への阻害活性が低いことや、ドッキングした methylenedioxyphenyl 誘導体よりも短いものでは CYP3A4 への阻害活性が低いことと一致しており、ketoconazole の立体異性体間では CYP3A4 への阻害活性が高いものが Discover-esff 力場で得られたエネルギー値でも安定であった。

次に、各誘導体の結合モデルを利用して CYP3A4 リガンドのファーマコフォアを推定し、代表的な CYP3A4 の基質に対して MOE のファーマコフォアドッキングを行った。計算結果のうち各化合物の代謝生成物を説明する配向の結合様式を選択した場合に、 K_m 値の対数と MMFF94s 力場で算出した相互作用エネルギー値との間に相関が得られた。今後、この方法を一般に CYP 阻害の予測に応用するには代謝部位を予測する方法も併せて確立する必要があると思われる。

ここで、CYP3A4 への阻害を回避する方法を考察すると、まず、化合物への酸性官能基の導入が挙げられる。例えば、アンジオテンシン II 拮抗薬で弱いながら CYP3A4 への阻害を示すロサルタンは、ドッキング結果から水酸基で Glu374 と水素結合を形成することが推定され、この水酸基に相当する部分がカルボキシル基に変換されたサルタン類では阻害が大幅に低減している。Glu374 の近傍には他に Asp214 や Asp217 も存在するため、CYP3A4 阻害が問題となった化合物で、ヘム鉄から 13-15 の位置に酸性官能基を導入することで負電荷同士の反発を生み CYP3A4 への阻害を回避できるものと考えられる。一方、ヘム鉄への配位結合を形成するアゾール環を有する化合物では、配位する窒素の隣の位置への置換基の導入や環への電子吸引基の導入が対処法として挙げられる。ピリジン環の 2 位をフッ素やメチル基で置換した場合にヘム鉄への配位に及ぼす不安定化の程度は、いずれも 10 数 kcal/mol であることが密度汎関数法・DMol による計算から見積もられ、前者は電気的な効果、後者は立体的な効果によると考えられる。

4 . CYP2C8 モデルに関する解析

CYP2C8, CYP2C9, およびCYP2C19 の活性部位の特徴を比較する目的でこれらのモデリングを行った結果、三者とCYP2C5 ではCYP2C8 にのみCYP3A4 モデルでのdistal site 2 に相当するポケットが存在することが分かった。このポケットの入り口はIle102, Ser114, Leu208, Val366, およびIle476 で構成され、このうちSer114, Val366, Ile476 の側鎖が他より小さいためにdistal site 2 とproximal siteとが繋がり、CYP3A4 と同様にポケットの容積が大きかった(740³)。これはCYP3A4 とCYP2C8 の両者で代謝を受ける薬物に関する報告が近年増えつつあることと一致し、CYP2C8 も多くの薬物の代謝に関与していて薬物相互作用の観点から重要な酵素である可能性が高い。

各 CYP モデルでのポケットの形状の妥当性を調べる目的で、CYP3A4 と CYP2C19 で異なる位置に代謝を受ける lansoprazole と、CYP3A4 と CYP2C8 で異なる位置に代謝を受ける paclitaxel を各モデルにプログラム・Goldを用いてドッキングした。その結果、得られた結合モデルは、いずれも薬物の代謝生成物を説明しうるものであった。

また、リガンド結合部位を比較すると、CYP2C8 のポケット内では、2つの極性アミノ酸 (Asn99 と Ser114) が distal site 2 に存在することが特徴的であった。更に、CYP2C8 で代謝を受けて水酸化されることが知られている paclitaxel を含む7つの薬物に共通なファーマコフォアを Catalyst により解析した。この結果に基づいて作成した CYP2C8 結合モデルでは、7化合物は、いずれも安定に Asn99 側鎖と水素結合を形成した。Asn99 との水素結合の形成は、これらの薬物が CYP2C8 で代謝を受けるのに適した配向に固定する役目を果たしていると思われる。

次に、CYP2C8 モデルのポケットの特徴と基質の性質との関連を調べる目的で、CYP2C8 と CYP2C9 の主な基質の物性値を比較した。CYP2C8 モデルのポケットの特徴から、基質分子の体積に大きな差が出ると予測されたが、MOE を用いて算出したすべての記述子中で両者に違いが見られたものは、分子量と分子屈折の2つであった。このうち、分子屈折は CYP2C8 のポケットが CYP2C9 に比較して長く、また、極性アミノ酸が存在することと一致する結果である。

5 . CYP2C8, CYP2C9 結晶構造との比較

後に座標が公開された CYP2C9 と CYP2C8 の結晶構造と、構築した各モデルを比較したところ、全体的には良く一致していたが、 α -ヘリックス F/G 間の領域と β -ヘリックス H/I 間の領域に大きな違いが見られた。これらは、Discover の分子動力学計算で揺らぎが大きいことが分かった領域と一致しており、実際にも複数のコンホメーションが存在している可能性があると考えられる。

6 . CYP3A4 結晶構造との比較

ごく最近報告された CYP3A4 の結晶構造との比較では、proximal サイトは良く一致しており、ポケットの長さが約 18 Å でありヘム鉄から 13-15 Å の位置に酸性アミノ酸が存在する

点はモデルからの予想通りであった。しかし、CYP2C8 や CYP2C9 の場合と同様に F/G 領域に構造の違いが見られた。

7 . 結語

CYP2C5の結晶構造を基にCYP3A4モデルを構築した結果、リガンド結合部位の容積は他のサブタイプに比較してかなり大きく、3つのサイトで構成されていた。モデルにおけるproximalサイトの構造、ポケットの長さ、および、酸性アミノ酸の存在は結晶構造と良く一致していた。一方、CYP2C8のポケットの形状的な特徴もCYP3A4に類似であり、CYP3A4と同様にCYP2C8も薬物相互作用の観点から注目すべき酵素であると推測された。また、結晶構造とモデリングの結果からヒト型CYPではF/G領域がフレキシブルであることが分かった。