

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。また、CYP2C8 は薬物代謝酵素として最近重要性が増している CYP である。本研究では、ホモロジーモデリングにより CYP3A4 および CYP2C8 におけるリガンド結合部位の解析を行った。

1. 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微生物の CYP 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考えられる。

アミノ酸配列のアライメントはヒトの 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を行い、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。特に、CYP3A4 に関しては CYP2C5 とのアミノ酸配列の相同性が低いため、精度の高い慎重なモデリングが必要であった。

2. 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 (450³) に比べ容積が非常に大きく (950³)、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) で構成されていた。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つであった。ヘム鉄に配位し、阻害作用のあるアゾール系抗真菌薬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。更に、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 の基質に対してファーマコフォアドッキングを行った。

医薬品が CYP3A4 阻害作用を有しないようにするための分子設計法の考察も行った。具体的には、化合物への酸性官能基の導入で、これはモデリングの結果から Glu374 の近傍には Asp214 や Asp217 の存在が予想されるため、CYP3A4 阻害が問題となる医薬品候補化合物ではヘム鉄近傍に位置する部位から 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出し、CYP3A4 への阻害を回避できるものと考えられた。これはアンジオテンシン II 拮抗薬でこの推論が正しいことが示された。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 CYP3A4 の阻害作用を減じる設計法として考えられた。モデリングの結果からピリジン環の 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が求められた。

3 . 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が側鎖の小さいアミノ酸により distal site 2 と proximal site とが繋がることで、CYP3A4 と同様にポケットの容積が大きくなったものである。大きなポケット容積を有することは CYP3A4 と CYP2C8 の両方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 も薬物相互作用の観点から重要な CYP 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 で異なる位置で代謝を受ける lansoprazole と、CYP3A4 と CYP2C8 で異なる位置に代謝を受ける paclitaxel を検討した結果、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。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 CYP2C8 結合モデルで解析した結果、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。

4 . CYP2C8, CYP2C9 結晶構造との比較

本研究を公表後、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、非常に良く一致しており、モデルの妥当性が検証できた。 -ヘリックス F/G 間の領域と -ヘリックス H/I 間の領域だけに違いが見られたが、これらは分子動力学計算で揺らぎが大きい領域と一致しており、実際の CYP においても複数のコンホメーションが存在している可能性が高いと考えられる。

5 . CYP3A4 結晶構造との比較

更に、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。異なる点は、CYP2C8 および CYP2C9 の場合と同様に F/G 領域に構造の違いが見られた。

以上の結果は、本ホモロジーモデリング研究が極めて妥当なものであり、CYP3A4 および CYP2C8 以外の CYP の立体構造の予測にも適用できる事が示された。

田中稔祐の研究は医薬品の開発において重要な薬物代謝に関するもので、得られた知見は薬学研究に寄与するところ大であり、博士(薬学)の学位に値する内容であると評価された。