

特別寄稿

松大Topics:

シトクロム P450 の作用機構に関する計算化学的研究

松山大学薬学部 薬品物理化学研究室 畑 晶之

1. はじめに

当研究室は「生体タンパク質の作用機構に関する計算化学的研究」をテーマの一つとして研究活動を進めている。私はこれまで、シトクロム P450 (CYP), β -ラクタマーゼ, HIV-1 プロテアーゼ, アセチルコリンエステラーゼなど種々の酵素を対象としてきたが, 中でも CYP は私の卒業研究の対象であったこともあり, 一番長く関わっているタンパク質である。本稿では, CYP の作用機構に関する計算化学的研究によって得られた成果の一部を紹介する。

2. CYP による基質酸化機構

CYP による一酸素原子添加反応サイクルを図 1 に示した。resting 状態 (1) から, 基質の結合によるヘム鉄のスピ状態変化 (低スピ→高スピ) に始まり ((1) → (2)), 一電子還元 ((2) → (3)), 酸素分子の導入 ((3) → (4)), もう一電子還元 ((4) → (5)) と続き, 2 個のプロトンの導入により酸素が活性化されて基質への添加が生じ ((5) → (6) → (6)'), 酸化された基質は酵素から脱離して反応は終了する ((6)' → (1))。 (5) → (6) → (6)' の過程は非常に早く進行するため, 基質に酸素を添加する最終活性種は未だ明らかではない。まず, 一般に最終活性種とされている compound I による酸化反応を量子化学計算により求めた (図 2(a))¹⁾。ヘム鉄に結合している酸素原子はラジカル性を帯びており, 基質から水素原子の引き抜き反応を起こす。次いで, 生成した水酸基が基質ラジカルと結合し, 反応は終了する。この反応は 2 段階反応で, 律速段階は最初の素反応であり, 活性化エネルギーは 15.5 kcal/mol であった。

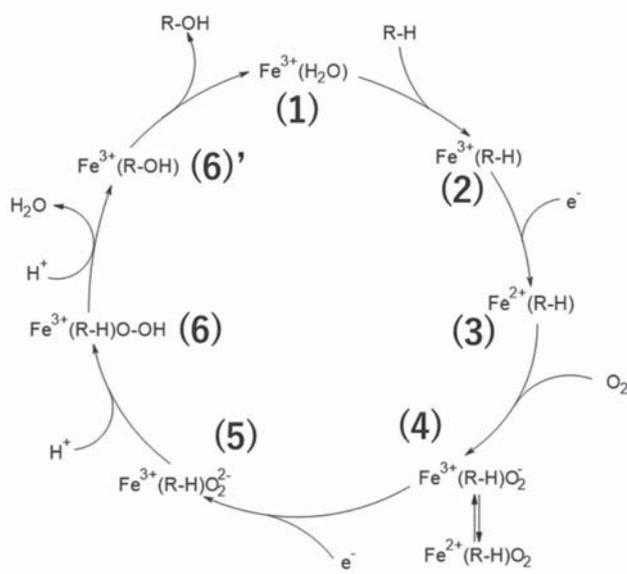


図 1 CYP による一酸素原子添加反応サイクル

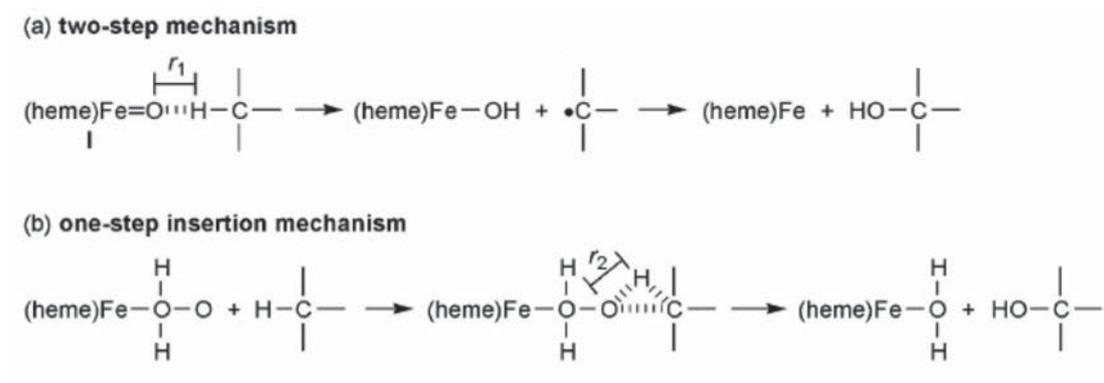


図2 CYPによる基質酸化における2つのプロセス

CYPによる炭化水素の水酸化反応においては、立体構造が保たれ、同位体効果が小さいといわれているが、compound Iによる酸化反応ではそれらを説明できない。図1(4)についての分子動力学(MD)計算において、ヘム鉄と直接結合していない方の酸素原子(遠位O原子)と基質の酸化を受ける部位との相互作用が保たれていたことから、ヘム鉄と直接結合している方の酸素原子(近位O原子)に2個のプロトンが結合した最終活性種を考え、酸化反応の計算を行った(図2(b))¹⁾。遠位O原子はスピン一重項性を帯びており、一段階で基質に挿入された。この反応はCYPによる炭化水素の水酸化反応における特徴を説明でき、しかも、活性化エネルギーは4.2 kcal/molと低い値であった。さらに、反応後にはヘム鉄に水分子が配位した形ができ、これは、resting状態の構造に対応する。

CYPによる酸化反応の実験において多種多様の反応生成物が報告されているが、この2種類の最終活性種による反応機構の存在がその要因ではないかと結論づけた。

3. CYP3A4による薬物代謝における内因性ステロイドの影響

CYPの分子種の1つであるCYP3A4はCYPで代謝される医薬品の半数以上の代謝に関与するとされており、医薬品の開発や薬物相互作用の考察において非常に重要な酵素である。この酵素による薬物代謝は、内因性ステロイドによる影響を受けることが実験的にわかっており、CYP3A4の基質であるネビラピン(NVP)の2位水酸化活性はアルドステロン(ALD)で著しく増加するのに対し、エストラジオール(EST)では阻害され、同じくCYP3A4の基質であるカルバマゼピン(CBZ)の10, 11-エポキシ化はアンドロステンジオン(AND)で著しく増加した²⁾。コンピュータグラフィックスでCYP3A4の構造を精査したところ、活性部位は非常に大きく、2個の基質分子が収容可能であると考えられたため、基質とステロイドが活性部位に同時に存在すると仮定し、分子力場(MM)計算によりCYP3A4-NVP-ALD複合体およびCYP3A4-CBZ-AND複合体を求め、活性部位における基質-ステロイド間の相互作用を調べた。NVPまたはCBZは、ステロイドとの水素結合により、ヘム(compound I)の第6配位座の酸素原子の近くに安定して存在できた(相互作用による安定化エネルギーは約6 kcal/mol程度)。これは、ステロイドとの相互作用により、NVPおよびCBZがより容易に水酸化される可能性を示している。CYP3A4-NVP-EST複合体についても同様に求め、NVP-EST間の相互作用を調べたところ、NVP水酸化部位が位置するベンゼン環とESTのベンゼン環との間で π/π 相互作用がみられ、これが反応の阻害につながるのではないかと考えられた。これらの結果から、活性部位における基質と内因性ステロイドとの相互作用がCYP3A4の活性を変化させる可能性があることが示された。

4. CYP3A4による薬物代謝に関する理論的研究

3.で触れたように、CYP3A4は、カルバマゼピン(CBZ)の10, 11-エポキシ化を触媒する。しかし、生成されるエポキシドは、6員環の水酸化物よりも20 kcal/mol程度ポテンシャルエネルギーが高かった。CYP3A4がこのようなエネルギー的に不利な化合物を生成する理由を明らかにするために、CYP3A4による

CBZ 10, 11-エポキシ化反応を理論計算により求めた³⁾。その結果、この反応は2本のC-O結合が逐次的に生成される2段階反応で構成されることがわかった。律速段階は1本目のC-O結合生成であり、活性化エネルギーはDFT (B3LYP/6-31G**) レベルで21.3 kcal/molであった。計算化学の良いところは、実験で得られていない反応も追跡できることである。芳香環の水酸化が起こると仮定し、その律速段階である、基質C原子とヘム鉄に配位したO原子との結合反応を理論計算により求めたところ、その活性化エネルギーは10, 11-エポキシ化の律速段階反応の活性化エネルギーよりも高いことがわかった。このため、10, 11-エポキシ化は芳香環の水酸化よりも生じる可能性が高く、10, 11-エポキシドのみが生成されるのではないかと結論づけた。

5. おわりに

CYPに関する研究を始めた当初は分子科学研究所や東京大学の大型計算機を使って10原子程度のモデルの量子化学計算を行っていたが、今では(MM計算を組み合わせれば)高性能のパソコンで酵素の全原子計算も十分できるほどになっている。また、CYP関連の結晶構造の数も格段に増え、いろんな分子種について研究できるようになってきた。現在、CBZの10, 11-エポキシ化反応で得られた結果から、反応の活性化エネルギーの大小で代謝部位の予測ができるのではないかと考え、CYP3A4で代謝される医薬品について、その検証を行っている。また、最近、CYPが関与すると考えられる薬物相互作用のメカニズムについて、MD計算による解明にも取り組んでいる。これらの研究を発展させ、医薬品の開発や医薬品適正使用に少しでも貢献できればと考えている。

6. 参考文献

- 1) Hata M., Hoshino T., Tsuda M., An ultimate species in the substrate oxidation process by cytochrome P-450. *Chem. Commun.*, 2000, 2037-2038 (2000)
- 2) Torimoto N., Ishii I., Hata M., Nakamura H., Imada H., Ariyoshi N., Ohmori S., Igarashi T., Kitada M., Direct Interaction between Substrates and Endogenous Steroids in the Active Site May Change the Activity of Cytochrome P450 3A4. *Biochemistry*, 42, 15068-15077 (2003)
- 3) Hata M., Tanaka Y., Kyoda N., Osakabe T., Yuki H., Ishii I., Kitada M., Neya S., Hoshino T., An epoxidation mechanism of carbamazepine by CYP3A4. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 5134-5148 (2008)