

CBI 学会 第 242 回研究講演会

Cytochrome P450 の分子計算

日時： 2004 年 5 月 19 日 (水)

場所： (株)富士総合研究所本社 2 階 大会議室

CBI 学会は特許法第 30 条第 1 項の規定に基づく学術団体に指定されました。

(平成 14 年 4 月 1 日)

日本学術会議法第 18 条第 3 項に基づき、第 19 期日本学術会議会員選出に係る
学術研究団体として登録されました。

(平成 14 年 9 月 13 日)

CBI 学会事務局

〒158-0097 東京都世田谷区用賀 4-3-16 イイダビル 301

Tel : 03-5491-5423 Fax : 03-5491-5462 E-mail : cbistaff@cbi.or.jp

学会のホームページ <http://www.cbi.or.jp>

開催趣旨

昨年、ヒト cytochrome P450 (CYP) 2C9 の結晶構造が明らかにされた。これによって、CYP に対する本格的な計算構造生物学的アプローチがいよいよ現実のものとなってきた。従来 CYP による薬物代謝の解析は主にリガンド・ベースに限定されていたが、今後は分子動力学法、分子軌道法、ホモロジーモデリング等を駆使した(タンパク質や溶媒環境も陽に考慮した)「より現実的な」条件下でのタンパク質-リガンド系の分子シミュレーションが可能となり、Structure-Based ADME/Tox と呼べる分野が発展していくことが期待される。CYP は CBI 学会の提唱する NR-SX (核内受容体-シンドロームX) 計画においてもキー分子の一つとして位置づけられており、4月の第241回講演会でも一部議論される予定である。今回の第242回講演会では、CYPの分子計算の最前線で活躍しておられる内外の第一線の研究者の方々に講師にお迎えして現状をレビューしていただく場を企画した。創薬開発に携わる多くの研究者の参加を期待する。

世話人：田中成典(神戸大学) 福澤 薫(富士総研)

プログラム

1 . 13:00-13:15

「はじめに」世話人

2 . 13:15-14:15

「From Classical to Structure Based 3D QSAR of Anti-Fungal Compounds
(P450 阻害剤の古典的 QSAR から "Structure Based 3D QSAR" 解析へ)」
中馬 寛(徳島大学薬学部)

3 . 14:15-15:15

「Reaction Pathway for Camphor Hydroxylation by a Compound I Model of Cytochrome P450 (シトクロムP450によるカンファーの水酸化に関する反応経路に関する理論的研究)」
吉澤一成(九州大学先導物質化学研究所)

< 15:15-15:30 休憩 >

4 . 15:30-16:15

「Prediction of P450-BM3 Substrate Binding and Activity
(P450-BM3 の基質結合性と活性の理論的予測)」

K. Anton Feenstra (Vrije Universiteit Amsterdam, Section of Molecular Toxicology,
Department of Pharmacochimistry)

5 . 16:15-16:40

「Bio-Scale Engine: Reaction Mechanism of Nitric Oxide Reductase Cytochrome P450nor from Fusarium Oxysporum (一酸化窒素還元酵素 Cytochrome P450nor の反応機構)」
塚本弘毅(産業技術総合研究所生命情報科学研究センター)

6 . 16:40-17:10

「Mechanism of Drug Metabolism by CYP3A4: Epoxidation of Carbamazepine
(CYP3A4による薬物代謝機構：特にカルバマゼピンエポキシ化について)」

畑 晶之(千葉大学大学院薬学研究院)

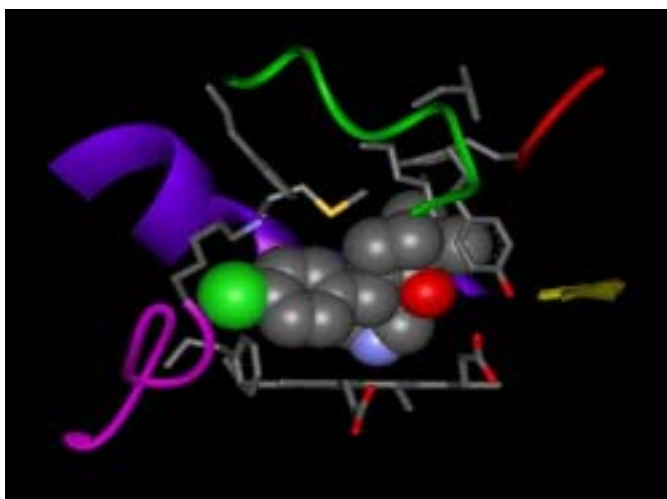
7 . 17:10-17:30 総合討論

From Classical to Structure Based QSAR of Anti-Fungal Compounds (P450 阻害剤の古典的 QSAR から”Structure Based QSAR”解析へ)

中馬 寛 (徳島大・院薬)

hchuman@ph.tokushima-u.ac.jp

我々は合成化学・生物科学分野の研究者と協力し、新規アゾール系農業用殺菌剤 meoconazole を 1994 年に上市した。この研究開発過程において古典的構造活性相関解析 (Classical QSAR) と計算化学的手法を活用し構造展開および最適化を行った。医療用真菌剤も含めてアゾール剤の標的受容体はチトクローム(CYP) P450_{14DM} であることはすでに知られていたが、



B.c CYP51 の活性部位と metconazole の相互作用推定図

metconazole を中心とする一連の化合物の置換基効果、立体配置等、および筆者らが開発した 3 次元構造活性相関解析 (Voronoi Field Analysis) から標的受容体 P450_{14DM} の活性部位近傍のモデルを構築していた。2001 年に *Mycobacterium tuberculosis* CYP51 (P450_{14DM}) と真菌剤 fluconazole の複合体の立体構造が X 線結晶解析によって明らかにされたが、我々の QSAR による推定結果と一致するものであった。同時に、この結果は Classical QSAR から阻害剤と P450 の立体構造に基づいた新しい QSAR、すなわち”Structure Based 3D QSAR”の契機となる知見であり、例えば菌特異的な抗菌剤のドラッグデザインも照準に入れることが十分に可能になってきている。

アゾール系真菌剤のヒトにおける主要な代謝酵素が CYP3A4 であることが知られているが、原子・電子レベルでの CYP3A4 との相互作用解析は薬物間相互作用 (飲み合わせ) に対しても有用な情報を与えると考えられる。そこで、我々は CYP51 を含めて X 線結晶解析により現在までに報告されている 10 種類以上の P450 の立体構造を基にした CYP3A4 のホモロジーモデリングから分子動力学計算、全系の分子軌道法計算を行っている。さらに基礎的実験値を得る目的で、種々のアゾール系化合物の CYP3A4, CYP2B1,2 との結合実験を行いつつある。

生物学的に CYC P450 はきわめて興味あるタンパク質であり、その機能解明のためには実験および理論・計算科学からなる統合的アプローチが必要とされている。Chemistry, Biology, and Informatics による「P450 の新しい科学とその応用」へ向けての新しい展開が期待される。

シトクローム P450 によるカンファーの水酸化の反応経路に関する理論的研究

九州大学 先導物質化学研究所 吉澤一成

量子化学計算から生物無機化学にアプローチすることが可能になりつつある。これまで生物無機化学者の用いる常套手段といえばモデル錯体の合成と分光測定であったが、ここに第3の研究手段が出現したと言っても過言ではないだろう。我々はこれまでにメタンモノオキシゲナーゼ、シトクローム P450、ジオールデヒドラーゼその他の金属酵素の活性中心構造と反応性について研究してきた。今回はシトクローム P450 によるカンファーの水酸化のメカニズムについて述べる。

シトクローム P450 は多くの脂肪族分子の一原子酸素添加反応を触媒するヘム酵素である。なかでも P450cam は立体、位置選択的にカンファーを 5-*exo*-hydroxycamphor に転換し、その構造と反応については多くの実験例がある。図 1 にカンファーの 5 位の水素引き抜き、および生成したラジカル種が再結合する遷移状態の最適化構造を示した。水素引き抜きの活性化エネルギーは 2 重項、4 重項のそれぞれについて 23.8 kcal/mol、21.4 kcal/mol と高く、エタンを基質とした場合と比べてもわずかに数 kcal/mol 低くだけであった。また、速度論的同位体効果 (KIE) もほぼ同じであり、両基質の水素引き抜き過程は本質的に同じであることが判明した。2 重項、4 重項共にリバウンドの遷移状態が存在し、その活性化エネルギーは数 kcal/mol ときわめて低いものであった。このリ

バウンドの遷移状態は水素引き抜きの遷移状態よりも安定であり、観測されている高い立体選択性を説明できる。しかし、この計算結果からは P450 による高いエネルギー障壁を有するヒドロキシル化が生理的条件下で起こることがうまく説明できない。そこでヒドロキシル化の前段階である酸素分子の活性化に注目することにした。Sligar らによるプロトンリレーモデルに基づいて、酸素分子のプロトン化のエネルギーを算出してみると、この化学反応が顕著な発熱過程であることが分かった。この過程の大きな余剰エネルギーを考慮に入れると、次の段階のヒドロキシル化はエネルギー的に極めて容易に起こることが予想される。

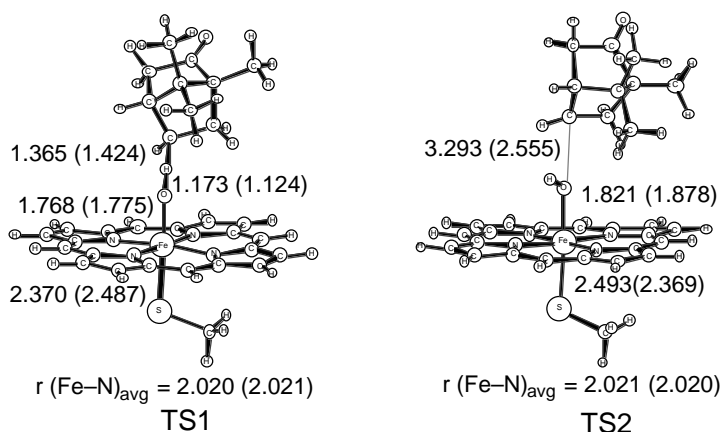


Figure 1. Optimized geometries of the transition states for the H-atom abstraction and recombination in camphor hydroxylation in the doublet (quartet) state. Units in Å.

文献

K. Yoshizawa, Y. Kagawa, and Y. Shiota, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 12365 (2000).; K. Yoshizawa, T. Kamachi, and Y. Shiota, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 9806-9816 (2001).; T. Kamachi and K. Yoshizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4652 (2003); T. Kamachi, A. F. Shestakov, and K. Yoshizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3672 (2004).

Rationalization of CYP102-BM3 substrate binding and activity

K. Anton Feenstra and Nico P. E. Vermeulen

LACDR, Computational Toxicology and Medicinal Chemistry, Department of Pharmacochemistry
Faculty of Exact Sciences, Vrije Universiteit, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam, Netherlands

The CYP102-BM3 enzyme, Cytochrome P450 BM3, or BM3 for short, from *Bacillus megaterium* catalyses the hydroxylation of fatty acids and mutants are known that also hydroxylate alkanes, like octane. Important features that it shares with other members of the CYP family are the relatively large binding cavity that does not induce a ‘tight fit’ of the substrate, and a wide spectrum of substrates.

Substrate hydroxylation typically takes place on sub-terminal positions ($\omega-1$, $\omega-2$, $\omega-3$), but not on the terminal (ω) position. The interactions between enzyme and substrate are very subtle; there are few specific ionic or hydrogen bonding interactions, and no ‘complementary fit’ of the substrate in the binding cavity. Using a combination of docking, dynamics simulation and quantum chemistry, these interactions and differences between mutants are investigated. Binding modes are found from automated docking, additional dynamics and binding statistics come from molecular dynamics (MD) simulations. Reactivities at several locations in the substrate are obtained from quantum mechanical (QM) calculations of the substrate transition state complex.

Substrates were docked into BM3 wildtype and mutants using the Gold automated docking program^[1]. MD simulations were started from several most dissimilar binding orientations found by docking, each for a period of 10ns, using the Gromacs MD package^[2] and the Gromos forcefield^[3]. Wild-type and mutant protein dynamical features were characterized using essential dynamics (ED) analysis^[4]. Activation barriers for hydrogen atom abstraction from the substrate were calculated using UHF at the semi-empirical AM1 level, using a neutral hydroxyl radical as a mimic to the activated heme-iron-oxygen species, following the procedure by Korzekwa & Jones^[5].

Qualitative differences in dynamical behaviour between wild-type and mutants were observed in the ED analysis, for the dynamics of the active site region only but not for the whole enzyme. Substrate binding was seen to be highly dynamical in the MD simulations, the substrates have much freedom to move around the active site interior and bind transiently at different positions, sometimes for relatively long times of several nanoseconds. For octane it was possible to identify preferred locations (i.e., ω , $\omega-1$ and $\omega-2$) but for octanoic and lauric acid anchoring of the carboxylic group prevented large movements of the substrate with respect to the initial position.

Activation barriers calculated on the ω position were higher than those for the other positions, which would shift the overall product formation away from ω hydroxylation. The calculated barrier heights are very sensitive to the electrostatic environment.

In summary, it is concluded that deriving binding statistics from dynamics simulations combined with activation barriers from QM calculations is a valuable tool to investigate and understand substrate binding and product formation in CYP-102 BM3, and CYP’s in general.

References

1. Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R.: *J. Mol. Biol.* **267**, 727 (1997)
2. Lindahl E., Hess B., Van der Spoel D.: *J. Mol. Mod.* **7** 306-317 (2001)
3. Van Gunsteren W.F., Billeter S.R., Eising A.A., Hünenberger P.H., Krüger P., Mark A.E., Scott W.R.P., Tironi I.G.: *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, Vdf Hochschulverlag AG ETH Zürich, Zürich, Switzerland (1996)
4. Amadei A., Linssen A.B.M., Berendsen H.J.C.: *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **17** 412-425 (1993).
5. Jones J.P., Mysinger M., Korzekwa K.R.: *Drug Metab. Disp.* **30**, 7-12 (2002)

Mechanism of Drug Metabolism by CYP3A4: Epoxidation of Carbamazepine (CYP3A4による薬物代謝機構：特にカルバマゼピンエポキシ化について)

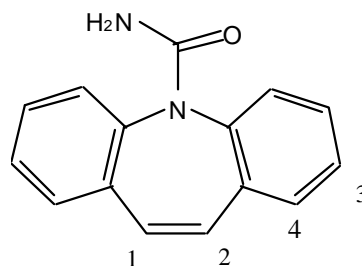
畑 晶之 (千葉大学大学院薬学研究院)

1. 緒言

CYP3A4はシトクロム P450 (CYP)の一種で、現在臨床使用され、CYPで代謝される医薬品の半数以上の代謝に関与するといわれており、非常に重要な酵素である。この酵素に関しては多くの実験的研究が行われており、いくつかの不思議な現象が報告されている。本研究ではその一部につき、理論計算を用いて研究した結果を報告する。

2. CYP3A4によるカルバマゼピンエポキシ化反応

CYP3A4は抗てんかん薬カルバマゼピン (CBZ) に対しアゼピン環のエポキシ化(図の結合 1-2 のエポキシ化)のみを行うことが知られている。しかし、エポキシ化体を含め、考えられる酸化体につき量子化学計算を行ってみると、エポキシ化体は芳香環水酸化体よりも約 20 kcal/mol 高い。なぜ CYP3A4 はポテンシャルエネルギー的に不安定なエポキシ化体のみを生成するのであろうか？この理由を理論計算により明らかにすることを試みた。



計算に使用したモデルは、CYP3A4 のホモロジーモデリング構造[1]につき AMBER6.0 を用いた分子力場計算を行って得られた構造を基に構築した。反応の解析には密度汎関数法を用い、B3LYP/3-21G** レベルで構造変化に伴うポテンシャルエネルギー変化を求めた。全体の電荷を 0 とし、二重項と四重項の二通りのスピン多重度を考慮した。

計算の結果、エポキシ化反応は compound 1 の酸素原子が図の 1 および 2 に逐次的に結合する二段階反応で、律速段階は最初の C-O 結合反応であることがわかった。また、反応の途中でスピン状態の入れ替わりが起こることが示唆された。このことを考慮に入れ、B3LYP/6-31G** でポテンシャルエネルギー計算を行ったところ、律速段階での活性化エネルギーは 21.3kcal/mol と算出された。

次に、CYP3A4 が CBZ の芳香環に対し水酸化を行うと仮定した場合の反応について考えた。CYP による芳香環水酸化にはいくつかの経路が提出されているが、本研究ではエポキシ化体を經由する経路を採用し、エポキシ化体生成反応の律速段階における構造変化およびポテンシャルエネルギー変化を求めた。図の 3 あるいは 4 に compound 1 の酸素原子が結合する場合を考慮したところ、例外があったものの、概ね、結合 1-2 の部分がエポキシ化される場合に比べ、高いことがわかった (25-27kcal/mol)。このことは、CYP3A4 による CBZ 代謝においてはアゼピン環のエポキシ化反応の方が芳香環水酸化よりも起こりやすいことを示しており、エポキシ化体のみが生成する理由であると考えられる。

3. CYP3A4による薬物代謝における内因性ステロイドの影響[2]

CYP3A4 の CBZ エポキシ化活性は、内因性ステロイドにより影響を受けることが知られている。その理由を理論計算により明らかにすることを試みた。CYP3A4 の活性部位は広く、CBZ とステロイドが同時に存在することは可能であると考えられる。そこで、それらの分子が CYP3A4 の活性部位で相互作用した状態を構築し、分子力場計算を行い、得られた構造につき CBZ とステロイド (アルドステロン (ALD)、アンドロステンジオン (AND)、エストラジオール (EST))との相互作用による安定化エネルギーを密度汎関数法 (B3LYP/6-31G**)により求めた。CBZ と ALD の場合、ALD の側鎖が大きいこと、立体障害により安定化エネルギーは小さく (2.89kcal/mol)、compound 1 の酸素原子からの距離も離れていた。これに対し、CBZ と AND の場合は AND に側鎖がないため、立体障害なく水素結合により相互作用でき、compound 1 の酸素原子からの距離も前者に比べ短い。さらに安定化エネルギーも大きい (6.03kcal/mol)。CBZ と EST の場合は分子同士が π/π 相互作用するため安定化エネルギーは小さい (2.68kcal/mol)。実験的には、ALD と EST は CBZ エポキシ化活性に大きな影響を与えないのに対し、AND は約 3 倍活性が上昇することがわかっており、計算結果は実験事実を説明する。以上のことから、CYP3A4 の活性部位における CBZ と内因性ステロイドの相互作用や CBZ と compound 1 との位置関係が、活性の違いに影響を与えているものと考えられる。

参考文献

- [1] G. D. Szklarz and J. R. Halpert, *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **11**, 265-272 (1997)
- [2] N. Torimoto et al., *Biochemistry*, **42**, 15068-15077 (2003)