

氏 名 (本籍) 小 山 紀 之

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 4 5 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 23 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科、専 攻 東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科  
(博士課程) 医 療 薬 学 専 攻

学 位 論 文 題 目

2 次 元 テ ン プ レ ー ト を 用 いた CYP2B6 代 謝 予 測 モ デ ル の 構 築

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 山 添 康  
教 授 眞 野 成 康  
准教授 叶 直 樹

## 論文内容要旨

薬物代謝に関与するチトクロム P450 (CYP) の分子種同定をヒト肝ミクロゾームや S9 を用いて試験されているが、ヒト試料は高価であり、試験できる化合物数も限られてくる。それに対して合成される候補化合物の数も莫大であり、全ての化合物をアッセイして代謝物を確認するのは事実上不可能である。定量的構造活性相関 (QSAR) による薬物代謝の *in silico* 予測モデルがいくつか報告されているが、実用可能な精度で予測ができていない。また、予測できたり、できなかったりしたことに対する科学的な解釈が得られていない。CYP 酵素群は広範な薬物を基質として、様々な反応で代謝する。基質について数多くの報告があり、このような酵素群は非常に稀である。本研究では、それらの基質の化学構造に着目して、基質側から基質の反応部位を特定するテンプレートシステムの構築を試みた。すなわち、酵素タンパクの構造を考慮にいれず、CYP で代謝される基質の大きさ及び立体構造を重ね合わせることで、基質がテンプレート内に収まる範囲を推定した。また、構築されたシステムの妥当性を、該当する CYP で代謝されない薬物も含んだプローブ基質を用いて確認した。今回は、酵素誘導が知られており、医薬品だけでなく多くの農薬や化学物質の代謝にも関与する CYP2B6 に焦点を当てた。

まず、CYP2B6 で代謝される多環芳香族炭化水素を重ね合わせ、共通して占有される領域からハチの巣のような六角形の格子状の平面テンプレートを2つ抽出した (Template A 及び B, 図 1)。この時、テンプレート上の反応部位を固定して基質の反応原子をその部分に配置し、基質の各原子をなるべく六角形の各頂点に配置した。基質の全ての原子がテンプレートの下面と側面の範囲内に保持された時に、その配置を代謝反応できる配置であると判断した。

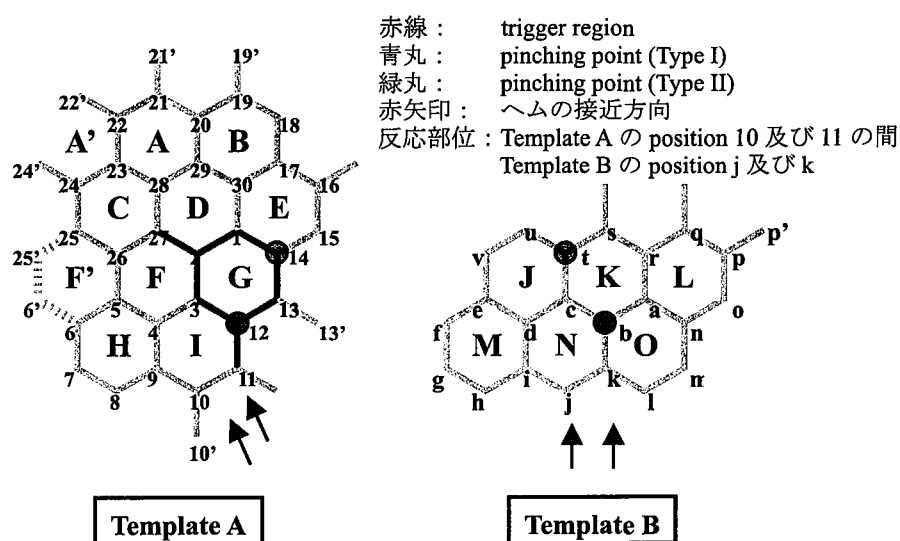
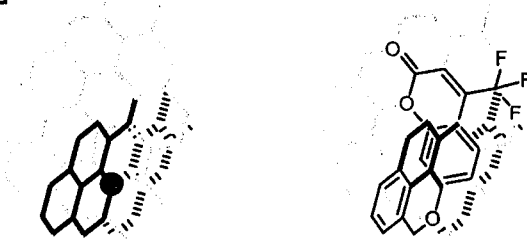


図 1 CYP2B6 反応を評価する平面テンプレート

Type I



Type II

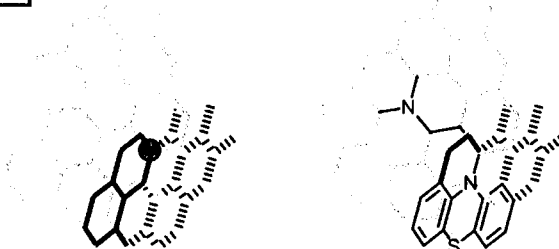


図2 テンプレートシステムの模式図

次に、立体構造を有する基質に適用させるため、この2つの平面テンプレートをT字状に垂直に組み合わせ、2つのタイプのテンプレートシステムを導出した (Type I 及び Type II, 図2)。CYP2B6 の基質は平面テンプレートの結合部位 (pinching point) で折れ曲がって片方もしくは両方のテンプレートに配置されると定義した。Type I, Type II のテンプレートシステムに 40 以上の CYP2B6 基質をランダムに選択して当てはめて、テンプレートの各頂点に基質の各原子が占有する割合を計算したところ、Template A の Ring G の部分で 80% 以上の占有率となる領域が見出され、この部分を trigger region と定義した。また、4 級炭素に結合する側鎖など、六角形の平面テンプレートの頂点に配置できない立体構造についても、配置できなかった残りの部分構造を収容する空間 (wing-shaped エリア) をテンプレート上に設けた。

テンプレートシステムの上方から入ってきた基質は、始めに trigger region で認識されて Template A 上に配置される。Trigger region を占有しつつ Template A の範囲内に基質全体を配置できた場合、acceptable と判定されて、テンプレートの oxidation site に位置している原子がその基質の reaction site となって反応する。基質全体が収容できない場合は、Template A からはみ出た側鎖が pinching point (Template A の position 12) で折れ曲がって Template B に入り込み、Template B の範囲内に側鎖が収まることで、oxidation site に位置する原子が reaction site となって反応する (Type I, 例として、図2に7-ベンジルオキシ-4-トリフルオロメチルクマリンの配置を示した)。Type I のテンプレートシステムで収まらない場合は、基質を pinching point (Template A の position 14) を通過させて Template B に配置させ、Template A に残りの側鎖を配置させる (Type II, 例として、図2にプロマジンの配置を示した)。両 Type とも、テンプレートに配置できない側鎖がある場合は、wing-shaped エリアの領域に収容する。テンプレート、wing-shaped エリアの両方で基質全体が範囲内に収まる場合に、acceptable と判定される。一方、部分構造が範囲を超えてしまう場合は unacceptable と判定され、反応が進行しないと予測される。

CYP2B6 で反応が進行しないものも含む 44 のプローブ基質を用いてテンプレートシステムのバリデーションを行った結果、今回構築されたテンプレートシステムは高い精度で反応の進行の有無を判定できた。また、基質の部位選択性や立体選択性もこのシステムで説明することができた。最終的に、CYP2B6 が代謝に関与する 82 化合物の 109 の反応について、テンプレートシステムによる判定が *in vitro* 実験データと一致した。

なお、今回構築したシステムは、基質が CYP2B6 で代謝を受けるかどうかを判定し、代謝を受ける場合はその反応部位を特定するデバイスであると考えている。すなわち、今回のテンプレートシステムでは、CYP2B6 の酵素タンパクの構造やリガンドと酵素との相互作用を、このシステムが直接反映しているとは考えていない。また、trigger region が酵素内のリガンドとの結合サイトに相当することは未だ証明されていない。さらに、wing-shaped エリアも基質を収容する酵素タンパクの形状を直接反映している必要性もなく、具体的な部位との対応を考慮していない。しかしながら、これまでに報告されている CYP2B6 代謝の特性を精度よく予測できた。

QSAR による *in silico* 予測モデルでは、基質の疎水性や電子密度などの数量に関する情報が必要であるが、今回はこれらのパラメーターをなるべく排除してシステム構築を行ったので、解析するための基質の特性情報や実験データなどを必要とせず、基質の構造のみで反応の有無を評価できるシンプルなシステムを構築できた。使用したソフトウェアも Chem Draw, Chem 3D と一般的に普及しているものであり、解析するための特別なソフトも必要ない。また、これまでのモデルでは、主要な反応領域までは決められても、反応する原子の位置までは決めることができていなかったが、今回のシステムは反応部位の特定までできるようになっている。

今回構築されたテンプレートシステムの今後の展開としては、このシステムを利用した反応のスコア化を考えている。今回のテンプレートシステムでは、基質の原子をなるべく各テンプレートの正六角形の頂点に配置したことから、占有率の高いテンプレート上の position に高い得点を与え、基質の原子が配置された各 position に与えられた得点を合計して反応をスコア化できるのではないかと考えている。基質内に複数の反応部位がある場合は、反応の優先順位をそのスコアでランク付けできると予想している。

今回は医薬品だけでなく、生体成分、農薬、環境物質などもモデルに当てはめて反応部位を特定することができたことから、情報の少ない薬物以外の分野でも利用できる可能性がある。また、医薬品開発の分野においても、予測された代謝部位を保護して合成展開したり、候補化合物の代謝物同定のスピードアップなど、創薬部門での利用も想定され、今後の本研究の進展が期待される。

## 審査結果の要旨

合成される医薬品候補の数も莫大で、全てをアッセイして代謝物を確認するのは事実上不可能である。このため、定量的構造活性相関 (QSAR) による薬物代謝の *in silico* 予測モデルが報告されている。しかし、実用可能な精度で予測ができていない。また、予測できたり、できなかったりしたことに対する科学的な解釈が得られない。CYP2B6 基質の化学構造に着目して、基質側から基質の反応部位を特定するテンプレートシステムの構築を試みた。すなわち、酵素タンパクの構造を考慮にいれず、CYP で代謝される基質の大きさ及び立体構造を重ね合わせることで、基質がテンプレート内に収まる範囲を推定した。また、構築されたシステムの妥当性を、該当する CYP で代謝されない薬物も含んだプローブ基質を用いて確認した。まず、CYP2B6 で代謝される多環芳香族炭化水素を重ね合わせ、共通して占有される領域からハチの巣のような六角形の格子状の平面テンプレートを 2 つ抽出した (Template A 及び B)。次に、立体構造を有する基質に適用させるため、この 2 つの平面テンプレートを T 字状に垂直に組み合わせ、2 つのタイプのテンプレートシステムを導出した (Type I 及び Type II)。CYP2B6 の基質は平面テンプレートの結合部位 (pinching point) で折れ曲がって片方もしくは両方のテンプレートに配置されると定義した。Type I, Type II のテンプレートシステムに 40 以上の CYP2B6 基質をランダムに選択して当てはめて、テンプレートの各頂点に基質の各原子が占有する割合を計算したところ、Template A の Ring G の部分で 80% 以上の占有率となる領域が見出され、この部分を trigger region と定義した。また、4 級炭素に結合する側鎖など、六角形の平面テンプレートの頂点に配置できない立体構造についても、配置できなかった残りの部分構造を収容する空間 (wing-shaped エリア) をテンプレート上に設けた。

CYP2B6 で反応が進行しないものも含む 44 のプローブ基質を用いてテンプレートシステムのバリデーションを行った結果、今回構築されたテンプレートシステムは高い精度で反応の進行の有無を判定できた。また、基質の部位選択性や立体選択性もこのシステムで説明することができた。最終的に、CYP2B6 が代謝に関与する 82 化合物の 109 の反応について、テンプレートシステムによる判定が *in vitro* 実験データと一致した。

なお、今回構築したシステムは、これまでに報告されている CYP2B6 代謝の特性を精度よく予測できた。このシステムは薬物代謝のみならず、新薬開発に寄与する事ことが予想される。

よって、本論文は博士薬学の学位論文として合格と認める。