

|         |   |
|---------|---|
| 氏名      | 増田 和文   |
| 授与した学位  | 博士  |
| 専攻分野の名称 | 薬学  |
| 学位授与番号  | 博乙第4030号  |
| 学位授与の日付 | 平成17年 3月25日   |
| 学位授与の要件 | 博士の学位論文提出者<br>(学位規則第4条第2項該当)  |
| 学位論文の題目 | Cytochrome P450 2D6とBunitrolol及びBufuralolの相互作用に関する計算化学的研究<br>— 活性中心におけるPhe-120, Glu-216 及び Glu-222の役割 — |
| 論文審査委員  | 教授 成松 鎮雄 教授 土屋 友房 教授 佐々木健二  |

## 学位論文内容の要旨

### 1 目的

CYP2D6 はヒトの肝ミクロソーム中に約 2%程度しか存在しないがオピオイド、鎮咳薬、抗うつ薬、降圧薬など臨床上重要な多くの医薬品の酸化代謝において、中心的な役割を担っている。さらに CYP2D6 は遺伝的多型性を有しており、医薬品の薬効や副作用における個体差の原因の 1 つとなっている。CYP2D6 による薬物の代謝機構を解明することは、CYP2D6 と新しい基質間の相互作用の予測を可能にし、さらには他の分子種も含めた CYP による代謝機構の解明につながると考えられる。本論文において bunitrolol (BTL) 及び bufuralol (BF) に対する CYP2D6 の代謝機構を解明する目的で分子動力学計算および最適化計算を行った。

### 2 方法

まず、モデル計算を行うには CYP2D6 の座標が必要となるが CYP2D6 は未だ結晶構造解析がなされていないため、SWISS-MODEL において既に結晶構造が解明されているウサギ由来の CYP2C5 を鋳型とするホモロジーモデルを構築した。さらに基質分子を活性中心に配置して酵素-基質複合体モデルの初期座標を作製した。これについて Insight II / Discover を用いて分子動力学計算および最適化計算を行い相互作用を検討した。

### 3 CYP2D6とBTLの相互作用

初期座標作成の段階で、heme 近傍にある Phe-120 が BTL の heme-Fe への接近に影響を及ぼしていることが予想された。これに基づいて Phe-120 を Ala へと置換した変異体 CYP2D6 (F120A) を作製し代謝活性を調べたところ、BTL の 4 位水酸化の活性は数十倍も上昇し、Km 値も著しく上昇することが明らかとなった。CYP2D6 (WT)-BTL 及び CYP2D6 (F120A)-BTL 複合体について分子動力学計算を行ったところ、BTL の 4 位炭素と heme-Fe の距離は 6.6 Å (WT) から 5.6 Å (F120A) へと約 1 Å 減少した。

### 4 CYP2D6とBFの相互作用

BF は、分子内に不斉炭素を持ち R 体 (R-BF)、S 体 (S-BF) との間で CYP2D6 の代謝活性が異なる。即ち、野生型 CYP2D6 の場合、 $R\text{-BF} \gg S\text{-BF}$  の基質エナンチオマー選択性を示し、また R-BF, S-BF いずれを基質とした場合も  $1^{\circ}R\text{-OH} < 1^{\circ}S\text{-OH}$  の代謝物ジアステレオマー選択性を示す。一方、F120A では S-BF の活性が大きく上昇し、 $R\text{-BF} \approx S\text{-BF}$  となる。さらに Glu-222 を Ala へと置換した E222A では WT の約 1/6 に活性が減少した。

この実験結果を説明する構造を探索したところ、BF の塩基性窒素が Glu-216, Glu-222 双方と静電的に強く結合する点は共通であるが、次の 2 種の異なる結合モデルが得られた。

(A) 高活性モデル：BF の水酸基が Glu-222 と水素結合して水酸化部位が heme-Fe に近い。

(B) 低活性モデル：BF の水酸基が Glu-216 と水素結合し、且つ WT の場合 BF のベンゾフラン環が Phe-120 とスタッキングし、水酸化部位が heme-Fe から遠い。

実験結果と対応させると CYP2D6 (WT) と S-BF を相互作用させた場合にのみ (B) の構造をとり、F120A 変異体においては R 体、S 体とも (A) の構造をとる可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

光学活性を有する医薬品である bunitrolol (BTL) 及び bufuralol (BF) に対する CYP2D6 の立体選択的代謝機構を解明する目的で分子動力学計算及び最適化計算を行った。まず CYP2D6 と BTL の相互作用では初期座標作製の段階で、ヘム近傍にある Phe-120 が BTL の芳香環と相互作用することが予想された。これに基づいて作製した Phe-120 を Ala により置換した変異体 CYP2D6(F120A) による BTL 4 位水酸化の活性は約 40 倍も上昇し、さらに  $K_m$  値も著しく上昇することが明らかとなった。次に CYP2D6 と BF の相互作用では CYP2D6 (WT) による BF 1'' 位水酸化反応において  $R\text{-BF} \gg S\text{-BF}$  の基質エナンチオマー選択性を示し、基質の  $R, S$  に関係なく 1''  $R\text{-OH} < 1'' S\text{-OH}$  の代謝物ジアステレオマー選択性を示す。一方、変異体 CYP2D6(F120A) では  $S\text{-BF}$  の活性が大きく上昇し、 $R\text{-BF}$  と同程度となる。この立体選択的代謝活性を説明することができる構造を探索したところ、次の 2 種の異なる結合モデルが得られた。

(A) 高活性モデル：BF の水酸基が Glu-222 と水素結合して水酸化部位がヘム鉄に近い。

(B) 低活性モデル：BF の水酸基が Glu-216 と水素結合し、且つ WT の場合 BF のベンゾフラン環が Phe-120 とスタッキングし、水酸化部位がヘム鉄から遠い。

実験結果に対応させると WT に  $S\text{-BF}$  を相互作用させた場合にのみ (B) の構造をとる可能性が示唆され、これは誘電率  $\epsilon = 6r$  の時エネルギー的に可能な構造であった。また、代謝物ジアステレオマー選択性は BF の芳香環についてのエチル基の回転角が支配的であることがわかった。さらに、CYP2D6 と BF の結合様式を BTL にも適用することで BTL の代謝活性及び  $K_m$  値についての説明が可能となった。

これらの知見は、CYP2D6 による光学活性医薬品の酸化反応における立体選択的代謝機構の一つを解明したものであり、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。