

P450と薬物代謝データベースと代謝物予測

Cytochrome P450, Drug Metabolism Database, and Prediction of Metabolites

あらまし

発見当初、特殊な酵素と考えられていたP450は、生物種を超えて広く分布し、多種多様な役割を演じていることが、最近までに明らかにされてきた。数百種類を超えるP450 (CYP) の数分の一が、哺乳動物の異物 (薬物) 代謝酵素である。これらの基質特異性は極めて広く、異物代謝においてキーとなる酵素である。CYPには遺伝的多型 (SNPs) があり、多型が、薬の効き方での、個人差の原因の一つとなっている。また、CYPが、化学物質による発癌^{はつがん}にも、関連していることも指摘されている。このことが、医薬品の研究開発の場で、異物代謝酵素やそれらによる代謝反応のデータベースの構築が望まれている理由である。

本稿では、P450研究の歴史、P450による異物代謝について述べ、開発中のP450異物代謝情報データベースおよび代謝物予測システムを紹介する。

Abstract

Recently, it has become apparent that cytochrome P450 (CYP) is widely distributed among the species and plays various important roles, although it was thought to be an enzyme participating in special reactions when it was first discovered. About 10% of the several hundred kinds of CYP are xenobiotic metabolizing (drug-metabolizing) enzymes of mammals. These CYPs have a very wide substrate specificity and are the key enzymes in drug metabolizing processes. CYPs have genetic single nucleotide polymorphisms (SNPs). It is thought that SNPs are partly responsible for the differences in drug effects among individuals and that CYP activity is connected with the carcinogenic activities of chemicals. Therefore, there is a demand for a database of CYP information and CYP metabolic products to assist in the research, development, and administration phases of drugs. This paper describes the history of CYP research and xenobiotic metabolism by CYP. This paper also introduces the CYP information database and metabolic-product prediction system that we are now developing. This database and system make it possible to use a chemical structure diagram or a metabolic reaction diagram for searching and predicting the metabolite of a target chemical based on the metabolic reaction data in the database.



朝永 惇 (ともなが あつし)
ライフサイエンス推進室 所属
現在、コンピュータケミストリーシ
ステム (CCS) 開発に従事。

ま え が き

著者らは、代謝反応とその阻害剤情報システム BioFrontier⁽¹⁾を開発、製品化した。その画面の一例を図-1に示す。BioFrontierは、約5,500件の代謝反応(主として一次代謝)、関連する酵素情報、およびそれらに対する約8,300の阻害剤情報を、CD-ROMに収載したものである。現在まで、製薬企業の研究所を中心に約40か所で利用されているが、種々改良すべき点が指摘されている。代表的なものに、P450による二次代謝反応や生体異物の代謝反応の追加、および代謝物の予測などがある。

本稿では、P450関連情報の重要性を述べるとともに、現在開発中のP450異物代謝情報データベースと代謝物予測システムを紹介する。

P450研究の歴史

P450とは、酸素を活性化して、多くの代謝反応(主として酸化反応)の触媒となる酵素の総称である。近年、医薬品の開発やその使用上で注目されているもののなかに約100種類の生体異物代謝酵素がある。医薬品の効果の個人差や生体異物の発癌性^{はつがんせい}に、それが関与していることが明らかにされつつある。

P450研究の歴史は、肝ミクロゾーム中に見いだされていた一酸化炭素結合性で450 nmに吸収極大値を有する色素^{(2),(3)}が、新種のヘム蛋白であることが明らかになり“P450”⁽⁴⁾と命名されたことで始まっている。システイン残基由来のS⁼が配位したヘム蛋白酵素であることが化学的特質である。当初はステロイド類や薬物の酸化反応に關する特殊な酵素と考えられていた。その後、多数の分子種が存在することが明らかになり、さらに、

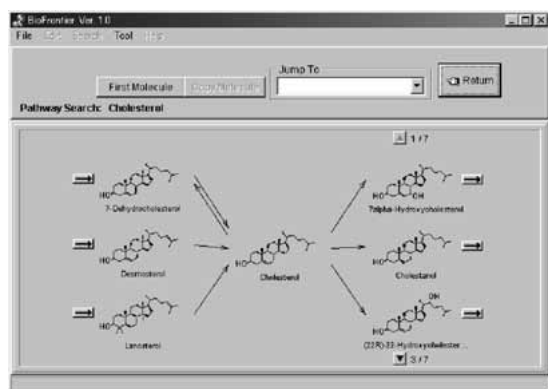


図-1 BioFrontierによる検索結果例

Fig.1-Example of search result by BioFrontier.

遺伝子レベルの研究が進むにつれ、生物界に広く分布し、反応の対象は、コレステロールやステロイドホルモンなどに代表される生体成分、植物のアルカロイド、微生物が生産する抗生物質のような二次代謝物などの合成経路上の反応から、医薬品などの人工産物の代謝反応など、多岐にわたっている。酵素遺伝子スーパーファミリー^(注1)を構成していること⁽⁵⁾も明らかにされ、その数は数百に及んでいる。最近では、600を超すP450の一次構造(アミノ酸配列)が明らかにされた。それにより、分子進化論的方法によってP450分子種相互間の進化上の類縁関係を解析することも可能になり、配列変化(構造変化)と機能の関係の解析も進められている。

P450の構造と機能の関係を、最も直接的に知る方法は、X線構造解析による3次元構造の解明である。現在までに5種類のP450⁽⁶⁾⁻⁽¹⁰⁾のそれが明らかにされている。3次元構造の比較が総説⁽¹¹⁾に述べられている。一次構造の相同性は低いにもかかわらず、二次構造や活性部位の構造など、基本的な分子構造はよく似ているとされている。したがって、酵素個々の基質特異性や反応の特異性は、細部の構造の違いによると考えられている。上記5種類のP450は非膜結合型酵素であり、異物代謝P450など真核生物の膜結合型P450の構造は現在までのところ解かれていないが、報告されている立体構造と類似していると想像されている。これらをもとにしてコンピュータモデリング(ホモロジーモデリング)を行うことにより、個々のP450の特徴を見いだすことも可能であろう。

P450による酸化反応は、分子状酸素を活性化し1個の酸素原子が基質に添加され、もう一方の酸素は水となる反応である。その活性化機構も詳細に調べられ、総説⁽¹²⁾にも分かりやすく述べられている。最近では、医学、薬学分野でも多くの研究成果が蓄積されており、P450は医薬品など生体異物の代謝において、キーとなる酵素であり、その薬効や毒性発現に大きな影響力を持っていることが明らかになりつつある。

P450による異物代謝

医薬品のように本来生体中に存在しない化合物を、あたかも以前から体内にあったかのように代謝する酵素が存在することは、一見不思議である。人間を含み哺乳動物は食物連鎖の上位にあり、植物など食餌^{しょくじ}となるより下位の生物に含まれる毒性の物質の危険に曝^{さら}されてき

(注1) 同一の遺伝子を祖先とし、進化の過程で種々の異なる遺伝子へ分化した遺伝子群。

た。そのような物質を解毒する形質を獲得した生物は生存上有利であり、このことが、進化的に人間など哺乳動物が異物代謝酵素を持つに至った理由であろう。数多くの毒性物質に対応できるためには、基質特異性の低い酵素の方が好ましい。事実、異物代謝に関与する酵素の特異性は極めて広く、数十種類の医薬品を代謝する酵素もある。この役割を担っているのが、約100種類のチトクロームP450 (CYPとも略され、CYP_nX_m, n, mは自然数, Xは大文字アルファベット, に分類されている) であり、肝臓に最も多く含まれている。解毒の機能は、外来性の化学物質に酸素を添加(酸化)し、より水溶性の高い代謝物に変え、体外への排出を容易にすることで、実現されている。

病気になる薬が投与されると、P450をはじめとする酵素によって代謝、排出される。もし、これらの薬物代謝酵素が存在しないと、投与された薬が永く体内に留まり効き目が強くまた永く効き過ぎ、副作用の原因ともなり、不都合である。事実PCBやダイオキシン類は代謝を受け難く、毒性を発揮している。医薬品の開発において、その薬がP450によりどのような速さでどのように代謝されるかを知ることが、極めて重要な課題となってくる理由である。また、CYPには多型(SNPs)があり、同一の酵素であってもその活性に差(個人差)がある場合がある。さらに、ある特定のCYPが遺伝的に欠損している場合もある。特定の薬に対する代謝活性が高い場合その薬が効きにくくなることが考えられる。これが薬の効き方の、個人差の理由の一つと考えられている。逆に、個人の種々CYPの酵素活性を事前に知ることができれば、各個人に効果がある薬を個別に投与することが可能となるかもしれない。

このようにP450は生体にとってたいへん有益な酵素であるが、時に代謝過程で化学的に反応性の高い代謝物に変換することがある。この結果、その代謝物がDNAと共有結合し遺伝子を損傷して発癌の原因^{(13),(14)}になったりもする。このことは逆に、そのような酵素の活性が低い場合や欠損している場合、発癌のリスクが低いことも予想される。このような仮説を証明するための様々な研究が行われている。^{(15),(16)}

多くの化合物によってCYPが誘導発現されると同時に、薬を含み多くの化合物が特定のCYPに強く結合しその酵素活性を著しく低下(阻害)させる場合がある。複数の薬が投与され、一方の薬が特定のCYPと強く結合し、他方の薬がその酵素により代謝される場合、他方

の薬の血中濃度が上昇し効き過ぎを起こし、副作用につながる場合がある。このような薬物相互作用の例が多数報告⁽¹⁷⁾されている。

どのCYPが、どのような薬物を代謝するか、どのような薬物により阻害されるかは総説⁽¹⁸⁾などにまとめられているが、より広範囲のデータを網羅し、種々の検索が可能なデータベースが望まれている。

P450データベースと異物代謝の予測

前章までに、医薬品の研究開発や薬剤投与の場面でCYPに関する情報の重要性を述べた。つぎに、P450に関する情報がどのようにして得られるかを紹介する。新たに発見・登録されたP450については、Nelsonのホームページ⁽¹⁹⁾から、その遺伝子配列、アミノ酸配列をはじめとし種々の情報を得ることができる。また、ホームページ⁽²⁰⁾からRendicが収集した多くのCYP(人間のCYPが中心)に関し、CYPによる医薬品(医薬品以外の生体に対する異物も含む)の代謝の情報、CYPを阻害する物質や誘導する物質を知ることができる。収集されている文献は、現在のところ約4,000件であり、定期的に追加されている。以上は無償で利用できるサイトであるが、最近、有償ではあるが、P450遺伝子全般、薬物代謝酵素、さらにP450遺伝子多型情報を網羅したデータベース⁽²¹⁾がバイオ情報化学産業コンソーシアム(JBiC)より公開されるようになってきている。

このように薬物や異物の代謝に関する情報は得やすくなってきているが、医薬品の研究開発の面からは物足りない点がある。いずれのデータベースでも、CYPに係る医薬品など低分子化合物の構造による検索ができないことである。有料のソフトウェアとしてMDL Information Systems Inc. のMetaboliteがある。このソフトは、P450による代謝に限定せず動物に投与されて薬物がどのような代謝物となるか(in vivo^(注2))が約10,000件収載されており、化合物構造による種々の検索が可能である。しかし、大部分のデータが古く実用上問題とされている。

一方、報告されている代謝反応を知るだけでなく代謝反応未知の化合物について、その代謝物を予測したい欲望がでてくる。医薬品の研究開発の場で代謝物の予測が可能であれば、この情報と化合物合成知識をもとに、毒性を示す代謝物を生じないようにある種の代謝反応を抑

(注2) 生体をそのまま実験対象とすること。

えたり、望ましい代謝反応を促進させたりするなどをし、研究の初期段階で合成候補化合物を絞ることができ、研究開発の効率を向上させることができる。代謝物予測システムとして、CompuDrug Ltd. のMetabolexpertとLahsa LimitedのMETEORがある。いずれも知識ベースシステムであり、主としてin vivoでの代謝反応データに基づき予測ルールを作成して用いている。前章で述べた不安定で高活性の代謝物はin vivoでは観測され難く、そのような代謝物の予測は困難である。

以上の背景下で、著者らはRendicらが収集した文献データより構造式、反応式を抽出し、構造式や反応式による検索が可能なデータベースを構築するとともに、それらデータに基づき、代謝物を予測するシステムを開発中である。以下にそれについて述べる。

予測は、既知トランスフォームを代謝物の予測をしたい化合物構造に適用することによって行っている。その手順を説明すると、まず既知代謝反応の反応中心を求める。反応中心とは、反応基質と反応生成物構造中で対応する原子対の中で、反応前後で化学的環境が異なる原子対のことである。その一例を図-2に示す。図中点線で結ばれているのが反応中心原子である。つぎに、各反応中心原子から所定の結合数以内でたどれる原子を抽出し、図-2の下図のような反応部分構造を求める。図の例では、所定の結合数は1である。この反応部分構造から点線を

除き、反応式としたものをトランスフォームと呼んでいる。予測対象となる化合物構造中にトランスフォーム式の左辺の構造が含まれていれば、このトランスフォームが適用可能である。トランスフォームは反応前後での結合の組替えを意味しているので、それを化合物に適用することにより、予測代謝物構造を生成することができる。既知反応から予測代謝物の生成までを、構造式面から見た様子を図-3に示す。対象化合物に、既知代謝反応から導かれた多数のトランスフォームの適用可否を調べ、適用可能なものについてそれを実行することにより、可能性のある代謝物を多数生成することができる。

前述の所定の結合数について、その数が多くなるほど

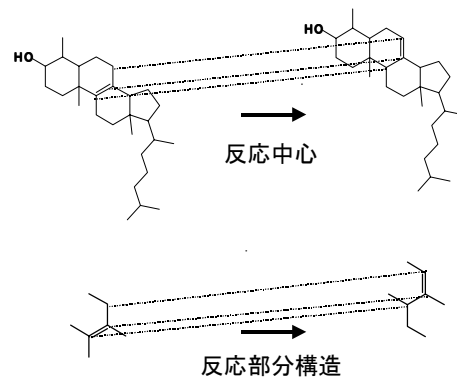


図-2 反応中心と反応部分構造

Fig.2-Reaction center and partial reaction structure.

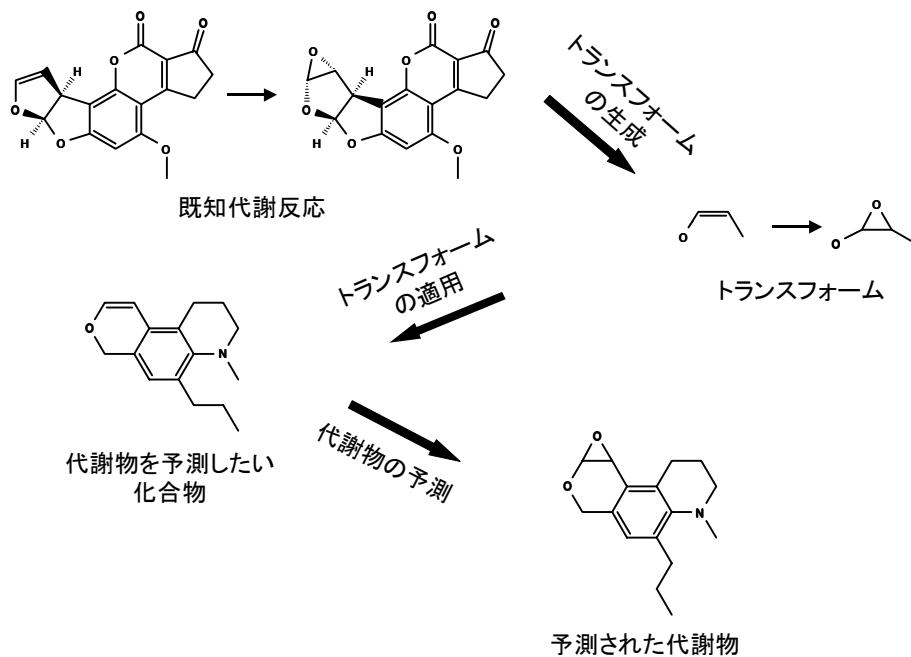


図-3 トランスフォームの適用による代謝物の予測

Fig.3-Prediction of metabolite by applying a transform.

生成される予測代謝物の数は少なくなる。そこで、開発中のシステムでは、所定の結合数の異なるトランスフォーム群を用意し、望ましい生成物数となるように、トランスフォーム群を使い分けることができる。また、利用者が所有する代謝反応データからトランスフォームを生成し、併せて使用することも可能である。さらに、多くの研究者の利用が想定されるので、Webで利用可能な代謝データベース、予測システムとして開発を進めている。

む す び

P450の研究の概要を紹介し、医薬品の研究開発の場でP450関連情報の必要性を述べた。今後の課題として、現在構築中のデータベースを継続的に充実させることの重要性を指摘したい。また、代謝物予測に関して、予測精度の向上のためにCYPの3次元構造も考慮した基質特異性の解明が今後の課題である。そのような試み^{(22),(23)}も行われ始めており、その進展を期待したい。

参考文献

- (1) <http://venus.netlaboratory.com/material/messe/biofrontier/>
- (2) M. Klingenberg : *Arch. Biochem. Biophys.* , Vol.75 , p.376 (1958) .
- (3) D. Garfinkel : *Arch. Biochem. Biophys.* , Vol.75 , p.493 (1958) .
- (4) T. Omura et al . : *J. Bio. Chem.* , Vol.237 , p.1375 (1962) .
- (5) D. W. Nerbert et al . : *DNA* , Vol.8 , p.1 (1989) .
- (6) T. L. Poulos et al . : *J. Biol. Chem.* , Vol.260 , p.16122 (1985) .
- (7) K. G. Ravichandran et al . : *Science* , Vol.261 , p.731 (1993) .
- (8) C. A. Haseman et al . : *J. Mol. Biol.* , Vol.236 , p.1169 (1994) .
- (9) J. R. Cupp-Vickery et al . : *Nature Str. Biol.* , Vol.2 , p.144 (1995) .
- (10) S. Y. Park et al . : *Nature Str. Biol.* , Vol.4 , p.827 (1997) .
- (11) 城宣嗣ほか : P450の立体構造 : 普遍性と個別性 . 化学と生物 , Vol.36 , No.7 , p.461-464 (1998) .
- (12) 島田秀夫 : P450による酸素の活性化機構 : 多様性と統一性 . 化学と生物 , Vol.36 , No.7 , p.465-469 (1998) .
- (13) F. P. Guengerich et al . : *Chem. Res. Toxicol.* , Vol.4 , p.391 (1991) .
- (14) T. Simada et al . : *Cancer Rev.* , Vol.56 , p.2979 (1996) .
- (15) 今井嘉郎ほか : 蛋白 核酸 酵素 . Vol.43 , p.203 (1998) .
- (16) K. Kawajiri et al . : *Jap. J. Cancer Res.* , Vol.82 , p.1325 (1991) .
- (17) 鎌滝哲也ほか : 薬物動態 . Vol.11 , p.282 (1996) .
- (18) 島田力他 : 薬物・毒物・癌原物質の代謝に関与するヒトのチトクロームP450 . 化学と生物 , Vol.36 , No.10 , p.659-663 (1998) .
- (19) <http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>
- (20) http://www.gentest.com/human_p450_database/index.html
- (21) 北島正人 : チトクロームP450及び薬物代謝酵素データベースシステム . 細胞 , Vol.33 , No.12 , p.478-481 (2001) .
- (22) M. J. de Groot et al . : Novel Approach To Predicting P450-Mediated Drug Metabolism : Development of a Combined Protein and Pharmacophore Model for CYP2D6 . *J. Med. Chem.* , Vol.42 , No.9 , p.1515 (1999) .
- (23) S. A. Islam et al . : A three-dimensional molecular template for substrates of human cytochrome P450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation . *Carcinogenesis* , Vol.12 , No.12 , p.2211 (1991) .