

## 2P077 CYP3A4 によるカルバマゼピン酸化機構

(千葉大院薬<sup>1</sup>・千葉大病院薬<sup>2</sup>) 畑 晶之<sup>1</sup>, 田中良和<sup>1</sup>, 京田直子<sup>1</sup>,  
刑部泰輔<sup>1</sup>, 幸 瞳<sup>1</sup>, 石井伊都子<sup>1</sup>, 北田光一<sup>2</sup>,  
根矢三郎<sup>1</sup>, 星野忠次<sup>1</sup>

**【緒言】** シトクロム P-450 (CYP) は薬物代謝酵素として広く知られている酵素であり、芳香族及び脂肪族の基質に対し酸素原子添加を行う酵素である。ヒトにおける薬物代謝には数種類の CYP が関与するとされているが、中でも CYP3A4 は現在臨床使用され、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 (Figure 1 の結合 1-2 のエポキシ化) のみを行う。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、エポキシ化体のポテンシャルエネルギーは芳香環水酸化体よりも約 20 kcal/mol 高いことがわかった。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？本研究では CYP3A4 による CBZ の代謝において、このような基質酸化部位特異性が生じる理由を分子力場計算及び密度汎関数法計算により明らかにすることを試みた。

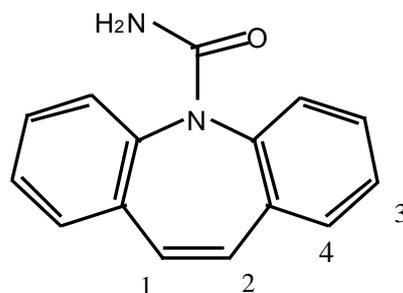


Figure 1 カルバマゼピン

**【方法】** ホモロジーモデリングにより構築された CYP3A4[1]の活性部位に CBZ を配置し、酵素の周囲に水分子を発生させて分子力場計算を行った。計算プログラムは AMBER6.0 である。得られた構造より基質、ヘム、Cys442 および基質と相互作用する残基を抜き出して量子化学計算を行うためのモデル化合物を構築し、構造変化に伴うポテンシャルエネルギー変化を求めた。計算には密度汎関数法を用い、交換項には Becke の式[2]を、相関項には Lee-Yang-Parr の式[3]を採用した。基底関数系は 3-21G\*\*および 3-21G である。反応の律速段階においては 6-31G\*\*を用い、エネルギー計算を行った。また、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[4]。計算プログラムは Gaussian98 である。

**【結果および考察】** はじめに、CYP3A4 による CBZ エポキシ化反応メカニズムを求めた。二重項における反応 初期構造 (Figure 2(D1)) において、CBZ はそのカルバモイル側鎖が Phe304 主鎖カルボニル基の酸素原子と水素結合することで保持されている。また、CBZ の被エポキシ化部位 (Figure 1 の結合 1-2) はヘムの第 6 配位座にある酸素原子とそれぞれ 2.89 Å、3.40 Å で相互作用している。この構造からヘムの酸素原子と CBZ の 1 の C 原子との距離が短くなるにつれてポテンシャルエネルギーが上昇し、2.10 eV で遷移状態 (Figure 2(D2)) が得られた。遷移状態を越えると 1 の C 原子とヘムの酸素原子とが結合を形成する (Figure 2(D3))。さらに、ヘムの酸素原子と 2 の C 原子との距離が短くなるとポテンシャルエネルギーが少し上昇し、2.11 eV で遷移状態 (Figure 3(D4)) を迎えたのち、結合を形成してエポキシ化反応は終了する (Figure 3(D5))。反応中、Phe304 と CBZ との水素結合は常に保たれていた。反応の律速段階は最初の反応で、活性化エネルギーは 13.8 kcal/mol であった。

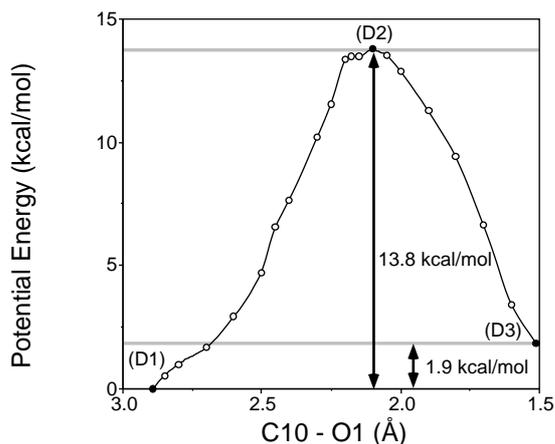


Figure 2 カルバマゼピンエポキシ化  
(二重項)における第一素反応の  
ポテンシャルエネルギー変化

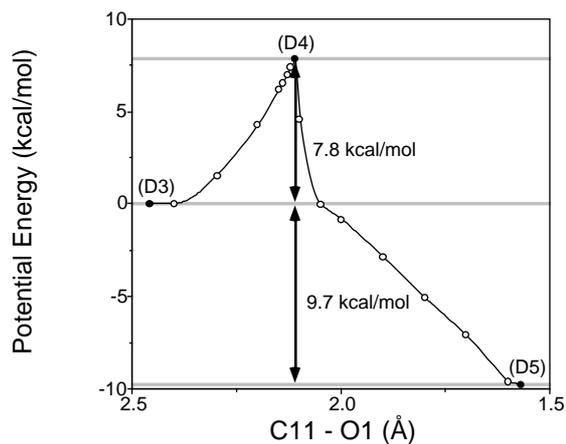


Figure 3 カルバマゼピンエポキシ化  
(二重項)における第二素反応の  
ポテンシャルエネルギー変化

**四重項における反応** 二重項の場合と同様、CBZはPhe304により水素結合で保持され、CBZの被エポキシ化部位(Figure 1の結合1-2)はヘムの酸素原子とそれぞれ2.88、3.40で相互作用している。反応も二重項の場合と同様、はじめにヘムの酸素原子とCBZの1のC原子とが結合を形成し、次いでヘムの酸素原子と2のC原子とが結合を形成してエポキシ化体が生成する。反応中、Phe304とCBZとの水素結合は常に保たれていた。反応の律速段階は最初の反応で、活性化エネルギーは22.6 kcal/molであった。

初期構造においてCBZがPhe304により水素結合で保持され、かつ、被エポキシ化部位がヘムの酸素原子と相互作用していることから、CYP3A4の活性部位はCBZに対しエポキシ化を起こすための立体構造を有していることがわかる。

二重項での反応と四重項での反応とをまとめると、初期構造においては四重項が安定であるが、一段階目の遷移状態や中間体構造では二重項が安定であった。すなわち、反応中にスピン状態の入れ替わりが起こっていることが示唆された。このことを考慮に入れると、律速段階における活性化エネルギーは15.1 kcal/molと算出された。また、B3LYP/6-31G\*\*によるエネルギー計算では、21.3 kcal/molとなった。

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。ヘムに配位している酸素原子がFigure 1の3や4と最初に結合した場合の活性化エネルギーは結合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。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。

#### 参考文献

- [1] G. D. Szklarz and J. R. Halpert, *J. Comput.-Aided Mol. Design*, 11, 265-272(1997)
- [2] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98, 5648-5652 (1993)
- [3] C. Lee, W. Yang and G. Parr, *Phys. Rev. B* 37, 785-789 (1988)
- [4] S. P. de Visser, F. Ogliaro, N. Harris and S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 3037-3047(2001)