

(徳島大学 院・薬) ○糸川 大祐, 村上 良真, 山内 あい子, 中馬 寛

1. はじめに

アゾール化合物は農薬、殺菌薬、抗真菌薬として幅広く広く利用されている。これらの化合物は、真菌のチトクロム P450 (CYP) に対して強い阻害作用を示し、真菌の細胞膜にラノステロールを蓄積させ、細胞膜機能の維持に必要なエルゴステロールを欠乏させる。CYP に対する阻害作用は、アゾール化合物が有する求核性窒素原子が CYP のヘム鉄に配位することによるものである。このとき、430 nm 付近に山、390 nm 付近に谷を持つ type II 結合スペクトルが生じる¹⁾。Type II スペクトルはイミダゾール基やアミノ基などヘムに配位できる窒素原子を有する化合物で観察されるため、CYP-アゾール化合物の相互作用を解析する上でその変化は有用な情報を与える。本研究では、アゾール化合物とラット CYP2B, CYP3A との結合活性を type II スペクトル変化を用いて測定した。さらに、CYP2B および CYP3A の各アゾール化合物との結合活性値について、分子特性との関係から考察を行った。

2. 方法

2-1. アゾール化合物

本研究で用いた化合物は、metconazole, uniconazole, tebuconazole, propiconazole, hexaconazole, flusilazole, cyproconazole, triadimenol, fluconazole, imibenconazole, 1-methy-1,2,4-triazole, clotrimazole, ketoconazole, miconazole, triflumizole, 1-phenylimidazole, 1-methylimidazole, *N*-(*n*-butyl)imidazole である。

2-2. 結合活性

7週齢の Wistar 系雄性ラットに phenobarbital (PB, 70 mg/kg *i.p.*, 3 days)、dexamethasone (DEX, 100 mg/kg *i.p.*, 4 days) を投与しそれぞれ CYP2B と CYP3A を誘導させ、常法により肝ミクロソームを調製した後、分光光度法により P450 含量を測定した。1 mg/ml ミクロソーム懸濁液に 0.01~100 μ M のアゾール化合物を添加した後、自記分光光度計で P450-基質結合差スペクトル測定を行った²⁾。pK_d (log(1/K_d))は Dixon プロットにより、pIC_{50s} (log(1/IC_{50s}))は type II スペクトルの飽和値の 50% に対応する濃度(IC_{50s})表わし、EC50MV を用いて IC_{50s} を決定した³⁾。

2-3. 活性部位の比較

異なる CYP の活性部位を比較する目的で、3 次元構造既知の各種 CYP (ヒト CYP3A4, 2C9, ウサギ CYP2C5, *Mycobacterium Tuberculosis* CYP51, *Bacillus megaterium* CYP102)に metyrapone (2-methyl-1, 2-di (3-pyridyl)-1-propanone)をドッキングさせ、metyrapone から半径 5/7/9/11 Å の残基の組成について検討した^{4, 5)}。これらのモデリング結果と実験結果について検討を行った。

2-4. QSAR 解析式

QSAR 解析において Bilinear Model, $\log(1/C) = a \log P + b \log(\beta P + 1) + const$ を用いた⁶⁾。

3. 結果と考察

3-1. 化合物の疎水性と CYP 結合活性の相関

CYP2B あるいは 3A とアゾール化合物の log *P* と pK_aの間には図 1 に示すような関係が見られた。これを QSAR 解析した結果、以下に示す回帰式を

得た[式 1-4].

【CYP2B】

$$\text{pIC}_{50} = 1.124 (\pm 0.157) \log P - 1.348 (\pm 0.242) \log (\beta P + 1) + 0.302 (\pm 0.221) I_{\text{azole}} + 2.921 (\pm 0.314)$$

$$n = 18, r = 0.980, s = 0.209, F = 115, \log \beta = -2.42$$

$$\log P_{\text{opt}} = 3.42 \quad [1]$$

$$\text{p}K_{\text{d}} = 1.124 (\pm 0.140) \log P - 1.265 (\pm 0.224) \log (\beta P + 1) + 0.297 (\pm 0.210) I_{\text{azole}} + 3.022 (\pm 0.298)$$

$$n = 18, r = 0.981, s = 0.198, F = 118, \log \beta = -2.57$$

$$\log P_{\text{opt}} = 3.47 \quad [2]$$

【CYP3A】

$$\text{pIC}_{50} = 1.144 (\pm 0.112) \log P - 1.394 (\pm 0.195) \log (\beta P + 1) + 0.211 (\pm 0.189) I_{\text{azole}} + 3.270 (\pm 0.261)$$

$$n = 16, r = 0.990, s = 0.169, F = 188, \log \beta = -2.86$$

$$\log P_{\text{opt}} = 3.49 \quad [3]$$

$$\text{p}K_{\text{d}} = 1.071 (\pm 0.136) \log P - 1.336 (\pm 0.235) \log (\beta P + 1) + 0.262 (\pm 0.227) I_{\text{azole}} + 3.210 (\pm 0.313)$$

$$n = 16, r = 0.982, s = 0.204, F = 110, \log \beta = -2.81$$

$$\log P_{\text{opt}} = 3.42 \quad [4]$$

ここで I_{azole} は indicator variable であり, 化合物がトリアゾール環を含む場合は 0 を, イミダゾール環を含む場合は 1 をとる.

式 1-4 から得られた $\log P_{\text{opt}}$ はそれぞれ 3.4~3.5 であり, CYP2B と 3A にはそれぞれの最適 $\log P$ 値 ($\log P_{\text{opt}}$) が存在し, この値を超えると化合物の結合親和力が低下することになる.

式 1-4 において, I_{azole} の係数はすべて正であり, それらの値は 0.2~0.3 である. このことから, イミダゾール環はトリアゾール環よりもヘムに対して 0.3~0.4 kcal/mol 高い結合配位エネルギーを有することが示唆された. イミダゾールがトリアゾールよりエネルギーの高い π -, σ -, HOMO をもつことがその理由の一つとして考えられる.

3-2. スペクトル強度 (ΔA_{max}) と疎水性との相関

CYP に対する結合スペクトルは二つに分類され, それぞれ type I と type II スペクトルと呼ばれている. Type I スペクトル変化はリガンドの疎水部位が CYP の疎水性残基と相互作用するため生じ, 390 nm 付近に山, 420 nm 付近に谷を持つ. 一方, イミダゾール基やアミノ基などヘムに配位できる窒素原子が結合すると 430 nm 付近に山, 390 nm 付近に谷を持つ type II スペクトルが生じる. スペクトル測定の結果得られた CYP2B と 3A に対する各化合物の ΔA_{max} と $\log P$ と関係を, 図 2 に示した.

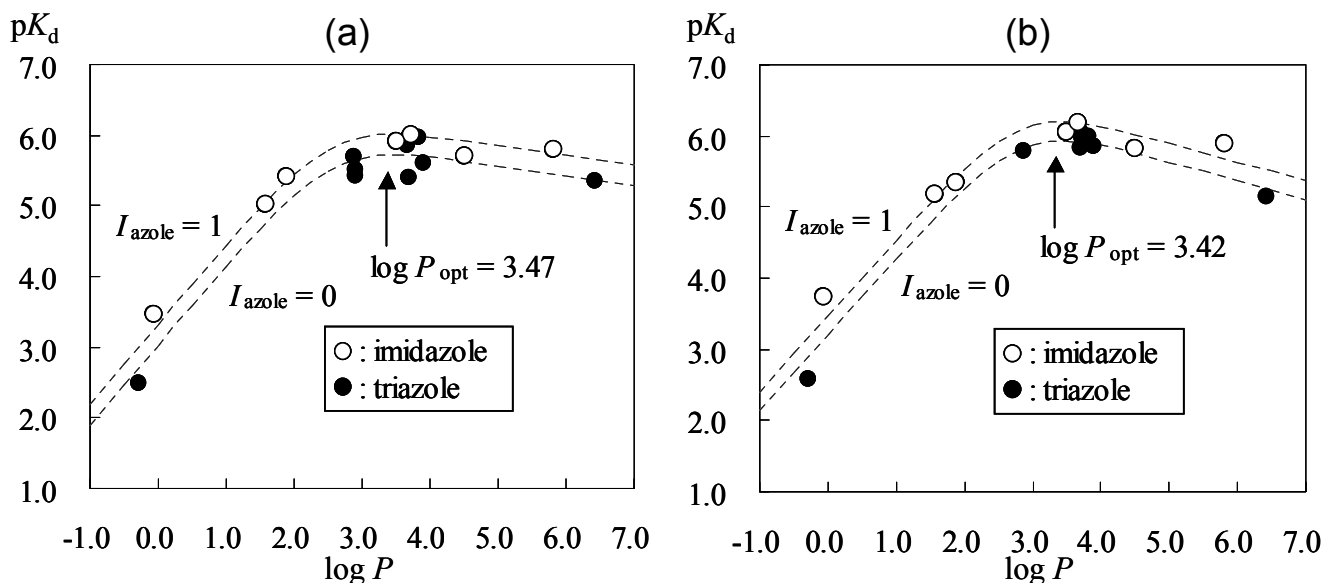


図1. CYP2B (a)とCYP3A (b)における各化合物の $\log P$ と結合活性値 ($\text{p}K_{\text{d}}$)

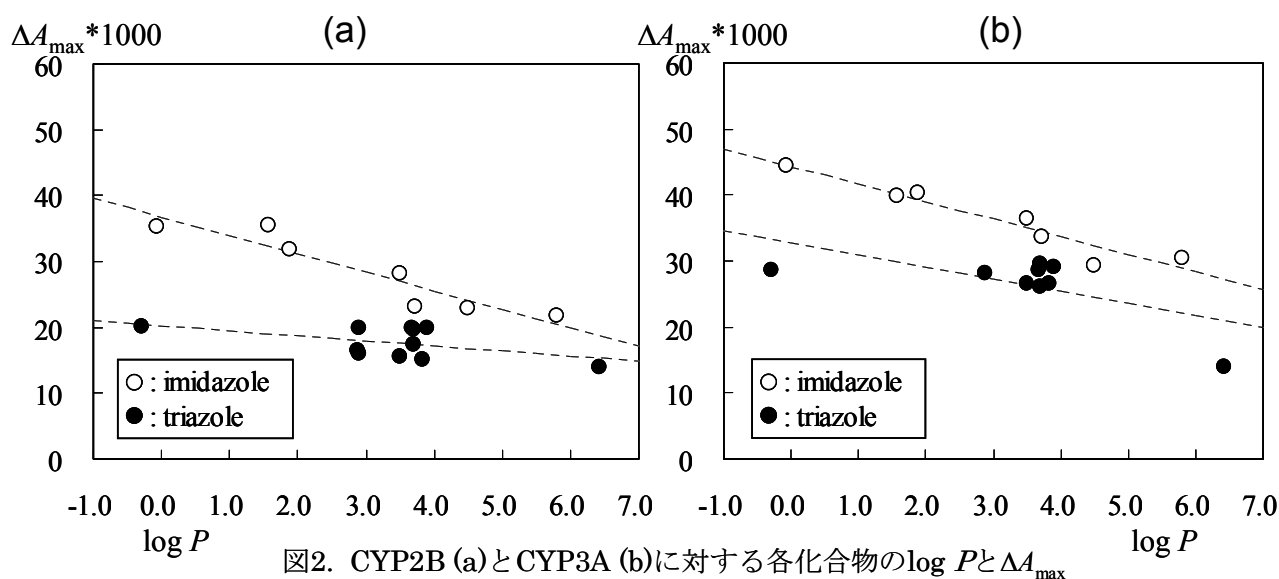


図2. CYP2B (a)とCYP3A (b)に対する各化合物の $\log P$ と ΔA_{\max}

ΔA_{\max} は $\log P$ が増大するにしたがって、減少する傾向が見られた。この結果は化合物の疎水部位が CYP の疎水性残基と相互作用した結果、type I 結合スペクトルが生じて、type II スペクトルと重なり合ったためと考えられる。さらにイミダゾールとトリアゾール化合物を比較すると、イミダゾール系化合物のほうは ΔA_{\max} が大きく、イミダゾール系化合物のほうがヘムへの配位がより強いことを支持している。これは式[1-4]の indicator variable I_{azole} の係数が正であることからの推測と合致する。また、CYP3A の ΔA_{\max} は CYP2B よりもわずかながら大きいことから、CYP3A のほうが 2B よりアゾール化合物と疎水性蛋白残基との相互作用がやや小さいことが示唆された。

3-3. 活性部位の比較

図 3 に methyrapone から半径 7 Å に存在する CYP3A4 および CYP102 の基質および触媒活性ポケットの構造を示した。CYP3A のほうがより広い結合ポケットを有していることが推測される。さらに 5 種類の CYP(3A4, 2C9, 2C5, 51, 102)の methyrapone から 5/7/9/11 Å 以内のアミノ酸残基の組成について検討した結果、疎水性残基の割合がどの距離においてもほぼ 6 割を超えていた (図 4)。このことから各 CYP の触媒活性ポケットでは疎水性残基の割合が高く、リガンドの疎水部位との相互作用が重要となることが予想される。さらに

図 4 から CYP3A の結合ポケットの大きさが他の CYP に比較して若干大きいことが示唆された。

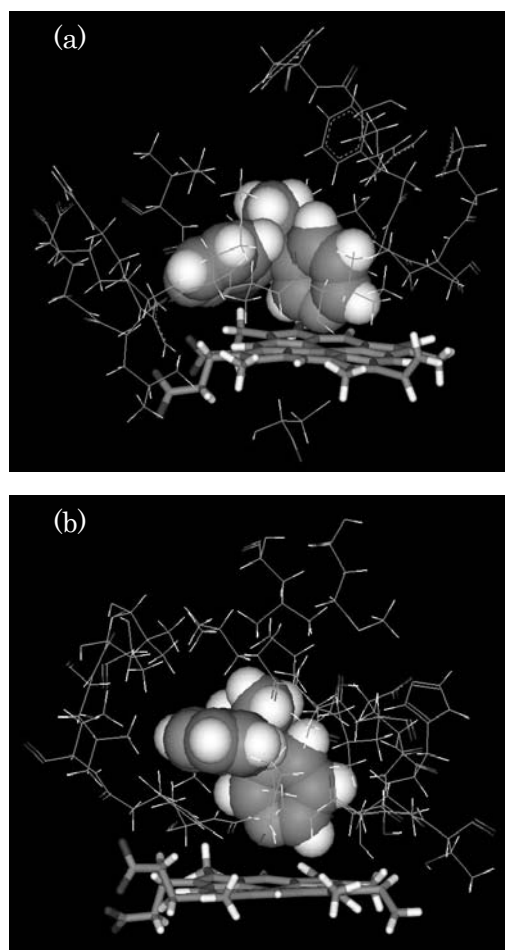


図 3. CYP3A4 (a) および CYP102 (b)の活性ポケット近傍 (methyrapone から半径 7 Å 以内) の比較

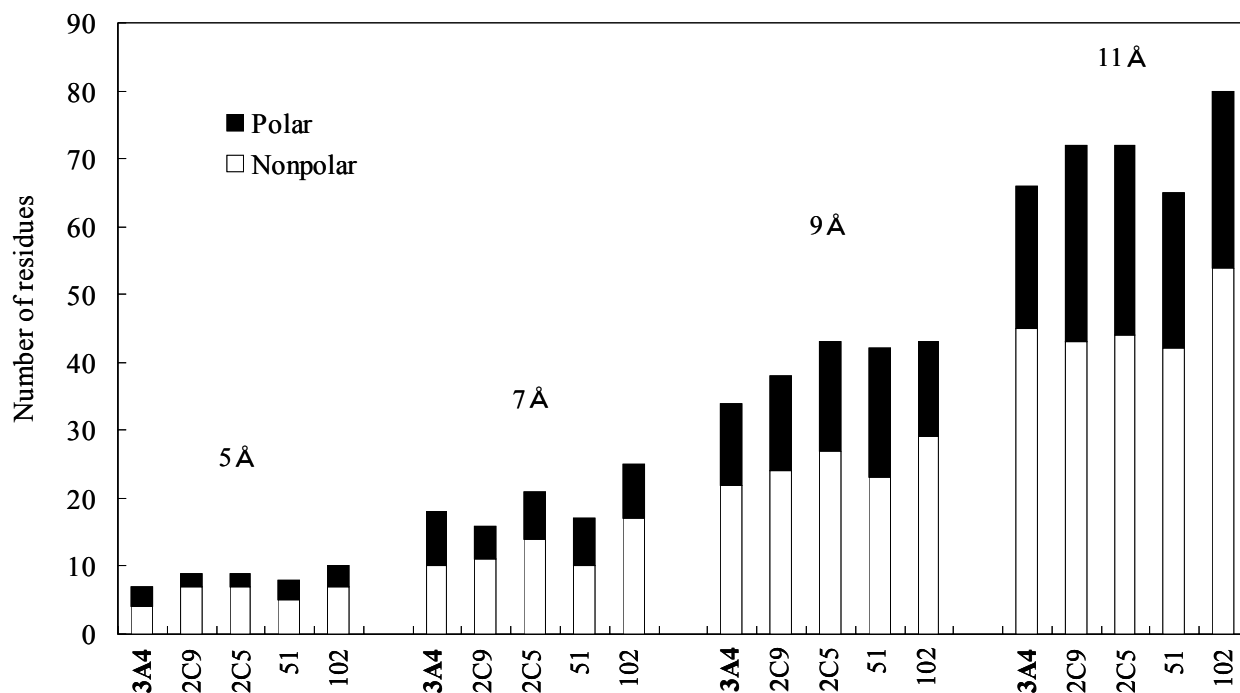


図 4. Metyrapone から各距離以内に存在するのアミノ酸残基の数と組成

4. まとめ

本研究でCYP2BとCYP3Aに対する各アゾール化合物の結合活性を測定した結果、すべての化合物でtype II結合スペクトルが観察された。モデリングで3A4は他のCYPと比較して触媒活性ポケットが大きいことが示唆されたが、本実験ではCYP2BおよびCYP3Aとのtype II結合におけるアゾール化合物の $\log P_{\text{opt}}$ はほぼ同じであった。これまでに、基質の疎水性とCYP酵素活性に関する構造活性相関解析については幾つかの研究がなされているが^{7,8)}、いずれも解析対象化合物の $\log P$ 範囲が0~5付近であったため、得られた回帰式は $\log P$ の1次式であった。本研究では、CYPとアゾール化合物のtype II結合には $\log P_{\text{opt}}$ が存在し、この値を超えると化合物の結合親和力が低下することを明らかにした。

本実験で用いたPB誘導型ラットとDEX誘導型ラットの肝ミクロソーム標品は、それぞれCYP2Bおよび3Aを主成分として含むが、今後は精製したCYPに対する各化合物の結合測定を行う予定である。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、アゾール化合物をご提供いただいた呉羽化学錦総合研究所 熊沢智副所長に、深く感謝いたします。

6. 引用文献

- 1) Y. Yoshida, H. Kumaoka: *J. Biochem.* **78** (1975), 455-468.
- 2) T. Wiggins, B.C. Baldwin: *Pestic. Sci.* **15** (1984) 206-209.
- 3) J. E. Throne *et al.*: *J. Econ. Entomol.* **88** (1995) 1513-1516.
- 4) PDB code; 1WOG (CYP3A4), 1OG5 (CYP2C9), 1N6B (CYP2C5), 1E9X (CYP51), 1JPZ (CYP102).
- 5) P.A. Williams *et al.*: *Science* **305** (2004) 683-686
- 6) C. Hansch *et al.*: *In Comprehensive Medicinal Chemistry*, Pergmon Press, Oxford **4** (1990) 506-511.
- 7) D.F.V. Lewis *et al.*: *Drug Discov. Today* **9** (2004) 530-535..
- 8) C. Hansch and L. Zhang: *Drug. Metab. Rev.* **36** (2004) 105-156.