

表 2-1(a) フッ素化化合物およびフタル酸エステル類などの化合物 (学習系)

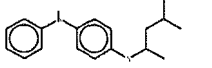
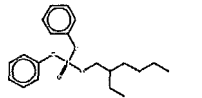
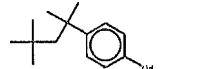

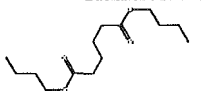
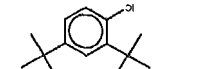
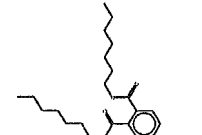
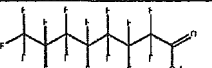
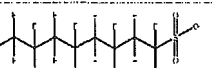
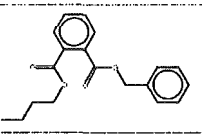
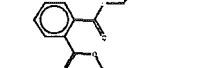
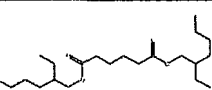
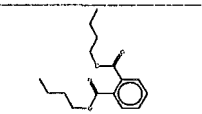
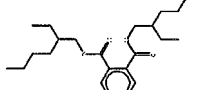
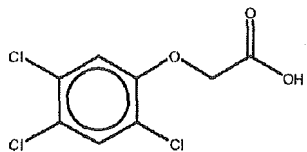
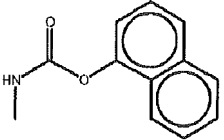
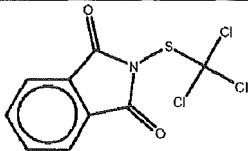
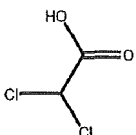
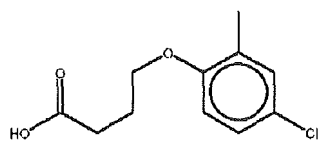
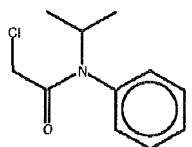

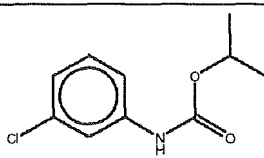
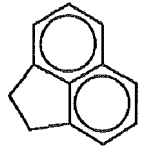
Mol ID	系	STRUCTURE	Name	MolWt	NOEL	PPAR活性	Kow
1	S		N-(1,3-Dimethylbutyl)-N-phenyl-p-phenylenediamine	268.4	4	++	4.68
4	S		2-Ethyl hexyl diphenyl phosphate	362.4	20	I	6.30
5	S		p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenol	206.3	15	++	5.28
6	S		Nonylphenol	220.4	150	+	5.99
7	S		Dibutyl adipate	258.4	1000	+/-	4.33
8	S		2,4-Di-t-butylphenol	206.3	75	-	5.33
9	S		Diheptyl phthalate	362.5	62	+	7.56
10	S		PFOA	414.1	1.5	II	5.68
11	S		PFOS	499.1	0.1	I	5.14
12	S		butyl benzyl phthalate	312.4	159	-	4.85
13	S		diethyl phthalate	222.2	750	-	2.65
14	S		di (2-ethyl hexyl) adipate	370.6	170	-	8.12
15	S		dibutyl phthalate	278.3	125	-	4.61
16	S		di (2-ethyl hexyl) phthalate	390.6	19	II	8.39

表 2-1(b) フッ素化合物およびフタル酸エステル類などの化合物 (検証系)

Mol_ID	系	STRUCTURE	Name	MolWt.	NOEL	Kow
64	V		245T	255.5	3	3.31
55	V		Carbaryl	201.2	9	2.35
60	V		Folpet	296.6	10	2.85
59	V		Dichloroacetic acid	128.9	12	0.92
68	V		MCPB	228.7	12	3.50
63	V		Propachlor	211.7	13	2.18
58	V		Ethylene Dibromide	187.9	27	1.96
57	V		chloropham	213.7	50.0	2.66
54	V		Acenaphthene	154.2	175.0	2.36

系 : S ; 学習系化合物、V ; 検証系化合物

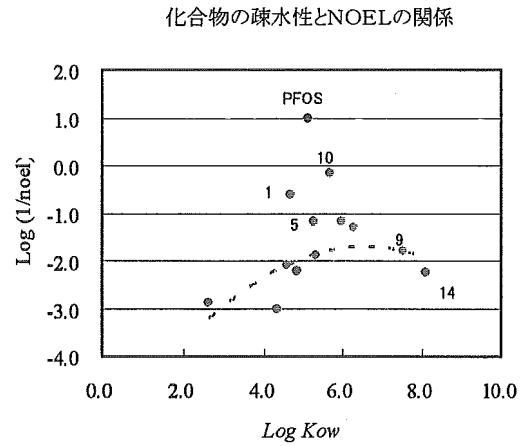
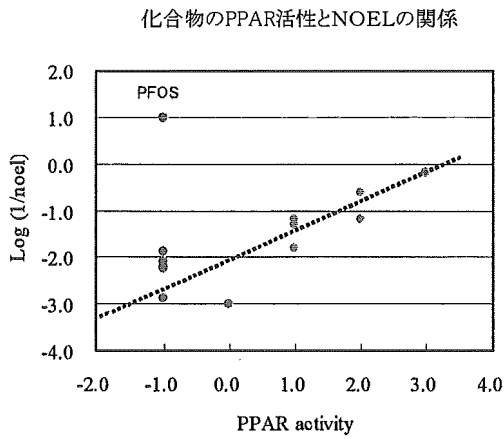


図 2-1 NOEL と PPAR 活性の関係 図 2-2 疎水性 (LogP) と NOEL との関係

表 2-2 記述子と NOEL との相関係数マトリックス

Kow	1.00							
Mol_Weight	0.47	1.00						
VDW	0.58	-0.03	1.00					
Dipole	0.10	0.28	0.17	1.00				
Homo	-0.20	0.51	-0.70	0.00	1.00			
Lumo	-0.09	0.57	-0.57	-0.04	0.59	1.00		
Frontia	-0.05	0.52	-0.48	-0.04	0.43	0.98	1.00	
Log(1/C)	0.17	0.59	-0.58	0.12	0.81	0.69	0.58	1.00
	Kow	Mol_Weight	VDW	Dipole	Homo	Lumo	Frontia	Log(1/C)

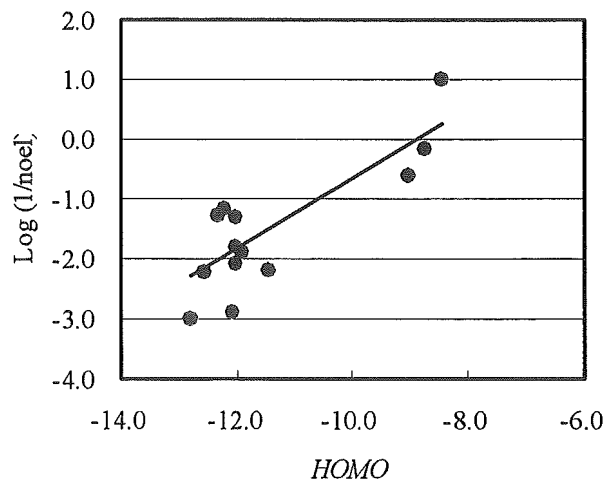


図 2-3 最高被占軌道エネルギー ( $E_{HOMO}$ ) と NOEL の関係

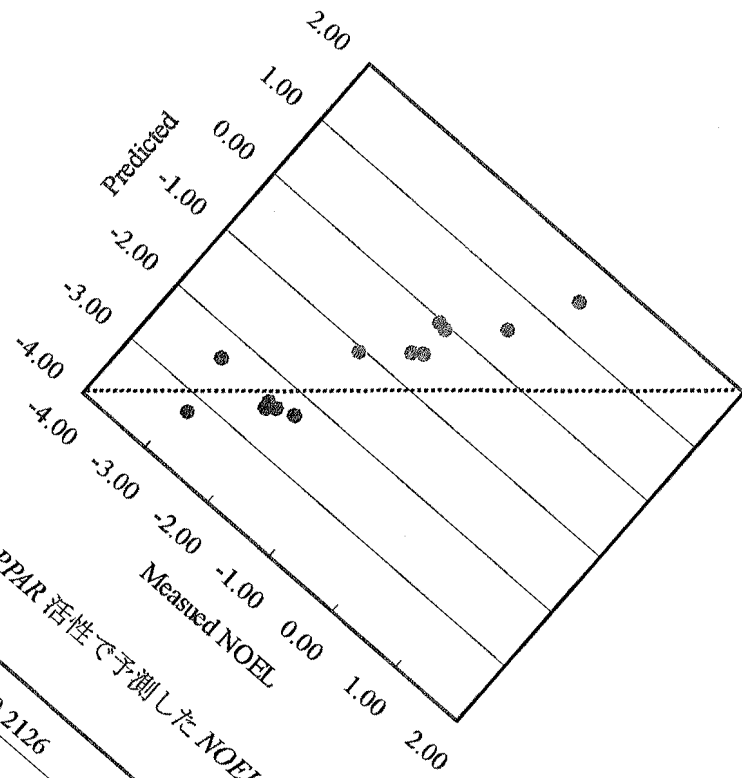


図2-4 LogP, VDW, PPAR 活性で予測した NOEL と実験値との関係

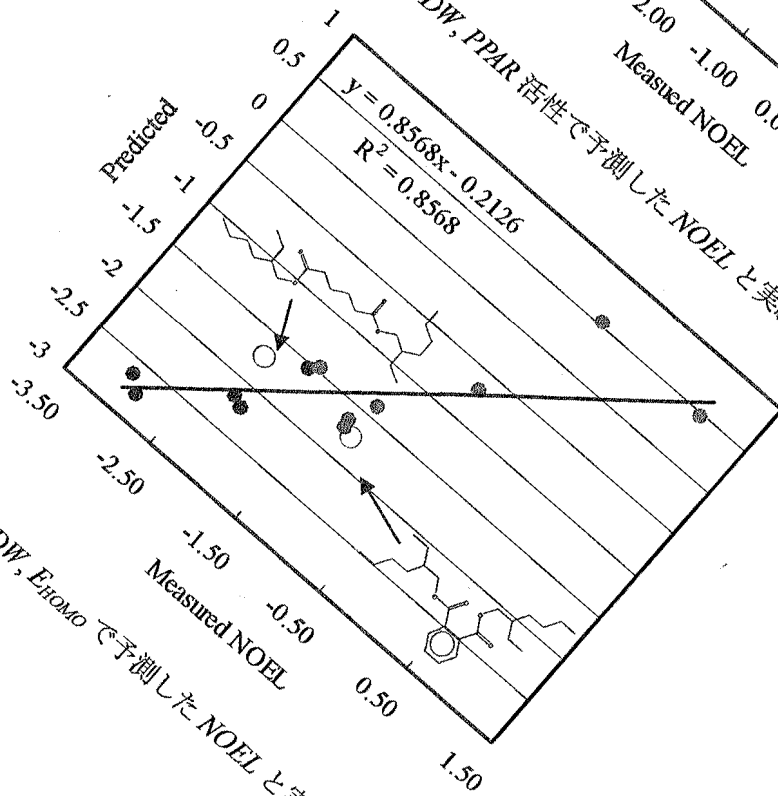


図2-5 LogP, VDW, EToMo で予測した NOEL と実験値との関係

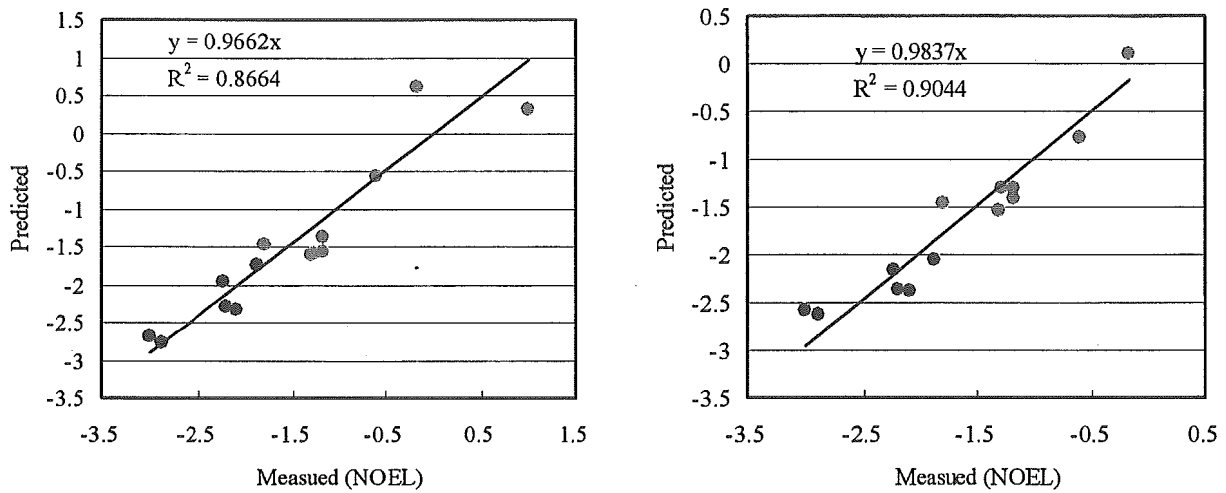


図 2-6 毒性作用機序モデルの予測結果 (左図：全物質、右図：PFOS を除いた場合)

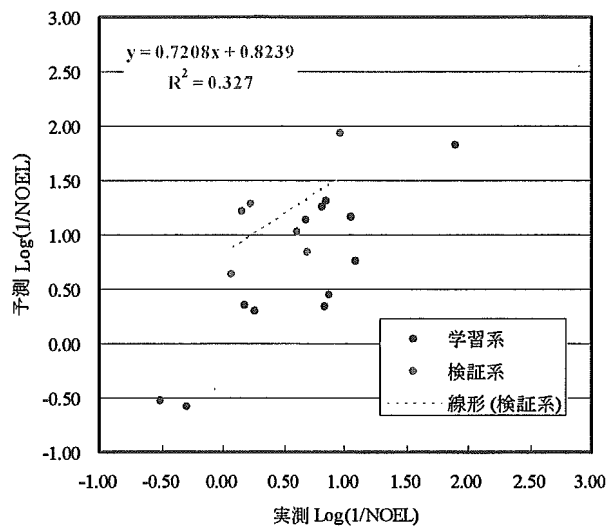


図 2-7 検証系化合物を用いた場合の予測結果

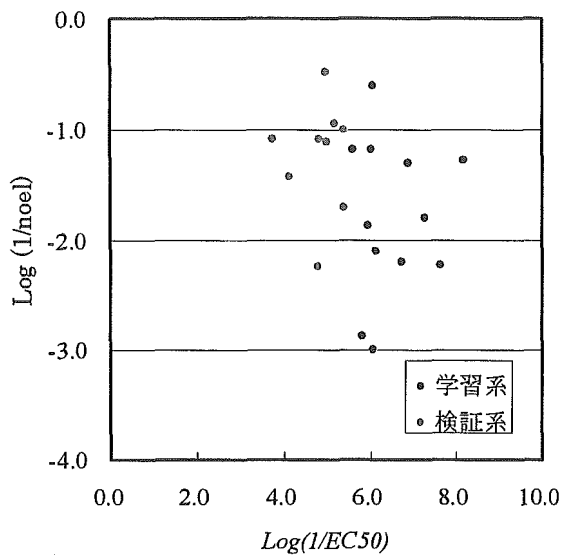


図 2-8 Assyas と NOEL の関係

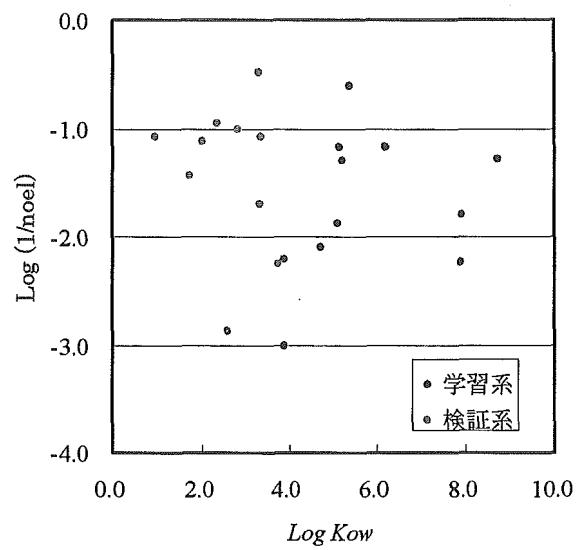


図 2-9 LogP と NOEL の関係

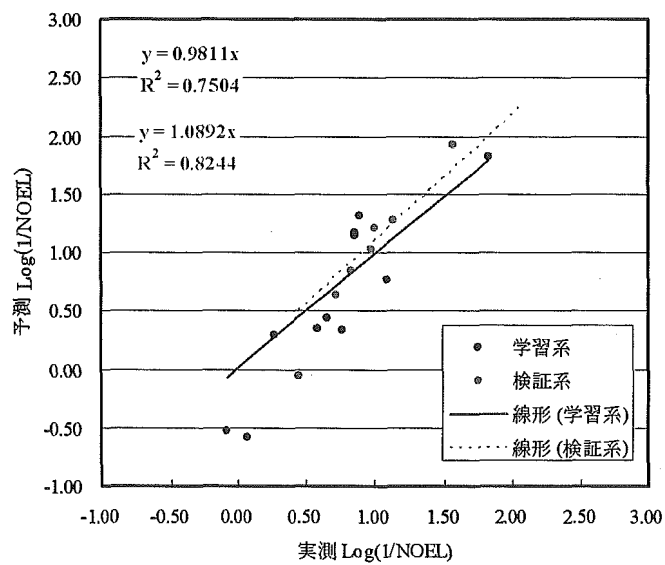
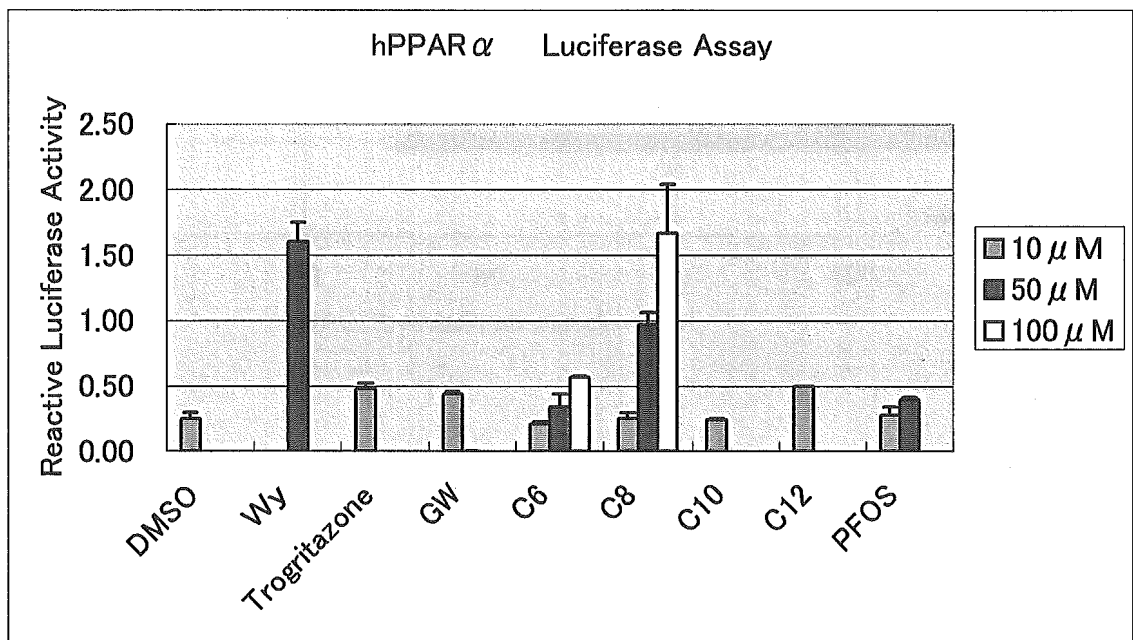


図 2-10 学習系、検証系の全化合物で  
QSAR を構築した場合の予測結果

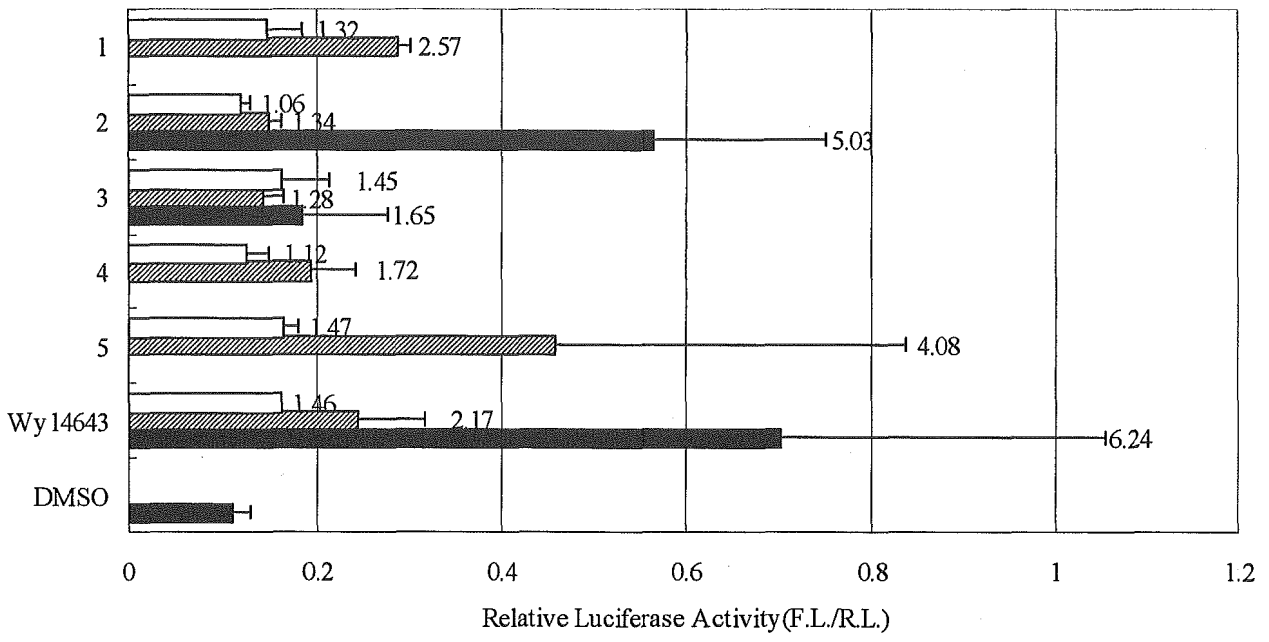
図 3-1 フッ素化合物のヒト PPAR リガンド活性

リガンド薬物 $\mu\text{M}$	C6			C8			C10			C12			PFOS		
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
$\alpha$	-	-	-	-	+	+++	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性	-	-	毒性
$\delta$	-	-	-	-	-	-	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性
$\gamma$	-	-	-	-	-	+	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性

図 3-2



☒ 3-3



☒ 3-4

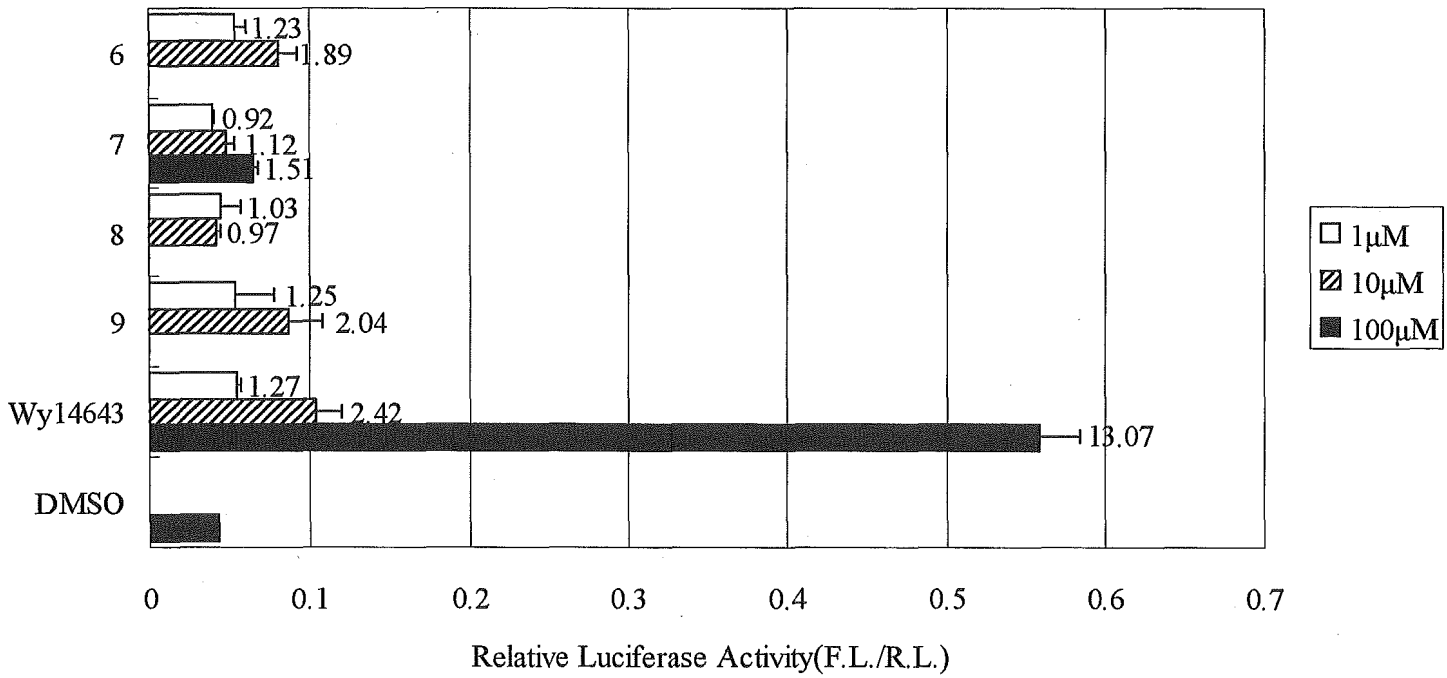
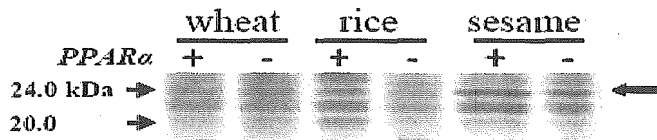




表 3-1

	用量	LOEL (lipid) 脂質代謝に関わる 最小影響濃度	NOEL (既存物質点検結果)	毒性評価	PPAR活性	活性評価
PFOA	1.5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500	-	1.5>, 肝重量増大	+++	50, x4 100, x6	+++
PFOS	0.028, 0.115, 0.294, 1.147♂ 0.034, 0.139, 0.348, 1.402♀	1, chol↓	0.1, BUN↑	+++	-	-
N-(1,3-dimethyl butyl)-N-phenyl-p-phenylenediamin	4, 20, 100	100♂♀, 20♀, liver weight↑ w/fatty change, 100♂, chol↑	4, LOEL	++	10, x2.6	++
1H,1H-perfluoro octanol					100, x5.0	+++
1H,1H,2H,2H-perfluoro octan-1-ol					-	-
2-ethyl hexyl diphenyl phosphate	4, 20, 100, 500	100, chol↑	20, LOEL	++	10, x1.7	+
p-tert-octylphenol	15, 70, 300	70♂, chol↓, A/G↓ BUN↑, TG↑	15, LOEL	++	1, x1.5 10, x4.1	++
nonylphenol (4- major)	4, 15, 60, 250	-	15♂, 60♀, 肝重量増加	+	10, x1.9	+
diethyl adipate	20, 140, 1000	-	1000<	-	100, x1.5	+/-
2,4-di-tert-butylphenol	5, 20, 75, 300	75♀, chol↑	75♂, 腎病変 20♀, LOEL	+	-	-
diheptyl phthalate	62.5, 250, 1000	1000♂, liver weight↑ w/fatty change	62.5♂, 肝臓の変化 250♀, 肝重量増加	+/-	10, x2.0	+
butyl benzyl phthalate	17, 51, 159, 470, 1417		159, 肝重量増加	-	-	-
diethyl phthalate	150, 770, 3160♂ 150, 750, 3710♀		760, 臓器重量変化	-	-	-
di(2-ethyl hexyl) adipate	28, 170, 1080		170, 肝重量増加	-	-	-
diethyl phthalate	0.01, 0.05, 0.25, 1.25%		125, 死亡発生	-	-	-
di(2-ethyl hexyl) phthalate	19, 64		19, 肝重量増加	++		

### A) SDS-PAGE



### B) PMF analysis

	1	11	21	31	41	51	61	71
<b>GST<math>\mu</math>1</b>	MPMELGHWV	RGLTHERML	LEYDSSYDE	<u>KPYTMDRARD</u>	<u>EDSSQWLER</u>	<u>FKLGDFPML</u>	<u>PYLIDGSHKI</u>	<u>TDSHAILRQ</u>
	01	91	101	111	121	131	141	151
	<u>AKQLELDGET</u>	<u>ECCGRADIV</u>	<u>ENGVMOTRQ</u>	<u>LMILGNPDF</u>	<u>EKQDFELKT</u>	<u>IPEKMLYSE</u>	<u>FLGKQYFAG</u>	<u>DKYTYVFLA</u>
	161	171	181	191	201	211		
	YDLDOYRMF	EPKGLDAFPH	LRCFLARFEG	LKKSAYVKS	<u>SRYLAPFES</u>	KMAKRSNK		
<b>GST<math>\mu</math>3</b>	MPMTLGYWV	RGLTHERML	LEYDSSYEE	<u>KPYTMDRARD</u>	<u>EDSSQWLER</u>	<u>FKLGDFPML</u>	<u>PYLIDGSHKI</u>	<u>TDSHAILRQ</u>
	01	91	101	111	121	131	141	151
	<u>AKQINLQGET</u>	<u>ECCFRVSTL</u>	<u>ENGVMOTRQ</u>	<u>LMVCCSPDF</u>	<u>EKQDFELTA</u>	<u>IPEKMLYSE</u>	<u>FLGKQYFAG</u>	<u>DKYTYVFLA</u>
	161	171	181	191	201	211		
	YDLDOYRMF	EPKGLDAFPH	LRCFLARFEG	LKKSAYVKS	<u>SRYLDFEVT</u>	KAGWQTD		

図 3-5 ゴマ食によって誘導されるタンパク質の PMF 解析による同定

## ●毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究

ヒト PPAR $\alpha$  のリガンド結合ドメイン(LBD) と PPAR $\alpha$  アゴニストである GW409544 の複合体の立体構造情報と PPAR $\alpha$  結合活性が既知の薬物系リガンドを使って、新規リガンドの活性予測が可能な 3D-QSAR モデルを作成する事を目的とした。

### 1. 方法

#### ① 3D-QSAR モデルの構築

3D-QSAR 解析を行うためには同一条件での実験から得られたデータが少なくとも 10 個以上は必要である。工業系化学物質に関して PPAR $\alpha$  の活性値(EC<sub>50</sub> 等)が明確なものは多くない。そのため、PPAR $\alpha$  に対する活性が既知のデータが豊富な薬物系リガンドを使って 3D-QSAR モデルを作成した。

初めに、PPAR $\alpha$  の LBD と GW409544 の複合体の X 線結晶解析実験による立体構造 (PDB code:1K7L) から取り出した GW409544 の結合配座を参照分子として、リガンド重ね合わせプログラム、FlexS(SYBYL)を用いて、PPAR $\alpha$  活性が既知の 20 個の化合物 (表1) の結合配座候補を生成した。FlexS では、リガンドに含まれるカルボン酸基が PPAR $\alpha$ LBD のリガンド結合部位のアミノ酸と水素結合をすると考えられるため、カルボン酸同士が重なるようにリガンドを重ね合わせた。生成された配座から PPAR $\alpha$  LBD-リガンド複合体構造を作成し、Tripos 力場 (電荷 PPAR $\alpha$ LBD: Kallman、リガンド:Gasteiger-Huckel) でエネルギー極小化計算を行って構造を最適化した。そして、エネルギー極小化後の複合体のエネルギーの低い (最安定モデルから 5kcal/mol の範囲内の複合体モデル) 複合体モデルを選択した。選択した複合体モデルからリガンドの結合配座を抽出し、これらの結合配座とそのアライメントを用いて三次元定量的構造活性相関解析の手法である CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 解析を行い、統計的に最良な結合配座セットを選択した。

#### ② 肝毒性を生じる化合物に対する活性予測

肝毒性を生じる化合物 (表 2) に対して結合配座を求めた。肝毒性を生じる化合物は学習系リガンドに共通に存在して見られるカルボン酸を持たない。共通の官能基がない場合には、学習系リガンドの時に用いた FlexS はあまり適していない。そこで、当研究室で開発されている結合配座推定手法を利用した。初めに、高温分子動力学法を利用した配座解析プログラム CAMDAS を使ってエネルギー極小配座集団を生成した。次に、

GW409544 の結合配座を参照分子として、得られた配座集団を SUPERPOSE プログラムを使って重ね合わせた。SUPERPOSE プログラムは、リガ

化合物	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	$-\log(\text{EC}_{50})$	ClogP
GW409544	0.002	8.70	5.63
compound(1)	0.004	8.40	8.59
LY-510929	0.009	8.05	5.96
compound(2)	0.013	7.89	4.93
compound(3)	0.032	7.49	4.39
GW9578	0.050	7.30	7.04
LY-465608	0.150	6.82	6.25
GW2433	0.170	6.77	7.57
Muraglitazar	0.240	6.62	4.85
compound(4)	0.360	6.44	5.69
GI262570	0.450	6.35	6.42
tesaglitazar	1.700	5.77	3.21
JTT-501 metabolite	1.900	5.72	2.48
ragaglitazar	3.200	5.49	6.10
GW7845	3.500	5.46	5.85
Wy-14643	5.000	5.30	3.24
L-165041	10.000	5.00	5.05
fenofibrate metabolite	30.000	4.52	4.50
bezafibrate	50.000	4.30	4.14
clofibrate metabolite	55.000	4.26	3.26

表 1 使用した PPAR $\alpha$ アゴニスト EC<sub>50</sub>・転写活性  
Cell-Based transactivation Assays

ド構造の官能基に半径 1Å の球を割当てた二つの配座を、同一特性の球がお互いに重なるように回転、並進運動させて、共通特性の官能基が重なるアライメントを生成するものである。この手法を使うことによってリガンドの結合配座とリガンドの活性部位結合状態でのアライメントを推定することができる。この方法を肝毒性を生じる化合物に応用し、GW409544 の結合配座の立体構造特徴とよく重なる結合配座候補を抽出した。これらの配座から PPAR $\alpha$  LBD-リガンド複合体構造を作成し、エネルギー極小化計算を行って構造を最適化した。そして、エネルギー極小化後の複合体のエネルギーの低いモデルのリガンドの配座を結合配座とした。この結合配座と GW409544 とのアライメントを基に CoMFA モデルを使って各化合物の PPAR $\alpha$  活性を計算した。

#### ③ 代謝化合物に対する活性予測

肝毒性を示すリガンドの中で、代謝活性を受けると考えられるリガンドに対して代謝化合物を考え、これらに対して上記と同様に結合配座を求め活性を計算した。

1	(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylene diamine
2	1H,1H-Perfluorooctanol
3	1H,1H, 2H, 2H-Perfluorooctanol
4	diphenyl 2-ethylhexyl phosphate
5	p-tert-Octylphenol
6	Nonylphenol
7	dibutyl adipate
8	2,4-D-tert-butyl phenol
9	diheptyl phthalate
10	butyl benzyl phthalate
11	diethyl phthalate
12	di (2-ethylhexyl) adipate
13	dibutyl phthalate
14	diethylhexyl phthalate

表2 肝毒性を生じるリガンド

(倫理面への配慮)

既存の X 線結晶解析データを用い、コンピュータによる解析を行うため、倫理的に問題となるようなことはない。

## 2.結果

□FlexS 及びエネルギー極小化計算の結果得られた配座数を表3にまとめた。エネルギー条件(最安定構造から 5kcal/mol 以内)を満たした配座をさらに PPARα LBD との相互作用様式で分類し代表配座を求めた。この代表配座の組み合わせセットを使って CoMFA 解析を行った。

化合物	flexSより生成した配座数	エネルギー条件を満たした配座数	代表配座数
compound(1)	201	4	2
LY-510929	237	45	5
compound(2)	236	22	3
GW9578	176	12	3
compound(3)	161	37	12
LY-465608	357	10	4
GW2433	280	5	4
Muraglitazar	251	37	3
compound(4)	424	16	6
GI262570	237	2	2
JTT-501 metabolite	287	26	5
ragaglitazar	274	7	3
GW7845	260	2	2
Wy-14643	583	12	6
L-165041	191	5	3
fenofibrate metabolite	391	1	1
bezafibrate	342	1	1
clofibrate metabolite	271	5	4

表3 各リガンドの配座数

その結果、静電相互作用、立体相互作用、ClogP (疎水性を表す指標) から統計的に有意なモデル(予測的相関係数  $q^2:0.735$ ,  $r^2:0.969$ ) を得ることができた(図1)。実験値と CoMFA モデルによる計算値をグラフにしたところほぼよく一致して

いた(図2)。また、CoMFA 解析から得られた活性の強弱に影響を与える空間領域を示す等高線情報(静電相互作用、立体相互作用)は PPARα LBD のリガンド結合部位周辺の立体構造特性と一致した(図3、図4)。このことは得られた CoMFA モデルが信頼できることを示唆している。

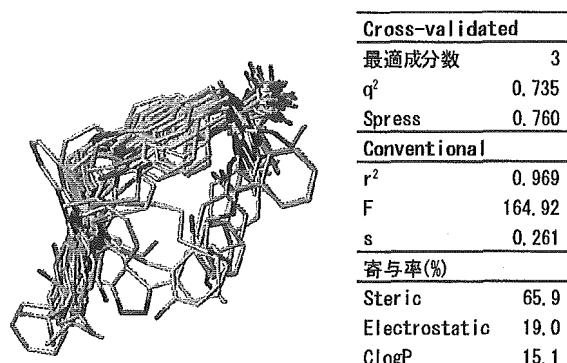


図1 結合配座とそのアライメント及び統計結果  
(活性値 =  $3.582 + (0.363) * \text{ClogP}$ )

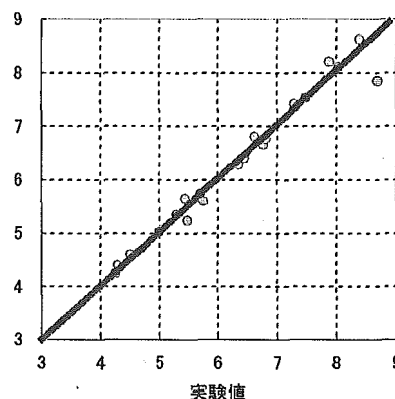


図2 実験値と CoMFA モデルによる計算値の比較  
単位:  $\log(1/EC_{50})$

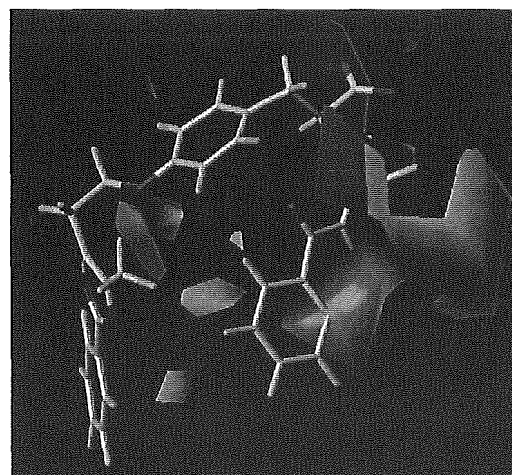


図3 CoMFA 等高線

緑: 立体的に高い置換基があると結合親和性が増える領域  
 黄: 立体的に高い置換基があると結合親和性が下がる領域  
 青: 正の電荷を持つ置換基があると結合親和性が増える領域  
 赤: 負の電荷を持つ置換基があると結合親和性が増える領域

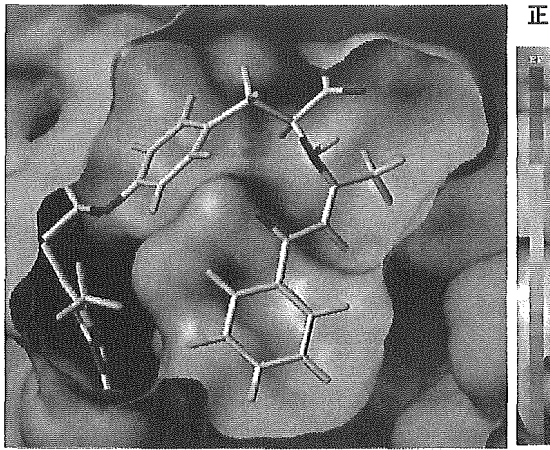


図4 タンパクの静電ポテンシャル表面

② CoMFA 式を使って肝毒性を生じる化合物の PPAR $\alpha$  に対する活性予測を行った結果を表4に示す。

	ClogP	計算値
1 (1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylene diamine	5.41	6.16
2 1H,1H-Perfluorooctanol	2.04	4.91
3 1H,1H, 2H, 2H-Perfluorooctanol	1.44	4.42
4 Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate	5.24	6.86
5 p-tert-Octylphenol	5.16	5.63
6 Nonylphenol	6.21	6.03
7 Dibutyl adipate	3.90	6.06
8 2,4-D-tert-butyl phenol	5.13	5.98
9 Diheptyl phthalate	7.91	7.29
10 butyl benzyl phthalate	3.88	6.72
11 Diethyl phthalate	2.62	5.82
12 Di (2-ethylhexyl) adipate	7.87	7.66
13 Dibutyl phthalate	4.73	6.15
14 Diethylhexyl phthalate	8.71	8.18

表4 肝毒性を生じる化合物に対するPPAR $\alpha$ 活性予測値

(Cell-Based transactivation Assays:  $\log(1/EC_{50})$ )

化合物はPPAR $\alpha$ 活性をある程度有することが予測された。この結果を実験結果と比較したものが図5である。7化合物(強:ピンク(5,1,9,6,4),低い:青(2,3))は活性の強弱が実験結果と計算結果間で一致した(5は実験による誤差が大きい)。一方、6化合物(黄色;7,13,8,11,12,10)は実験では活性が弱いと出たにも関わらず、計算では活性があると予測された。

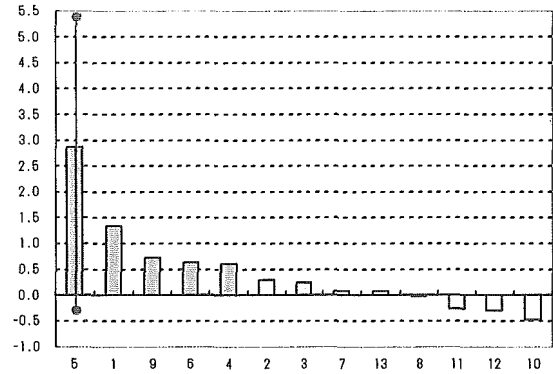
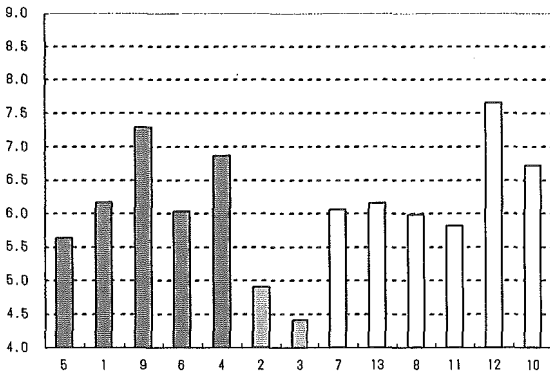


図5 上図 CoMFAモデルによる予測値

Cell-Based transactivation Assays:

$\log(1/EC_{50})$

下図 実験による活性値の規格値

Relative Luciferase Activity Assays

(F.L./R.L.) をDMSOとWy14643 (基準化合物) で

規格化した値 (5は実験誤差が大きい(赤線))

③ この要因として、エステラーゼ酵素によって代謝される可能性が挙げられる。親化合物が代謝され代謝化合物に変わってしまうために、実験と予測間で異なったのではないかと考えられた。そこで、表2の化合物の中で代謝を受ける可能性がある化合物を調べた。その結果、7、9、10、11、12、13が代謝を受けると考えられた。そこで、これらの化合物が代謝を受けた後に生成されると考えられる化合物(表5)に対して、PPAR $\alpha$ 活性を計算した。

親リガンド	代謝によって生成すると考えられるリガンド
7	monobutyl adipate
9	monoheptyl phthalate
10	monobutyl phthalate
11	phthalic acid monoethyl ester
12	mono-2-ethylhexyl adipate
13	monobutyl phthalate (10 と同じ)

表5 代謝を受けて生じるとされる化合物

代謝を受けない化合物と受ける化合物を分けて計算結果をグラフにまとめたものが図6、7である。図6は代謝を受けない化合物に対するPPAR $\alpha$ 活性の予測と実験の結果を並べたものである。8を除いて、活性の強弱(強:赤、弱:青)をほぼ正しく分類することができたことがわかる(表6)。

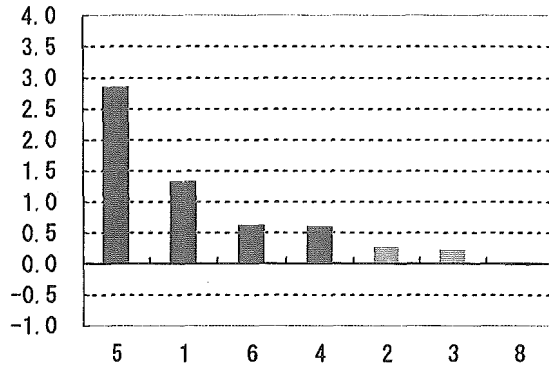
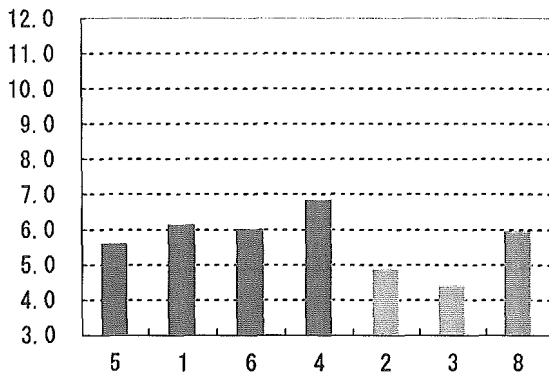


図6 代謝を受けないリガンド

上図 CoMFAモデルによる予測値  
Cell-Based transactivation Assays:  
 $\log(1/EC_{50})$

下図 実験による活性値の規格値  
Relative Luciferase Activity Assays  
(F.L./R.L.) をDMSOとWy14643 (基準化合物) で規格化した値

表6 代謝を受けない化合物に対する実験と予測結果の比較

化合物番号	5	1	6	4	2	3	8
実験	+	+	+	+	-	-	-
計算	+	+	+	+	-	-	+

図7は、代謝を受ける化合物に対する代謝前の親化合物と代謝後に生成される化合物のPPARαの活性予測の結果である。この図から、代謝後に生成する化合物は親化合物よりPPARα活性が弱いことが予測された。実験は細胞系によるものであるため、実験による活性結果が計算結果と異なって低かったのはその化合物が代謝されたためではないかと思われる。

例としてDibutyl adipateとその代謝物であるmonobutyl adipateのPPARαLBDとの相互作用の図を示した(図8)。

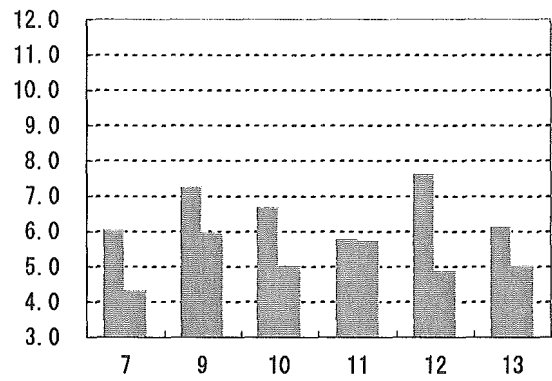


図7 代謝を受ける化合物のPPARα活性の予測値

■ 代謝前の親化合物  
■ 親化合物の代謝後に生成される化合物

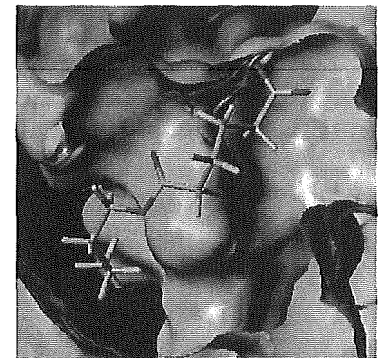
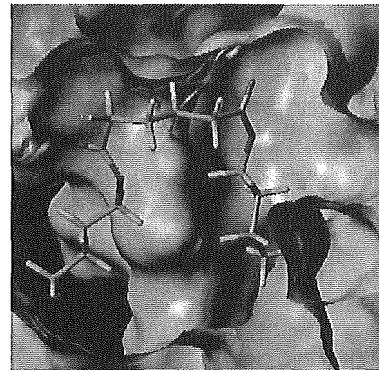


図8 PPARαLBDとの相互作用図

上 dibutyl adipate (緑)  
下 monobutyl adipate (オレンジ)

④ 代謝生成によって生じる最終化合物で、PPARα活性が測定された化合物に対して、同様にPPARαの活性値を計算し実験値と比較した。その結果、活性順位が実験と予測で一致していた(図9、表7)。

定量的構造活性相関モデル (CoMFA モデル) を得ることができた。このモデルを使って肝毒性を示す化合物の PPAR $\alpha$  に対する活性予測がほぼ可能であることがわかった。

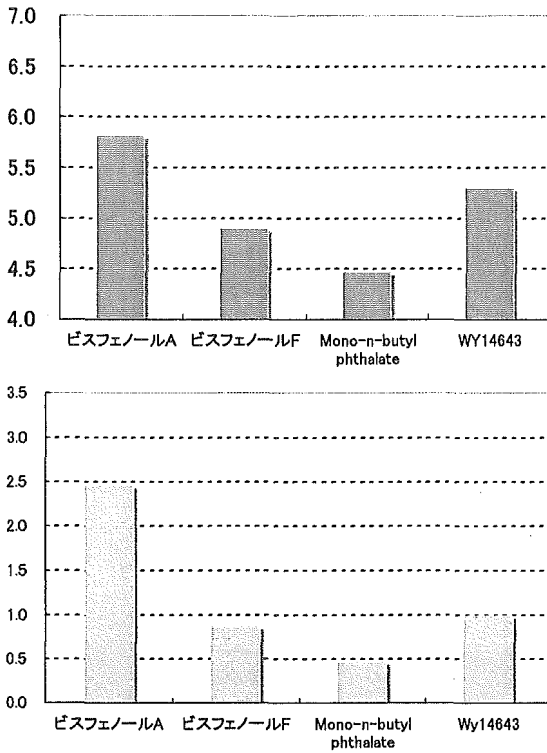


図9 代謝化合物

上図 CoMFAモデルによる予測値

Cell-Based transactivation Assays:  
log(1/EC<sub>50</sub>)

下図 実験による活性値の規格値

Relative Luciferase Activity Assays  
(F.L./R.L.) をDMSOとWy14643 (基準化合物) で規格化した値

	実験	計算
ビスフェノールA	+++	+++
ビスフェノールF	++	++
Mono-n-butyl phthalate	+	+
Wy14643	++++	++++

表7 代謝化合物に対する実験と予測結果の比較  
(Wy14543は基準化合物)

### 3. 考察

PPAR $\alpha$ リガンドと PPAR $\alpha$  LBD との複合体モデルから得られた、PPAR $\alpha$ LBD との結合に関与する PPAR $\alpha$ リガンドの官能基の三次元空間配置 (三次元ファーマコフォア) と CoMFA モデルを用いることにより、コンピュータ上での工業材料に用いられる化合物の PPAR $\alpha$ に関する活性予測を比較的容易に行うことができるようになるものと思われる。

### 4. 結論

PPAR $\alpha$ 活性の既知のリガンドを使って PPAR $\alpha$  LBD との複合体モデルと統計的に有意な三次元

## ●化学物質の代謝活性化の予測モデルに関する研究

生体内での代謝変換の知見は、化学物質の安全性評価のための重要な情報である。ヒト環境中には多数の化学物質が含まれ、毎日多くの化学物質に我々は接触しており、また食事成分として意図的および非意図的に取り込んでいる。これら多数の化学物質の安全性を、従来手法で短期間に評価することは難しく、コストも膨大な額になる。現在添加物香料のような微量物質について簡略化のルール作りが進められている。現在このルールにも代謝経路の有無についての項目があり、安全性評価の指標の1つとなっている。

過去 10 年間に医薬品を中心に代謝に関する情報の流れに大きな変化があった。従来実験動物で得られた代謝情報をヒトに外挿して代謝が評価されていた。しかし代謝酵素の研究が進展してヒトと実験動物の種差が明瞭になり、ヒトにおける代謝はヒト由来の試料を用いて評価することが前提となった。同様の種差は医薬品だけでなく多くの化学物質にも当てはまる。この問題を乗り越えるためヒト酵素発現系で得られた代謝情報をデータベース化して、これを基に単一酵素ごとに基質特異性を明らかにして、この情報から未評価化学物質の代謝特性を予測する系を開発することを試みた。

化学物質の安全性評価において癌原性や遺伝毒性は化学物質の構造と代謝に深く関わっている。本研究ではこれら試験に深く関わるチトクローム P450 の CYP1A2 と CYP2C9 を取り上げ、解析した。

## B. 研究方法

### 化学物質の代謝情報

ヒト CYP の発現系試料を用いて測定された代謝データを収集した。ヒト CYP の発現系には酵母細胞、昆虫細胞など宿主には違いがあり、補酵素からの電子伝達する NADPH-cyt.P450 還元酵素の発現レベルにも差がみられる。しかしながら今回のデータ収集ではこれらを区別せず、基質特性情報として得られたものをリストした。

化学物質の代謝についての情報精度にもかなりの違いが見られる。主代謝物のみを測定対象としたデータと副生成物を含めた定量データを含む論文もあったが、今回は必要事項の抜き出しに必要な項目のみを採用した。

データの収集は Medline を用い、PubMed 検索で該当する文献を選択した。

検索項目は、基本的に CYP1A あるいは CYP2C9, human liver としたが、化合物によっては該当する論文が選択されないため、阻害薬物等の情報を付加して収集した。

## 2. 研究結果

得られた化学物質情報を下に示す。

Substrate	Product	CYP form1
7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene	9,10-oxide	CYP1A1
3-Methylcholanthrene		CYP1A
Almotriptan		CYP3A4
Atrazine	iPr-OH	CYP1A2



Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	3-hydroxylation	CYP1A
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	7,8-oxide	CYP1A
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	6-OH	CYP1A
Benzo[ <i>c</i> ]phenanthrene		CYP1A2
Clozapine		CYP1A2
Coumarin	coumarin 3,4-epoxide	CYP1A1/2
Cyclobenzaprine	N-demethylation	CYP1A2
Daidzein		CYP1A2
DMXAA	6-methylhydroxylation	CYP1A2
Fluvoxamine		CYP1A2
Furafylline	inf mechanism	CYP1A2
Imipramine		CYP1A2
JANEX-1	O-demethylation	CYP1A2
Lidocaine	N-DE	CYP1A2
Lisofylline	pentoxyfylline	CYP1A2
PhIP	N-OH	CYP1A2
Primaquine		CYP1A2
Promazine	5-sulphoxidation	1A1>2B6>1A2 2C19>2B6>1A1>
Promazine	N-demethylation	1A2
Ropivacaine	3-OH-ropivacaine	CYP1A2
Ropivacaine	4-OH-ropivacaine	CYP3A4
Ropivacaine	2-OH-methyl-ropivacaine	CYP3A4
Ropivacaine	2',6'-pipercoloxylidide	CYP3A4
Rutaecarpine	inh	CYP1A2
S 16020	Unknown	CYP1A2
Sanguinarine	inh mechanism	CYP1A2
Tacrine	7-OH	CYP1A2
Tanshinone IIA	inf	CYP1A2
Terbinafine	DHDiol	CYP1A2
Terbinafine	N-DM	CYP1A2
Thalidomide	5,5'-OHs	CYP1A
Theophylline	demethylation	CYP1A2
Theophylline	hydroxylation	CYP1A2
Tizanidine	ring Ox	CYP1A2
Verlukast	epoxidation	CYP1A1

Zaleplon	N-DE	CYP3A4
Zolmitriptan	N-demethylation	CYP1A2
Zolpidem	alcohol deriv	CYP1A2

ここで CYPform1 は主代謝酵素として報告されている分子種で、化学物質によっては CYP1A2 が主酵素でなく、むしろ副次的に関与する場合、リストには他の分子種のみが記載されているものも加えた。

#### 予測に当たっての基本的考え方

これまでの構造予測手法では、分子全体が酵素の基質結合部位に一度にはまり込むことを想定していたが、分担研究者らは、チトクローム P450 の酸化反応は、基質の一部が酵素の特定部位に接触して捕捉されることではじまると考えて予測する手法を開発した。基質は補足後、ヘム近傍の環境に合うコンフォメーションを採ったときに酵素内に固定され、結果として酸化を受ける。

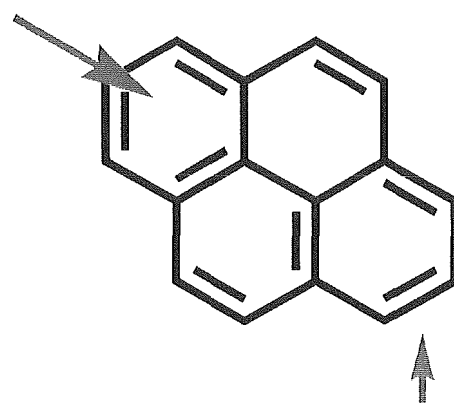
最初に接触する部位を **trigger site** と呼ぶ。他の P450 分子種では基質構造内に基質の構造を酸化部位とオープン空間にはいる部位に分ける **pinching point** と呼ぶ箇所がある。CYP2C9 については、これまでの検討から **trigger site** と **pinching point** を結ぶ線に対し、**trigger site** 側の端からみて右下に酸化部位が来る。

CYP1A2 では **trigger site** が平板状でその直線上に **pinching point** があると予測されるため、**pinching point** の決定は不必要となる。代表的な約 10 種の物質についてこの原則を CYP1A2 基質に適用して酸化部位と **trigger site** の関係を調べた結果、酸化部位は特定範囲の距離を中心に分布することが明らかとなった。この距離はベンゼン環 3 個分に相当する。

この段階で、**trigger pinching oxidizing** 各部位の同一平面性が必要な要素であることが半明したので、これらを統一的に扱うルールとして **pyrene rule** を考案した。

#### Pyrene rule について

下図の **pyrene** は 4 環性の平面分子である。ここで CYP1A2 に基質は赤字矢印の部位が **trigger site** に捕捉されると考える。平面性が重要な要素である。空間上下左右の構造が一定の条件を満たすと、緑矢印の酸化部位がヘム近傍に向かって配位して固定されると考える。これら 2 部位の間をさらに固定する必要があり、上下環いずれかの炭素が **pinching point**



を兼ねる。

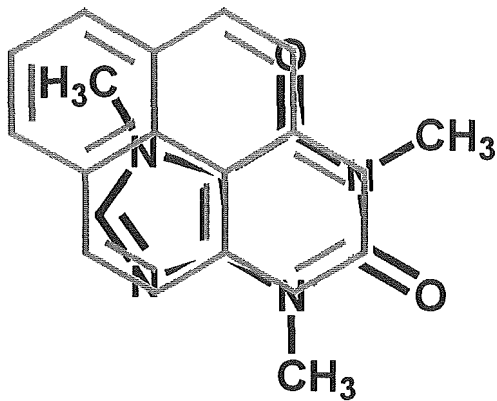
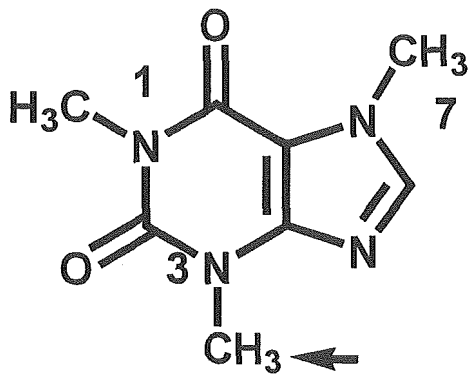
このように考えると、被検化合物を **pyrene** と重ねることによって適合性を調べることが可能となる。

基本的には 3 環にわたって重なる部位の多い物質ほど、適合性があると考えられる。

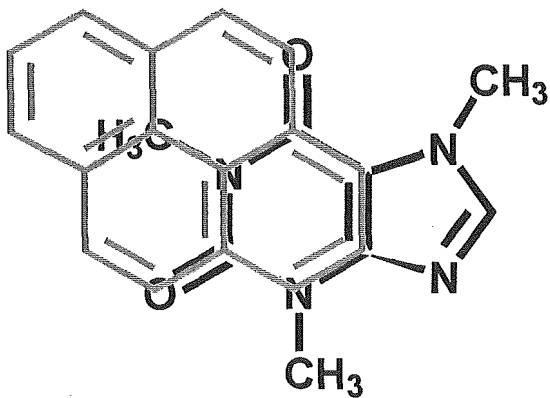
ヘムは緑の矢印下方から接近するので側鎖がこの下方 2 炭素までの範囲にあれば基質となる。

酸化部位右側はベンゼン環 1 個分の余裕があり、**pyrene** 下方の **naphthalene** 部は **anthracene** になっても収容可能である。しかしさらに延長できない。また左下に **pyrene** 下端を超えて伸張はできない。**Trigger** 部位の上は比較的余裕がある。

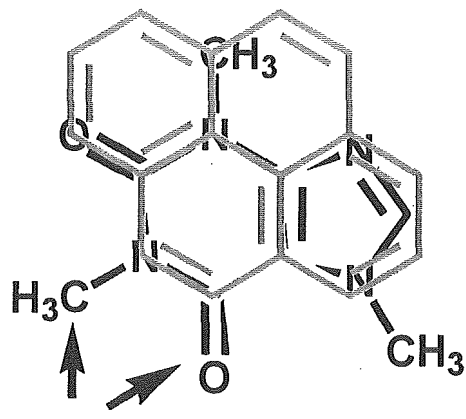
Caffeine の酸化反応



N-3-methyl 基の酸化が優先する。N-7methyl 基が何とか trigger site の役目をカバーしている。



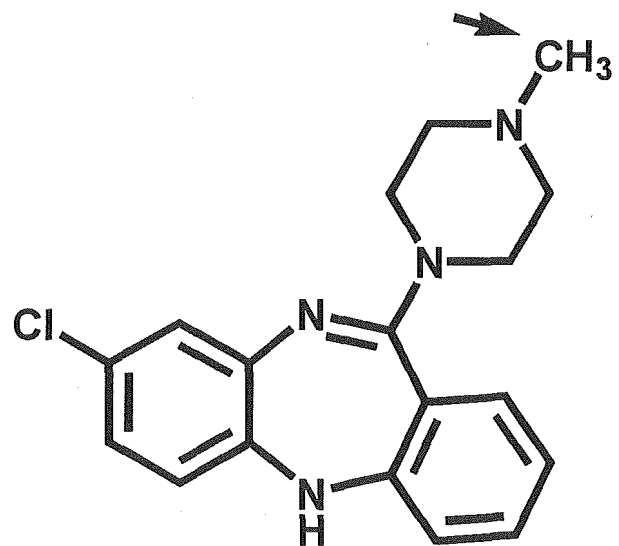
上図の配置では trigger 部位に入る部分が少なく、trigger site の平面性を保持できないと考えられる。また 5 員環上の 7-メチル基が配置に邪魔となる。



hinder ?

N-7-methyl 基の酸化は左下に来る carbonyl 基の障害を受ける。結果的に最上図に示した配置で N-3-methyl 基の酸化が優先すると判断する。

Clozapine の CYP1A2 による代謝



この物質は連続する 3 環の向きによって、この 3 環で作る平面に対してピペラジン環が手前あるいは奥に配置される。結果的に N-メチル基も奥あるいは手前に移動する。酸化は trigger 平面の手前で、最下部におこる。

