

短 報

ドッキングシミュレーションによるヒト CYP1 酵素と カンナビノイドの結合部位の解析

増田 和文^{1),2)*}, 貝原 輝昭¹⁾, 石尾 みほ¹⁾, 高塚 雄太¹⁾, 加藤 久登¹⁾
¹⁾ 就実大学薬学部薬品物理化学研究室, ²⁾ 就実大学大学院医療薬学研究科

Structural analysis of the binding site between human CYP1 enzymes and cannabinoids by docking simulation

Kazufumi Masuda^{1),2)*}, Teruaki Kaihara¹⁾, Miho Ishio¹⁾, Yuta Takatsuka¹⁾, Hisato Kato¹⁾
¹⁾ *Laboratory of Physical Chemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University,*
²⁾ *Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University*
(Received 15 November 2018; accepted 25 December 2018)

Abstract: The cannabinoids Δ^9 -THC, CBD, and CBN inhibit the 7-ER *O*-de-ethyl reaction via CYP1 enzymes (CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1), but the K_i value for each cannabinoid-enzyme combination differs notably depending on the CYP-cannabinoid combination. Combinations with markedly strong inhibitory activity are CYP1A1-CBD, CYP1A2-CBN, and CYP1B1-CBN. In this study, we performed docking simulations between CYP1 enzymes and Δ^9 -THC, CBD, CBN, and 7-ER, with the aim of clarifying the mechanisms of their markedly different inhibitory activities. As a result, in cannabinoids, hydrogen bonds were formed between the hydroxyl groups in all the molecules and amino acid residues. In addition, formation of π - π stacking and interaction with aromatic hydrophobic pockets were observed in CYP1A1-CBD, CYP1A2-CBN, and CYP1B1-CBN. Conversely, only the formation of π - π stacking and interaction with aromatic hydrophobic pockets were observed in 7-ER. Based on these results, the combination of the formation of hydrogen bonds and π - π stacking and interaction with aromatic hydrophobic pockets can be considered factors for strong inhibitory activity.

Keywords: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, cannabinoids, docking

緒言

CYP1 ファミリーは、2つのサブファミリー (A, B) で構成され、ヒトにおいては、CYP1A1,

CYP1A2, CYP1B1 の3つの分子種が存在する。多環芳香族炭化水素やダイオキシン類などにより誘導され、がん原性多環芳香族炭化水素、マイコ

トキシンの酸化, 芳香族アミン, 複素環アミンの窒素原子の水酸化などが代表的な反応である. CYP1A1 は喫煙者の肺に発現するが, 肝にはほとんど存在せず, ベンゾ[a]ピレンを水酸化する^{1,2)}. CYP1A2 は肝のみに存在しヒト肝ミクロソーム中の P450 のうち約 13% を占め, アセトアニリドの 4 位水酸化, カフェインの *N*-脱メチル化を触媒する. CYP1B1 はヒト肝ミクロソーム中 P450 の 1% に満たないが, 皮膚, 腎, 前立腺などにも存在し 17 β -エストラジオールの 4 位水酸化や多くのがん原性物質の代謝活性化に関与する³⁾.

大麻の成分はカンナビノイドと総称され, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD) 及び cannabinol (CBN) を 3 大成分として約 100 種類が存在し, 大麻における向精神作用の中心は Δ^9 -THC である. カンナビノイドは, それ自身が CYP により代謝を受ける一方で, 競合的に他の基質の代謝反応を阻害することが報告されている^{4,6)}.

Δ^9 -THC, CBD, CBN は, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 により 1'位あるいは 3'位の水酸化を受ける (図 1)⁷⁾. 一方, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 は, 7-ethoxyresorufin (7-ER) の *O*-de-ethylation (EROD) 活性を有するが, Δ^9 -THC, CBD, CBN により阻害を受ける (図 1). その阻害活性の強さは, CYP の分子種, カンナビノイドにより大きく異なる. 山折りらは CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 における Δ^9 -THC, CBD, CBN の EROD 活性阻害定数 K_i 値を報告しており, 特に CYP1A1-CBD, CYP1A2-CBN, CYP1B1-CBN の組み合わせにおいて阻害活性が顕著に強い⁴⁾.

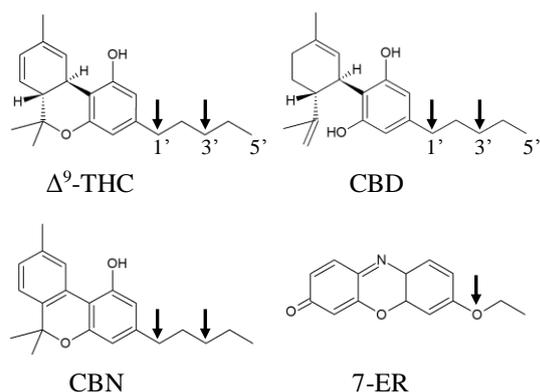


図 1 カンナビノイド及び 7-ER の構造式. 代謝部位を矢印で示す. カンナビノイドは水酸化を受け, 7-ER は *O*-脱エチル化を受ける.

この阻害活性の機構を明らかにするため CYP1 酵素とカンナビノイド及び 7-ER のドッキングシミュレーションを行い, 酵素-基質複合体の構造, 結合に関与するアミノ酸残基, その相互作用を調べ比較検討した.

方法

1. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 の構造

タンパク質構造データベース RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) から CYP1A1 (PDB ID: 4I8V)⁸⁾, CYP1A2 (PDB ID: 2HI4)⁹⁾, CYP1B1 (PDB ID: 3PM0)¹⁰⁾ の結晶構造を得た. 結晶構造中には水分子, 阻害剤分子等が含まれるため, これらを取り除きシミュレーションに用いる構造とした. CYP1A1 については, 結晶構造 4I8V 中の 4 分子 (A~D) のうち A 分子の座標を用いた.

CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 の結晶構造には, その阻害剤である α -naphthoflavone が結合しており, それぞれ Phe-224, Phe-226, Phe-231 と π - π スタッキングを芳香環の面間距離 3.5~3.8 Å で形成し, CYP1A2, CYP1B1 においては, それぞれ Phe-226-Phe-260, Phe-231-Phe-268 が基質を挟み込むように芳香性疎水ポケットを形成していた. CYP1 酵素と α -naphthoflavone 間の π - π スタッキング形成, 芳香性疎水ポケットとの相互作用に関与するアミノ酸残基は, シミュレーション結果においても同様の関与が見られた. 例として CYP1A2 における活性中心の構造を図 2 に示す. 結晶構造中の α -naphthoflavone は, 水素結合を形成していない. π - π スタッキングをグレーの領域で, 芳香環の面間距離を矢印で, 芳香性疎水ポケットをオープンサークル (塗りつぶしのない円) で示している (図 2)⁹⁾.

また, 3 つの酵素の C_α 重ね合わせを構造アライメントサーバ FATCAT (<http://fatcat.godziklab.org/>) を用い, 相同性を配列相同性検索サーバ NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用い調べた.

2. Δ⁹-THC, CBD, CBN 及び 7-ER の構造

ChemSketch (<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>) を用いて作成したのち、半経験的分子軌道法プログラム MOPAC (Ver 7.0) の PM3 法により最適化を行った。

3. CYP1 酵素と基質の複合体モデル

Molegro Virtual Docker Ver 6.0 (MVD)^{11, 12)}を用い CYP1 酵素と基質のドッキングシミュレーションを行った。グリッド幅 0.8 Å で CYP1 酵素の空洞を作成し、得られる 5 つの空洞のうち、ヘムに近接する空洞を活性中心とした。この空洞の重心を中心とする半径 15 Å, グリッド幅 0.3 Å の球体に対し 1500 (max iterations) × 10 (runs) の構造サーチを行い、Moldock Score (式 1)¹¹⁾の小さい順に安定な 3~5 の構造を得た。Score は、エネルギーに相当する無次元数であり、Score が小さいことは、エネルギーが低く安定であることを意味

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad \text{— (式 1)}$$

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{protein}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right]$$

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{protein}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexible bonds}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{clash}$$

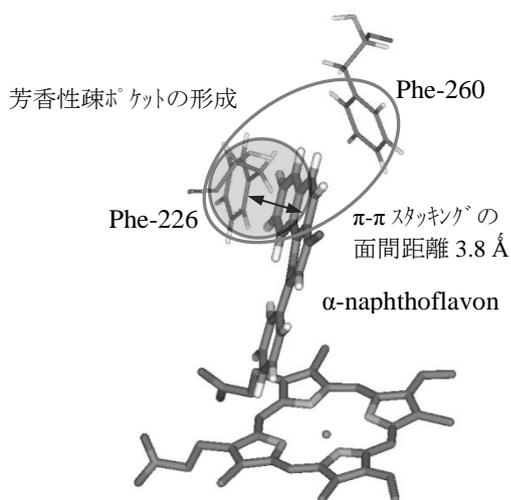


図 2 CYP1A2 の結晶構造 (2HI4) における α-naphthoflavone. 水素結合を点線で、芳香性疎水ポケットをオープンサークルで、π-π スタッキングをグレーの領域で示す。

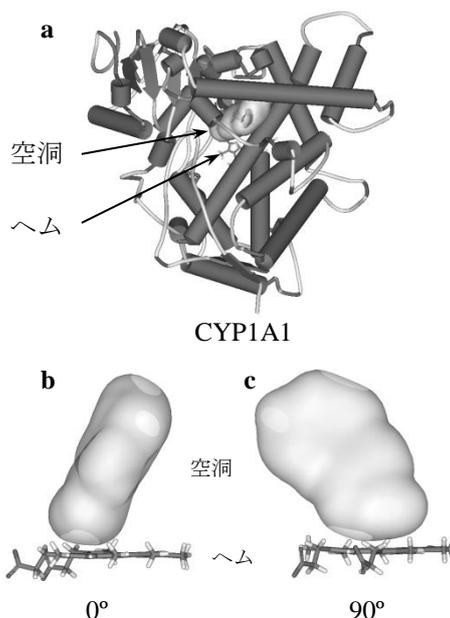


図 3 CYP1A1 のシリンダーモデル及びヘムと活性中心の空洞. a: CYP1A1 のシリンダーモデル. ヘム及び活性中心の空洞を矢印で示す. b, c: ヘム及び活性中心の空洞. c は b を 0° として 90° 回転させた図である。

している。式 1 において E_{inter} は分子間エネルギー, E_{intra} は分子内エネルギー, E_{PLP} は区分線形ポテンシャル (Piecewise Linear Potential)¹³⁻¹⁵⁾, E_{clash} は基質分子内で衝突が起こったときのペナルティ関数である¹¹⁾。

Moldock Score は、分子間及び分子内のポテンシャルエネルギーの合計であるため、原子の数、原子の種類が異なる構造モデル間では、比較することができない。一方、水素結合の Score である ‘HBond’ は、Protein-Ligand 間の値であるため比較することは可能である。また、π-π 相互作用そのものは、エネルギーの評価 (式 1) に組み込まれていないため、直接判断することはできないが、得られた構造において芳香環同士が平行で面間距離 3.5 Å 前後であれば、π-π スタッキングの形成が十分考えられる。なお、CYP は剛体として扱われ、シミュレーションの間にその構造が崩れることはない。

ドッキングシミュレーションでは、Score に基づき成績上位のドッキング構造が複数抽出される。多数の結合の組合せから高速で効率よく結合の可能性のある構造を抽出するため、活性中心に

作成したグリッド上において比較的粗い構造が抽出される。よって、効率よくドッキング構造の候補が抽出できる反面、構造最適化計算に比べると計算精度の点においてやや劣り、抽出された複数の候補中には実験事実とそぐわない構造が含まれることがある。しかし、現実には、酵素-基質の複合体が形成され代謝反応が起こることから、得られた構造のうち、Moldock Score がより小さく、代謝部位がヘム鉄により近い構造を CYP1 酵素-基質複合体モデルとして選択した。なお、 Δ^9 -THC, CBD, CBN の代謝部位は、3'位炭素 (C3'), 7-ER では、エトキシ基の酸素とした (図 1)。

4. モデルの表示

DS Visualizer 2.0 (Accelrys Inc.) を用い、得られた座標のモデル表示、空洞の表示を行い、原子間距離を求めた。

結果及び考察

1. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 の構造

CYP1A1 のシリンダーモデル及びヘムと活性中心の空洞を例として図 3 に示す。CYP1A1 分子のほぼ中央にヘムが、少しずつれてヘム第 6 配位座側に空洞が位置している (図 3a)。

CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 の構造は、P450 の中で最もその構造が保存されており、主に芳香族化合物の代謝に関与していることが知られている。NCBI BLAST によるアミノ酸一次配列の 'Identities' (一致する割合) 及び 'Positives' (性質の似たアミノ酸残基も一致とみなす割合) は、CYP1A1-CYP1A2 (73%, 85%), CYP1A1-CYP1B1 (41%, 60%), CYP1A2-CYP1B1 (40%, 57%) であり、RMSD (平均二乗偏差) は CYP1A1-CYP1A2 (1.61 Å), CYP1A1-CYP1B1 (2.24 Å), CYP1A2-CYP1B1 (2.48 Å) であった。ファミリーの異なる、例えば CYP1A1-CYP3A4 では、'Identities', 'Positives', RMSD はそれぞれ 21%, 41%, 3.0 Å で CYP1 酵素同士に比べ相対的に相同性は低く、 C_{α} の変動も

大きいことがわかる。また、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 の空洞の体積は、それぞれ 82.9 Å³, 74.4 Å³, 78.9 Å³ (平均値: 78.7 Å³) で他の CYP に比べ小さいもののその形状は、扁平であり、多環芳香族化合物など原子数の多い分子であっても平面的な形状であるため活性中心に結合することができると考えられる。また、空洞はいずれもヘムに対し傾いていた (図 3b, 3c)。

EROD 活性を阻害する強さは、CYP1A1 において CBD > CBN > Δ^9 -THC, CYP1A2 において CBN >> CBD > Δ^9 -THC, CYP1B1 において CBN >> Δ^9 -THC > CBD である⁴⁾。ここでは、2つの K_i 値の比較において 10 分の 1 以下である場合に阻害活性の強さを '>>' と表記した。7-ER よりも強い相互作用でカンナビノイドが CYP と結合すれば、EROD 阻害活性を示し、その結合が強ければ強いほど阻害活性も強いと考えられる。

カンナビノイド中の芳香環及び-OH 基の数に注目すると、 Δ^9 -THC は芳香環 1, -OH 基 1, CBD は芳香環 1, -OH 基 2, CBN は芳香環 2, -OH 基 1 を有しており、芳香環は π - π スタッキングに-OH 基は水素結合に関与する可能性がある。

一般に、水素結合よりも π - π スタッキング、疎水性相互作用のエネルギーは小さい。水素結合の結合エネルギーは 8~30 kJ/mol であり、結合の角度、距離により数値に幅があるが、例えば水の 2 量体では、約 21 kJ/mol である¹⁶⁾。一方、ベンゼン二量体の π - π スタッキングの結合エネルギーは、約 8.4 kJ/mol である¹⁷⁾。

2. CYP1A1-Ligands

CYP1A1 とリガンドとのドッキングシミュレーションの結果を表 1 及び図 4 に示す。

7-ER は、CYP1A1 の Phe-224 と芳香環が平行になった構造 (面間距離: 3.7 Å) が得られ、 π - π スタッキングが形成されていた (図 4a)。 Δ^9 -THC は、ヒドロキシ基 (-OH 基) と Gly-316 (ペプチド結合のカルボニル基) との間に水素結合が形成されており、水素結合の Score は、-2.5 であっ

表1 CYP1A1 と各基質のドッキングモデルにおける相互作用

基質	HBond	水素結合形成の アミノ酸残基 (-OH...O 間距離: Å)	π - π スタッキング形成の Phe (面間距離: Å), 疎水ポケット形成の Phe	反応部位と Fe の距離 (Å)	CYP1A1 と 基質の相互作用
7-ER	0.0	N.D.	Phe-224 (3.7 Å)	4.43	π - π スタッキング*
Δ^9 -THC	-2.5	Gly-316 (1.74)	N.D.	3.92	水素結合 (1)*
CBD	-2.1	Ser-116 (2.93)	Phe-224 (3.6 Å)	5.26	水素結合 (3) π - π スタッキング*
		Asp-313 (2.27)			
CBD	-2.1	Gly-316 (3.82)	Phe-224 (3.6 Å)	5.26	水素結合 (3) π - π スタッキング*
CBN	-2.5	Gly-316 (1.88)	Phe-224 (3.4 Å)	4.32	水素結合 (1) π - π スタッキング*

*括弧内の数値は、水素結合に関与するアミノ酸残基の数

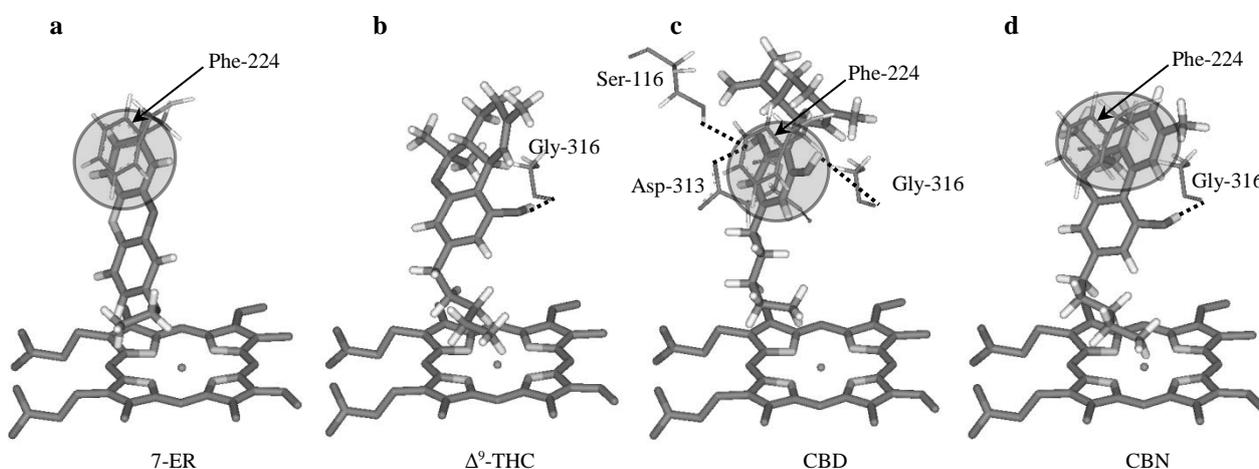


図4 CYP1A1 と各基質のドッキングモデル. 水素結合を点線で、 π - π スタッキングをグレーの領域で示し、グレーの領域内に含まれる Phe-224 を矢印で指している.

た (図 4b). CBD は、2つの-OH 基と Ser-116 (側鎖の-OH 基), Asp-313 (側鎖のカルボニル基), Gly-316 (ペプチド結合のカルボニル基) との間に水素結合が形成され (Score: -2.1), さらに Phe-224 と π - π スタッキングの形成が見られた (図 4c). CBN は、-OH 基と Gly-316 (ペプチド結合のカルボニル基) との水素結合 (Score: -2.5) 及び Phe-224 との π - π スタッキングが形成されていた (図 4d). 山折らは、CYP1A1-CBD において Phe-224 との π - π スタッキング, Asn-221, Leu-312 との水素結合を報告しているが¹⁸⁾, Phe-224 との π - π スタッキングは、一致するものの水素結合を形成するアミノ酸残基は異なっている. 用いられた CYP1A1 の構造は、CYP1A2 の結晶構造をテンプレートとしたホモロジーモデルであったため、

本研究で用いた CYP1A1 の結晶構造とアミノ酸残基の三次元配置が異なっていたことが原因であると考えられる.

CYP1A1 と基質の相互作用において、阻害活性の強さに結合の種類、数を括弧内に併記した序列は CBD (水素結合 3, π - π スタッキング 1) > CBN (水素結合 1, π - π スタッキング 1) > Δ^9 -THC (水素結合 1) > 7-ER (π - π スタッキング 1) であった.

水素結合の Score は CBD, CBN, Δ^9 -THC それぞれ -2.1, -2.5, -2.5 であり、1つの水素結合が強く形成されたときの Score は約 -2.5 であることから、それぞれ水素結合がおおよそ 1 つ分形成されていることに相当する. 例えば、CBD において水素結合に関与するアミノ酸残基の数は 3 つであっても Score は、-2.1 であり、水素結合としては約

1 つ分の Score である。

阻害活性の強さが CBD > CBN となる理由は、水素結合を 3 つのアミノ酸残基と形成する CBDの方が 1 つのアミノ酸残基と形成する CBN よりもゆらぎに対して確率的に安定な水素結合が形成できるためであると考えられる (図 4c, 4d)。つまり、熱力学的平衡状態における構造のゆらぎにより水素結合が切れることがあっても、複数の結合相手があれば、確率的に水素結合を形成しやすいと考えられる。

K_i 値との比較から水素結合に加え π - π スタッキングの形成があると、阻害活性は強くなると考えられる。CBN (水素結合 1, π - π スタッキング 1) の阻害活性は CBD (水素結合 3, π - π スタッキング 1) よりも弱いものの K_i 値は CBD において 0.155 μ M, CBN において 0.541 μ M であり, Δ^9 -THC (4.78 μ M) よりもそれぞれ約 31 分の 1, 約 9 分の 1 の濃度で、どちらも強い阻害活性を示している。

3. CYP1A2-Ligands

CYP1A2 とリガンドとのドッキングシミュレーションの結果を表 2 及び図 5 に示す。

7-ER は、CYP1A2 の Phe-226 と芳香環が平行になった構造 (面間距離: 3.6 Å) が得られ、 π - π スタッキングが形成されていた。さらに Phe-226 は、Phe-260 とともに芳香性疎水ポケットを形成していた (図 5a)。 Δ^9 -THC は、CYP1A1 の場合と同様、-OH 基と Gly-316 (ペプチド結合のカルボニル基) との間に水素結合が形成されており、水素結合の Score は、-2.5 であった (図 5b)。CBD は、2 つの-OH 基と Thr-124 (側鎖の-OH 基)、Asp-313 (側鎖のカルボニル基)、Gly-316 (ペプチド結合のカルボニル基) との間に水素結合が形成され、Score は、-2.8 であった (図 5c)。CBN は、-OH 基と Gly-316 (ペプチド結合のカルボニル基) との水素結合 (Score: -2.8) 及び Phe-226 と Phe-260 により形成される芳香性疎水ポケットに捉えられ、Phe-226 と π - π スタッキングの形成

が見られた (図 5d)。

CYP1A2 と基質の相互作用において、阻害活性の強さに結合の種類、数を括弧内に併記した序列は CBN (水素結合 1, π - π スタッキング 1, 芳香性疎水ポケット 1) >> CBD (水素結合 3) > Δ^9 -THC (水素結合 1) > 7-ER (π - π スタッキング 1) であった。

水素結合の Score は CBN, CBD, Δ^9 -THC それぞれ -2.1, -2.8, -2.5 であり、CYP1A1 での考察同様、それぞれ水素結合がおおよそ 1 つ分形成されていることに相当すると考えられる。また、CBD は、水素結合を形成するアミノ酸残基の数が 3 つあることから水素結合の形成が安定していると考えられる。

阻害活性が著しく強い CBN では、水素結合に加え、 π - π スタッキングの形成、芳香性疎水ポケットとの相互作用が見られた。 K_i 値に基づく阻害活性の強さの序列と相互作用の対応から、CBN では CBD の安定的に形成される水素結合よりもさらに安定な結合が形成されていることになり、水素結合のみよりも水素結合に加え π - π スタッキングの形成及び芳香性疎水ポケットとの相互作用の存在が大きく寄与していると考えられる。 π - π スタッキングの形成 (芳香環同士が完全に平行で重なり合う必要はない¹⁷⁾) 及び芳香性疎水ポケットとの相互作用 (疎水性部位がポケット内にあればよい) は、水素結合が成立する条件 (結合角, 距離) に比べて柔軟性が高い。つまり π - π スタッキングの形成及び芳香性疎水ポケットとの相互作用は、それ自体が結合に寄与すると同時に、活性中心の空洞内における基質の空間的配置を柔軟性をもって安定させ、さらに水素結合の形成を安定させる要因となっていると考えられる。水素結合に関与するアミノ酸残基が複数存在する効果よりも水素結合に加え π - π スタッキングの形成、芳香性疎水ポケットとの相互作用が存在することの効果の方が安定化により寄与していると考察する。

表2 CYP1A2 と各基質のドッキングモデルにおける相互作用

基質	HBond	水素結合形成の アミノ酸残基 (-OH...O 間距離: Å)	π - π スタッキング形成の Phe (面間距離: Å), 疎水ポケット形成の Phe	反応部位と Fe の距離 (Å)	CYP1A2 と 基質の相互作用
7-ER	0.0	N.D.	Phe-226 (3.6), Phe-260	4.42	π - π スタッキング ^a 芳香性疎水ポケット
Δ^9 -THC	-2.5	Gly-316 (2.16) Thr-124 (1.81)	N.D.	3.77	水素結合 (1)*
CBD	-2.8	Asp-313 (2.77) Gly-316 (2.91)	N.D.	3.63	水素結合 (3)
CBN	-2.1	Gly-316 (2.22)	Phe-226 (3.8), Phe-260	5.40	水素結合 (1) π - π スタッキング ^a 芳香性疎水ポケット

*括弧内の数値は、水素結合に関与するアミノ酸残基の数

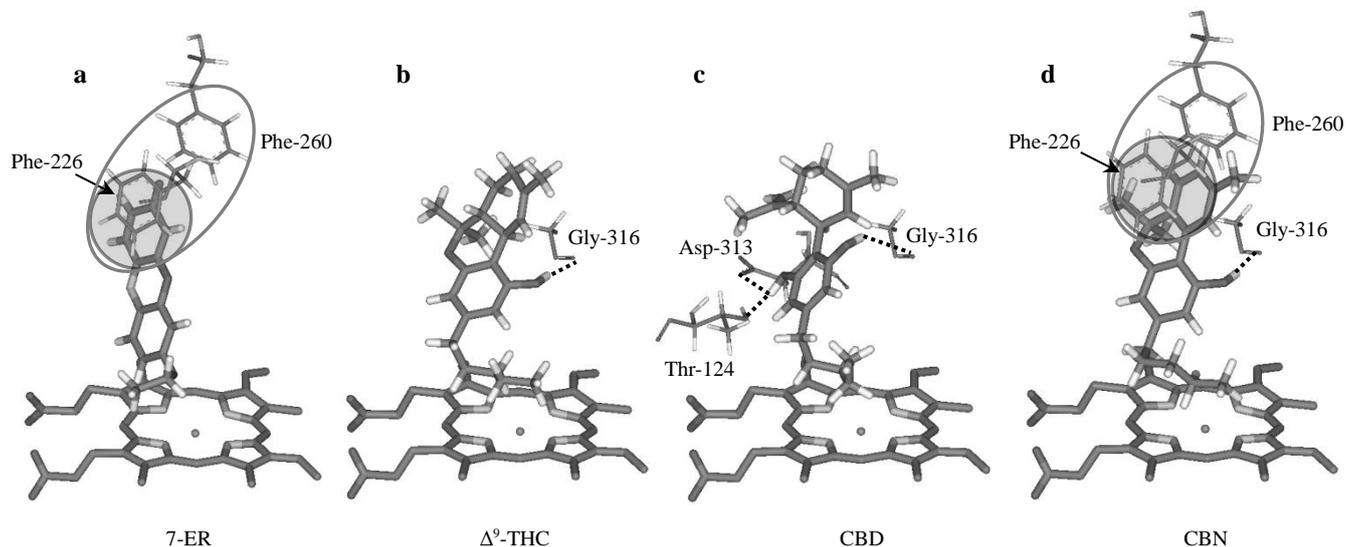


図5 CYP1A2 と各基質のドッキングモデル. 水素結合を点線で、芳香性疎水ポケットをオープンサークルで、 π - π スタッキングをグレーの領域で示し、グレーの領域内に含まれる Phe-226 を矢印で指している。

4. CYP1B1-Ligands

CYP1B1 とリガンドとのドッキングシミュレーションの結果を表3及び図6に示す。

7-ERは、CYP1B1のPhe-231と芳香環が平行になった構造(面間距離: 3.7 Å)が得られ、 π - π スタッキングを形成していた。また、Phe-231は、Phe-268とともに芳香性疎水ポケットを形成していた(図6a)。 Δ^9 -THCは、-OH基とGly-329(ペプチド結合のカルボニル基)との間に水素結合が形成されており、水素結合のScoreは、-2.5であった(図6b)。CBDは、2つの-OH基とAsp-326

(側鎖のカルボニル基)、Gly-329(ペプチド結合のカルボニル基)との間に水素結合が形成され(Score: -2.1)、さらにPhe-231との π - π スタッキングの形成が見られた(図6c)。CBNは、-OH基とGly-329(ペプチド結合のカルボニル基)との水素結合(Score: -2.5)及びPhe-231との π - π スタッキングの形成が見られた(図6d)。

CYP1B1と基質の相互作用において、阻害活性の強さの序列に結合の種類、数を括弧内に併記するとCBN(水素結合1, π - π スタッキング1, 芳香性疎水ポケット1) >> Δ^9 -THC(水素結合1) >

表3 CYP1B1 と各基質のドッキングモデルにおける相互作用

基質	HBond	水素結合形成の アミノ酸残基 (-OH...O 間距離: Å)	π - π スタッキング形成の Phe (面間距離: Å), 疎水ポケット形成の Phe	反応部位と Fe の距離 (Å)	CYP1B1 と 基質の相互作用
7-ER	0.0	N.D.	Phe-231 (3.7), Phe-268	4.42	π - π スタッキング [☆] 芳香性疎水ポケット
Δ^9 -THC	-2.5	Gly-329 (2.02)	N.D.	3.90	水素結合(1) [*]
CBD	-2.1	Asp-326 (2.89) Gly-329 (3.05)	N.D.	4.23	水素結合(2)
CBN	-2.5	Gly-329 (2.12)	Phe-231 (3.4), Phe-268	4.72	水素結合(1) π - π スタッキング [☆] 芳香性疎水ポケット

*括弧内の数値は、水素結合に関与するアミノ酸残基の数

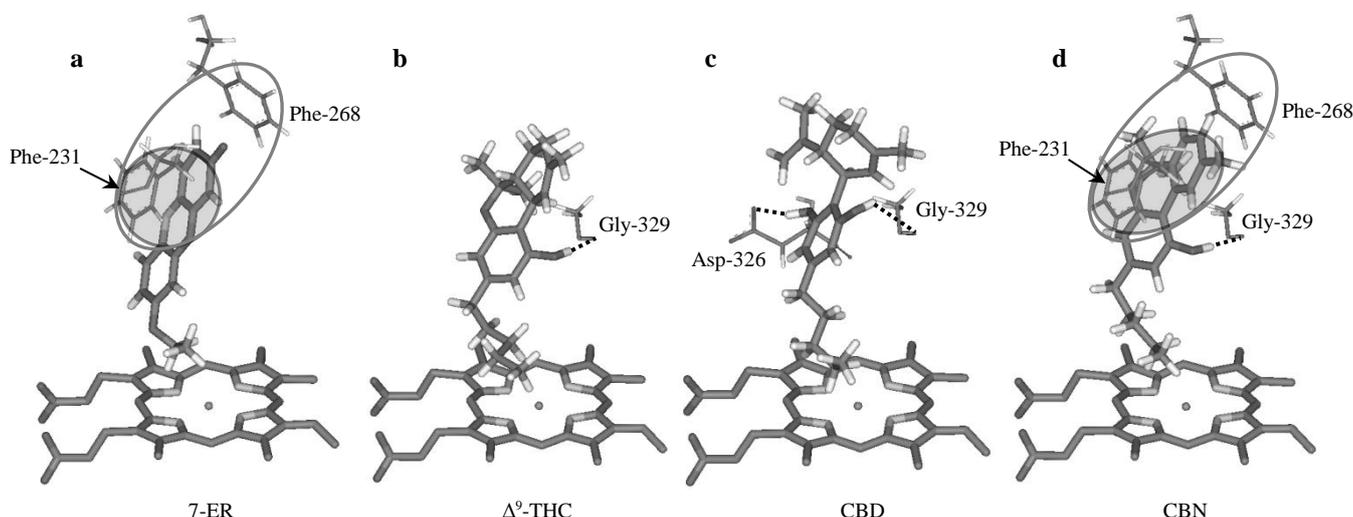


図6 CYP1B1 と各基質のドッキングモデル。水素結合を点線で、芳香性疎水ポケットをオープンサークルで、 π - π スタッキングをグレーの領域で示し、グレーの領域内に含まれる Phe-231 を矢印で指している。

CBD (水素結合 2) > 7-ER (π - π スタッキング 1) である。

水素結合の Score は CBN, Δ^9 -THC, CBD それぞれ -2.5, -2.5, -2.1 であり, CYP1A1 での考察と同様にそれぞれ水素結合がおおよそ 1 つ分形成されていることに相当すると考えられる。

CYP1A2 の場合と同様に、著しく阻害活性の強い CBN においては、水素結合に加え、 π - π スタッキングの形成及び芳香性疎水ポケットとの相互作用が見られた。CBN の阻害活性が著しく強い理由は、CYP1A2 での考察と同様である。CYP1A1 における考察と同様に複数のアミノ酸残基と水素結合を形成しているとゆらぎに対し

て安定な水素結合が形成できると考えたとき、CBD の方が Δ^9 -THC よりも阻害活性は強いことになるが、序列は逆転している。この点において矛盾が生じるが CYP1A1-CBD における水素結合の形成が 3 に対し CYP1B1-CBD では 2 であることから、数が 2 では確率的に安定な水素結合形成への寄与が 3 のときよりも小さく、数が 1 のときと同程度であるために実験データ上の序列で逆転が起こった可能性がある。これを K_i 値で比較すると Δ^9 -THC, CBD それぞれ 2.47, 3.63 μM ⁴⁾ であり、 Δ^9 -THC の K_i 値は CBD の約 70% で極端な差とはなっていない。

ドッキングシミュレーションにより CYP1 酵

素とカンナビノイドの結合に関与する重要なアミノ酸残基が明らかとなった。また、得られた構造と相互作用を阻害活性の強さとを対応させることにより、阻害活性が著しく強い CYP1A1-CBD, CYP1A2-CBN, CYP1B1-CBN における相互作用は、水素結合と π - π スタッキング、芳香性疎水ポケットとの組み合わせであることがわかった。水素結合に π - π スタッキングの形成、芳香性疎水ポケットの相互作用が加わることによって、より強い阻害活性が発揮されたと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、重要な示唆を賜りました第一薬科大学 渡邊和人教授、信州大学医学部附属病院薬剤部 山折大准教授に感謝致します。

引用文献

- 1) Beresford A.P.: CYP1A1: Friend or Foe?, *Drug Metab. Rev.*, 25(4), 503-517 (1993).
- 2) Shimada T., Yun C.H., Yamazaki H., Gautier J.C., Beaune P.H., Guengerich F.P.: Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens, *Mol. Pharmacol.*, 41, 856-864 (1992).
- 3) Shimada T., Hayes C.L., Yamazaki H., Amin S., Hecht S.S., Guengerich F.P., Sutter T.R.: Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1, *Cancer Res.*, 56, 2979-2984 (1996).
- 4) Yamaori S., Kushihara M., Yamamoto I., Watanabe K.: Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes, *Biochem. Pharmacol.*, 79, 1691-1698 (2010).
- 5) Yamaori S., Maeda C., Yamamoto I., Watanabe K.: Differential inhibition of human cytochrome P450 2A6 and 2B6 by major phytocannabinoids, *Forensic Toxicol.*, 29, 117-124 (2011).
- 6) Yamaori S., ebisawa J., Okushima Y., Yamamoto I., Watanabe K.: Potent inhibition of human cytochrome P450 3A isoforms by cannabidiol: role of phenolic hydroxyl groups in the resorcinol moiety, *Life Sci.*, 88, 730-736 (2011).
- 7) Yamamoto L., Watanabe K., Narimatsu S., Yoshimura H.: Recent advances in the metabolism of cannabinoids, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27(8), 741-746 (1995).
- 8) Walsh A. A., Szklarz G. D., Scott E. E.: Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism, *J. Biol. Chem.*, 288, 12932-12943 (2013).
- 9) Sansen S., Yano, J. K., Reynald R. L., Schoch G. A., Griffin K. J., Stout C. D., Johnson E. F.: Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2, *J. Biol. Chem.*, 282, 14348-14355 (2007).
- 10) Wang A., Savas U., Stout C. D., Johnson E. F.: Structural characterization of the complex between α -naphthoflavone and human Cytochrome P450 1B1, *J. Biol. Chem.*, 286, 5736- 5743 (2011).
- 11) Molegro virtual docker user manual, CLC bio, Denmark, 2013.
- 12) Thomsen R., Christensen M. H.: MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking, *J. Med. Chem.*, 49(11), 3315-3321 (2006).
- 13) Gehlhaar D. K., Verkhivker G., Rejto P. A., Fogel D. B., Fogel L. J., Freer S. T.: Docking conformationally flexible small molecules into a protein binding site through a evolutionary programming, *Proceedings of the fourth international conference on evolutionary programming*, 615-627 (1995)

- 14) Gehlhaar D. K., Bouzida D., Rejto P. A.: Fully automated and rapid Flexible docking of inhibitors covalently bound to serine proteases, *Proceedings of the seventh international conference on evolutionary programming*, 449-461 (1998)
- 15) Yang J-M., Chen C-C.: GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking, *Proteins*, 55, 288-304 (2004).
- 16) Tsuzuki S., Luthi H. P.: Interaction energies of van der Waals and hydrogen bonded systems calculated using density functional theory: Assessing the PW91 model, *J. Chem. Phys.*, 114, 3949-3957 (2001).
- 17) Tsuzuki S., Honda K., Uchimaru T., Mikami M., Tanabe K.: Origin of Attraction and Directionality of the π/π Interaction: Model Chemistry Calculations of Benzene Dimer Interaction, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 104-112 (2002).
- 18) Yamaori S., Okushima Y., Masuda K., Kushihara M., Katsu T., Narimatsu S., Yamamoto I., Watanabe K.: Structural requirements for potent direct inhibition of human cytochrome P450 1A1 by cannabidiol: Role of pentylresorcinol moiety, *Biol. Pharm. Bull.*, 36(7), 1197-1203 (2013).