

〈研究報告〉

キサンチン酸化還元酵素 —物理学から臨床医学まで—

岡本 研¹・菊地浩人²

Xanthine Oxidoreductase: from physics to clinical medicine

Ken OKAMOTO, Hiroto KIKUCHI

アブストラクト

キサンチン酸化還元酵素 (XOR) はプリン異化経路に属する酵素であり、代謝学的に重要な酵素である。しかしそれだけではなく、XORはタンパク分子として種々のユニークな特徴を持ち、多くの分野において重要な研究対象となっている珍しい酵素である。その阻害剤は尿酸の産生を抑制し、血清尿酸値を低下させる効果があるため、痛風の治療薬として臨床で広く用いられ、医学、薬学において重要なタンパク分子となる。阻害剤の売り上げは年間1000億円以上にもおよび、医療経済の点からも重要な分子となる。哺乳類 XORは特定の条件下で構造変化をおこし、活性酸素を生じるため、種々の病態との関連が示唆されている。構造変化の機構は生化学、構造生物学的に、病態との関連は医学研究において重要な研究対象となる。種々の補酵素は生体高分子に対する分光学的解析の先駆けとなるとともに、モリブデンを用いた水酸化機構はタンパク質の動的解析、化学反応のシミュレーションのよい対象となるので、生物物理学においても重要な分子である。

本稿は、Ⅱ部構成となっており、第Ⅰ部では XOR分子の構造と活性酸素生成機構、生理的役割、医学的な重要性 (酵素欠損症、阻害剤)、第Ⅱ部では XOR

¹ 日本医科大学・生化学・分子生物学教室 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

² 日本医科大学・物理学教室 Department of Physics, Nippon Medical School

の阻害剤に対する阻害作用を深く理解するために、XOR の動的構造という視点の研究に関して、その考え方を中心として説明されている。

第 I 部 XOR による尿酸の産生機構と生理作用

1. キサンチン酸化還元酵素について

キサンチン酸化還元酵素 (xanthine oxidoreductase; XOR) はバクテリアから哺乳類、高等植物にわたる広範囲の生物種が有している酵素であり、分子量、アミノ酸配列、立体構造、酸化還元中心の構成などほぼ同じ構成である [1-3] (図 1、図 2)。XOR は同じ単位 2 つから成り立っているが (図 2)、今その単位をサブユニットと呼ぶことにする。図 1 には、サブユニットにおける、ラット、ヒト、ウシ、ニワトリ、バクテリアのアミノ酸配列を示したが、図中左上に示してある通りサブユニットは 3 個のドメインから構成されており、N 末端にある 20kDa のドメインには 2 種の [2Fe-2S] 型の鉄硫黄中心、中央にある 40kDa のドメインには FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド)、C 末端にある 85kDa のドメインにはモリブドプテリンというモリブデン原子を含む補酵素が存在する。XOR は天然基質であるキサンチン、ヒポキサンチンだけでなく多くのヘテロサイクル化合物、アルデヒドを水酸化する [4]。XOR の生理的役割は生物種により異なる。鳥類、爬虫類はアミノ窒素を尿酸として排泄する動物であり、アミノ基は de novo 合成を介して尿酸となった後尿中に排泄される。哺乳類における XOR の主な役割はアデニンとグアニンを含むヌクレオチドの異化にある。また昆虫では XOR は色素代謝にも関与している [5]。XOR の遺伝子発現および調節は生物種により異なる。哺乳動物においては常時一定量発現しているいわゆる housekeeping enzyme であり、常に一定量は発現している。XOR はプリン分解系の最終の 2 段階を触媒する酵素であり、ヒポキサンチンを水酸化してキサンチンに、さらにキサンチンを水酸化して尿酸に代謝する (図 7-1)。ヒトにおいて XOR は尿酸を産生する唯一の酵素であるため、尿酸生成阻害による痛風、高尿酸血症治療薬の標的酵素となる。

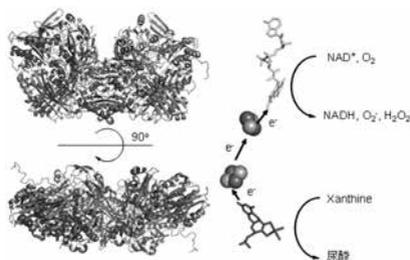


図2：(左) ウシキサンチン酸化還元酵素（XOR）の結晶構造。

(右) XORの補酵素；反応サイクル中の電子の流れと基質との反応部位を示す。

2. 活性変換の分子機構

XORはNAD⁺を電子受容体とするキサンチン脱水素酵素（xanthine dehydrogenase; XDH）として組織中に存在するが、哺乳動物の酵素のみは酸素を主な電子受容体とするキサンチン酸化酵素（xanthine oxidase; XO）へと活性が変換する [6]。XDHとXOの主な違いは、FADにおける電子の受容体がNAD⁺であるか酸素分子であるかによる。XDHと酸素との電子授受の反応は遅く、NAD⁺との反応が早い。XOはこの逆となる。他の酸化還元活性中心、モリブドプテリンと鉄硫黄中心の性質は変化しない。活性変換の分子機構は結晶構造の情報を用いて詳細に解析されている [7]。XDH及びXOはそれぞれ1.65および2.3Åの分解能で結晶構造が決定され、FAD結合部位周囲の環境の違いとFADをとり囲む水素結合ネットワークが明らかになった。活性変換は連鎖的構造変化による複雑なプロセスである。①活性変換は分子内のジスルフィド結合の形成、プロテアーゼによるドメイン間ループ部の切断がトリガーとなる。②N端側ドメインと中央部ドメインを連結するループはタンパク質表面にゆるく結合しているが、トリガー部位の変化により安定性を失い、表面から解離する。③ループ上に存在するPhe549を含むπカチオン相互作用に基づくアミノ酸クラスターが解離する。④フラビン近傍のループ領域（A-ループ、Gln423-Lys433）の構造が大きく変化し、XDHではアスパラギン酸がイソアロキサジン環のC6位近傍に存在しているが、XOではアルギニンが接近するようになる（図4）。FAD付近の静電的環境の違いがFADの還元電位の変化を引き起こす主要因と考えられる。さらにXOではループ領域の構造変化により立体障害が生じ、NAD⁺結合

部位が消失するとともに、酸素の接近に適した疎水領域に富む新たな溶媒チャンネルが生じる (図3)。

最終的に FAD 周辺に存在するループ (A-ループ) の構造が大きく変化することで XO は NAD^+ との反応性を失い、同時に酸素を還元してスーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素を生ずるようになる。最近の研究によれば C 末端の構造の変化により活性変換のエネルギー障壁が変化し、活性変換を制御していることが明らかになり、他のタンパク質や細胞膜などとの相互作用により構造変化が惹起される可能性が示唆されている [8]。C 末端ペプチドを欠失させた変異酵素は XDH と XO デヒドロゲナーゼおよびオキシダーゼの中間的構造を持ち、酵素活性上も XDH と XO の中間的性質を示す [8]。

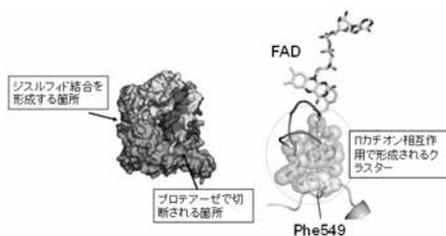


図3：(左) ウシ XOR のサブユニットと活性変換に関与するドメイン間ループを示す。
(右) 活性変換に関与するアミノ酸クラスター。

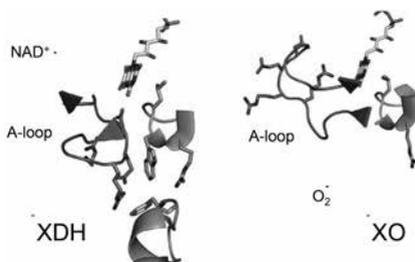


図4：脱水素酵素 (XDH) と酸化酵素 (XO) の A-loop の構造。それぞれの基質の接近方向を示す。

活性変換はいくつかの生理学および病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たす。XOR は血管内皮細胞に豊富に存在し [9, 10]、XO により産生される活性酸素による組織障害が、虚血再還流障害をはじめとする種々の病態の原因であ

るとする説が提出された [11]。それを期に病態に関する XOR の関与について膨大な数の論文が出されている [12, 13]。また、乳汁中では XO として存在すること、XOR のノックアウトマウスでは乳腺細胞内の脂肪滴の蓄積、子の発育異常などが観察されることから、活性変換は乳汁分泌に必要な過程であると推測されている [14]。ストレス時に XOR と血管内皮細胞膜との相互作用が報告されており [15]、XOR の局在の変化と活性変換の運動が血管障害に関与するという報告がある [16]。D/O 変換が生じるときに酵素分子表面での最も大きな変化は C 末端ペプチドの構造変化であり、C 末端の構造変化に伴う他のタンパク質や膜との相互作用が関与している可能性が示唆されている [8]。

3. 哺乳動物におけるキサンチン酸化還元酵素の生理的役割

哺乳類 XOR は肝臓および血管内皮細胞を含む種々の器官に分布し、乳腺にも豊富に存在する。乳腺組織中で XOR は他のタンパク質と複合体を形成しており、脂肪滴安定化に働くと考えられている。乳汁中の脂肪滴は milk fat globule membrane (MFGM) と呼ばれる特定のタンパク質で覆われた構造体として存在している。MFGM は乳腺上皮細胞の細胞膜に由来し、分泌の過程で脂肪滴を覆うような形態をとる。MFGM はいわばミセルのような状態をとり、中性脂肪を乳汁中で安定な状態に保つ役割を持っている。乳汁分泌過程における XOR の関与についていくつかの実験的証拠が報告されている。McManaman らは、マウスの乳腺において授乳開始時に XOR の発現が増大し、アディポフィリン (ADPH)、ブチロフィリン (BTN) と複合体を形成することを報告した [17]。ADPH は脂肪滴と結合し、BTN は細胞膜の細胞質側に結合している。XOR はこれらタンパク質と複合体を形成し、乳腺細胞の脂質滴分泌過程における細胞膜との相互作用の際に機能すると考えられている。Vorbach らは XOR 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、解析を行っている [14]。(−/−) ホモ接合マウスは腎不全により生後 6 週間以内に死亡したが、ヘテロ接合体 (+/−) マウスは生存し、正常な生殖能力を持つまでに成長した。しかし、ヘテロ接合体 (+/−) 雌は授乳中にすべての仔は出生直後飢餓で成長障害をきたすか死亡した。電子顕微鏡による解析では、XOR 欠損マウスは乳腺細胞における脂肪滴形成不全を示唆する所見を認めた。Harrison らのグループによる一連の研究では XOR は主に乳脂肪滴で不活性な demolybdo 型として存在している。すなわち脂肪滴形成機構には XOR の

酵素活性は関係なく、タンパク構造が重要であることを示唆している[18]。一方、XORのオキシダーゼ活性により生成される活性酸素が抗菌作用をもたらしているとする見解がある。実際、新鮮な乳汁において大腸菌の増殖を阻害することが示されている[19]。乳汁中のXORはdemolybdo型であること、基質となるプリン濃度が低いことからもう一方の活性部位であるフラビンを介した活性酸素産生が考えられる。XORは広い範囲の基質の水酸化を触媒し、ROSの生成を行う。XORはROS産生を介し虚血再灌流障害に関与しており、XOR由来のROSが炎症反応および胃腸管の抗菌防御において重要な役割を果たすことが示唆されている。さらに、MouraらのグループはXORが亜硝酸塩を還元し、強力な血管拡張物質である一酸化窒素(NO)を生成することを報告している[20]。低酸素条件下でXOは亜硝酸塩を還元し、NOを生成することが確認されている。さらに亜硝酸存在下では牛乳中XORの殺菌作用は増強されるという報告もある[21]。XORにより生産されるNOは、例えば、虚血に対して保護的な役割を果たしている可能性が示唆されている[20]。しかし、XOによって報告されたNO産生は嫌気性条件下であっても非常に低い。OH、モリブデン(IV)の水分子と交換性のある水酸基がNOを生成するNO₂によって置換され得ることは化学的にありうる状態である。これらの非常に遅い反応が生理学的意義を持っているかどうかはまだ明らかではない。

4. XORと医療の関連性

XORは尿酸を産生する唯一の酵素であり、XORのいくつかの阻害剤は安定した反応中間体または中間体類似構造を形成することにより酵素を阻害する。アロプリノールは50年近くにわたり抗痛風薬として使用されている化合物であり、生体基質であるヒポキサンチンの異性体である。アロプリノールでは8位の炭素原子が窒素に、隣接する7位窒素が炭素に置換されている。当初はキサンチンのモリブデン中心への結合に競合する阻害剤として機能すると考えられたが、実際にはより複雑な方法で阻害する。還元された酵素と阻害剤の強固に結合した複合体(図5左)が形成されることで阻害作用を及ぼすことが明らかになっている。アロプリノール自体は、実際にはXOの基質であり、オキシプリノールに変換され、モリブデン中心と複合体を形成する。ウシ、バクテリアXOにおいてオキシプリノール結合構造の結晶構造が決定されており、モリブデン(IV)に配位す

る水分子がオキシプリノールの2位窒素原子で置換されている。オキシプリノールは、最終的に空気中の酵素の再酸化の際に解離するものの（37℃における半減期は2～3時間）[22]、このタイトな複合体の形成がアロプリノールの強力な阻害効果の理由である。

長期間にわたりアロプリノールは高尿酸血症の治療に使用される唯一の XOR 阻害剤であったが、現在ではフェブキソスタット、トピロキソスタットも国内外において承認されている。両化合物ともにアロプリノールよりも強力な血中尿酸濃度の低下作用を認めている。両化合物はアロプリノールよりも大きい分子であり、XOR との結合機構はかなり異なる。ウシ酵素とフェブキソスタット複合体においては水素結合、イオン結合、疎水相互作用などの複数の相互作用を介して、構造ベースの阻害剤として作用し、XOR の基質結合ポケットのほとんどを隙間なく満たしている（図5右）。バクテリア XOR の基質結合ポケットは哺乳類のものとは非常によく似た構造をしており、ドッキング・シミュレーションにおいてもフェブキソスタットは安定してポケット内に存在できる。しかし実際の阻害活性ではバクテリア酵素に対しては哺乳類酵素の10万分の1の強さしか示さない[23]。これは異なる種族間では酵素の構造は似ていても動的性質が異なることに起因する。動的構造に関する記述は、第II部で説明される。

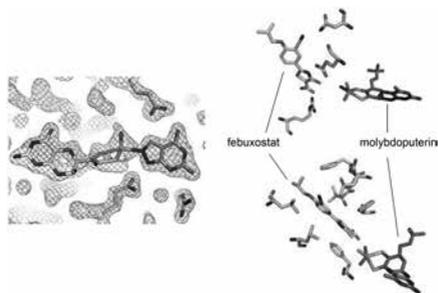


図5：(左) ウシ XOR とオキシプリノールの複合体結晶構造；電子密度図を網目で示す。オキシプリノールとモリブデン原子間には電子密度のつながりが観察され、共有結合の存在を示す。
(右) ウシ XOR とフェブキソスタットの複合体結晶構造。

5. 阻害剤の痛風以外への適応と XOR 欠損症

前述したように XOR 阻害剤は低酸素ストレスなどに際して組織保護の効果を有するとされる多くの報告があるが、最近になり筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスに対する病態進行遅延効果が報告されている [24]。機序の解明のためには XOR 欠損症患者の解析が役立つと考えられる。XOR 単独欠損症では基質であるキサンチンが尿酸へと代謝されず尿中に排泄されるキサンチン尿症を呈するほかはほぼ無症状で経過する [25]。プリン排泄系においてキサンチンの前駆体であるヒポキサンチンからキサンチンへの変換もまた XOR により触媒されるが、ヒポキサンチンはサルベージ回路によりイノシン酸に変化し、ATP などへと再利用されるので、ヒポキサンチンは蓄積しない。欠損症患者は血清尿酸値が低い (1mg/dL 以下)、血液検査において発見されることが多い。腎性低尿酸血症は尿酸トランスポーターの異常による尿細管からの尿酸再吸収障害により発症するが、こちらも無症状に経過する。尿酸は組織中で有力なラジカルスカベンジャー (反応性の高いラジカルと反応し、安定なラジカルを生成する物質) として働くと考えられ [26]、濃度が低下した場合に障害が出る可能性があるが、実際にはそれを示唆する報告はない。尿酸以外にもビタミン C など同様の作用を行う物質があり、それらで補完されると考えられる。今後は XOR 欠損症の解析も含む低尿酸状態の解析が必要となるだろう。

第Ⅱ部 XOR と阻害剤の作用に関する研究 — タンパク質の動的構造の視点から —

第Ⅰ部においては、XOR に関して、幅広い視点から俯瞰的且つ概論的に記述されてきた。第Ⅱ部においては、1つの研究テーマに絞って、研究を進めるに当たっての考え方を中心にした内容となる。研究のテーマは、XOR の静的な 3 次元構造から単純には明らかにすることができないような、阻害剤による阻害作用の違いを解明することである。その際の 1つの方法論として、タンパク質の動的構造に着目する視点に基づいてまとめられている。

1. キサンチン酸化還元酵素の3次元構造と痛風薬

(1) キサンチン酸化還元酵素 (XOR) の3次元構造と PDB

タンパク質の3次元構造は、その機能と密接に関係していると初歩的な生物学の教科書にも記述され、1980年代からタンパク質の結晶化技術の発展に伴って、主にX線結晶解析によって指数関数的に3次元構造が解明されてきた。XORの3次元構造に関しては、図6-1、図6-2にも示した通り、2000年以降明らかにされてきた。

興味深いことに、バクテリアと哺乳類といった進化的に非常に離れているXORでも、3次元構造が似ていることがわかった。特に、基質が反応する反応中心付近では、バクテリアと哺乳類の3次元構造はほぼ同じと言って良い。これと呼応するかのよう、ヒポキサンチンやキサンチンといった基質の反応に関しては、両者は同じ反応を示す。

コード名	登録年	採取元	分解能	反応ポケットに結合している分子、その他の特徴	文献
1FIQ	2000/8/4	ウシミルク	2.5 Å	基質、阻害剤なし	27
1FO4	2000/8/24	ウシミルク	2.1 Å	基質、阻害剤なし	27
1JRO	2001/8/14	Rhodobacter capsulatus	2.7 Å	アロキサンチン	28
1JRP	2001/8/14	Rhodobacter capsulatus	3 Å	アロキサンチン	28
1NSX	2002/11/7	ウシミルク	2.9 Å	フェブキノスタット(TEI-6720)	29
1V97	2004/1/21	ウシミルク	1.94 Å	FYX-051	30
1VDV	2004/3/25	ウシミルク	1.98 Å	Y-700	31
1WYG	2005/2/14	ラット肝臓	2.6 Å	アミノ酸3つの置換(C535A, C992R, C1324S)	
2CKJ	2006/4/19	ヒトミルク	3.59 Å	オキシダーゼ型の不完全変換	
2E1Q	2006/10/27	ヒトミルク	2.6 Å	アミノ酸1つの置換(E803V)	32
2E3T	2006/11/28	ラット肝臓	2.28 Å	アミノ酸2つの置換(W335A, F336L)	33
3B9J	2007/11/5	ヒト	2.3 Å	基質(2-hydroxy-6-methylpurine)	34
3BDJ	2007/11/14	ヒトミルク	2.0 Å	オキシプリンノール	35
3ETR	2008/10/8	ヒト	2.2 Å	キサンチン、ルマジン	36
3ELB	2008/10/9	ヒト	2.6 Å	基質(2-hydroxy-6-methylpurine), desulfo-form	36
2WR	2008/11/14	Rhodobacter capsulatus	2.9 Å	ヒポキサンチン(6-hydroxypurine), desulfo-form	37
2W3S	2008/11/14	Rhodobacter capsulatus	2.9 Å	キサンチン, desulfo-form	37
2W54	2008/12/4	Rhodobacter capsulatus	3.3 Å	Pterin-6-aldehyde	37
2W55	2008/12/4	Rhodobacter capsulatus	3.4 Å	ヒポキサンチン, アミノ酸1つ置換(E232Q)	37

図6-1: PDBに登録されているXDH (熱いXOR)の一覧(その1)。

コード名	登録年	採取元	分解能	反応ポケットに結合している分子、その他の特徴	文献
3NRZ	2010/7/1	ウシミルク	1.8 Å	ヒポキサンチン	38
3NR1	2010/7/1	ウシミルク	2.6 Å	6-mercaptopurine	38
3NVV	2010/7/8	ウシミルク	1.82 Å	Arsenic	39
3NVW	2010/7/8	ウシミルク	1.6 Å	indole-3-acetaldehyde and guanine	40
3NVZ	2010/7/8	ウシミルク	1.6 Å	indole-3-acetaldehyde and guanine	40
3NVY	2010/7/8	ウシミルク	2.0 Å	flavonoid inhibitor quercetin	41
3AM9	2010/8/27	ウシミルク	2.17 Å	FYX-051	22
3AMZ	2010/8/27	ウシミルク	2.1 Å	尿酸塩	42
3AN1	2010/8/27	ラット肝臓	1.73 Å	尿酸塩	42
3AX7	2011/3/30	ウシミルク	2.34 Å	protease cleaved form	43
3AX9	2011/3/31	ウシミルク	2.3 Å	protease cleaved form	43
3SR6	2011/7/7	ウシミルク	2.1 Å	Arsenic	39
3ZVY	2011/8/27	マウス肝臓	2.545 Å	aldehyde oxidase	44
3UNA	2011/11/15	ウシミルク	1.9 Å	NAD bound (conformational gating)	43
3UNC	2011/11/15	ウシミルク	1.65 Å	conformational gating	43
3UNI	2011/11/15	ウシミルク	2.2 Å	NADH bound (conformational gating)	43
4YRW	2015/3/16	ウシミルク	1.99 Å	C-terminal deletion protein	8
4YSW	2015/3/17	ウシミルク	1.99 Å	NADH bound (C-terminal deletion protein)	8
4YTY	2015/3/18	ラット肝臓	2.2 Å	NADH bound, アミノ酸3つの置換(C535A, C992R, C1324S)	8
4YTZ	2015/3/18	ラット肝臓	2.3 Å	C-terminal deletion protein (intermediate form)	8
5G5G	2016/5/25	ショウジョウバエ	1.7 Å	Aldehyde Oxidoreductase	45
5G5H	2016/5/25	ショウジョウバエ	2.3 Å	Aldehyde Oxidoreductase, アミノ酸1つ置換(R440H)	45

図6-2: PDBに登録されているXDH (熱いXOR)の一覧(その2)。

(2) XOR の阻害剤

基質の反応は、図 7-1 に示すように、ヒポキサンチン (6-hydroxypurine) をキサンチン (2,6-dihydroxypurine) に、キサンチンを尿酸に変える 2 段階の反応を起こす。始めの反応(ヒポキサンチンからキサンチンへの水酸化反応)が起こった後、引き続き 2 番目の反応 (キサンチンから尿酸への水酸化反応) が生じるのか、それとも始めの反応の後生成されたキサンチンは一端 XOR の反応ポケットから出て行き、全く別の反応として、キサンチンが XOR 内に入って尿酸となるのかの機構は、未だわかっていない。前者であれば、XOR 内での巧みな機構 (XOR とキサンチンとの間の協動的な動き) が働いていることになる。

基質と競合して、基質の代わりに反応ポケットに入って、ある程度の時間反応ポケットに留まるような分子があれば、基質は反応中心と反応することができなくなるので、そのような分子は XOR の阻害剤ということになる。XOR の阻害剤は、キサンチンが尿酸になるのを防ぐので、痛風治療薬の候補となる。ここでは、XOR の阻害剤として、アロプリノールとフェブキソスタットを紹介する。

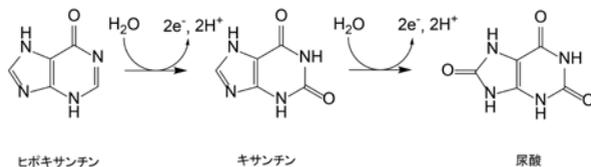


図 7-1 : XOR の基質及びその生成物である尿酸の構造式。XOR の反応中心で、2 段階に水酸化反応が行われる。

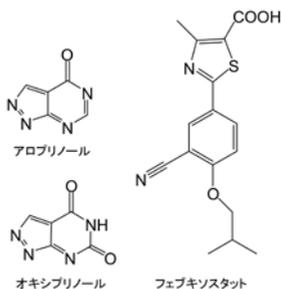


図 7-2 : 阻害剤アロプリノール、アロプリノールが XOR 反応中心で水酸化されて生成されるオキシプリノール、及び構造阻害剤であるフェブキソスタットの構造式。

図 7-2 は、アロプリノール、オキシプリノール及びフェブキソスタットの構造式が描かれてある。アロプリノールは、1956 年に Gertrude B. Elion によって開発された痛風治療薬であり、1988 年に彼女はノーベル医学生理学賞を受賞している。構造式からわかる通り、アロプリノールはヒポキサンチンの構造異性体であり、XOR の反応中心でヒポキサンチンと同じ部分が反応をする。しかし、生成される分子はキサンチンではないために（オキシプリノール）、尿酸の生成が抑制されるのである。アロプリノールは、痛風治療薬として現在でも使用されている程、息の長い薬である。

タンパク質の 3 次元構造が明らかにされてくると、タンパク質の構造を基にして、コンピュータシミュレーションによって薬が開発されるようになった。インフルエンザの薬として知られているタミフルは、タンパク質の構造を基にして作られた薬として有名である。このような創薬手法は SBDD (Structure Based Drug Design) と呼ばれる。このような手法によって、本来の基質とは全く異なった 3 次元構造を持つ阻害剤が、現在次々と作られている。

痛風薬 (XOR の阻害剤) の場合、XOR の 3 次元構造を基にしてコンピュータでシミュレーションをして作られたものではないが (その意味では正確には SBDD とは呼べないが)、XOR の反応ポケットに、その周囲との分子間力で結合する阻害剤フェブキソスタット (図 7-2) が国内製薬会社 (帝人ファーマ) により開発され [46]、2011 年に痛風治療薬として認可されて現在アロプリノールにとってかわりつつある。アロプリノールは、XOR の反応中心で水酸化された後に、尿酸と同様に XOR から離れていくが、フェブキソスタットは、一度 XOR の反応ポケットに入れば、XOR 自体が代謝されるまで離れにくいので、薬を頻繁に飲む必要がなくなるという利点がある。

2. 静的な 3 次元構造の限界と研究の動機

(1) 種によるフェブキソスタットの阻害作用の違い

タンパク質の 3 次元構造が機能にとって重要なことは、SBDD による創薬が成功していることから明らかであるが、3 次元構造だけでは機能を説明出来ない現象もある。創薬においても、鍵と鍵穴説の拡張として、1958 年に D. E. Koshland によって誘導適合 (induced fit) と呼ばれる考え方が提唱され、酵素とリガンドとの相互作用によって結合する部分の構造が変化しながら結合する場

合が説明されている [47]。

XORの阻害剤であるフェブキソスタットの場合、哺乳類のXORを阻害するが、細菌のXORを阻害しないことが、著者の一人であるOkamotoの実験によって明らかになった [23]。また、XORの反応ポケット内に、フェブキソスタットが結合している結晶構造も解析されて、その3次元構造がわかったが [29]、それを見ると、特に誘導適合をしている様子もない。従って、XORとフェブキソスタットとの結合に関しては、静的な3次元構造では単純に説明することが困難で、単なる誘導適合とも異なる説明が要求されることになった。

そこで、哺乳類のXORと細菌のXORに対する、フェブキソスタットの阻害作用の違いを、動的構造の観点から明らかにすることを考えた。なお、Kikuchiらは、既に分子動力学の計算結果から、実験事実を説明することに成功している [23]。本論文では、今後の研究の一助になることを意識し、これまで論文化していない規準振動解析の結果、及び分子動力学の結果を述べる。

(2) 動的構造の重要性

タンパク質の3次元構造が指数関数的に解明され、その3次元構造によって、非常に多くの生体反応の機構が理解されてきたが、静的な3次元構造だけでは、その機構を説明することができない現象も多々あるのではないかと憶測される。少なくとも、XORとフェブキソスタットの結合における機能発現に関しては、正にその一例であった。

タンパク質の静的な3次元構造だけで、タンパク質の機能発現が説明できない場合、次に考えるべきことは、タンパク質を構成している各原子の動きであると考えるのは極めて自然な考え方の流れである。

3. 動的構造を表す際の2つの方法論について

ここでは、本論文でXORの動的構造を示す計算を行った2つの手法について、それらの基本的な考え方を概観する。

(1) 規準振動解析を用いることに関する考え方

2つのタンパク質の組成が異なっているにもかかわらず、その3次元構造が似ているということに関して、ここでまず考えたい。真空中の分子1個に着目す

るとき、その分子の安定的な構造は、その分子のポテンシャルエネルギー極小値である状態である。即ち、今比較している2つのタンパク質を構成している各原子の位置において、タンパク質のポテンシャルエネルギーは極小値である。次に、比較している2つのタンパク質において、2つのタンパク質の、対応している2つの原子に着目し、それらの原子を同じ方向に同じ距離だけ少し移動させた際の2つのタンパク質のポテンシャルエネルギーの変化を考えてみる。対応している原子2個を、それぞれ同じ方向に同じ長さだけ動かすと、2つのタンパク質の組成は異なるので、ポテンシャルエネルギーの値の変化は、2つのタンパク質で違うはずである。

対応する原子の移動方向を変えても同様の議論が成り立つ。更には、全ての対応する原子に対して同様の議論が成り立つ。即ち、各原子の x, y, z の3つの座標を変数として、ポテンシャルエネルギーの変化を表すと、変数の変化に対して2つの分子のポテンシャルエネルギーの変化量が異なる事になる。2つのタンパク質の3次元構造が似ていても、相互作用の違いがここに現れることになる。

2つの3次元構造が似ているタンパク質において、相互作用の違いを利用して、それを動的構造の違いとして表現しようとするのが、後述する規準振動解析 (normal vibrational mode analysis) である。規準振動解析では、まず分子の規準振動を計算するが (規準振動の基本的な計算方法は、[48, 49, 50] を参照して欲しい。また、「基準振動」という言葉もよく用いられるが、ここでは英語の「normal」に「規準」という訳語にあて、規準振動という言葉を使う)、それはタンパク質を構成している各原子が、安定構造を中心として調和振動していると仮定している。その仮定の下に、各原子の振動ポテンシャルに着目すると、各原子間の相互作用が異なれば、振動のバネ定数が異なることになる。従って、3次元構造が似ている2つのタンパク質において、振動の仕方が異なるのである。

初期条件 (この場合、初期座標) は、実験から得られたタンパク質の3次元構造を基にするが、実験から得られた3次元構造が、理論的なポテンシャルエネルギー極小値であるとは限らない。そこで、規準振動解析を行うために、タンパク質の構造を、まず理論的なポテンシャルエネルギー極小値にしておかなければならない。そこで、実験値から出発して、実験値に近いポテンシャルエネルギー極小値の3次元構造をまず求め、その構造の下に規準座標や規準振動数を計算する。理論的なポテンシャルエネルギー極小値にする過程を、最適化と呼ぶ。

(2) 分子動力学を用いる考え方

タンパク質を構成する各原子を質点として考え、古典力学の基本方程式であるニュートンの運動方程式に基づいて、タンパク質を構成する各原子の位置と速度を時間の関数として求め、その結果を解析していくのが分子動力学の手法である。

規準振動解析の利用では、1つのエネルギー極小値を基準として、その周囲でのポテンシャルエネルギーの様子を振動として表現するものであった。その結果として、2つの静的な3次元構造が同じであっても、その組成の違いによる相互作用の違いを反映して、2つのタンパク質の違いを表現しようとする考え方であった。しかし、タンパク質が巨大な分子であることから、タンパク質にはポテンシャルエネルギーの極小値が非常に多く存在する。ある構造の近傍で、ポテンシャル障壁がそれほど高くなく、次のポテンシャルエネルギー極小値へ容易に移動可能な状況が連続するような場合、元の極小値を中心にして振動するのではなく、ポテンシャル障壁を乗り越える動きをしながら、タンパク質を構成している一部分が大域的に揺らいでいる場合がある。むしろ、このような揺らぎこそ、タンパク質の特徴としては興味深い。タンパク質の構造が結晶のように整った形状で無いことが、複雑な揺らぎを生んでいて、そのような現象と機能を結びつけて議論することは有意義と思われる。

このように、大域的に揺らいでいる場合を考察するためには、規準振動解析よりも分子動力学を行った方がよい。規準振動解析に比べて計算時間がかかり、計算結果のデータ量は膨大になるが、分子動力学の手法は運動を解析する方法として、物理学の原理に忠実でダイレクトな手法と言える。

分子動力学を行うには、これは規準振動でも同じであるが、初期構造がわからなくてはならない。ニュートンの運動方程式を解くには、初期条件が必ず必要である。この初期条件は、実験から得られたタンパク質の3次元構造を基にすることになる。但し、このときに、初速度の情報がない。そこで、一般的に初速度の初期条件は、その大きさを温度から決め、方向に関しては乱数で与える（専門的にはマクスウェル分布で与える）。初期条件が異なれば、時間発展する位置と速度の値も変化する。従って、分子動力学を用いてタンパク質の運動を記述する場合には、できるだけ多くの計算を行い、統計的に運動を議論する必要がある。但し、現在の計算処理の能力から、現実的には統計的に満足できるような量の計算数を行うことは困難が伴うので、この点を克服する方法論を見出すのも、分子動力学の研究課題の1つとなる。

なお、初期の速度条件によって、構造が実際と大きく異なってしまふことを防ぐために、計算のノウハウとして、例えば、初めは各原子の速度ベクトルの大きさを小さくして計算し（温度を小さな値とする）、徐々に温度を上げながら常温にして、そこから実際の計算を始めるなどの方法が採られる。

4. XOR モリブドプテリン・ドメインの規準振動解析

(1) 方法

計算は、XOR のモリブドプテリン・ドメイン 1 個に関して行われた。反応中心が存在し、基質や阻害剤が結合する反応ポケットがこのドメインにあるということと、現実的に研究を遂行するための計算機の計算処理能力を考慮して設定された系である。

計算は、FEDER/2 というプログラムを利用した [51, 52]。このプログラムは、1980 年代前半に Harold Sheraga のグループによって開発された ECEPP [53, 54] というポテンシャル関数を利用した規準振動解析のプログラムである。このプログラムの特徴は、タンパク質の内部座標の内、共有結合の結合長と結合角は固定され、独立変数として 2 面角だけが採用されていることである。タンパク質の構造に関連した振動は、低振動数モードである 2 面角の振動であることが多いので、タンパク質の特徴を描き出すにはふさわしいプログラムと思われる。

FEDER/2 では、X 線結晶解析などの実験データの構造を出発点として、最適化が行われる。これは、プログラム内で使われているポテンシャルエネルギー関数で実験データの構造を計算するとき、常にエネルギーの極小値であるとは限らないからである。

最適化で求められた 3 次元構造を基にして規準振動を計算し、本研究では XOR のモリブドプテリン・ドメインを構成している各原子間の運動の相関を計算した。具体的には、相関係数 Γ_{ij} と呼ばれる次の量を計算した。

$$\Gamma_{ij} = \frac{\langle \Delta \mathbf{r}_i \cdot \Delta \mathbf{r}_j \rangle}{\langle (\Delta \mathbf{r}_i)^2 \rangle^{1/2} \langle (\Delta \mathbf{r}_j)^2 \rangle^{1/2}} \quad (1)$$

ここに、 $\Delta \mathbf{r}_i$ 及び $\Delta \mathbf{r}_j$ は、それぞれ i 番目及び j 番目の原子のポテンシャルエネルギー極小値の構造からの変位ベクトルを表している。原子の番号は、モリブドプテリン・ドメインを構成する全ての原子に付けた通し番号である。また、 $\langle \rangle$

は全ての規準振動モードと時間の平均を取ることを意味し、 $\langle (\Delta \mathbf{r}_i)^2 \rangle^{1/2}$ は、 i 番目の原子の変位ベクトルの 2 乗平均平方根 (root mean square) である。この相関係数の値は、大雑把に言うとベクトルの内積の計算であり、同じ位相で振動していれば正の値に、反位相で振動していれば負の値に、ゼロに近ければ、位相の相関がないことを示す値と考えて良い。なお、計算結果は、モリブドプテリン・ドメインを構成している各アミノ酸残基の α 炭素間だけを示すことにする。 α 炭素の振動が各アミノ酸の運動を代表していると考えられる。

(2) モリブドプテリン・ドメインの構造

図 8 は、(a) ウシの XOR (哺乳類を代表していると考えて良い) と (b) *Rhodobactor capsulatus* の XOR (バクテリアを代表していると考えて良い) である。また、図 9 は、その中でモリブドプテリン・ドメインだけを取り出したものである。Spacefill 表示している部分は、補酵素であり、本研究で規準振動解析をする際は除いた。なお、分子動力学の計算においては、タンパク質分子の周囲に水を配置させ、補酵素としてモリブドプテリンだけを考慮に入れている。

本論文では、ウシ (哺乳類を代表していると考えて良い) XOR、及び *Rhodobactor capsulatus* (バクテリアを代表していると考えて良い) XOR のモリブドプテリン・ドメインに関する規準振動計算の結果を記述する。本研究において XOR 全体で規準振動計算を行わなかった理由は、計算量が膨大になってしまい、計算機による処理に時間がかかってしまうことによる。

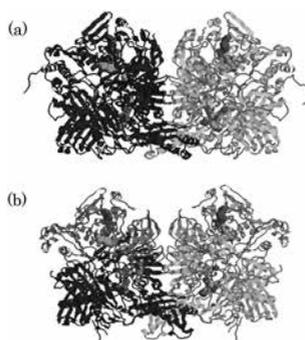


図 8 : XOR を New cartoons 表示したもの。

(a) ウシの XOR で、PDB コード 1FO4 のデータから作成。

(b) *Rhodobactor capsulatus* の XOR で、PDB コード 1JRO のデータから作成。

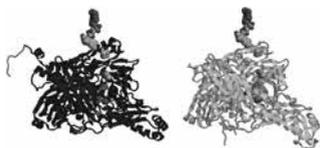


図9：モリブドプテリン・ドメインを New cartoons 表示したもの。

左は、ウシの XOR で、PDB コード 1FO4 のデータから作成。

右は、*Rhodobacter capsulatus* の XOR で、PDB コード 1JRO のデータから作成。

(3) 反応ポケットの入り口の位置

反応ポケットは、図8或いは、図9の下側にある。問題としているのは、XORの動的構造を明らかにし、XOR に対する阻害剤の阻害作用の違いを解明することなので、まず着目すべきは反応ポケットを中心とした部分である。そこで、規準振動解析自体はモリブドプテリン・ドメイン全体に対して行ったが、その計算結果から着目している部分をクローズアップする。図10はウシであり、図11はバクテリア (*Rhodobacter caplatus*) である。反応ポケット周辺は、10個のポリペプチドから構成されていて、それら10個のポリペプチドに対して、Segment 1, Segment 2, . . . , Segment 10 というように名前を付け、本論文ではそれらを S1, S2, . . . , S10 と記述することにする。

図10及び図11から、反応中心の入り口方向から見ても、2つの3次元構造が似ている様子がわかる。なお、ウシの方にだけ、反応中心の入り口の位置がわかるように、ダークブルーの円のマークを入れておいた。基質はこの入り口から出入りし、阻害剤は、その構造により、出入りするものや、この入り口を塞ぐものがある。



図10：ウシ XOR 結晶構造 (1FO4) から作成した反応中心ポケット周辺の構造。ダークブルーの円は、反応中心ポケットの入り口部分を示している。



図11：*Rhodobacter capsulatus* の XOR 結晶構造 (1JRO) から作成した反応中心ポケット周辺の構造。

(4) 結果

(4.1) 低い振動モード

エネルギー等分配の法則から、低い規準振動モードの振幅は大きくなる。タンパク質を構成している原子の動きの大きさが、機能に対して重要な影響を与えるということであれば、低い振動モードに着目する必要がある。そこで、規準振動の計算結果から低い規準振動モードにおける振動数とその規準振動における各原子動きを考える。

図 12 は、ウシ XOR のモリブドプテリン・ドメインの規準振動の様子を示したものであり、低い方から 4 番目の振動モードで、その振動数は 2.355cm^{-1} である。各原子から描かれた黄色の矢印の大きさは、その原子の振幅を表し、矢印の向きは、ある時刻の振動方向を表している。従って、各原子はポテンシャルエネルギー極小値の位置を基準点として、矢印の黄色い線の方向に黄色い線の長さ按比例した振幅で単振動をしていると考えて欲しい。ここで、注意しておかなければならないが、振幅は、見やすくするために、あくまで実際の振幅の長さに比例させている（実際の変位はもっと小さい）という点である。但し、図に載せてある黄色い線の長さに関して、実際の振幅からの比例定数を、全てのモードで同じにしているため、全ての図における相対的な振幅の大きさが比較できるようにしてある。

また、図 13 は、ドメイン全体の振動の様子が一目で印象づけられるように、図 12 において描かれている Wireframe 表示の部分を取った図である。この下から 4 番目の振動モードの特徴は、図の左右方向で全体的に反位相の開閉するような振動をしていることである。もう少し詳しく説明をするために、ウシ XOR 及びバクテリア XOR の反応ポケットの部分だけをトリミングして、下から 8 つのモードを、それぞれ図 14 及び図 15 に示す。

図 14-1 及び図 14-2 から、ウシ XOR の場合は、低い方から 3 番目のモードや 4 番目のモードで反位相の振動がある一方、図 15-1 及び図 15-2 から、バクテリア XOR の場合には、反位相のモードがないことが特徴の 1 つと考えられる。同位相の振動モードでは、全体的に同じ方向に動くので、反応ポケットの入り口の広さは常に一定である。一方、反位相の振動モードでは、反応ポケットの入り口付近の広さが、基準となる構造よりも、広くなったり狭くなったりする。

このことから、1 つの仮説として、「フェブキソスタットのような少し大きい分子は、ウシ XOR の反応ポケットの入り口付近が広がったときに、ポケットに入り易い」ということが挙げられる。

(56)

実験事実として、フェブキシスタットは、ウシ XOR に対して阻害作用があり、バクテリア XOR には阻害がかからないので、フェブキシスタットがバクテリア XOR の反応ポケットに入りにくいことが原因である可能性がある。バクテリア XOR の反応ポケットにも、ウシ XOR 同様、フェブキシスタットが結合できる空間は存在するが、そもそも反応ポケットに入ることが難しいのではないかと、この計算結果から考えられる。

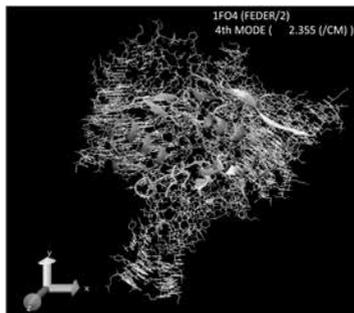


図 12 : ウシ XOR モリブドプテリン・ドメインの規準振動の様子。低い方から 4 番目の振動モードで、その振動数は、2.355 (1/cm)。着目する反応中心ポケット入り口付近は、Cartoon 表示、それ以外は、Wireframe 表示。黄色の矢印は、大きさが振動の振幅で、向きがある時刻の運動方向を示す。ポテンシャルエネルギー極小の位置から、この振動数で単振動していると考えられる。



図 13 : 図 12 において、反応中心ポケット周辺以外の Wireframe 表示を取ったもの。

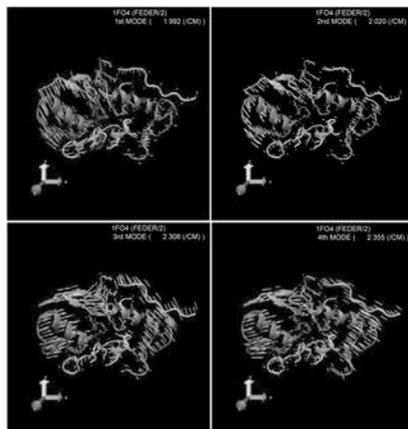


図 14-1 : ウシ XOR モリブドプテリンドメインの規準振動の様子。反応ポケットの部分だけをクローズアップしたもの。低い振動モードの1番目から4番目のモードを示したもの。

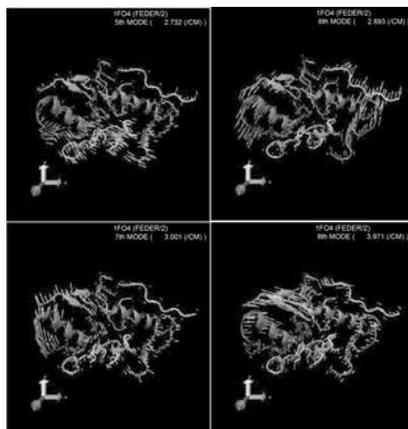


図 14-2 : ウシ XOR モリブドプテリンドメインの規準振動の様子。反応ポケットの部分だけをクローズアップしたもの。低い振動モードの5番目から8番目のモードを示したもの。

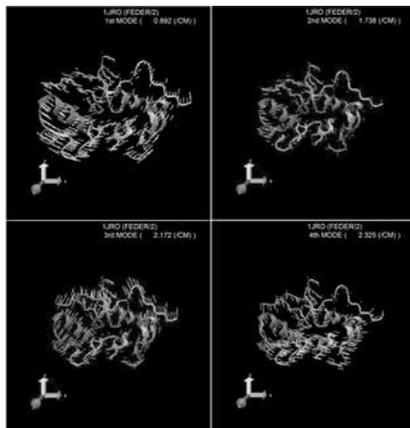


図 15-1 : バクテリア (*Rhodobacter capsulatus*) XOR モリブドプテリンドメインの規準振動の様子。反応ポケットの部分だけをクローズアップしたもの。低い振動モードの 1 番目から 4 番目のモードを示したもの。

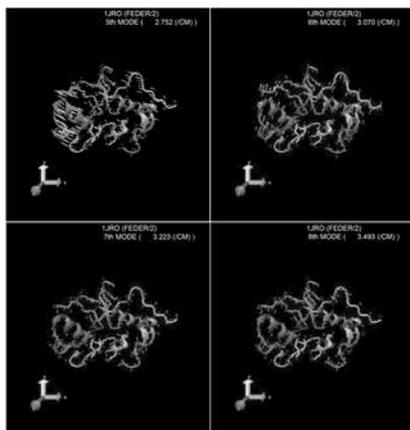


図 15-2 : バクテリア (*Rhodobacter capsulatus*) XOR モリブドプテリンドメインの規準振動の様子。反応ポケットの部分だけをクローズアップしたもの。低い振動モードの 5 番目から 8 番目のモードを示したもの。

(4.2) 相関係数

図 16-1 は、ウシ XOR に関する相関係数の計算結果をまとめたものであり、図 16-2 は、バクテリア (*Rhodobactor capsulatus*) XOR に関する相関係数の計算結果をまとめたものである。

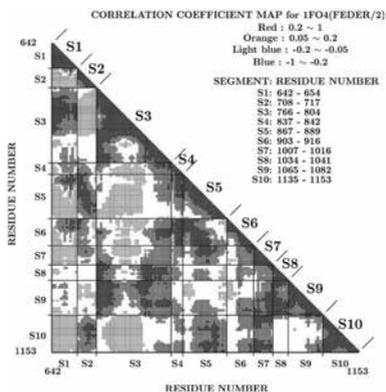


図 16-1 : ウシ XOR モリブドプテリン・ドメインの規準振動計算から得られた、反応ポケットを作っている S1 から S10 の間の相関係数を三角マップで示したもの。

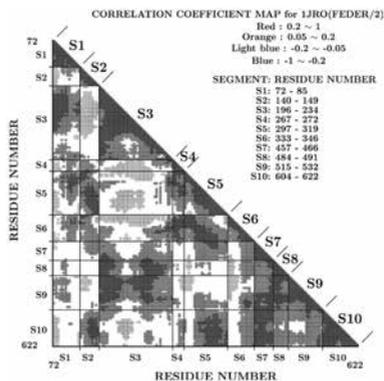


図 16-2 : バクテリア XOR モリブドプテリン・ドメインの規準振動計算から得られた、反応ポケットを作っている S1 から S10 の間の相関係数を三角マップで示したもの。

2つの結果を比較すると、ウシの場合と、バクテリアとの場合で、どちらもセグメント間の運動の相関傾向は似ていて、既に述べたことを補足するようであるが、反応ポケット部分の負の相関が、バクテリアではウシよりも弱い。また、運動の相関傾向は似ていると書いたが、S1 だけ傾向がやや異なっている。図 10 及び図 11 を見るとわかるように、S1 は反応ポケットの入り口に位置している。この結果から、ウシ XOR とバクテリア XOR において、フェブキソスタットによる阻害作用の違いは、この S1 の部分の動きの違いに因る可能性がある。

(4.3) 4 節のまとめ

ウシ XOR とバクテリア XOR の 3 次元構造は酷似しているが、規準振動解析から、i) 反応ポケット入り口の低振動モードにおいて、ウシ XOR の場合だけ、反位相の動きが見られたこと、ii) 反応ポケット入り口の一角を占めるセグメント 1 (S1) の部分が、反応ポケット付近を構成している他のセグメントとの間の動き方の違いが表されたこと、が挙げられる。

規準振動解析からは、これ以上機能上の違いの原因に言及するような強力な定量的証拠を得ることは難しいが、少なくとも、静的には明らかにならなかった相互作用の違いが、浮き彫りになったという点では意味があろうかと思われる。

5. XOR モリブドプテリン・ドメインの分子動力学計算

(1) 分子動力学計算 (MD 計算) の前の準備計算

ウシ XOR のモリブドプテリン・ドメインは、PDB のコード名 1FO4 から、残基番号 600 番から 1310 が選ばれた。また、バクテリアのモリブドプテリンドメインは、PDB のコード名 1JRO から、残基番号 30 番から 377 番、及び 402 番から 777 番が選ばれた。途中の 378 番から 401 番までは、disorder 領域のため割愛した。1JRO の 777 番は、タンパク質自体の C 末端なので、そのまま水素を付加したが、その他の端は、N 末端側にはアセチル基で、C 末端側にはメチル基でキャップ処理を行った。ちなみに、規準振動計算の際には、1JRO の disorder 領域も計算に含めている。

XOR から 8\AA 以上離れた結晶水は取り除き、立方体の周期境界条件の下でバルクの水分子が加えられ、MD 計算が行われた。図 17 の右上にある図は、その状況のイメージ図である。XOR モリブドプテリン・ドメインの原子数は、約 1

万1千個であり、水分子の数は、約8万個である。

また、モリブドプテリン分子のパラメータは、フェブキソスタットを結合したMD計算を行った際 [23] に、作成したものが使用された。

(2) MD計算の具体的実行方法

MD計算は、カリフォルニア州立大学のサンフランシスコ校を中心にして作られているソフトウェア Amber12 [55] が使用された。図17は、そのときのプロトコルをまとめたものである。使用された力場は、ff03.r1であり、電気的な偏りを消すために、プラスに帯電しているナトリウムイオンが配置された。

分子動力学計算において、時間の刻み幅は2フェムト秒で、シェイク法が用いられ、図17に示してあるような平衡化が行われた。その後、100ナノ秒のプロダクションランが実行された。

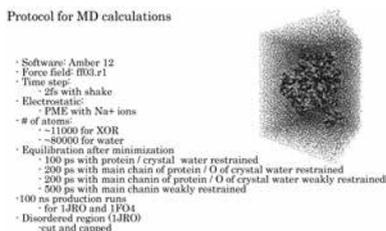


図17：ソフトウェア Amber12を利用して分子動力学計算を行う際、計算方法などを簡単にまとめたもの。

(3) 結果

MD計算が実行され、時系列で各原子の位置と速度が得られた。それらのデータを利用して、本論文では、フェブキソスタットのような阻害剤が、ウシ XOR とバクテリア XOR に対して異なる阻害作用を示す原因を計算結果から考えていく。ここでは、その原因が、規準振動解析の所で定義した XOR の反応ポケット付近の Segment 1 (S1) の部分にあるのではないかと着目して議論をしてみたい。

ウシ XOR とバクテリア XOR の規準振動解析の比較において、S1 部分だけが、反応ポケットを構成している幾つかのセグメントとの間の相関係数が異なっていた。そのことは、比較している2つの XOR の反応ポケットにおいて、S1 部分の受ける相互作用が異なっていることを意味している。

図 18 は、ウシ XOR のモリブドプテリン・ドメインに関して、反応ポケットの部分のわかりやすいような角度から示したものである。図中の左上に黄色で示した部分が S1 領域である。両方向の矢印が描かれているが、丁度その部分が反応ポケットである。図中、中央やや下付近に、cpk 表示された分子があるが、それがモリブドプテリン分子であり、その分子の中でオレンジ色に塗られた原子が反応中心のモリブデン原子である。図 18 は、ウシ XOR を描いたものであるが、バクテリア XOR の構造もウシ XOR と酷似しているため、同じ図が描ける。但し、アミノ酸番号が異なり Phe649 の位置に相当している、バクテリア XOR のアミノ酸は Ala79 である。

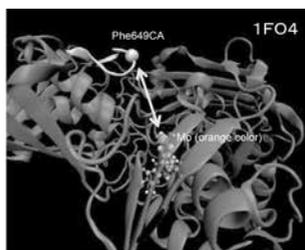


図 18 : ウシ XOR のモリブドプテリン・ドメインをある角度からクローズアップしたものの。上部黄色で描かれている部分は Segment 1 であり、そのターン部に Phe649 がある。図中では、Phe649 の α 炭素を cpk 表示してある。中央やや下付近に cpk 表示しているのがモリブドプテリンである。分子の一番上付近にあるオレンジ色した原子がモリブデン原子である。

本研究では、S1 部分の動き（動的構造）に焦点が当てられている。そこで、反応中心のモリブデン原子と、S1 領域のターン部にある α 炭素（ウシ XOR ならば、Phe649、バクテリア XOR ならば、Ala79）との間の距離を時系列で示す。図 18 からわかるとおり、この距離が長くなることは、S1 部分がタンパク質の外側に開くような動きをすることを意味している。この部分が外側に開けば、反応ポケットの入り口が広がるので、基質や阻害剤などが反応ポケットに入り易くなる。従って、ウシ XOR とバクテリア XOR において、この S1 の動きの違いが阻害剤の阻害作用と関係している可能性がある。

計算結果（図 19-1、図 19-2）から分かる通り、ウシ XOR の場合も、バクテリア XOR の場合も、初期状態における距離は約 15 Å であるが、両者ともその距離が長くなる傾向が見られた。但し、2 回の計算だけからの言及となるが、ウシ

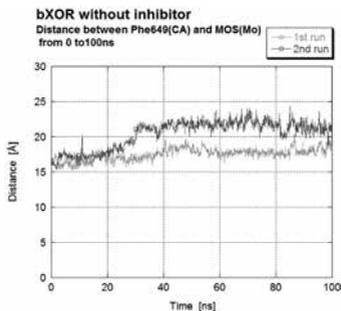


図 19-1 : ウシ XOR (PDB コード名 1FO4) の Phe649 の α 炭素とモリブドプテリンのモリブデン原子との間の距離。横軸は、分子動力学における時間軸である。

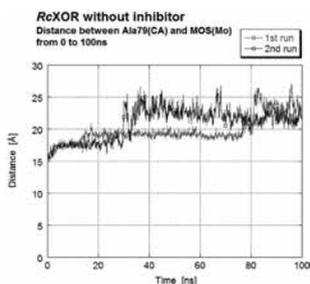


図 19-2 : バクテリア XOR (PDB コード名 1JRO) の Ala79 の α 炭素とモリブドプテリンのモリブデン原子との間の距離。横軸は、分子動力学における時間軸である。

XOR の場合の方が、バクテリア XOR の場合よりも揺らぎの幅が小さいことがわかる。ウシ XOR の 1 回目の計算においては、 $17 \sim 18 \text{ \AA}$ を維持していて、2 回目の計算においては、20 ナノ秒付近から次第に長くなり、30 ナノ秒付近で 20 \AA を越えて、その後は 20 \AA から 25 \AA の間で揺らいでいる。一方、バクテリア XOR の 1 回目の計算においては、20 ナノ秒にならない内に 20 \AA 付近に達し、80 ナノ秒付近で、 25 \AA と長くなり、以後 22 \AA から 26 \AA の間で揺らいでいる。2 回目の計算においては、20 ナノ秒付近で 20 \AA を越え、以後 20 \AA から 25 \AA の間で揺らいでいる。

今回の結果からは、S1 領域が、タンパク質の外側に開く現象が見られる傾向

にあることがわかったが、ウシ XOR とバクテリア XOR の違いまでは今回の研究では明らかにされなかった。今後、初期条件を変えてより多くの計算を行うことや、100 ナノ秒を越えた時間領域の計算も行って、ウシ XOR とバクテリア XOR における、S1 領域の動きの違いをより詳しく解析する必要がある。

6. まとめと今後の研究の見通し

静的な 3 次元構造が酷似しているウシとバクテリアの XOR であるが、例えば阻害剤のフェブキソスタットに対する阻害作用が異なっていることが実験から明らかにされた。静的な 3 次元構造からだけでは、単純に理解できない現象であるが、タンパク質分子を作っている構成原子間の相互作用の違いに関して、規準振動解析や分子動力学を行うことによって、表現することが可能である。

本研究の場合、規準振動解析から、反応ポケットの入り口付近にある S1 領域は、幾つかの他のセグメントから受けている相互作用が、ウシの場合とバクテリアの場合とで異なっていることが明らかにされ、機能上の違いを、この部分に帰着できるのではないかという仮説が成立した。分子動力学の計算結果から、反応中心のモリブデン原子と S1 領域のターン先端部分との間の距離が長くなることがわかり、ウシ XOR の場合とバクテリア XOR とでは、S1 と反応ポケット周辺のその他の領域との相互作用が異なっていることから、S1 部分の動き方に違いが生じることが予想される。更に、この動き方の違いが、フェブキソスタットのような、ウシ XOR の場合とバクテリア XOR とで阻害作用が異なる現象と結びついている可能性もある。

多くの計算の実行、100 ナノ秒以上の計算の実行に加え、フェブキソスタットのような阻害作用の差異が生じる阻害剤を XOR に結合させた MD 計算も多数回実行する必要がある。阻害剤が結合している場合に、S1 部分の動きの違いが明らかになれば、本研究結果との関連性から新しい発見が期待されるであろう。

参考文献

- [1] Hille, R. (1996) The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757-2816.
- [2] Hille, R., Hall, J., and Basu, P. (2014) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 3963-4038.
- [3] Hille, R., and Nishino, T. (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* **9**, 995-1003.

- [4] Okamoto, K., Kusano, T., and Nishino, T. (2013) Chemical nature and reaction mechanisms of the molybdenum cofactor of xanthine oxidoreductase. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 2606-2614.
- [5] Chovnick, A., Gelbart, W., and McCarron, M. (1977) Organization of the Rosy locus in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **11**, 1-10.
- [6] Nishino, T. (1994) The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J. Biochem.* **116**, 1-6.
- [7] Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F., and Nishino, T. (2008) Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* **275**, 3278-3289.
- [8] Nishino, T., Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Eger, B. T., and Pai, E. F. (2015) The C-terminal peptide plays a role in the formation of an intermediate form during the transition between xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *FEBS J.* **282**, 3075-3090.
- [9] Jarasch, E. D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H. W., Keenan, T. W., and Franke, W. W. (1981) Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* **25**, 67-82.
- [10] Kooij, A., Bosch, K. S., Frederiks, W. M., and Van Noorden, C. J. (1992) High levels of xanthine oxidoreductase in rat endothelial, epithelial and connective tissue cells. A relation between localization and function? *Virchows Arch. B, Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **62**, 143-150.
- [11] McCord, J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* **312**, 159-163.
- [12] Cantu-Medellin, N., and Kelley, E. E. (2013) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* **1**, 353-358.
- [13] Berry, C. E., and Hare, J. M. (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* **555**, 589-606.
- [14] Vorbach, C., Scriven, A., and Capecchi, M. R. (2002) The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes & development* **16**, 3223-3235.
- [15] Rouquette, M., Page, S., Bryant, R., Benboubetra, M., Stevens, C. R., Blake, D. R., Whish, W. D., Harrison, R., and Tosh, D. (1998) Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Lett.* **426**, 397-401.
- [16] Battelli M. G., Bolognesi A. and Polito L. (2014) Pathophysiology of circulating

- xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochim Biophys Acta*. **1842**, 1502-1517.
- [17] Jeong, J., Rao, A. U., Xu, J., Ogg, S. L., Hathout, Y., Fenselau, C., and Mather, I. H. (2009) The PRY/SPRY/B30.2 domain of butyrophilin 1A1 (BTN1A1) binds to xanthine oxidoreductase: implications for the function of BTN1A1 in the mammary gland and other tissues. *J. Biol. Chem.* **284**, 22444-22456.
- [18] Godber, B., Sanders, S., Harrison, R., Eisenthal, R., and Bray, R. C. (1997) $> 95\%$ of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 519S.
- [19] Stevens, C. R., Millar, T. M., Clinch, J. G., Kanczler, J. M., Bodamyali, T., and Blake, D. R. (2000) Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet* **356**, 829-830.
- [20] Maia, L. B., and Moura, J. J. (2011) Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: a new class of nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 443-460.
- [21] Hancock, J. T., Salisbury, V., Ovejero-Boglione, M. C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R., and Harrison, R. (2002) Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3308-3310.
- [22] Matsumoto, K., Okamoto, K., Ashizawa, N., and Nishino, T. (2011) FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **336**, 95-103.
- [23] Kikuchi, H., Fujisaki, H., Furuta, T., Okamoto, K., Leimkühler, S., and Nishino, T. (2012) Different inhibitory potency of febuxostat towards mammalian and bacterial xanthine oxidoreductases: insight from molecular dynamics. *Sci. Rep.* **2**, 331.
- [24] Kato, S., Kato, M., Kusano, T., and Nishino, T. (2016) New Strategy That Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in G1H-G93A Transgenic Mice: Oral Administration of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors That Are Not Substrates for the Purine Salvage Pathway. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* **75**, 1124-1144.
- [25] Ichida, K., Amaya, Y., Okamoto, K., and Nishino, T. (2012) Mutations associated with functional disorder of xanthine oxidoreductase and hereditary xanthinuria in humans. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 15475-15495.
- [26] El Ridi, R., and Tallima, H. (2017) Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *J. Adv. Res.* **8**, 487-493.
- [27] Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T., Pai, E. F. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10723-10728.
- [28] Truglio, J. J., Theis, K., Leimkühler, S., Rappa, R., Rajagopalan, K. V., Kisker, C. (2002) Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine

- dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure*, **10**, 115-125.
- [29] Okamoto, K., Eger, B. T., Nishino, T., Kondo, S., Pai, E. F., Nishino, T. (2003) An Extremely Potent Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase: Crystal Structure of the Enzyme-Inhibitor Complex and Mechanism of Inhibition. *J. BIOL. CHEM.* **278**, 1848-1855.
- [30] Okamoto, K., Matsumoto, K., Hille, R., Eger, B. T., Pai, E. F., Nishino, T. (2004) The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7931-7936.
- [31] Fukunari, A., Okamoto, K., Nishino, T., Eger, B. T., Pai, E. F., Kamezawa, M., Yamada, I., Kato, N. (2004) Y-700[1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic acid]: a potent xanthine oxidoreductase inhibitor with hepatic excretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 519-528.
- [32] Yamaguchi, Y., Matsumura, T., Ichida, K., Okamoto, K., Nishino, T. (2007) Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate. *J. Biochem. (Tokyo)* **141**, 513-524.
- [33] Asai, R., Nishino, T., Matsumura, T., Okamoto, K., Igarashi, K., Pai, E. F., Nishino, T. (2007) Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase. *J. Biochem. (Tokyo)* **141**, 525-534.
- [34] Pauff, J. M., Zhang, J., Bell, C. E., Hille, R. (2008) Substrate orientation in xanthine oxidase: crystal structure of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine. *J. Biol. Chem.* **283**, 4818-4824.
- [35] Okamoto, K., Eger, B. T., Nishino, T., Pai, E. F., Nishino, T. (2008) Mechanism of inhibition of xanthine oxidoreductase by allopurinol: crystal structure of reduced bovine milk xanthine oxidoreductase bound with oxipurinol. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**, 888-893.
- [36] Pauff, J. M., Cao, H., Hille, R. (2009) Substrate Orientation and Catalysis at the Molybdenum Site in Xanthine Oxidase: CRYSTAL STRUCTURES IN COMPLEX WITH XANTHINE AND LUMAZINE. *J. Biol. Chem.* **284**, 8760-8767.
- [37] Dietzel, U., Kuper, J., Doebbler, J. A., Schulte, A., Truglio, J. J., Leimkühler, S., Kisker, C. (2009) Mechanism of Substrate and Inhibitor Binding of *Rhodobacter Capsulatus* Xanthine Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **284**, 8768-8776.
- [38] Cao, H., Pauff, J. M., Hille, R. (2010) Substrate orientation and catalytic specificity in the action of xanthine oxidase: the sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid. *J. Biol. Chem.* **285**, 28044-28053.
- [39] Cao, H., Hall, J., Hille, R. (2011) X-ray Crystal Structure of Arsenite-Inhibited

- Xanthine Oxidase: Mu-Sulfido, Mu-Oxo Double Bridge between Molybdenum and Arsenic in the Active Site. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12414-12417.
- [40] Cao, H., Hall, J., Hille, R. (2014) Substrate orientation and specificity in xanthine oxidase: crystal structures of the enzyme in complex with indole-3-acetaldehyde and guanine. *Biochemistry* **53**, 533-541.
- [41] Cao, H., Pauff, J. M., Hille, R. (2014) X-ray Crystal Structure of a Xanthine Oxidase Complex with the Flavonoid Inhibitor Quercetin. *J. Nat. Prod.* **77**, 1693-1699.
- [42] Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Eger, B. T., Pai, E. F., Nishino, T. (2010) Crystal Structures of Urate Bound Form of Xanthine Oxidoreductase: Substrate Orientation and Structure of the Key Reaction Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17080-17083.
- [43] Ishikita, H., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., Pai, E. F. (2012) Protein conformational gating of enzymatic activity in xanthine oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 999-1009.
- [44] Coelho, C., Mahro, M., Trincão, J., Carvalho, A. T. P., Ramos, M. J., Terao, M., Garattini, E., Leimkühler, S., Romão, M. J. (2012) The First Mammalian Aldehyde Oxidase Crystal Structure: Insights Into Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **287**, 40690-40702.
- [45] Correia, M. A., Otrelo-Cardoso, A. R., Schwuchow, V., Sigfridsson Clauss, K. G., Haumann, M., Romão, M. J., Leimkühler, S., Santos-Silva, T. (2016) The Escherichia Coli Periplasmic Aldehyde Oxidoreductase is an Exceptional Member of the Xanthine Oxidase Family of Molybdoenzymes. *ACS Chem. Biol.* **11**, 2923-2935.
- [46] Okamoto, K., Kondo, S., Nishino, T. (2012) A new-generation uric acid production inhibitor: Febuxostat. Analogue-based Drug Discovery III from IUPAC (International union of pure and applied chemistry), Fischer J, Ganellin CR, Rotella DP eds, pp356-367. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- [47] D. E. Koshland (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **44**, 98-104. doi:10.1073/pnas.44.2.98.
- [48] 菊地浩人 (2013) 汎用性ある分子振動の B 行列作成方法と力定数の座標変換方法に関する考察. *日本医科大学基礎科学紀要* **42**, 37-84.
- [49] E. B. Wilson Jr., J. C. Decius and P. C. Cross: *Molecular Vibrations: The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra*, Published by McGraw-Hill, New York (1955) and Dover Publications (1980).
- [50] 水島三一郎、島内武彦 (1958) : 赤外線吸収とラマン効果、共立出版、東京.
- [51] Wako, H., and N. Go (1987) Algorithm for rapid calculation of Hessian of conformational energy function of proteins by supercomputer. *J. Comp. Chem.* **8**, 625-635.
- [52] Wako, H., S. Endo, K. Nagayama, and N. Go (1995) FEDER/2: program for static

and dynamic conformational energy analysis of macromolecules in dihedral angle space. *Comp. Phys. Commun.* **91**, 233-251.

- [53] Momany, F. A., R. F. McGuire, A. W. Burgess, and H. A. Schraga (1975) Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions, and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids. *J. Phys. Chem.* **79**, 2361-2381.
- [54] Nemethy, G., M. S. Pottle, and H. A. Scheraga (1983) Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino acids. *J. Phys. Chem.* **87**, 1883-1887.
- [55] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A. W. Götz, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R. M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P. A. Kollman (2012), AMBER 12, University of California, San Francisco.

(受付日 平成 29 年 9 月 30 日)

(受理日 平成 29 年 11 月 30 日)