〈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<sup>1</sup>·菊地浩人<sup>2</sup>

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I部ではXOR

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> 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

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> 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、尿酸生成阳害による痛風、高尿 酸血症治療薬の標的酵素となる。

N-terminal domains	
rat XDR	
human XOR	
howine X08	WTADELVEEVNGKKWEKNADPETTLLAYLBRKLGLBGTKLGOEGGCGACTVWLS_56
chicken XOR	MAPPETGDEL VEFVNGKX/VEKD/DPETTLLTYLRRKLGLCGTKLGCGEGGCGACT/WIS 60
Rcepsulatus_XOR	WETAFLLNSETRRVRTEDPTOSLLELLR-AEGLTGTKEGCNEGDCGACTVWTR 52
rat_XUK	KTORLUNKTVH SYNACLAPTCSLHH-VAVITVEGTONTO-ALHPVOEKTAKSHSSUCIP 114
housing WP	KTURLARKTYTE SAMAGLAP TOSCHE TAYTTYEOTOSTKTRLEP FACTORS/000000000000000000000000000000000000
chicken X02	KYDPEOKX11 HHTAMACLEPTCALHH-VAVITVECTONTKSPLHPACEPTAKSHOSOOF 110
Rcapsulatus_XOR	DAAGSRAVNACLIMILPOLAG-KALIRTIEGLAAPOGRLHPVQQANIDHHGSQCGF 105
rat_XOR	CTPGIVMSMYTLLRNOPEPTVEEIENAF0GNLCRCTGYRPILOGFRTFAKD 165
nunan_xux	CIPGIVISMTILLOW/PEPINEEIENAFUGNECKUIGTKPILUGFRIFARD 165
chicken X09	CTPGTVMSWTTLDWVPEPTVEETEDAEVGNEVROTOTOTPTLDWFRTPANA
Rcapsulatus_XOR	CTPGF1VSMAAAHDRDRKDYDDLLAGNLCRCTGYAP1LRAAEAAAGE 152
rat_XOR	GGCCGGSGNNPNCCMNQTK 184
human_XOR	960C060GNNPN0CMN0KK 185
bovine_X0R	
chicken_XOR	ANGTGCCHSKGENSMNGGCCGGKANGPGCCMNEKENVTIMISSSLFDSSEFGPLDPTGEP1 237
Rcapsulatus_ADK	
rat_XOR	
human_XOR	******
bovine_XOR	
chicken_XOR	FPPELMTORNK 248
Rcapsulatus_XOR	
Intermediate dom	ains
three meanate does	
rat XOR	DOTVSI SPSI ENPERENZI OPTOEPTEPPETTRI KOTP-OKKI REEGERVTWTOASTNEE 243
rat_XOR	DOTVSLSPSLFNPEDFKPLDPT0EPIFPPELLRLKDTP-OKKLRFEGERVTWI0ASTMEE 243 DNEXVSLSPSLFNPEDFKPLDPT0EPIFPPELIRLKDTP-DK01 BFEGERVTWI0ASTMEE 244
rat_XOR human_XOR	DOTVSLSPSLFNPEDFKPLDPTOEPIFPPELLRLKDTP-OKXLRFEGERVTNIOASTMEE 243 DHSVSLSPSLFNPEFFTPLDPTOEPIFPPELLRLKDTP-RKOLRFEGERVTNIOASTLKE 244 DHTVTLSPSLFNPEEFFTPLDPTOEPIFPPELLRLKDTP-RKOLRFEGERVTNIOASTLKE 244
rat_XOR human_XOR bovine_XOR	DOTVSLSPSLFNPEDFKPLDPTOEP1FPPELLRLKDTP-OKKLRFEGERVTNIOASTMEE 243 DHSVSLSPSLFNPEEFHPLDPTOEP1FPPELLRLKDTP-HX0LRFEGERVTNIOASTLKE 244 DHTVTLSPSLFNPEEFHPLDPTOEP1FPPELLRLKDVP-PX0LRFEGERVTNIOASTLKE 244
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR	DOTVSLSPSLFINPEDER/RLDPTOEP1FPPELLRLkDTP-OKKLIPEGER/VTN10ASTMEE 243 DRSVSLSPSLFRPEFTRLDPTOEP1FPPELLRLkDP-PKOLIPEGER/W10ASTLKE 244 DRTVTLSPSLFNPEEFNRLDPTOEP1FPPELLRLkDP-PKOLIPEGER/W10ASTLKE 244 E-OKOVCFKGER/WN10PTTLGE 270
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR	DOTVOLSPSLFRVEDPRR/Det0eP1FPPELLRLKDTP-OKOLRFEGENVTHIOASTWEE 243 DKSVGLSPSLFRVEEFPLDPT0EP1FPPELLRLKDTP-RKOLRFEGENVTHIOASTWEE 244 DKTVTLSPSLFRVEEFINLDPT0EP1FPPELLRLKDTP-RKOLRFEGENVTHIOASTWEE 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR	001VSLSPSLRWEDHRLDPTOEPTFPELLRUOTP-0X0LRFEGENTHI 0ASTNEE 243 0KVSLSPSLRWEETRLDPTOEPTFPELLRUOTP-0X0LRFEGENTHI 0ASTNEE 243 INVTLSPSLRWEETRLDPTOEPTFPELLRUOTP-0X0LRFEGENTHI 0ASTNEE 243 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR	00TVSLSPSLFRVEDPRRLDPTOPTIPPELLRLXDTP-0XCLRFEGERVTHIOUSTIME 243 NIXVSLSPSLFRVEETRLDPTOPTIPPELLRLXDTP-0XCLRFEGERVTHIOUSTILE 244 NIVTLSPSLFRVEETRLDPTOPTIPPELLRLXDTP-0XCLRFEGERVTHIOUSTILE 244 NIVTLSPSLFRVEETRLDPTOPTIPPELLRLXDVP-PXCLRFEGERVTHIOUSTILE 244 -C-0XVCFRUERVMII OTTOPTIPPELLRLXDVP-PXCLRFEGERVTHIOUSTILE 244 -C-0XVCFRUERVMII OTTOPTIPPELLRLXDVP-PXCLRFEGERVTHIOUSTILE 244 -C-0XVCFRUERVMII OTTOPTIPPELLRXDVP-PXCLRFEGERVTHIOUSTILE 244 -C-0XVCFRUERVMII OTTOPTIPPELLRXDVP-PXCLRFEGERVMII OTTOPTICE -C-0XVCFRUERVMII OTTOPTOPTIPPELLRXDVP-PXCLRFEGERVMII OTTOPTOPTIPPELLRXDVP-PXCLRFEGERVMII OTTOPTOPTIPPELLRXDVP-PXCLRFEGERVMII OTTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTO
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR	00TVSLSPSLFWEDHRFLOPTOEPTOPPTOPPTOPPTOPULRLUOTP-0X0LFFGENVTHI OASTWEE 243 00VSLSPSLRRFEFTDLOPTOEPTIPPELLRUOTP-0X0LFFGENVTHI OASTWEE 244 00VTLSPSLRRFEFHELDPTOEPTIPPELLRUOTP-0X0LFFGENVTHI OASTWEE 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR	001VSLSPSLPREDRRLDPTOP10P9LLRLXDTP-0XCLRFEGEVTNI IOSTIKE 243 INSVSLSPSLRREETRLDPTOP1PPELLRLXDTP-0XCLRFEGEVTNI IOSTIKE 244 INVILSPSLRREETRLDPTOP1PPELLRLXDVP-RXLRFEGEVTNI IOSTIKE 244 INVILSPSLRREETRLDPTOP1PPELLRLXDVP-RXLRFEGEVTNI IOSTIKE 244 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcepsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR	00TVSLSPSLPREPRIP.0F06P1FP9ELIRL/0TP-0X0LFF66EVTH10ASTHEE 243 0RVSLSPSLRRFEFTR_0F06P1FP9ELIRL/0TP-0X0LFF66EVTH10ASTHE2 444 0VTLSPSLRRFEFTR_0F06P1FPPELIRL/0TP-0X0LFF66EVT10ASTHE2 443 0VTLSPSLRFEFTR_0F06P1FPPELIRL/0TP-0X0LFF66EVT10ASTHE2 443 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR	001VSLSPSLRWEDHRFLDPTDEP1FPELLRLXDTP-0XCLRFEDERVTNI IONS1WEE 243 NIXVSLSPSLRWEETRLDPTDEP1FPELLRLXDTP-0XCLRFEDERVTNI IONS1WEE 243 NIVILSPSLRWEETRLDPTDEP1FPELLRLXDVP-PXCLRFEDERVTNI IONS1WE 244 NIVILSPSLRWEETRLDPTDEP1FPELLRLXDVP-PXCLRFEDRVTNI IONS1WE 244 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR	001VSLSPSLFWEDHRLDPTOEPIEPPELIRLUOTP-0X0LFFGEIVTII IOISTINEE 243 001VSLSPSLFWEEFIRLDPTOEPIEPPELIRLUOTP-0X0LFFGEIVTII IOISTINEE 244 001VTLSPSLFWEEFIRLDPTOEPIEPPELIRLUOTP-0X0LFFGEIVTII IOISTINE 244 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR chicken_XOR rat_XOR	001VSLSPSLRWEDHRLDPTOP10P9LIPHELIRLK0TP-0KURFEGENTNI IONS1WEE 243 0KVSLSPSLRWEETRLDPTOP1PPELIRLK0TP-0KURFEGENTNI IONS1WEE 244 INVILSPSLRWEETRLDPTOP1PPELIRLK0TP-0KURFEGENTNI IONS1WE 244 INVILSPSLRWEETRLDPTOP1PPELIRLK0TP-0KURFEGENTNI IONS1WE 244 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR nat_XOR human_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR human_XOR	001VSLSPSLFWEDHRLDPTOEPTOPUTPOLLRLUOTP-0X0LRFEGENTTII OASTMEE 243 DIRVSLSPSLFWEETPLDPTOEPTOPUTPOLLRLUOTP-0X0LRFEGENTTII OASTMEE 244 DIRVSLSPSLFWEETPLDPTOEPTOPUTPOLLRLUOTP-0X0LRFEGENTTII OASTMEE 244 DIRVSLSPSLFWEETPLDPTOEPTOPUTPOLLRLUOTP-0X0LRFEGENTTII OASTMEE 244 DIRVSLSPSLFWEETPLDPTOEPTOPUTPOLLRUOTP-0X0LRFEGENTII OASTMEE 244 DIRVSLSPSLFWEETPLDPTOEPTOPUTPOLLRUOTP-0X0LRFEGENTII OASTMEE 244 DIRVSLSPSLFWEETPLDPTOEPTOPUTPOLLRUOTP-0X0LRFEGENTII OASTMEE DIRVSLSPSLFWEETPLDFTOEPTOPUTPOLITERUSTOPUTOFUTOFUT DIRVSLSPSLFWEETPLDFTOEPTOPUTPOLITERUSTOPUTOFUTOFUT DIRVSLSPSLFWEETPLDFTOEPTOPUTPOLITERUSTOPUT DIRVSLSPSLFWEETPUTOFUTOFUTOFUT DIRVSLSPSLFWEETPUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUT DIRVSLSPSLFWEETPUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUT DIRVSLSPSLFWEETPUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOFUTOF
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR nat_XOR human_XOR bovine_XOR	001VSLSPSLFRVEDPRPL0PT0PT1PPELLRLx0TP-0xXLFFE0EVTNI IOS1WE 243 0xVSLSPSLFRVETFIL0PT0PT1PPELLRLx0TP-0xXLFFE0EVTNI IOS1WE 244 INVTLSPSLFRVEDPRL0PT0PT1PPELLRLx0TP-0xXLFFE0EVTNI IOS1WE 244 INVTLSPSLFRVEDPRL0PT0PT1PPELLRLx0TP-0xXLFFE0EVTNI IOS1WE 244 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcappulatus_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR human_XOR human_XOR	001VSLSPSLFWEDFKPL0P10P11PPELLRLvDTP-0X0LFFGEIVTH10AS1WE 243 001VSLSPSLFWEEFKPL0P10P11PPELLRLvDTP-0X0LFFGEIVTH10AS1WE 244 001VTLSPSLFWEFMPL0P10P11PPELLRLvDTP-0X0LFFGEIVTH10AS1WE 244 001VTLSPSLFWEFMPL0P10P11PPELLRVDP-7X0LFFGEIVTH10AS1WE 245 001VTLSPSLFWEFMPL0P10P11PPELLRVDP-7X0LFFGEIVTH0AS1WE 245 001VTLSPSLFWEFMPL0P10P11PPELLRVDP10F540A5 001UL0 XA00FDAXLVWINTE101EWFX0MLFFR1VCPANTFELNSVDW0F015FAAA5 001UL0 XA00FDAXLVWINTE101EWFX0MLFFN1VCPANTFELNSVDW0F015FAAA5 001UL0 XA00FDAXLVWINTE101EWFX0MLFFN1VCPANTFELNSVDW0F015FAAA5 001UL0 XA00FDAXLVWINTE101EWFX0MLFFN1VCPANTFELNSVDW0F015FAAA5 001UL0 XA00FDAXLVWINTENG1EWFX0MLFFN1VCPANTFELNSVDW0F015FAAA5 001UL0 XA00FDAXLVWINTENG1EWFX0MLFFN1VCPANTFELNSVDW0717 001UL0 XA00FDAXLVWINTENG1EWFX0MLFFN1VCPANTFELNSVDW0717 001UL0 XA00FDAXLVWINTENG1EWFX0MLFFN1VCPANTFELNSVDW0717 001UL0 XA00FDAXLVWINTENG1EWFX0MLFAX0VSVXA5100111TF59150VF93 001UL0 XA00FF7470LCDW7FAA0XVSVXA5100111TAP5150VF93 001UL0 XA00FF7470LCDW7FAA0XVSVXA5.00011TAP5150VF93 001UL0 XA00FF7470LCDW7F4A0XVSVXA5.00011TAP5150VF93 001UL0 XA00FF7470LCDW7F4001VF74
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR bovine_XOR chicken_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR chicken_XOR	001VSLSPSLFRVEDPRPL0P10P21PPELLRLx0TP-0xXLPFE0EVTN103S1XE2 243 0xVSLSPSLFRVEETRL0PT02P11PPELLRLx0TP-0xXLPFE0EVTN103S1XE2 244 0xV1LSPSLRVEETRL0PT02P11PPELLRLx0TP-0xXLPFE0TN103S1XE2 244 0xV1LSPSLRVEETRL0PT02P11PPELLRLx0TP-0xXLPFE0TN103S1XE2 245 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Reapoulatus_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Reapoulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Reapoulatus_XOR	001VSLSPSLFWEDHRLDPT0EP1FPELLRLX0TP-0X0LRFEGENTTII 00S1WE 243 DRVSLSPSLFXREETIR.DPT0EP1FPELLRLX0TP-0X0LRFEGENTTII 00S1WE 244 DRVSLSPSLFXREETIR.DPT0EP1FPELLRLX0TP-0X0LFFGENTTII 00S1WE 244 DRVSLSPSLFXREETIR.DPT0EP1FPELLRLX0TP-0X0LFFGENTTII 00S1WE 244 
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR	001VSLSPSLRWEDHRFLDPTDP1FPELLRLXDTP-0XCLRFEDERVTNI IDASTMEE 243 DISVSLSPSLRWEETRLDPTDP1FPELLRLXDTP-0XCLRFEDERVTNI IDASTMEE 243 INVILSPSLRWEETRLDPTDP1FPELLRLXDTP-0XCLRFEDERVTNI IDASTMEE 244 INVILSPSLRWEETRLDPTDP1FPELLRLXDVP-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 INVILSPSLRWEETRLDPTDP1FPELLRLXDVP-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDPFDLRLXVPREIDEDTDF1FFELLRLXDVF-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDPFDLRLXVPREIDEDTDF1FFELLRLXDVF-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDPFDLRLXVPREIDEDTDF1FFELLRXDVF-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDPFDLRLXVPREIDEDTDF1FFELLRXDVF-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDPFDLRLXVPREIDEDTDF1FFELLRXDVF-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDPFDLRLXVPREIDEDTDF1FFFELLRXDVF-PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDPFDLRXVVFTEIGI IDEVXXVFTLRVEIR PXCLRFEDRVTNEEDI IFGAASO ILLDLXDF200FPXCLVFTEIGI IDEVXXVFTLRVEIR PXCLRFEDRVTNI IDASTMEE 244 ILLDLXDVFELRVFTLF1FFFFELREDRFADRVTSVXSGEIDTI ITASPI IDAVP 364 ISIVESTLLXDVXLRVEITENEI IDEVXXVFTLRVEIR PXCLRFEDRVTNI ITASPI IDAVP 364 ISIVESTLLXDVXLRVEIR VFTLFFFFFELREDRFADRVTSVXSGEIDTI ITASPI IDAVP 364 ISIVESTLLXDVXLRVEIR VFTLFFFFFELREDRFADRVEIRSSVXSGEIDTI ITASPI IDAVP 364 ISIVESTLLXDVXLRVEIR VFTLFFFFFELREDRFADRVEIRSSVXSGEIDTI ITASPI IDAVP 364 ISIVESTLLXDVXLRVEIR VFTLFFFFFELREDRFADRVEIRSSVXFTLDAVELDVXLRVEIRSF0DPX 375 ISIVESTLLXDVXLRVEIRSVTTKLTRFFFFFELREDRFADRVEIRSSVXFTLDAVELDVXLRVEIRSF0DPX 375 ISIVESTLLXDVXLRVEIRSF0DFXTTI IDAVELEDFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR human_XOR human_XOR choicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR human_XOR	001VSLSPSLFWEDPKPL0P10P10P10PULRLWDTP-0XU.PF00EVTII 0031WE 243 001VSLSPSLFWEETPL0P10P10PPULRLWDTP-0XU.PF00EVTII 0031WE 244 001VLSPSLFWEETPL0P10P10PPULRLWDTP-X00EVECPUTI 0031WE 244 001VLSPSLFWEETPL0P10P10PPULRLWDTP-X00EVF00EVTII 0031WE 245 001VLSPSLFWEETPL0P10P10PPULRLWDTPR01EF00E 102VLA00PP0ALWWNTE 101EW670MLFPL1V0PAITPL0XV90MP015F0A02 300 LLDU.A00PPALWWNTE 101EW670MLFPL1V0PAITPL0XV90MP015F0A02 300 LLDU.A00PPALWWNTE 101EW670MLFPL1V0PAITPL0XV90MP015F0A02 300 LLDU.A00PPALWWNTE 101EW670MLFPL1V0PAITPL0XV90MP015F0A02 300 LLDU.A00PPALWWNTE 101EW670MLFPL1V0PAITPL0XV90MP015F0A02 300 LLDU.A00PPALWWNTE 101EW670MLFPL1V0PAITPL0XV90MP015F0A02 300 LLDU.A00PPALWWNTE 101EW670MLFPL1V0PAITPL0XV90F015F0A02 300 LLDU.A00PPALWEETPL0XV90F0F01F0A020VSXL0X00011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLFT070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0X0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLFT070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0X0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0X0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFFA020VSXL0011TA6P150UF90 364 LSUSSILLEXXXLF070EFFF07VRLE0XFF07VRL1DF60EFF5AFF040 423 PNAS0AULTUSS0EFF5AFF0000FFF07VRL1DF60EFF5AFF040 423 PNAS0AULTUSS0EFF5AFF0000FFF07VRL1DF60EFF5AFF040 423 LSUSSILLEXXXLF07000FFFF07VRL1DF60EFF5AFF047XH004475
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR human_XOR bovine_XOR capsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR capsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR human_XOR bovine_XOR	001VSLSPSLFNPCBPR/DPT0P11PPELIRLNDTP-0KURFE0EVTNI IOIS1NEE 243 0KVSLSPSLRVREETRLDPT02P11PPELIRLNDTP-0KURFE0EVTNI IOIS1NEE 244 INVILSPSLRVREETRLDPT02P11PPELIRLNDTP-KOLFE0EVTNI IOIS1NE 244 INVILSPSLRVREETRLDPT02P11PPELIRLNDTP-KOLFE0EVTNI IOIS1NE 244 INVILSPSLRVREETRLDPT02P11PPELIRLNDTP-KOLFE0EVTNI IOIS1NE 244 ILIOLKAORPANL WONTE IOIEIEKFNMLP7NI IORMITELWSTPENOTOIS50A07 300 ILIOLKAORPANL WONTE IOIEIEKFNMLP7NI IORMITELWSTPENOTOIS50A07 300 ILIOLKAORPANL WONTE IOIEIEKFNMLP7NI IORMITELWSTPENOTOIS50A07 300 ILIOLKAORPANL WONTE IOIEIEKKFNMLF7NI IORMITELWSTPENOTOIS50A07 300 ILIOLKAORPANL WONTEVIEIEKKFNMLF7NI IORMITELWSTPENOTOIS50A07 300 ILIOLKAORPANL WONTEVIEIEKKFNMLF7NI IORMITELWSTPENOTOIS50A07 300 ILIOLKAORPANLTVIITEVIEIEKKFNMLF7NI IIIIFXIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR	001VSLSPSLRWEEPRR.DPTOP10P11PPELLRLXDTP-0XLRFEGERVTNI IOSTINEE 243 0XVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10P11PPELLRLXDTP-0XLRFEGERVTNI IOSTINEE 244 0XVVLSPSLRWEEPRLDPTOP10P11PPELLRLXDTP-0XLRFEGERVTNI IOSTINE 244 0XVVLSPSLRWEEPRLDPTOP10P11PPELLXUDP-PXDLRFEGERVTNI IOSTINE 244 0XVVLSPSLRWEEPRLDPTOP10P11PPELLXUDP-PXDLRFEGERVTNI IOSTINE 244 0XVLSPSLRWEIPRLDPTOP10P11PPELLXUDP-PXDLRFEGERVTNI IOSTINE 244 0XVLSPSLRWEIPRLDPTOP10P11PPELLXUDP-PXDLRFEGERVTNI IOSTINE 244 0XVLSPSLRWEIPRLDPTOP10P11PPELXUDPELSVERIPPELSTRAMG 304 1LDLXAGPPCNLVVINTE IOI EBRARD, VTLLXPAR IPPENNOTE ISTINA 304 1LSVLSVLXVLXVILXE IOING VTLLXPAR IPPENNOTE ISTINA 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXETERI ISING VTLLXPAR IPPENNOTE ISTINA 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXETERI ISING VTLLXPAR IPPENNOTE ISING ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXETERI ISING VTLLXPAR IPPENNOTE ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXLXETERI ISING XVLXLXLXETERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXLXETERI ISING XVLXLXLXETERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXLXETERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXETERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXETERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXETERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXETERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXVLXVLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXXVLXLXEERI ISING 304 1LSVLSVLXXVLXEERI ISING 304 1LSVLSXLXLXEERI ISING 304 1LSVLSXL
rat_XOR human_XOR bovine_XOR choren_XOR Respuid_tus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR	001VSLSPSLPREDERRIDPTOP10PP11PPELLRLX0TP-0X0LRFEGERVTNI0AS1WE 243 01VSLSPSLPREEFITA_0PT02P11PPELLRLX0TP-0X0LRFEGERVTNI0AS1WE 244 01VTLSPSLPREEFITA_0PT02P11PPELLRLX0TP-0X0LRFEGERVTNI0AS1WE 244 01VTLSPSLPREEFITA_0PT02P11PPELLRLX0TP-0X0LRFEGERVTNI0AS1WE 244 01VTLSPSLPREEFITA_0PT02P11PPELLRLX0TP-0X0LRFEGERVTI0AS1WE 244 01VLSPSLPREEFITA_0PT02P11PPELLRLX0TP-0X0LRFEGERVTI0AS1WE 244 01UL0KA0PPELX0VNTEIGIEWKPX0LFPINIVOPANIPELNSVHOP0015F0A0C3 30 01UL0KA0PPELX0VNTEIGIEWKPX0LFPINIVOPANIPELNSVHOP0015F0A0C3 30 01UL0KA0PPELX0VNTEIGIEWKPX0LFPINIVOPANIPENNV0DET015F0A0C3 30 01UL0KA0PPELX0VNTEIGIEWKPX0LFPINIVOPANIPENNV0DET015F0A0C3 30 1SVVETLVDVALLVD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NI1TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLVD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NI1TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLVD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NI1TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLVD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NI1TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLVD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NI1TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLVD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NI1TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NI1TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NITASP1500HFA0X0VCVALLSELFIDEFISANA04 LSVVETLVDVALLD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NA011TASP150LPV3 363 LSVVETLVDVALLD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NA011TASP1500P1300 LSVVETLVDVALLD0TEVFIDEURKA0CHFA0X0VKSVASIG0NA010000000000000000000000000000000000
rat_XOR human_XOR bovine_XOR Reapoulatus_XOR human_XOR human_XOR bovine_XOR Reapoulatus_XOR rat_XOR human_XOR human_XOR human_XOR human_XOR human_XOR human_XOR human_XOR human_XOR human_XOR	001VSLSPSLFWEDHRFL0PT0P10P11PPELLRLVDTP-0X0LRFE0EIVT1100S1WE2 243 DISVSLSPSLFXREETIFL0PT02P11PPELLRLVDTP-0X0LRFE0EIVT1100S1WE2 244 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02P11PPELLRLVDTP-X0LRFE0EIVT1100S1WE2 244 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02P11PPELLRLVDTP-X0LRFE0EIVT1100S1WE2 244 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02P11PPELLRVDTP-X0LRFE0EIVT1100S1WE2 245 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02P11PPELLRVDTP2WFE0EIVT010S1WE2 245 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02P11PPELLRVDTP2WFE0EIVT010S1WE2 245 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02F1W102PX11PELRVDTP2WFE0EIVT010S1WE2 245 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02F1W102PX11PELRVDTP2WFE0EIVT02F1ACF 245 DIVTLSPSLFXREETIFL0PT02F1W102PX11PERVT02F1CF1FT04F1CAU DIVTLSPSLFXFEEITIFL0PT02F1W102PX11PERVT02F1CF1FT04F1CAU DIVTLSPSLFXFEEITIFL0PT02F1W20F4F1SF0AUCA01REFF020F10AF971 245 DISVERTILSVAGETEFF5F0AUEDERFAQUXSVSV50AUT1A591S1WF9 305 LSVERTILSVAGETEFF5F0AUEDERFAQUXSVSV50AUT1A591S1WF9 305 LSVERTILSVAGETEFF5F0AUEDERFAQUXSV50AUEDEFF5AUF0A
rat_XOR human_XOR bovine_XOR choviene_XOR chovine_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR rat_XOR rat_XOR	001VSLSPSLPREEPRID PTOEP1FPELIRLIKUTP-0KURFEGERVTNI IOIST INEE 243 01VSLSPSLRREEFITA (PTOEP1FPELIRLIKUTP-0KURFEGERVTNI IOIST INEE 244 INITLISPSLRREEFITA (PTOEP1FPELIRLIKUTP-7KURFEGERVTNI IOIST INE 244 INITLISPSLRREEFITA (PTOEP1FPELIRLIKUTP-7KURFEGERVTNI IOIST INE 244 INITLISPSLRREEFITA (PTOEP1FPELIRLIKUTP-7KURFEGERVTII IOIST INE 244 INITLISPSLRREEFITA (PTOEP1FPELIRLIKUTP-7KURFEGERVTII IOIST INE 244 INITLISPSLRREEFITA (PTOEP1FPELIRLIKUTP-7KURFEGERVTII IOIST INE 244 ILIOLKAORPALIVONTEI IOI EIKKFYNMEPL IVOPAIT FELINSVHOPOI ISFOAK3 00 ILIOLKAORPALIVONTEI IOI EIKKFYNMEPL IVOPAIT FELINSVHOPOI ISFOAK3 00 ILIOLKAORPALIVONTEI IOI EIKKFYNMEPL IVOPAIT FELINSVHOPOI ISFOAK3 00 ILIOLKAORPALIVONTEI IOI EIKKFYNEL FANNA (PTOEPISI ISFOAK3 00 ILIOLKAORPALIVONTEI IOIEI EIKKFYNEL FANNA (PTOEPISI ISFOAK3 00 ILIOLKAORPALIVONTEI ISFOAK3 00 ILIOLKAORPALIVONTEI ISFOAK3 (PTOEPISI ISFOAK3 00 ILIOLKAORPALIVONT
rat_XOR human_XOR bovine_XOR Choicen_XOR Recopulatus_XOR rat_XOR human_XOR choicen_XOR Recapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR Recapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR human_XOR human_XOR	001VSLSPSLRWEEPRR.DPTOP10PP1LPHLLRLXDTP-0xCLRFEGERVTHIOUSTIKE 243 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10PP1LPHLLRLXDTP-0xCLRFEGERVTHIOUSTIKE 244 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10PP1PP1LRLXDTP-0xCLRFEGERVTHIOUSTIKE 244 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10PP1PP1LRLXDTP-0xCLRFEGERVTHIOUSTIKE 244 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10P1PP1PPLRLXDTP-0xCLRFEGERVTHIOUSTIKE 244 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10P1PP1LPXDVTPLDSVTPLDVSTRUGSTRUK 244 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10P1PP1LPXDVTPLDSVTPLDVSTRUGSTRUK 344 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10P1PP1LPXDVTPLDSVTPLDSVTPLDVSTRUGSTRUK 344 0xVSLSPSLRWEEPRLDPTOP10P1LPXDVTPLDS
rat_XOR humar_XOR bovins_XOR choren_XOR Respuid tus_XOR rat_XOR humar_XOR bovins_XOR choren_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR humar_XOR	001VSLSPSLFNPCBPR/DPT0P10P11PPELLRLx0TP-0x0LRFE0EVTN103S1NE2 243 0xVSLSPSLFNPCEPR/DPT0P1PPELLRLx0TP-0x0LRFE0EVTN103S1NE2 244 0xV1LSPSLRNPCEPR/DPT0P2P1PPELLRLx0TP-0x0LFFE0EVTN103S1NE2 244 0xV1LSPSLRNPCEPR/DPT0P2P1PPELLRLx0TP-0x0LFFE0EVTN103S1NE2 244 0xV1LSPSLRNPCEPR/DPT0P2P1PPELLRLx0TP-0x0LFFE0EVT103S1NE2 245 LL0LxA00FPARLWONTE101EWFX9MLP7N1VP2M1PELNSVH0P2015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1VP2M1PELNSVH0P2015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1VP2M1PENNV0P2M1PE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1VP2M1PENNV0P2M1FE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1VP2M1PENNV0P2M1FE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1VP2M1PENNV0P2M1FE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1VP2M1FE0NV0F0FE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1LP2M1FE0NV0F0FE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1LP2M1FE0NV0F0FE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7N1LP2M1FE0NV0FA02FE015F0A3C3 30 LL0LXA00FPARLWONTE101EWFX9MLF7NFF0A7K1LSP2ELRLX1F0A00K5X4500N11TA59150LMP3 30 LSVEXTLEVANLF0A7EFF9F0A7K1LSPEELRFX5007K011F0A00K59100P1 32 LSVEXTLEVANLF0A7EFF9F0A7K1LSPEELLSEEPF5AFKA0 428 PNAS0ALTLVS80TRTV900HFFF9F0A7K1LSPEELLSEEPF5AFKA0 428 SRFED01AVXTSBIRVF0F0FF1F0A7K1LSPEELLSEEPF5AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0F1F0A7K1LSPEELLSEEPF5AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0F1F0A7K1LSPEELLSEEPF5AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0A7K1LSPEELLSEEP55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0F1F0A7K1LSPEELLSEEP55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0F1F0A7K1LSPEELLSEEP55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0F1F0A7K1LSPEELLSEEP55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0F1F0A7K1LSPEELLSEEP55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0A7K1LSPEELLSEEF55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0A7K1LSPEELLSEEF55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0F1F0A7K1LSPEELLSEEF55AFKA0 425 SRFED01AVXTSBIRVF0F0A7K1LSPEELDFF557K0041554547547K0 455 SRFED01AVXTSBIRVF0F0A7K1LSPEELDFF557K004554554554754764454545455455455455455455455455555555
rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR human_XOR bovine_XOR human_XOR bovine_XOR human_XOR bovine_XOR human_XOR	001VSLSPSLRWEEPRICPTOPTOPTOPTOPULPULUKUTP-0XLRFEGENTHI UOSTINE 243 0XVSLSPSLRWEEPRICPTOPTOPTOPTOPTOPULSUUVP-PXLRFEGENTHI UOSTINE 244 0XVVLSPSLRWEEPRICPTOPTOPTOPTOPTOPULSUUVP-PXLRFEGENTHI UOSTINE 244 0XVVLSPSLRWEEPRICPTOPTOPTOPTOPTOPTOPULSUUVP-PXLRFEGENTHI UOSTINE 244 0XVLSPSLRWEEPRICPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOP
rat_XOR humar_XOR bovins_XOR choicken_XOR racapsulatus_XOR humar_XOR bovins_XOR choicken_XOR rat_XOR humar_XOR bovins_XOR choicken_XOR rat_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR rat_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR	DOTVSLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTOPUTPOLILIKUTP-OKURFEGENTTII OASTIKE 243 DISVSLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-OKURFEGENTTII OASTIKE 244 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTTII OASTIKE 244 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE 244 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE 244 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE 245 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE 245 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE 245 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE 245 DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTIPPELIKUTP-NOKUFEGENTII OASTIKE DISVLSPSLRWEEPER/DPTOPTIPPELIKUTPPEN/DPTOTISION/043 LSVLSPSLRWEEPER/DPTOPTIPPEN/RUTPPA/RUTPPEN/DPTOTISION/043 LSVLSPSLRWEEPER/DPTOPTIPPON/RULPPER/DPTOTISION/043 LSVLSPSLRWEEPER/DPTOPTIPPON/RULPPER/DPTOTISION/043 LSVLSPSLRWEEPER/DPTOPTIPPON/RULPPELISEI EPISKGEFFSAR/NA 426 PINASOARLIVSIORTRY/DMOHTFPPON/RULPPELISEI EPISKGEFFSAR/NA 426 PINASOARLIVSIORTRY/DMOHTFPPON/RULPPEN/RULPPELISEI EPISKGEFFSAR/NA 426 PINASOARLIVSIORTRY/DMOHTFPPON/RULPPEN/RULPPELISEI EPISKGEFFSAR/NA 426 PINASOARLIVSIORTRY/DMOHTFPPON/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEI/SULPPELISEI EPISKGEFFSAR/NA 426 PINASOARLIVSIORTRY/DMOHTFPPON/RULPPEN/RUPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RUPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RUPPEN/RULPPEN/RULPPEN/RULPPE
rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR human_XOR	DOTIVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPLICALUSTD-OKCLRFEGENTINIOSTINEE 243 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPLICALUSTD-RKOLFEGENTINIOSTINE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPLICALUSTD-RKOLFEGENTINIOSTINE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPTOPPLICALUSTD-RKOLFEGENTINIOSTINE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPTOPPLICALUSTD-RKOLFEGENTINIOSTINE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPLICALUSTD-RKOLFEGENTINIOSTINE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPLICALUSTD-RKOLFEGENTINIOSTINE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPLICALUSTD-RKOLFEGENTINIOSTINE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPTOPT
rat_XOR human_XOR bovins_XOR chovien_XOR rat_XOR human_XOR bovins_XOR chovien_XOR rat_XOR human_XOR bovins_XOR human_XOR bovins_XOR human_XOR bovins_XOR rat_XOR human_XOR bovins_XOR rat_XOR human_XOR bovins_XOR human_XOR bovins_XOR human_XOR bovins_XOR human_XOR bovins_XOR human_XOR bovins_XOR	DOTVSLSPSLRWEEPER/DPTDP/IPPELIRL/DTP-0KURFEGEVTINIOSTIKE 243 DKVSLSPSLRWEEPIR/DPTDP/IPPELIRL/DTP-0KURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DPTDPTPPERIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DPTDPTPPERIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DPTDPTPPERIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DPTDPTPPERIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DPTDPTPERIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DVDPTPELIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DVDPTPELIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DVDPTPELIRL/DVDP-PKURFEGEVTINIOSTIKE 244 DVTLSPSLRWEEPIR/DVDPTPELIRL/DVDPTPELIRL/DVDPTLOSTIGATION 234 LLU/AAGPER/DVDVTEIGIEBIR/DVDPTI/DVDPTIL/DVDPTELISS/DHEPDSISGAAAC 304 LLU/AAGPER/DVDVTEIGIEBIR/DVDVTLG/DVTLSPSLRWEEPISISGAAAC 304 LLU/AAGPER/DVDVTLGIEBIR/DVDVTLG/DVTLSPSLRWEEPISISGAAAC 304 LLU/AAGPER/DVDVTLGIEBIR/DVDVTLG/DVDVLG/DVDVTLG/DVDVTLG/DVDVTUGATIGUTEPISISGAAC 305 LSVETLIS/VALK/DVDVTLF/DVDVTLF/DVDVLG/DVDVTLG/DVDVTLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVVLG/DVDVTVLG/DVDVTVLG/DVDVVLG/DVDVTVLG/DVDVVCUGATISAL/TVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVVLG/DVDVVGVLG/DVDVGVGVGVGVGVUGVGVUGVGVGVGVGVGVGVGVGVGV
rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR rat_XOR bovine_XOR choicen_XOR choicen_XOR choicen_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR capsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR choicen_XOR capsulatus_XOR rat_XOR rat_XOR	DOTIVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPTOPULALUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 243 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPTOPULAUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPTOPULAUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPTOPPTOPULAUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPTOPULAUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPTOPULAUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPTOPULAUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPTOPULAUNDTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPTOPULAUNTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPULAUNTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPULAUNTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPULAUNTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPULAUNTP-OKOLRFEGENTINIOUSTIKE 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPULAUNTPOPOTOPULAUNTPOPTOPUTAUTIONINAUNTPULAUNTPOPOTOPULAUNTPOTOPULAUNTPOISOURCEURING DIRVSLSPSLARVEERING PTOFOPTOPUTAULIPSELISE PTOPOTOSIANUT 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOFOPTOPUTAULIPSELISE PTOPOTOSIANUT 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOFOPTOPUTAULIPSELISE PTOPOTOSIANUT 244 DIRVSLSPSLARVEERING PTOFOTOPUTAUTIOPULAUNTPOPUTAUTIOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPUTAUTIONINGPTOPUTAUTIOPULAUNTPOISOURTIAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTOPULAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAUNTOPULAUNTPOISOURTIAUNTOPULAU
rat_XOR humar_XOR bovins_XOR chovien_XOR racepuilatus_XOR rat_XOR humar_XOR bovins_XOR chovien_XOR rat_XOR humar_XOR bovins_XOR humar_XOR bovins_XOR chovien_XOR rat_XOR humar_XOR bovins_XOR rat_XOR humar_XOR hovins_XOR humar_XOR	DOTVSLSPSLENKEEPER/EPTOPPTOPPTOPPTOPPTOPULSUUTE ENVIRONMENTE 243 DOTVSLSPSLENKEEPER/EPTOPPTOPPTOPPTOPPELLIKUOTP-OKOLRFEGERVTNIOSISTIKE 244 INTLISPSLENKEEPER/EPTOPPTOPPTOPPELLIKUOTP-OKOLRFEGERVTNIOSISTIKE 244 INTLISPSLENKEEPER/EPTOPTOPPTOPPELLIKUOTP-OKOLRFEGERVTNIOSISTIKE 244 INTLISPSLENKEEPER/EPTOPTOPPTOPPELLIKUOTP-OKOLRFEGERVTNIOSISTIKE 245 ILLOKAMORPANLI VONTEI GIELEKKPNME/PILIVOPANTIPELINSVHOPEGISTGAAG 300 LLOKAMORPANLI VONTEI GIELEKKPNME/PILIVOPANTIPELINSVHOPEGISTGAAG 300 LUKAKSOPANLI VONTEI GIELEKKPNME/PILIVOPANTIPELINSVHOPEGISTGAAG 300 LUKAKSOPANLI VONTEVIGI GIELEKKAKSUKAKSI GONI 11ASP1 SOLMV3 305 LSIVEKTLIKUMA (LOTEKTEPKIK) CARIFA AGKIVKSVASI GONI 11ASP1 SOLMV3 305 SISTEDI AKVITSBIRVIVEKTLIKUME/CARIFA AGKIVKSVASI GONI 11ASP1 SOLMV3 305 SISTEDI AKVITSBIRVIVEKTLIKUME/CARIFA AGKIVKSVASI GONI 11ASP1 SOLMV3 305 SISTEDI AKVITSBIRVIVEKTLIKUMA (LOTEKTLIKUKAELLISELI LISTEKSEEPEFSAKAKA 42 SISTEDI AKVITSBIRVIVEKTLIKUKELLISEKTIKIKI 444 NIEDI AKVITSBIRVIVEKTLIKUKELLIKUKENKIKIKIKIKIKI GONORIFIKSKILTIKIKIKIKIKI 444 NIEDI AKVITSBIRVIVEKTL
rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR rat_XOR bovine_XOR choicen_XOR choicen_XOR choicen_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR choicen_XOR choicen_XOR choicen_XOR choicen_XOR choicen_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR capsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR choicen_XOR choicen_XOR choicen_XOR human_XOR bovine_XOR bovine_XOR bovine_XOR bovine_XOR human_XOR bovine_XOR	DOTIVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIOSTIKE 243 DISVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIOSTIKE 244 DISVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIOSTIKE 244 DISVSLSPSLARVEERING PTOPPTOPPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIOSTIKE 244 DISVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIOSTIKE 244 DISVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIOSTIKE 245 DISVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIOSTIKE 245 DISVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIONA 05 DISVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIONA 05 DISVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPOPTOPPOPTOPPOPTOPPLICALUSTP-OXCLRFEGENTINIONA 05 DISVSLSPSLARVEERING PTOPOPTOPPOPTOPPOPTOPPOPTOPPIPTOPPOPTOPP

rat_XOR	FASATLLFQK	551
human_X0R	FASATLLFOK	552
bovine_X0R	YTSATLLFOK	551
chicken_XOR	Y1SATELFHKDP1AST0LF0EVPRG	595
Rcapsulatus_XOR	AVAVLEVMP	462

Rcapsulatus\_XOR AALPLLAQDFTPLSDWRAS-AAYRWNAAQAMALRYVR

#### C-terminal domains

rat_XOR	DPPANVQLFQEVPKDQSEEDMVGRPLPHLAANMQASGEAVYCDD1PRY 599	
human_X0R	DPPADVQLFQEVPK0QSEEDMVGRPLPHLAADMQASGEAVYCDD1PRY 600	
chicken XOR		
Rcapsulatus_XOR	MSVGKPLPHDSARAHVTGQARYLDDLPCP 29	
rat_XOR	ENELSURLYTSTRAHAK ITSTDTSEAKKVPGFVCFLTAEDVPNSNATGLFND651	
howine XOR	ENELSCHLVTSTRAHAKTIKSTDTSEAAKVPGPVCFTSADDTPGSNFTGLFND 652 ENELFLRLVTSTRAHAKTIKSTDVSEACKVPGFVCFTSADDTPGSNFTGLFND 651	
chicken_XOR	ENELYLTLVTSTQAHAKILSIDASEAQSVPGFVCFVSAKDVPGSNITGIAND 680	
Rcapsulatus_XOR	ANTLHLAFGLSTEASAA1TGLDLEPVRESPGV1AVFTAADLPHDNDASPAPSP 82	
rat YOP		
human_X0R	-ETVFAKDKVTCVGHI IGAVVADTPEHTQRAAQGVKITYEELPAIITIEDAIKN 705	
bovine_XOR	-ETVFAKDTVTCVGHI1GAVVADTPEHAERAAHVVKVTYEDLPAIITIEDA1KN 704	
chicken_XOR	-ETVFAEDVVTCVGHIIGAVIADTQEHSRRAAKAVKIKYEELKPIVTIQEAIEQ 733	
Kcapsulatus_XOK	EPVLATGEVIEVGEPTFLYAATSHIGAARTAARGARTTYAPI9*ATLTLDQALAA 135	
rat_XOR	NSFYGSE1K1EKODLKKGFSEADNVVSGELY1GOOGEHFYLETNCT1AVPKGEAGEN 760	
human_XOR	NSFYGPELK1EKGDLKKGFSEADNVVSGE1Y1GGQEHFYLETHCT1AVPKGEAGEM 761	
bovine_XOR	NSFYGSELK1EKGDLKKGFSEADNVVSGELY1GGODHFYLETHCT1A1PKGEEGEM 760	
chicken_AUK Roansulatus XOR	USFROPVINARDVINAPEESUHILEGENHIGGUEHFILEIHGILAVPNGEDGEN 789 DSRFFROPVINARDVITALAGAAH AFOCFFIGODFHFYLFODAALALPAFOCV 190	
rat_XOR	ELFVSTQNTNKTQSFVAXNLGVPDNR1VVRVKRNGGGFGGKETRSTVVSTALALAAHKTG 820	
human_XOR	ELEVISTON TWKTOSEVAKWEGVPANR I VRVKRWGGGEGGKETRSTVVSTAVALAAVKTG 821	
chicken XOR	ELEVISIONANTOEFTASALGVPSNR1VPVKRIGGGGGGKETRSTLVSVAVALAATKTG 620	
Rcapsulatus_XOR	VIHCSSQHPSEIQHKVAHALGLAFHDVRVENRNIGGGFGGKESQQNHLAIACAVAARATG 250	
rat_XOR	RPVRCMLDRDEDML I TGGRHPFLAKYKVGFMKTGTVVALEVANFSNGGNTEDLSRS I MER 880	
hovine XOR	HPVPCMLDRDEDML I TGGNPFT LARTK VOFMKTGT VALEVDIT SNVGNT GOLGOSTNER. GOT	
chicken_XOR	RPVRCMLDRDEDWLISGGRHPFLGRYKVGFWKNGKIKSLEVSYYSNGGNSADLSHGVMDR 909	
Rcapsulatus_XOR	RPCKMRYDRDDDMV1TGKRHDFR1RYR1GADASGKLLGADFVHLARCGMSADLSLPVCDR 310	
rat YOP	ALCHIENAVY IDVIDGTORI/VENI DONTACROCCORONE LAEVANCEVATTOCI DAEC. GAD	
haman XOR	ALFINENCYKTPNTRETORI OKTNEPSNTAFROFOGPOUNLTAETHISEVATTOUPAEE 940 ALFINENCYKTPNTRETORI OKTNEPSNTAFROFOGPOUNLTAECHNSEVAVTOSNPAFE 941	
bovine_XOR	ALFHMDNCYKIPNIRGTGRLCKTNLSSNTAFRGFGGPGALFIAENWKSEVAVTCGLPAEE 940	
chicken_XOR	ALLHLONSYN I PWVS I NGFI CKTNLSSNT AFROFOG POGIMI I AECHNSOL ARKCOLPPEE 969	
Rcepsulatus_XOR	AMLHADGSYFVPALRIESHRLRTNTQSNTAFRGFGGPQGALGNERAIEHLARGNGRDPAE 370	
rat_XOR	VRRKNWYKEGDLTHFNOKLEGFTLPRCWDECLASSOYLARK 981	
human_XOR	VRRKNLYKEGDLTHFNOKLEGFTLPRCWEECLASSO/HARK 982	
bovine_XOR	VRIIKNINYKEGDLTHFNORLEGFSVPRCII/DECLKSSO/YYARK 981	
Chicken_AUK Resonalatur XOR	VRK.INET	
NV8poura cos_von		
rat_XOR	REVEKFNRENCHKKRGLC11PTKFG1SFTLPFLNQGGALVHVYTDGSVLLTHGGTEINGQG	1041
human_XOR	SEVDKFNKENCNIKKRGLC11PTKFG1SFTVPFLNQAGALLHVYTDGSVLLTHGGTENGQG	1042
bovine_XOR	SEVDKFNKENCHKKRGLC11PTKFG1SFTVPFLNGAGAL1HVYTDGSVLVSHGGTENGOG	1041
cnicken_AUK Resoculatur XOR	ALTEEPINAUNKIINAKIIMATII PINAUTETTI TII NAAALVIIVTI DOSVLLIINGI EIKOO AETAANNETNOTI ADGTALSOVVEGTEETTTIII NAAALVOTVTIDOSVALNIAGETENGOG	400
hoepeanacao_nor		400
rat_XOR	LHTKIN/OVASRALKIPTSK1H1SETSTNTVPNTSPTAASASADLNGQGVYEACQT1L	1098
human_XOR	LHTKWOVASRALKIPTSKIYISETSTNTVPNTSPTAASVSADLNGDAVYAACOTIL	1099
bovine_XOR	LHTKIN QVASKALKIPISKIYISETSTNTVPNSSPTAASVSTDIYGQAVYEACQTIL	1098
Chicken_Auk Resosulatus XOS	LTINELWASASUG	547
hoeped re cao_hor		24/
rat_XOR	KRLEPFKKKKPTGPNEANVMDAYTSAVSLSATGFYKTPNLG	1139
human_XOR	KRI EPYKKKNPSSSWEDWVTAAYNDTVSI SATGEYRTPNI G	1140
bovine XOR		
shister VOD	KRLEPFKKKNPDGSWEDWVMAAYQORVSLSTTGFYRTPNLG	1139
chicken_XOR	KRLEPFKKKNPDGSHEDWVMAAYOORVSLSTTGFYRTPNLG KRLEP1KQSNLKGSHEDWIKTAYENCISLSATGFYRTPDVG ORLAGEVAADEGCAADDV1EDADDV1AGSUBECEFLAANAB21GLGTCFATDRV	1139 1168 607
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF	KRLEPFKKKNP	1139 1168 607
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR	KREEPEKONIP	1139 1168 607 1199
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR	RELEPFIXORP OGSIEDI VAAYOORYS, STTGY'RTPILG KRILEPI KORAL KORADU GSIEDI VAAYOORYS, STTGY'RTPILG GRLAG'VAAREGCAARDVI FDAQUVAASKSIRFAE I VAAYNARISL SATGY'ATPILS YSFETINGGNPHYTSY'AVASEVE LOL CLOHANLRTD I VMOVSSLIVA ID LOYGEAF YSFETINGGNPHYTSY'AVASEVE LOL CLOHANLRTD I VMOVSSLIVA ID LOYGEAF	1139 1168 607 1199 1200
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR	INDE EPROKUM	1139 1168 607 1199 1200 1199
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR	IREEPFIKOUN-OSSIEDN-WAANOORVSLSTTGFYRTPILG RELEPFIKOUN-KONNED-WAANOORVSLSTTGFYRTPILG RELEPFIKOUN-SEAN-SEAN-SEAN-SEAN-SEAN-SEAN-SEAN-SEA	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOF	IND. EPROXID— OBSEDUE — MUANYOPPUS, STG 778 FPUS, D MELEP FROM IS EP FROM IS EP FROM IS EP FROM IS EN FOR THE AND	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF numan_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR	DELEPHORUM	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR	INTELEPROXIN	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260
chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR	INTE EPROKUIN	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259
chicken_XOR Rcapsulatus_XOR numan_XOR bowine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bowine_XOR chicken_XOR	INTELEPROXIN	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1288
chicken XOR Rcapsulatus_XOR numan_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR numan_XOR bovine_XOR chicken_XOR chicken_XOR chicken_XOR	IND. EPROXID— OBSEDIE — WAANVOORS, STIGT YN TRYNG, G VALEP FROAD I GELAFYLAAREOCAADWI FDAODVOASCKSIFF AE (VAANNAR 13, SATG YR INPON YSEE TINSOPPHYT SYWASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YSEE TINSOPPHYT SYWASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YSEE TINSOPPHYT SYWASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YSEE TINSOPPHYT SYWASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YSEE TINSOPPHYT SYWASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YSEE TINSOPPHYT SYWASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YN TE TINSOPPHYT SYWASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YN TE TINSOPPHYT SYNASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YN TE TINSOPPHYT SYNASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YN TE TINSOPPHYT SYNASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YN TE TINSOPPHYT SYNASSEY IDD. CHOMM, RTI I WAANSEL MAI TO KOMEAF YN TINSOPPHYT SYNASSEY IDD. TO KOM TO KAN TO KAN TO KAN TO YOU GL J.T. LEEL MYSFEGAL HINDYST YK I PHOSO I FEFTING LINSOPHIN YN XWAAN YN TO KANNE YN KONDOL HWAAT SYNAF YN YN KAN TO	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1260 1259 1288 727
chicken_XOR Rcapsulatus_XOR numan_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR numan_XOR human_XOR human_XOR capsulatus_XOF rat_XOR	INDE EPROXIN	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1260 1259 1288 727
chicken_XOR Rcapsulatus_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR	INTELEPROXIN	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1288 727 1318 1320
chicken_XDR Rcapsulatus_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR human_XOR human_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOR rat_XOR human_XOR bovine_XOR	DE EPROXID- DESEEDIE - WAARVOORS STETYSTERE, E DELEPIROXID- DESEEDIE - WAARVOORS STETYSTERE, E DELEPIROXID- STETYSTERE, STATISTICS, STETYSTERE, E VISETINGGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITO I WAORSSLAPA ID GOVEDA- TSTETINGGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITO I WAORSSLAPA ID GOVEDA- WER, RAGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITO I WAORSSLAPA ID GOVEDA- WOR, RAGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITO I WAORSSLAPA ID GOVEDA- WOR, RAGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITO I WAORSSLAPA ID GOVEDA- WOR, RAGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITA WAARVOOR WOR, RAGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITA WAARVOOR WOR, RAGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITA WAARVOOR WOR, RAGOPPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITA WAARVOOR WOR, RAGOPHYTSTWASSEVEIDD, TOOHNA, ITA WAARVOOR WOR R	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1268 727 1318 1320 1319
chicken_XDR Rcapsulatus_XOR human_XDR bovine_XDR chicken_XDR Rcapsulatus_XOF rat_XDR human_XDR bovine_XDR chicken_XDR rat_XDR human_XDR bovine_XDR chicken_XDR human_XDR bovine_XDR chicken_XDR	INTELEPROXIN	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1288 727 1318 1320 1319 1345
chicken_XDR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XDR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XDR Rcapsulatus_XOF rat_XOR human_XOR bovine_XOR chicken_XOR Rcapsulatus_XOF	INDE EPROXIP. — OBSIEDIE — WAANTODRIS, STIGT VIETRIG, G DELEPTIKOMI – OBSIEDIE — IKT ATRIKALS, STIGT VIETRIG, G DELEPTIKOMI – KONSTRUKT, STIGT VIETRIG, VIETRIG, STIGT VIET	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1288 727 1318 1320 1319 1345 777
chicken_XDR Rcapsulatus_XOF rat_XDR human_XDR bovine_XDR chicken_XDR Rcapsulatus_XOF human_XDR bovine_XDR human_XDR bovine_XDR capsulatus_XOF rat_XDR human_XDR bovine_XDR chicken_XDR Rcapsulatus_XOF chicken_XDR rat_XDR	INTELEPROXIN- ODSREDIM - VIAAANDENS STETTSTREE INTELEPROXIN- ODSREDIM - VIAAANDENS STETTSTREE INTELEPROXIN- ODSREDIM - INTANTIME ISL SATETSTREVE ISTELENGREPHITSTWANSEVE ID.C. TORMIN, REV INVOISSELIVEN ID OVERAF VISETINGREPHITSTWANSEVE ID.C. TORMIN, REV INVOISSELIVEN ID OVERAF VISETINGREPHITSTRESSELIVIER STELLIVEN VISETING VIENA VOUL, L.T.LELLINSFEGSLITHRIGSTIK I PAG SIP IFFINISL INCOMMENT I VASION VOUL, L.T.LELLINSFEGSLITHRIGSTIK I PAG SIP IFFINISL INCOMMENT I VASION VOUL, L.T.LELLINSFEGSLITHRIGSTIK I PAG SIP IFFINISL INCOMMENT I VASION VOUL, L.T.LELLINSFEGSLITHRIGSTIK I PAG SIP IFFINISLINGOPHREI I FISSION VOUL, L.T.LELLINSFERSLITHRIGSTIK I PAG SIP IFFINISLINGOPHREI I FISSION VOUL, L.S.LINSFERSLITHRIGTIK I PAG SIP IFFINISLINGOPHREI I FISSION VOUL, L.S.LINSFERSLITHRIGGNANGUE VIENDICHTINGUE I F	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1268 727 1318 1320 1319 1345 777
ch isken, JOR Ricepsel att, JOR rat, JOR human, JOR bovine, JOR hicken, JOR cepsel attus_JOR rat, JOR human, JOR Ricepsel attus_JOR human, JOR Ricepsel attus_JOR rat, JOR human, JOR	INTELEPROXIP	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1260 1259 1288 727 1318 1320 1319 1345 777
ch icken. JOR Receptulatus_IOF rat_XOR human_XOR human_XOR Riceptulatus_IOF Riceptulatus_IOF rat_XOR human_XOR human_XOR human_XOR hicken.JOR rat_XOR rat_XOR rat_XOR rat_XOR human_XOR poins_IOR rat_XOR human_XOR poins_IOR	INTELEPROXIP	1139 1168 607 1199 1200 1199 1228 667 1259 1260 1259 1288 727 1318 1320 1319 1345 777

図1:ラット、ヒト、ウシ、ニワトリ、バクテリア (Rhodobacter capsulatus) XOR のアミノ酸配列。サブユニットのドメインごとに分けて示す。

chicken\_X0R

-ELSGE 453



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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>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-Lvs433)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な要因と考えら 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<sup>+</sup> との反応性を失い、同時に酸素を還元してスーパーオキサイ ドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、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的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連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 globure 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的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 demolvbdo 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 NO<sub>2</sub>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 が低いため(lmg/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) として働くとされ「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 ー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に、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	Rhodobactor capsulatus	2.7 Å	アロキサンチン	28
1JRP	2001/8/14	Rhodobactor capsulatus	3Å	アロキサンチン	28
1N5X	2002/11/7	ウシミルク	2.8 Å	フェブキソスタット(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	オキシダーゼ型への不完全変換	
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	EF	2.3 Å	基質(2-hydroxy-6-methylpurine)	34
3BDJ	2007/11/14	ヒトミルク	2.0 Å	オキシブリノール	35
3ETR	2008/10/8	FF	2.2 Å	キサンチン、ルマジン	36
3EUB	2008/10/9	EF	2.6 Å	基質(2-hydroxy-6-methylpurine), desulfo-form	36
2W3R	2008/11/14	Rhodobactor capsulatus	2.9 Å	ヒポキサンチン(6-hydroxypurine), desulfo-form	37
2W3S	2008/11/14	Rhodobactor capsulatus	2.9 Å	キサンチン、desulfo-form	37
2W54	2008/12/4	Rhodobactor capsulatus	3.3 Å	Pterin-6-aldehyde	37
2W55	2008/12/4	Rhodobactor 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 (熱いは 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
3NS1	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
3ZYV	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 (熱いは 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)が起この 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同的な動き)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。





キサンチン

尿酸

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。

### 

(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も明らかなことであるが、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、 バクテリアの 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 とバクテリアの 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。

### 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のにもかかわらず、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。

(50)

(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うことを防 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のモリブトプテリン・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の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<sub>ij</sub>と呼ばれる次の量を計算した。

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

ここに、Δ**r**<sub>*i*</sub>及びΔ**r**<sub>*j*</sub>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、〈 〉

(52)

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、〈(Δr<sub>i</sub>)<sup>2</sup>〉<sup>1</sup><sup>2</sup>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ることはよく行われる。

### (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) Rhodobctor 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 Rhodobctor 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、*Rhodobactor 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(*Rhodobactor 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。



残基部号:Segment 色 642-654: (S1) red 708-712: (S2) green 766-804: (S3) blue 837-842: (S4) yellow 867-889: (S5) purple 903-916: (S6) orange 1007-1016: (S7) pink 1034-1041: (S8) silver 1065-1082: (S9) cyan 1135-1153: (S10) brown

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。



73-85:	(S1)	red
140-149:	(S2)	green
196-234:	(\$3)	blue
267-272:	(S4)	yellow
297-319:	(\$5)	purple
333-346:	(\$6)	orange
457-466:	(S7)	pink
484-491:	(S8)	silver
515-532:	(\$9)	cyan
604-622:	(S10)	brown

図 11: *Rhodobactor 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、低い方ら4番目の振動モードで、その振動数は2.355cm<sup>-1</sup>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に比例し 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 いるので、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。

このことからは、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くなったときに、ポケッ トに入り易い」ということが挙げられる。 実験事実として、フェブキソスタットは、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、フェブキソ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、フェブキソ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 いう仮説が、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 モリプ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 モリプ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。

(57)



図 15-1:バクテリア (*Rhodobactor cpsulatus*) XOR モリプ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 (*Rhodobactor cpsulatus*) XOR モリプ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 cpsulatus*) 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、バクテリアのモヂブドプテリンドメ 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 8Å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 の部分が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 と酷似しているので、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。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 a 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)に焦点があてられている。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 a 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 15Å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 a 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 a 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、17~18Å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 20Å を越えて、その後は20Åから25Å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20Å付近に達し、80ナノ 秒付近で、25Åと長くなり、以後22Åから26Å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 20Åを越え、以後20Åから25Å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

(63)

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) > or=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: structurebased 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 Xanthi ne 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., Trincao, J., Carvalho, A. T. P., Ramos, M. J., Terao, M., Garattini, E., Leimkühler, S., Romao, 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., Romao, 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

(68)

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)