

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006-2008

課題番号：18590276

研究課題名 (和文) 蛋白質のX線結晶構造に基づく創薬のための分子基盤研究

研究課題名 (英文) Molecular basis of structure-based drug design.

研究代表者 岡本研 (OKAMOTO KEN)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60267143

研究成果の概要：

①XDH 阻害剤複合体のデータ収集、精密化

ウシXDHと国内で開発した数種類の阻害剤との複合体の構造解析を行なった。今年度は天然に存在する不活性型酵素であるデサルフォ型酵素との複合体につきデータ収集、精密化を行い、完了した。生体内ではデサルフォ型酵素はXDHの総量の20～30%を占めており、活性中心モリブデンに配位している硫黄原子のひとつが酸素に置き換わっている。デサルフォ型酵素が活性型にコンバートされることにより活性調節を行う機構も考えられている。デサルフォ型酵素と各種阻害剤の構造を解明することは阻害剤の阻害機構解明、酵素反応機構解明のための重要な知見となる。

②構造ベース創薬の試み

上記研究の知見に基づき、酵素と安定な反応中間体を形成し酵素反応を強力に阻害する化合物を国内製薬会社と共同で設計した。同化合物とXDHとの複合体結晶構造を作成中である。

③ラットXDHおよび変異酵素の結晶化、データ収集、精密化。

哺乳類XDHは構造変化を起こすことで活性酸素生成の制御をおこなっていることをラット酵素蛋白質の変異体についてX線結晶解析により構造解析を行い明らかにした。これらの研究は本酵素蛋白質が乳汁分泌に係わることを意味し、系統発生における蛋白質の使い分けという興味ある課題である。本プロジェクトの推進により得られた知見により、活性変換にかかわる新たなファクターとして酵素タンパクのC末端が関与していることが予想された。今年度はC末端欠失変異酵素を作成、結晶化し、データ収集を行った。現在精密化作業を行っている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：キサンチン酸化還元酵素 (2)構造ベース創薬(3)エックス線結晶構造

1. 研究開始当初の背景

キサンチン脱水素酵素はプリン排泄系の最終段階を触媒する酵素であり、尿酸を産生することから痛風、高尿酸血症のターゲットとなり、阻害剤アロプリノールは40年来臨床で広く用いられている。本酵素はモリブデンを補酵素として持ち、水酸化反応はモリブデン近傍で起こる。申請者は本酵素の阻害剤の阻害機構を酵素学的、分光学的、構造生物学的アプローチから研究してきた。その成果として酵素のX線結晶構造を2.1Å分解能で決定し、基質認識機構、ガイド機構を明らかにした。また、申請者は反応中間体の結晶構造を捕捉することにも成功し(1.9Å)、本酵素の特異な酸化的水酸化反応の概要を解明した。

哺乳類のキサンチン脱水素酵素と細菌(*R. Capusulatus*)由来のキサンチン脱水素酵素はC α 間のRMSDが低く、主鎖のトレースにほとんど差がない。特に活性中心付近の構造は側鎖も含めてほぼ同一である。しかし、ある種の阻害剤に対しては、その阻害の強さが大きく異なることがわかった。阻害剤 febuxostat は哺乳類酵素に対して $K_i = 10^{-10}$ M の阻害を示し、申請者の解析で明らかになった結晶構造によれば複数の相互作用が複合した多重相互作用で結合し、基質結合ポケットの空間を隙間なく埋めている。基質結合ポケット開口部は阻害剤の大きさに比べ狭いので、結合に際しては酵素分子の構造変化が生じていると考えられる。一方、細菌由来のキサンチン脱水素酵素に対しては、基質結合ポケットの形状がほぼ同じであるにもかかわらず阻害はおこらない。この実験事実はX線結晶構造からは解釈不可能であり、タンパク質とリガンド、阻害剤の結合に静的構造以外の要因が存在することを示している。

2. 研究の目的

申請者を含むグループはこの要因がタンパク質分子の微細な差によるものと考え、特に基質が入り出すチャンネル付近の構造の違いが阻害剤に対する結合強さの違いと密接に関係するものだと予想される。

構造生物学の盛隆とともに多くのヒトタンパク質の立体構造が判明しつつある。その中に疾患の薬物治療のターゲットとなるタンパク質含まれている。これら構造情報を元に阻害剤やリガンドを設計し薬物の開発を行う、いわゆる「構造ベース創薬」が行われつつある。しかし上に上げた我々の経験からは計算上は十分に強い結合が得られても、実際

のタンパク質との結合、阻害の強さは予想ほど高くはないことがありうる。

3. 研究の方法

ウシ、ラット、ヒトキサンチン酸化還元酵素と基質、構造ベース阻害剤、反応中間体を形成する阻害剤との複合体結晶構造を高分解能にて決定し、部位特異的変異酵素の解析結果とあわせて、構造の微細な差が反応機構に与える影響を詳細に検討する。

4. 研究成果

①XDH 阻害剤複合体のデータ収集、精密化
ウシXDHと国内で開発した数種類の阻害剤との複合体の構造解析を行なった。今年度は天然に存在する不活性型酵素であるデサルフォ型酵素との複合体につきデータ収集、精密化を行い、完了した。生体内ではデサルフォ型酵素はXDHの総量の20~30%を占めており、活性中心モリブデンに配位している硫黄原子のひとつが酸素に置き換わっている。デサルフォ型酵素が活性型にコンバートされることにより活性調節を行う機構も考えられている。デサルフォ型酵素と各種阻害剤の構造を解明することは阻害剤の阻害機構解明、酵素反応機構解明のための重要な知見となる。

②構造ベース創薬の試み

上記研究の知見に基づき、酵素と安定な反応中間体を形成し酵素反応を強力に阻害する化合物を国内製薬会社と共同で設計した。同化合物とXDHとの複合体結晶構造を作成中である。

③ラット XDH および変異酵素の結晶化、データ収集、精密化。

哺乳類XDHは構造変化を起こすことで活性酸素生成の制御をおこなっていることをラット酵素蛋白質の変異体についてX線結晶解析により構造解析を行い明らかにした。これらの研究は本酵素蛋白質が乳汁分泌に係わることを意味し、系統発生における蛋白質の使い分けという興味ある課題である。本プロジェクトの推進により得られた知見により、活性変換にかかわる新たなファクターとして酵素タンパクのC末端が関与していることが予想された。今年度はC末端欠失変異酵素を作成、結晶化し、データ収集を行った。現在精密化作業を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

(1) Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Pai EF, 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. 6:888-893.

(2) Matsumura T, Okamoto K, Iwahara S, Hori H, Takahashi Y, Nishino T, Abe Y. (2008)

Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxidase: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization.

J Biol Chem. 283:284-293.

(3) 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. 141:513-524.

(4) Asai R, Nishino T, Matsumura T, Okamoto K, Igarashi K, Pai EF, Nishino T. (2007)

Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase.

J Biochem. 141:525-534.

(5) Nishino Tomoko, Okamoto Ken, Eger Bryan T, Pai Emil F, Nishino Takeshi. (2008)

Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase.

FEBS J. 275:3278-3289

(6) Ken Okamoto and Takeshi Nishino (2008)

Crystal structures of mammalian xanthine oxidoreductase bound with various inhibitors: allopurinol, febuxostat, and FYX-051. J Nippon Med Sch. 75:2-3.

(7) 岡本研、西野武士 (2008)

モリブデンによる水酸化反応中間体の構造と反応機構

生化学、80、531-539

(8) 岡本研 (2008)

尿酸生成抑制薬

日本臨床 66、748-753

(9) 岡本研 (2007)

結晶構造からみた尿酸生成抑制剤の阻害機構

日医大医学会誌 3、83-88

(10) 岡本研、西野武士 (2006)

酵素のかたちにあわせた痛風治療薬 (特集 タンパク質のかたちと病気)

バイオニクス 3、36-41

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Ken Okamoto

X-ray structural and molecular biological analyses of various species of xanthine oxidase (dehydrogenase).

Gordon Research Conferences (New London, USA), 2007, July

(2) Okamoto, K.

Potent inhibitors of xanthine oxidoreductase: Mechanisms of inhibition and crystal structures of the enzyme-inhibitor complexes

12th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man. (Chicago USA), 2007 June

(3) 岡本研

結晶構造から見たキサンチン酸化還元酵素阻害剤の阻害機構の解明

第 41 回痛風核酸代謝学会学会賞受賞講演、2008 年 2 月、福井

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本研 (OKAMOTO KEN)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60267143

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者