

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570198

研究課題名(和文)キサンチン酸化還元酵素における阻害剤の作用の研究 「鍵と鍵穴」のドグマを超えて

研究課題名(英文)The study on the structure-based inhibitor mechanism for xanthine oxidoreductase: beyond a lock-key system

研究代表者

菊地 浩人(Kikuchi, Hiroto)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00224907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：XORはキサンチンを尿酸にする酵素であり、過剰な尿酸の蓄積は痛風の原因となる。XORは細菌からヒトまで存在し、3次元構造は全ての生物種で酷似していて同じ反応機構により尿酸生成を行う。しかし、日本で開発された痛風治療薬febuxostatは、哺乳類XORを阻害するが、細菌XORを阻害しないことが酵素学的実験からわかった。このことは、阻害剤と酵素の静的な3次元構造(いわゆる鍵と鍵穴)では簡単に理解できないことを意味しているが、動的な視点に着目し、分子動力学計算を行うことによって説明することに成功した(Sci. Rep. 2, 331; DOI:10.1038/srep00331 (2012))。

研究成果の概要(英文)：Xanthine oxidoreductase (XOR) catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine followed by oxidation of xanthine to uric acid. Because having too much uric acid in the body causes a disease, gout, human XOR is a target of drugs to treat gout. XOR is found in a wide range of organisms from bacteria to man, and the substrate-binding pockets of mammalian and bacterial XOR are well-conserved as regards catalytically important residues and three-dimensional structure. In this research, we found in terms of the enzymatic experiments that febuxostat, a drug recently developed in Japan inhibits mammalian XOR, but not bacterial XOR. This means that a so-called key-lock system breaks and it is difficult to elucidate this functional differences from the view point of static three-dimensional structure of an inhibitor and an enzyme. However, we succeeded in reproducing the experimental results using MD calculations from the view point of dynamics (Sci. Rep. 2, 331; DOI:10.1038/srep00331 (2012)).

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：酸化還元酵素 構造・機能予測 分子動力学 キサンチン 痛風治療薬 阻害剤 フェブキソスタット創薬

1. 研究開始当初の背景

複合金属酵素であるキサンチン酸化還元酵素(XOR)は2量体からなる分子量30万の巨大タンパク質である。この酵素は体内でプリン化合物が分解されたときにできるキサンチンを水酸化して尿酸に変換する機能を持ち、その変換率が大きすぎると痛風を引き起こす。よって、そのキサンチン結合部位に別の低分子をリガンドとして結合させることができれば、それはキサンチンの阻害剤として働き、痛風の薬となる。そのような阻害作用の分子論的な理解のためには、結合部位を含めた、XORの3次元構造のデータが必要となる。2000年に西野らのグループによるX線結晶解析によって、1.6Åの分解能でその立体構造が明らかにされた。

阻害剤の一つであり、日本発の痛風治療薬として認可されたばかりのフェブキソスタットは、XORの基質であるキサンチンのように結合部位と共有結合をするのではなく、結合部位の隙間を埋めるようにしてコンタクトする(structure-basedの阻害剤である)ことが、本研究分担者の岡本らの哺乳類(ウシ)のXORに対するX線結晶解析から分かっていた。また、バクテリア由来のXOR(ロドバクターXOR)の3次元構造もX線結晶解析から分かっており、反応中心付近のアミノ酸残基は全て保存され、3次元構造自体も哺乳類とバクテリアのXORは酷似していることが知られていた。

ところが、本研究が企画される前の段階で、「痛風薬フェブキソスタットの阻害効果は生物の種によって異なる可能性がある」ことが、岡本らの酵素学的な実験によって指摘された。この実験結果により、酵素の3次元構造が酷似しているにもかかわらず、フェブキソスタットに対する阻害効果が異なる科学的理由が要求されることとなった。

本研究の準備段階として、タンパク質とリガンドのドッキングの相性を診断するドッキングソフトウェアを用いた予備的な計算を行ってみたところ、哺乳類とバクテリアのXORに対するフェブキソスタットの阻害作用の違いを示す結果は得られなかった。酵素の静的な3次元構造を反映した従来のドッキングソフトウェアによる計算からは、実験事実を説明することはできなかった。すなわち、それまで教科書などで記述されてきた、単純な「鍵と鍵穴」の考え方(静的な3次元構造の考え方)では、XORとフェブキソスタットとの間の結合機構を、単純には理解することができないことを意味していた。

2. 研究の目的

キサンチン酸化還元酵素(XOR)は、キサンチンを水酸化して尿酸に変換する酵素であり、その過剰な反応は痛風の原因となる。キサンチン結合部位の3次元構造を用いて、「鍵と鍵穴」の考え方から痛風の新薬をデザインすることは従来行われてきているが、阻害剤

フェブキソスタットとXORとの間の関係は、「鍵と鍵穴」の考え方によって理解することが単純にはいかない。本研究では、酵素学的実験と計算機実験によって、フェブキソスタットをはじめ、幾つかのstructure-basedのXOR阻害剤の阻害作用機構を、「鍵と鍵穴」のドグマを越えて、分子レベルにおける動力学的な視点を導入して明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 酵素学的実験

ロドバクターXORを大腸菌にて発現する系を構築し、精製を行う。精製した細菌XORに対するフェブキソスタット阻害効果を解析する。阻害定数の算出と阻害様式の決定を行う。結果について、ウシXORに対するフェブキソスタットの阻害作用の酵素学的解析結果(Okamoto et al. 2001)と比較検討を行う。

ロドバクターXOR、ウシXORとフェブキソスタットのドッキングシミュレーションを行ない、すでに発表した複合体結晶構造(Okamoto et al. 2001)と比較検討を行う。

様々な阻害剤が結合したXORの結晶を作成し、その結晶構造をX線結晶解析から明らかにしていく。

計算機実験の結果に応じて、ウシとロドバクターのXORに関して、ポイントミューテーションを行えるように準備する。

(2) 計算機実験

XORの補酵素であるモリブドプテリンに関して、動力学的計算に必要な力場パラメータを、量子化学計算を行うことによって決定していく。

XORの反応中心を含むチャンネル内における阻害剤の安定構造を求める。安定構造が決定したら、その安定度を既存のドッキングソフトウェアで評価する。

阻害剤フェブキソスタットがXORと結合している状態を初期構造として、分子動力学計算を行う。XORのモデルは、ウシとロドバクターの3次元構造を利用する。

分子動力学計算結果を基にして、結合自由エネルギー計算を行う。また、より精度の高い結合自由エネルギー計算を行うための方法論も模索する。

XORとフェブキソスタットとの反応に関する分子動力学計算の結果、生物種で違いが見出された場合、その違いに関してアミノ酸残基を単位とする議論を行う。場合によっては、特定のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換して、その置換モデルにおいて分子動力学計算を行う等をして、反応の違いの原因をアミノ酸残基の違いに見出す。

フェブキソスタット以外の阻害剤に関しても、上記と同様の計算を行う。

4. 研究成果

(1) フェブキソスタットの阻害作用が、哺

乳類とバクテリアの XOR とでは大きく異なっていた。ウシ XOR に対しては阻害定数が 10^{-10}M と極めて強い阻害を示し、阻害様式は混合型の阻害であるのに対して、ロドバクター XOR に対しては阻害定数 10^{-5}M と弱い阻害作用しかなく、阻害様式も非競合阻害であり、ウシ XOR に対するものとは異なっていた。両 XOR に対する結合様式は大きく異なっていることが予想された。

(2) フェブキソスタットの阻害作用が、哺乳類とバクテリアの XOR とでは大きく異なっていることに関して、静的な 3 次元構造を基に計算する既存のドッキングソフトウェアでは、阻害作用の違いを説明することは出来なかったが、動力学的な視点が考慮される分子動力学計算を行ったところ、実験事実を再現するような結果が得られた。フェブキソスタットの XOR に対する阻害作用に関して、単に静的な 3 次元構造だけで説明するのは難しく、動力学的な視点を持つことが重要であることがわかった。

(3) フェブキソスタットの阻害作用が、哺乳類とバクテリアで違っていたことの原因は、本来の基質と結合する反応中心付近のアミノ酸残基の影響ではないことがわかった。また、その違いの原因が、XOR のチャネル(酵素側の「鍵穴」部分)の入り口付近の疎水性アミノ酸残基によるものであることが予想された。

(4) 分子動力学計算の結果を解析する際に、阻害剤と XOR の結合自由エネルギーの計算を、MM-PBSA 法や GB-SA 法を用いているが、共同研究者の藤崎は、反応の前後の状態だけから自動的に反応経路を計算する手法であるパスサンプリング法を発展させ、簡単なリガンド結合の系を例にして計算することに成功した。今後、XOR とフェブキソスタットの系にも適応させる新たな目標が生まれた。

(5) フェブキソスタット以外に、FYX-051 という XOR の阻害剤がある。XOR の生体中の機構は、補酵素モリブドプテリンが、基質キサンチンと共有結合で結合して電子を奪うが、阻害剤 FYX-051 は、基質キサンチンのようにモリブドプテリンと共有結合をすると同時に、フェブキソスタットのように XOR の鍵穴を埋め尽くすという、XOR への 2 つの結合方法を伴って阻害作用を行っている。この FYX-051 がモリブドプテリンに共有結合をして電子が奪われる際の化学反応の機序に関して、研究分担者の岡本は、X 線結晶構造解析を基にしてモデルを提唱した。

(6) フェブキソスタット以外に、BOF という XOR の阻害剤がある。BOF は薬としてま

だ認可されておらず、哺乳類 XOR に対してはフェブキソスタットより若干阻害作用が弱く、バクテリア XOR に対してはフェブキソスタットよりも若干阻害作用が強い性質をもつ。この BOF が結合したウシ XOR の結晶構造が共同研究者の岡本によって決定された。

(7) 阻害剤 BOF が結合した XOR に関して、その状態を初期構造として分子動力学計算を 100ns 行ったところ、ウシ XOR の場合には 3 次元構造の変化が見出されなかった一方、バクテリア XOR に関しては、BOF が XOR から外れる動きを示し、更にその動きと共役して、XOR の鍵穴入り口付近を形成している一つのペプチドループが、XOR の外側にゲートを開くような動きを示した。XOR を構成している部分の動きとして、これまで知られていないものであり、基質や阻害剤が XOR の鍵穴に出入りする際のキーとなる現象である可能性がある。異なる初期条件で分子動力学計算を更に行い、この動きが再現されるかどうかを確認する必要があるが、次の研究につながる重要な成果の一つとなった。

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 13 件)

H. Ishikawa, B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, E. F. Pai, Protein conformational gating of enzymatic activity in xanthine oxidoreductase, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、Vol. 134, 2012, 999-1009
DOI:10.1021/ja207173p

H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, S. Leimkühler, and T. Nishino, Different inhibitory potency of febuxostat towards mammalian and bacterial xanthine oxidoreductases: insight from molecular dynamics, *Sci. Rep. (Nature.com)*, 査読有、Vol. 2, 2012, 331-1 - 331-8
DOI:10.1038/srep00331

M. Shiga and H. Fujisaki, A quantum generalization of intrinsic reaction coordinate using path integral centroid coordinates, *J. Chem. Phys.* 査読有、Vol. 136, 2012, 184103-1-11
DOI:10.1063/1.4709723

Y. Matsunaga, H. Fujisaki, T. Terada, T. Furuta, K. Moritsugu, and A. Kidera, Minimum Free Energy of Ligand-Induced Transition in Adenylate Kinase, *PLoS Comput. Biol.*, 査読有、Vol. 8, 2012, e1002555-1-12
DOI:10.1371/journal.pcbi.1002555

藤崎弘土、古田忠臣、岡本 研、菊地浩人、理論生物物理と生化学を組み合わせた薬物研究 キサンチン酸化還元酵素と阻害剤フェブキソスタットの結合機序、日本医科大学医学会誌、査読有、Vol. 8、2012、222-227

K. Okamoto, T. Kusano, T. Nishino, Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase, *Curr. Pharm. Des.*、査読有、Vol. 19、2013、2606-2614
DOI:10.2174/1381612811319140010

H. Kikuchi, A Versatile Method for Making Wilson's B-matrix in silico and a Study of Force Constant Transformation between Internal and Cartesian Coordinates, *Bull. Lib. Arts & Sci. Nippon Med. Sch.*、査読有、Vol. 42、2013、37-85

A. Nakamura, T. Tsukada, S. Auer, T. Furuta, M. Wada, A. Koivula, K. Igarashi, M. Samejima, The tryptophan residue at the active site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important for initiation of degradation of crystalline cellulose, *J. Biol. Chem.*、査読有、Vol. 288、2013、13403-13510
DOI:10.1074/jcb.M113.452623

Y. Watanabe, W.-L. Hsu, S. Chiba, T. Furuta, M. Sakurai, Dynamics and structural changes induced by ATP and/or substrate binding in the inward-facing conformation state of P-glycoprotein, *Chem. Phys. Lett.*、査読有、Vol. 557、2013、145-149
DOI:10.1016/j.cplett.2012.12.040

岡本 研、キサンチン酸化還元酵素研究 110 年 酵素蛋白お哺乳類における多面性；デヒドロゲナーゼからオキシダーゼへの変換とキサンチン酸化還元酵素が触媒するさまざまな反応、高尿酸血症と痛風、査読無、21 巻、2013、69-74

T. Furukawa-Hagiya, T. Furuta, S. Chiba, Y. Sohma, M. Sakurai, The power stroke driven by ATP binding in CFTR as studied by molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. B.*、査読有、Vol. 117、2013、83-93
DOI:10.1021/jp308315w

H. Fujisaki, M. Shiga, K. Moritsugu, and A. Kidera, Multiscale enhanced path sampling based on the Onsager-Machlup action: Application to a model polymer, *J. Chem. Phys.*、査読有、Vol. 139、2013、054117-1-9
DOI:10.1063/1.4817209

藤崎弘土、タンパク質へのリガンド結合に関する計算物理・化学的アプローチ、日本医科大学医学会誌、査読有、Vol. 9、2013、135-139

[学会発表](計 18 件)

H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, S. Leimkühler, and T. Nishino, Structure-based inhibitor mechanism of febuxostat for xanthine oxidoreductase: molecular dynamics study, Ninth Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists, July 2011, Santiago de Compostela (Spain)

藤崎弘土、菊地浩人、戸田幹人、高見利也、分子階層モデルを使った生体分子の量子ダイナミクス、日本物理学会 2011 年秋季大会、2011 年 9 月 21 日、富山大学

菊地浩人、藤崎弘土、古田忠臣、岡本 研、西野武士、キサンチン酸化還元酵素に対するファブキソスタットの阻害作用、日本物理学会 2011 年秋季大会、2011 年 9 月 22 日、富山大学

香川 浩、藤崎弘土、菊地浩人、志賀基之、ミオシン ATPase における加水分解の反応経路：QM/MM 法による計算、日本物理学会 2011 年秋季大会、2011 年 9 月 22 日、富山大学

戸田幹人、高見利也、福水健次、菊地浩人、藤崎弘土、生体分子の分子動力学時系列データに対する統計解析、日本物理学会 2011 年秋季大会、2011 年 9 月 23 日、富山大学

戸田幹人、高見利也、福水健次、菊地浩人、藤崎弘土、生体分子の分子動力学時系列データに対する統計解析 2、日本物理学会第 67 回年次大会、2012 年 3 月 24 日、関西学院大学

藤崎弘土、菊地浩人、戸田幹人、高見利也、分子階層モデルを使った生体分子の量子ダイナミクス、日本物理学会第 67 回年次大会、2012 年 3 月 26 日、関西学院大学

H. Fujisaki, Theoretical investigation of vibrational energy transfer using the tier model with ab initio potential energy surfaces, Gordon Research Conference on vibrational spectroscopy, Aug. 2012, Biddeford, Maine (USA)

H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, and T. Nishino, Molecular dynamics and free energy analysis of xanthine oxidoreductase-ligand interactions, TACC 2012 Theory and Applications of Computational Chemistry, Sep. 2012, Pavia (Italy)

藤崎弘土、菊地浩人、戸田幹人、高見利也、分子階層モデルを使った量子ダイナミクス、日本物理学会 2012 年秋季大会、2012 年 9 月、横浜国立大学

H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, and T. Nishino, Molecular dynamics simulations and binding free energy analysis of xanthine oxidoreductase-ligand complexes, The 50st Annual Meeting of the Biophysics society of Japan, Sep. 2012, Nagoya (Japan)

岡本 研、菊地浩人、藤崎弘土、古田忠臣、西野武士、抗痛風薬フェブキソスタットとキサンチン酸化還元酵素との相互作用の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月、福岡国際会議場

藤崎弘土、松永康佑、木寺詔紀、Onsager-Machlup 作用を用いたペプチドのパスサンプリング、日本物理学会第 68 回年次大会、2013 年 3 月、広島大学

K. Okamoto, H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, S. Leimkühler, and T. Nishino, Molecular Dynamics and Free Energy Analysis of Xanthine Oxidoreductase-Ligand Interactions, 2013 Molybdenum & Tungsten Enzymes Conference, July 2013, Sintra (Portugal)

藤崎弘土、富士香奈、戸田幹人、タンパク質シニョリンの構造変化パスサンプリング、日本物理学会 2013 年秋季大会、2013 年 9 月、徳島

H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, and T. Nishino, Mutation studies on the mammalian and the bacterial XORs with inhibitors, The 51st Annual Meeting of the Biophysics society of Japan, Oct. 2013, Kyoto (Jpn)

K. Fuji, M. Sekijima, H. Fujisaki, M. Toda, Time-series analysis of molecular dynamics: Conformational change and dynamics of collective behavior, The 51st Annual Meeting of the Biophysics society of Japan, Oct. 2013, Kyoto (Jpn)

K. Fuji, H. Fujisaki, M. Toda, Time series analysis of molecular dynamics simulation –collective behavior and conformational change-, Biophysical Society 58th Annual Meeting, Feb. 2014, San Francisco (USA)

〔図書〕(計 2 件)

K. Okamoto, S. Kondo, T. Nishino, Wiley-VCH (Germany), A new-generation uric acid production inhibitor: Febuxostat. In: Fischer J, Ganellin CR, Rotella DP editors. Analogue-based Drug Discovery III, 2012, pp. 365-376

T. Nishino, K. Okamoto, B. T. Eger, E. F. Pai, de Gruyter (Germany), The xanthine oxidoreductase enzyme family: xanthine dehydrogenase, xanthine oxidase, and aldehyde oxidase. Hand book of flavoproteins Volume 2 (Hille R, Miller S M, Palfey B editors), 2013, pp. 103-124

〔産業財産権〕 出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 浩人 (KIKUCHI, Hiroto)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00224907

(2) 研究分担者

岡本 研 (OKAMOTO, Ken)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60267143

藤崎 弘土 (FUJISAKI, Hiroshi)
日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 6 0 5 7 3 2 4 3

古田 忠臣 (FURUTA, Tadaomi)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号： 1 0 4 3 1 8 3 4

(3)連携研究者

()

研究者番号：