

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440081

研究課題名(和文) ヒトには効くがバクテリアには効かない痛風薬 酵素薬剤相互作用のダイナミクス

研究課題名(英文) The gout medicine which has strong effects on mammalian XOR but not on bacterial XOR: dynamics of the interaction between enzyme XOR and its inhibitor BOF

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：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える。過剰な尿酸の産生は痛風を導くので、ヒトXORは痛風薬のターゲットである。XORは細菌からヒトまで存在し、その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、阻害剤BOF-4272(BOF)は、哺乳類XORを阻害する一方、細菌XORを阻害しない。このことは、XORの静的な3次元構造からBOFの阻害機構を単純には理解できないことを意味している。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BOFによる阻害作用の違いを説明することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Xanthine oxidoreductase (XOR) physiologically catalyzes the hydroxylation of hypoxanthine to xanthine, followed by the catalysis of the hydroxylation of xanthine to uric acid. As excess production of uric acid leads to gout, human XOR has been a target of anti-gout drugs. XOR is found in a wide range of organisms from bacteria to human, 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 enzymatic experiments that inhibitor BOF-4272 (BOF) inhibits mammalian XOR but not bacterial XOR. This means that it is difficult to understand the inhibitory mechanism of BOF from the view point of only the static three-dimensional structure of XOR. However, we succeeded in reproducing the experiment results using MD calculations from the view point of dynamics.

研究分野：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
BOF

1. 研究開始当初の背景

キサンチン酸化還元酵素 (XOR) は分子量 30 万の巨大タンパク質であり、活性中心にモリブデンを有する数少ない酵素である。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ヒポキサンチンを水酸化してキサンチンに変換し、更にキサンチンを水酸化して尿酸に変換する。過剰な尿酸の産生は痛風を導くので、ヒト XOR は痛風薬のターゲットタンパク質である。

また、補酵素として、モリブドプテリン、鉄イオウ複合体、フラビン複合体を持ち、ヒポキサンチンやキサンチンを水酸化する際に、これらの複合体間で電子移動が生じる。この電子移動の機構は、生体分子の電子移動やエネルギー移動の機構解明としても興味深い酵素である。

タンパク質の 3 次元構造が 1980 年代頃から、指数関数的に明らかにされるようになり、XOR も例外ではなく、2000 年に西野らのグループによる X 線結晶解析によって、ウシの XOR が 1.6 Å の分解能で明らかにされた。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。

反応中心付近は、キサンチン分子が回転運動をすることができる程の空間がある (この空間をここでは「結合ポケット」と言う)。反応中心のキサンチン結合部位において、キサンチンを結合させることなく、別の低分子を結合させれば、それはキサンチンの阻害剤として働き、痛風の薬となる。1988 年にノーベル医学生理学賞をとった G. Elion が開発したアロプリノールは、キサンチンに似た分子で、反応中心と結合し (しかし尿酸にはならない)、キサンチンの反応を邪魔するので、40 年以上も痛風薬として使用されている。

XOR の阻害剤には阻害作用の仕方として 3 タイプある: i) 基質タイプ: 基質と同様に反応中心と結合し、キサンチンとの反応を阻害するタイプ。アロプリノールは正にこのタイプ。ii) XOR とは共有結合することなく、「結合ポケット」の空間を埋め、XOR とは分子間力で結合するタイプ。iii) i) と ii) の両方を併せ持つタイプ。国内製薬会社 (帝人ファーマ) により開発され、2011 年に認可された新規痛風治療薬であるフェブキソスタット (日本での薬の名前はフェブリク) は、ii) のタイプの阻害剤であり、一度 XOR の「結合ポケット」にはまると、XOR が代謝されるまで結合し続けるので、処方される人間は薬を飲む頻度が少なくすむメリットがある。

当該研究の前研究で、フェブキソスタットは哺乳類には効くが、バクテリアには効かないことが発見され、その機構は、静的な 3 次元構造だけで理解することが単純にはいかず、XOR のダイナミクスを考え、動的構造によって理解されることが指摘された

(Kikuchi et al. 2012)。また、当該研究を行うに当たって、フェブキソスタットとは分子構造の全く異なる阻害剤である BOF-4272 (BOF) もフェブキソスタット同様、哺乳類の XOR を阻害するが、バクテリアの XOR には阻害がかからないことがわかった (発表準備中)。そこで、フェブキソスタットと同様の手法 (分子動力学計算 (MD 計算)) で、簡単に予備計算を行ったところ、バクテリアの XOR においてのみ、「結合ポケット」の入り口付近を構成しているペプチドループが、あたかも門が開くように、酵素外側に動く運動が見られた。XOR の「結合ポケット」に出入りする阻害剤との関係において非常に興味深い現象であり、この運動に着目して、XOR の動的構造の特徴の一端を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

キサンチン酸化還元酵素 (XOR) はキサンチンを尿酸にする酵素であり、過剰な反応による尿酸の蓄積は痛風の原因となる。XOR はバクテリアからヒトまで存在し、その 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、痛風治療薬 (強力な XOR 阻害剤) であるフェブキソスタットは、哺乳類の XOR は阻害するが、バクテリアの XOR を阻害しないことが MD 計算と酵素学的実験から申請者らにより実証された (kikuchi et al. 2012)。このことは、従来の「鍵と鍵穴」の考え方 (静的な 3 次元構造) では単純には説明できないことを示唆している。本研究ではこの成果を推し進め、種の異なる XOR に対して、フェブキソスタットとは別の阻害剤 BOF-4272 (BOF) の阻害作用がどのような機構で行われているのか、計算と実験の両面から解析を行い、特に、阻害力の違いを生みだしている XOR と阻害剤との動的構造機構の物理化学的な本質を明らかにする。

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。精製したロドバクター XOR に対する BOF 阻害効果を解析する。また、阻害定数の算出と阻害様式の決定を行う。同様に、ウシ XOR に対する BOF の阻害効果を解析する。解析結果を、フェブキソスタットをはじめ、他の阻害剤の阻害作用と比較検討を行う。

BOF をはじめ、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。また、BOF が結合した XOR の結晶構造が明らかになった際には、ドッキングシミュレーションから計算された 3 次元構造と比較検討を行う。

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

(2) 計算機実験

XORの反応中心を含む「結合ポケット」内における阻害剤BOF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BOF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。様々な初期条件から出発して、計算の信頼度を高める。また、長時間のシミュレーションも行い、同様に計算の信頼度を高める。

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。

ロドバクターXORの「結合ポケット」入り口付近のループだけが、外側に開くという計算結果に対して、その信頼度が高いという結論となった場合には、そのループの動きがどのような機構で起こっているのかまで明らかにする。

XORに関する長期スパンでの研究を意識して、生体中の電子移動やエネルギー移動に関する研究も併せて行う。

4. 研究成果

(1)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。

(2)BOFの阻害作用に関して、ウシ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、ロドバクター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とが岡本らの実験で明らかにされた。

(3)BOF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いことがわかった。BOFの場合もフェブキソスタットと同様、静的な3次元構造の視点からは、阻害作用を説明することが現状では困難である。

(4)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、ロドバクターXORに関しては、BOFがXORから外れる動きを示し(実験事実と整合性のとれる結果)更にその動きと共役して、XORの「結合ポケット」入り口付近を形成している一つのペプチドループが、XORの外側にゲートが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「結合ポケット」に出入りする際のキーとなる現象である可能性があった。この計算の信頼性を得るために、様々な初期条件から計算を試みた結果、ペプチドループの動き始める時間には差があったものの、このループの

動きは信頼性が非常に高いことがわかった。一方で、哺乳類のXORに関しては、初期条件を変えても、このようなペプチドループの動きは見られなかった。

(5)基質がXORの反応中心に結合した際に、引き続き生じるXOR内の電子移動機構解明に向けて、まずは小さい分子を取り上げ、その分子内でのエネルギー移動に着目し、量子ティアモデルを利用して議論をした。

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5件)

H. Fujisaki, K. Yagi, H. Kikuchi, T. Takami, and G. Stock, Vibrational energy transport in acetylbenzonitrile described by an ab initio-based quantum tier model, *Chem. Phys.*, Vol.482, 2017, 86-92, 査読あり、<http://www.sciencedirect.com/science?ob=ArticleListURL&method=list&ArticleListID=-1210927259&sort=r&st=13&view=c&md5=95c5970e428c0b2378f10a955da4f725&searchtype=a>

S. Chiba, T. Furuta, and S. Shimizu, Kirkwood-Buff integrals for aqueous urea solutions based upon the quantum chemical electrostatic potential and interaction energies, *J. Phys. Chem. B*, Vol. 120, 2016, 7714-7723, 査読あり、DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05611

Yamaguchi M, Okamoto K, Kusano T, Matsuda Y, Suzuki G, Fuse A, Yokota H., The Effects of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors on Oxidative Stress Markers following Global Brain Ischemia Reperfusion Injury in C57BL/6 Mice, *PLoS One*, Vol. 10 (7), 2015, e0133980, 査読あり、DOI: 10.1371/journal.pone.0133980

Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T, 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.*, Vol. 282, 2015, 3075-3090, 査読あり、DOI: 10.1111/febs.13277

Nishino T and Okamoto K, Studies of Candidate Drugs to Treat Hyperuricemia and Gout, *J. Biol. Inorg. Chem.*, Vol. 20, 2015, 195-207, 査読あり、DOI: 10.1007/s00775-014-1210-x

〔学会発表〕(計 4 件)

菊地 浩人、藤崎 弘士、古田 忠臣、岡本 研、西野 武士、ヒトには効くがバクテリアには効かない痛風薬 酵素と阻害剤 BOF との相互作用ダイナミクス、日本物理学会 2016 年秋季大会、2016 年 9 月 13 日～16 日、金沢大学角間キャンパス(金沢)

H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, and T. Nishino、On the Motion of a Loop Located in the Entrance to the Ligand-binding Pocket of Bacterial XOR with the Inhibitor BOF、第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年 9 月 13 日～15 日、金沢大学角間キャンパス(金沢)

H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, T. Nishino、The loop opening motion of the bacterial XOR with the inhibitor BOF: molecular dynamics study、10th Congress of the world Association of Theoretical and Computational Chemists、Oct. 5th~10th、2014、Santiago (Chile)

K. Okamoto, H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, S. Leimkühler, T. Nishino、The gate opening motion of xanthine binding pocket of XOR、The 18th international symposium on flavins and flavoproteins、Jul. 27th~Aug. 1st、Cha-AM (Thailand)

〔図書〕(計 1 件)

T. Nishino, K. Okamoto, and S. Leimkühler、Enzymes of the Xanthine Oxidase Family、RSC Metallobiology Series No. 5、Molybdenum and Tungsten Enzymes: Biochemistry Edited by Russ Hille, Carola Schulzke, and Martin L.Kirk、The Royal Society of Chemistry 2017、Published by the Royal Society of Chemistry, pp192-239.

〔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

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：10431834

(3) 連携研究者

藤崎 弘士 (FUJISAKI, Hiroshi)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60573243