

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	In silico 解析によるキノノイドジヒドロプテリジン還元酵素の基質結合様式と反応機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	河野はるか
Author(English)	Haruka Kono
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12615号, 授与年月日:2023年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:一瀬 宏,林 宣宏,北尾 彰朗,清尾 康志,関嶋 政和
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12615号, Conferred date:2023/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命工学 生命工学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（ 理学 ）
学生氏名： Student's Name	河野 はるか		審査員主査： Chief Examiner	一瀬 宏	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

キノノイドジヒドロプテリジン還元酵素 (QDPR、EC 1.5.1.34) は、NADH 要求性の short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) ファミリーに所属する酵素であり、キノノイド型ジヒドロピオプテリン (*q*BH2) を基質とし、テトラヒドロピオプテリン (BH4) へと還元する。BH4 はモノアミン系神経伝達物質や一酸化窒素などの生成に必須の重要な補酵素であり、その欠乏は精神発達遅滞や高フェニルアラニン血症などの症状を引き起こす一方、過剰な BH4 は疼痛を引き起こすといった報告も存在することから、BH4 の細胞内濃度を適切にコントロールすることが重要といえる。QDPR は BH4 濃度維持において重要な役割を有し、その欠損症は BH4 欠乏を招く。更に、QDPR 欠損由来の BH4 欠乏では、てんかんや脳内の葉酸低下など特有の症状を引き起こすことから、QDPR が BH4 代謝以外の生理機能を有している可能性も示唆されている。

この様に QDPR は生理学的に重要な酵素でありながら、基質が不安定なキノノイド型であるため、酵素 - 基質複合体の立体構造が不明であり、基質認識機構や反応機構が明らかになっていない。そこで本研究では、基質の不安定性という解析における難点を克服するうえで有用な分子シミュレーションを軸とし、QDPR-NADH-*q*BH2 の複合体構造及び反応機構の解析を行い、QDPR の生理機能のより詳細な理解や BH4 代謝拮抗薬への応用に繋げることを目指した。

初めに、基質である *q*BH2 の結合様式推定を試みた。レセプターは、ヒト由来 QDPR (hQDPR) - NADH の結晶構造 (PDB ID: 1HDR) をベースとし、結合領域周辺残基をフレキシブル領域と指定した induced-fit docking と 100 ns の分子動力学 (MD) シミュレーションにて基質が結合領域に入り込めるように構造最適化を行ったものを使用した。このレセプターと *q*BH2 を利用し、AutoDock Vina でドッキングシミュレーションを行ったところ、*q*BH2 のカルボニル酸素と側鎖の配向により 4 種類に分類できるドッキングポーズを取得した。これらの中から最も妥当な結合様式を決定するため、Amber20 による MD シミュレーションを行った。100 ns、3 回の MD シミュレーションによる基質のダイナミクス解析と 1 μ s、3 回によるシミュレーションによるレセプター - リガンド間の重原子レベルコンタクト頻度解析を組み合わせたところ、最も妥当な結合様式は基質のカルボニル酸素が hQDPR の Y149 ヒドロキシ基側、側鎖が NADH のニコチンアミド環側を向くものであると結論付けた。また、hQDPR が *q*BH2 よりも更に側鎖がかさ高いキノノイドジヒドロ葉酸 (*q*DHF) に対する還元活性を有していたことから、推定結合様式の優位性を確認した。

続いて、推定した酵素 - 基質複合体を基に hQDPR のユニークな性質や反応機構の解析を行った。まず、重原子レベルのコンタクト頻度解析から、通常の SDR ファミリーでは見られない、活性モチーフの Lys 残基 (K153) 末端窒素原子と基質のヘテロ原子が高頻度で相互作用している事が明らかになった。相互作用ペアおよび K153I 変異体の動力的パラメータから、K153 は基質と静電相互作用をしていることが示唆された。また、基質非結合時 (hQDPR-NADH) 及び酵素 - 基質推定複合体の代表構造との構造アラインメント及び、hQDPR-NADH 複合体の MD シミュレーションによる残基間距離解析から、hQDPR は基質結合に伴い、SDR ファミリー特有のフレキシブル領域である substrate-binding-loop より上流にも非常にフレキシブルな領域が存在し、K153 と基質の相互作用や基質結合に伴う closed コンフォメーション形成に寄与していることを明らかにした。反応機構解析では、分子軌道計算による NADH-*q*BH2 複合体の HOMO/LUMO 解析を初めて行い、これにより先行研究で示唆されていたヒドリド転移過程をより明確に示すことができた。

更に、*q*DHF に対する動力的パラメータから、QDPR が *q*DHF を生理学的基質とすることで葉酸代謝にも関与している可能性を考察した。興味深いことに、同じく BH4/葉酸代謝双方に関与しているジヒドロ葉酸還元酵素と QDPR は、所属ファミリーや一次構造、立体構造や補酵素要求性が全く異なっていることを示した。

本研究では、上記の通り hQDPR-NADH-*q*BH2 複合体の立体構造について詳細な解析を行い、有力な結合様式や SDR ファミリーとしてはユニークな相互作用・ダイナミクスの特性などを明らかにした。これらの知見は、構造生物学的知見からの疾患メカニズム解明や、タンパク質の立体構造に基づく QDPR の阻害剤設計において有力な知見となることが期待される。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	河野 はるか		審査員主査： Chief Examiner	一瀬 宏	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Quinonoid dihydropteridine reductase (QDPR, EC 1.5.1.34) is a NADH-dependent enzyme which belongs to a short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family. It catalyzes the reduction of *quinonoid* dihydrobiopterin (*q*BH2) to tetrahydrobiopterin (BH4) in the BH4-recycling pathway. BH4 is an essential cofactor for biosynthesis of monoamine, nitric oxide and so on. BH4-deficiency causes mental retardation and hyperphenylalaninemia. On the other hand, an excess of BH4 leads to pain, so maintaining appropriate level of BH4 is important. QDPR contributes to maintain BH4 level and is supposed to have other physiological functions due to additional symptoms in BH4-deficiency caused by QDPR.

Although QDPR is an important enzyme, mechanistic and structural insights are poor, especially enzyme-substrate complex structure is unknown due to instability of *quinonoid*-form substrate. So, I analyzed substrate binding mode and reaction mechanism of human QDPR (hQDPR).

First, I performed preliminary structural optimization of hQDPR-NADH complex (PDB ID: 1HDR) to obtain *q*BH2-acceptable receptor. I docked *q*BH2 to optimized hQDPR-NADH using AutoDock Vina and obtained docking poses which can be categorized four binding modes based on orientation of carbonyl oxygen atom and side chain of *q*BH2. Next, I determined the most plausible binding mode by molecular dynamics (MD) simulation using Amber20. I analyzed dynamics of substrate and heavy-atomic level contact between receptor and ligand and determined that carbonyl oxygen and side chain at *q*BH2 which is the most plausible binding mode orient to hydroxy group of Y149 and nicotinamide ring of NADH, respectively.

Using proposed hQDPR-NADH-*q*BH2 complex, I revealed several interesting properties of hQDPR by contact analysis and comparison to hQDPR-NADH binary complex structure. In the case of hQDPR, K153 which is active motif in SDR family can interact with substrate directly. Additionally, substrate-binding triggered drastically conformational change in not only substrate-binding loop but also N-terminal side. This conformational change is important to K153-substrate interaction and forming closed conformation of substrate-binding state.

Finally, I showed that *quinonoid* dihydrofolate can be physiological substrate for QDPR and QDPR contribute to not only BH4 metabolism but also folate metabolism from kinetics analyses, although enzymatic properties of dihydrofolate reductase which also contributes to both BH4/folate metabolism were significantly different from those of QDPR.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).