

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
Type(English)	Doctoral Thesis



東京工業大学  
Tokyo Institute of Technology

2023 年度 博士論文

*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

東京工業大学 生命理工学院  
生命理工学系 生命理工学コース  
一瀬研究室

河野 はるか  
指導教員 一瀬 宏 教授

2023/10/31

# 目次

略語表	v
図一覧	vii
表一覧	ix
第 1 章 序論	1
1.1 テトラヒドロビオプテリン (BH4)	1
1.1.1 BH4 の生理機能・特徴	1
1.1.2 BH4 代謝: 葉酸化合物代謝との繋がり	2
一般的な生物種 (哺乳類等) の場合	3
トリパノソーマ科の原生生物の場合	4
1.2 QDPR	6
1.2.1 生理的役割・機能	6
1.2.2 酵素科学・構造生物学的知見の現状	8
1.2.3 基質結合様式の先行研究	11
1.3 本研究の目的	15
1.3.1 QDPR-NADH- <i>q</i> BH <sub>2</sub> 複合体の結合様式解析 (第 3 章, 5 章)	15
1.3.2 推定結合様式をもとにした酵素-基質相互作用および反応機構解析 (第 4 章)	16
第 2 章 本研究で用いた主な手法	17
本章の概要	17
2.1 本研究における <i>in silico</i> アプローチの流れ	17
2.2 ドッキングシミュレーション	18
2.2.1 概要	18

2.2.2	ドッキングシミュレーションの基盤理論	19
	ドッキングポーズの探索	20
	スコアリング	20
2.2.3	ドッキングシミュレーションの種類	21
	バリエーション 1: receptor-rigid docking	21
	バリエーション 2: induced-fit docking	21
2.2.4	本研究におけるドッキングシミュレーションの流れ	21
	使用したファイル形式	22
	使用ツール	23
2.3	Molecular Dynamics (MD) シミュレーション	25
2.3.1	概要	26
2.3.2	座標ファイルとトポロジーファイル	27
2.3.3	本研究における MD シミュレーションの流れ	27
	インプットファイル作成	27
	構造最適化	29
	平衡化	29
	プロダクションラン	29
2.4	Quantum Mechanics (量子力学, QM) 計算	29
2.4.1	概要	29
2.4.2	半経験的分子軌道計算	30
2.4.3	本研究で行った QM 計算の流れ	31
	ソフトウェア	31
	行った計算の概要・流れ	32
第 3 章	QDPR-NADH-qBH2 複合体の結合様式解析	33
	本章の概要	33
3.1	手法	33
3.1.1	レセプターの構造最適化	34
3.1.2	最適化後の receptor-rigid docking による複合体構造候補取得	35
3.1.3	MD シミュレーションによる結合様式選別	35
	インプットファイル構築	35
	構造最適化からプロダクションランまで	36
3.1.4	qBH2, qDHF を基質とした QDPR 活性測定	36

3.2	結果	37
3.2.1	hQDPR-NADH と <i>q</i> BH2 のドッキングシミュレーション	37
3.2.2	100 ns の MD シミュレーション	41
3.2.3	1 $\mu$ s の MD シミュレーション	43
3.3	考察	46
3.3.1	原子レベルのコンタクト解析に基づいた結合様式推定	46
3.3.2	<i>in vitro</i> での <i>q</i> DHF アッセイによる裏付け	47
3.3.3	推定複合体構造	49
第 4 章 酵素-基質相互作用・反応機構解析		50
本章の概要		50
4.1	手法	50
4.1.1	mode B における重原子レベルでの相互作用解析	50
4.1.2	hQDPR-NADH 複合体の MD シミュレーション	51
4.1.3	<i>q</i> BH2-NADH 複合体の HOMO/LUMO 計算	51
4.2	結果	52
4.2.1	複合体相互作用解析	52
4.2.2	hQDPR-NADH 複合体と mode B の比較	53
	hQDPR-NADH 複合体と mode B 代表構造の静的状態比較	53
	ダイナミクスの比較	56
4.3	考察	57
4.3.1	ユニークな相互作用	57
	K153 と基質の相互作用	57
	A136 の $\beta$ 炭素と基質の相互作用	59
4.3.2	基質結合前後の特徴比較: 「第 2 の substrate-binding-loop」	60
4.3.3	反応機構の検討	62
第 5 章 QDPR と葉酸代謝		66
本章の概要		66
5.1	QDPR と葉酸化合物代謝: 先行研究の整理	66
5.1.1	THF の非酵素的分解と中間体としての <i>q</i> DHF	66
5.1.2	<i>in vivo</i> での解析による報告	67
5.2	基質結合様式解析から見えた QDPR と葉酸代謝の関連	67

第 6 章	結論	70
6.1	QDPR-NADH- <i>q</i> BH <sub>2</sub> の結合様式及び相互作用等の解析	70
6.1.1	成果	70
6.1.2	課題点とその解決案	73
6.2	QDPR と葉酸代謝の関連解析:	75
6.2.1	成果	75
6.2.2	課題・解決案	76
6.3	<i>in silico</i> 解析結果と <i>in vitro</i> データの比較	76
参考文献		78
	公表論文	78
	その他参考文献	78
付録		89
	補足図表	89
謝辞		92

# 略語表

QDPR

キノノイドジヒドロプテリジン還元酵素

qBH2

キノノイド (6*R*)-*L*-erythro-7,8-ジヒドロビオプテリン (キノノイドジヒドロビオプテリン)

BH2

*L*-erythro-7,8-ジヒドロビオプテリン (ジヒドロビオプテリン)

BH4

(6*R*)-*L*-erythro-5,6,7,8-テトラヒドロビオプテリン (テトラヒドロビオプテリン)

BP

*L*-erythro-ビオプテリン (ビオプテリン)

DHFR

ジヒドロ葉酸還元酵素

qDHF

キノノイド (6*S*)-7,8-ジヒドロ葉酸 (キノノイドジヒドロ葉酸)

DHF

7,8-ジヒドロ葉酸 (ジヒドロ葉酸)

THF

(6*S*)-5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸 (テトラヒドロ葉酸)

PTR1

プテリジン還元酵素

PT

プテリン

NAM

ニコチンアミド

SDR ファミリー

short-chain dehydrogenase/reductase ファミリー

PDB

[Protein Data Bank](https://www.rcsb.org/)

MD

molecular dynamics (分子動力学)

HOMO

highest occupied molecular orbital (最高被占軌道)

LUMO

lowest unoccupied molecular orbital (最低空軌道)

# 図一覽

1.1	BH4/葉酸代謝の基本パターン . . . . .	3
1.2	トリパノソーマ科の BH4/葉酸代謝 . . . . .	5
1.3	QDPR の酵素反応式 . . . . .	6
1.4	BH4 再還元段階 . . . . .	7
1.5	QDPR のトポロジーとアミノ酸配列 . . . . .	10
1.6	先行研究で提唱されている QDPR-NADH- <i>q</i> BH2 結合様式 2 種 . . . . .	13
1.7	先行研究から推定した hQDPR の基質結合領域 . . . . .	14
1.8	hQDPR と <i>Leishmania major</i> PTR1 との構造アラインメント . . . . .	15
2.1	シミュレーションの大まかな流れ . . . . .	18
2.2	タンパク質-低分子化合物ドッキングシミュレーションの模式図 . . . . .	19
2.3	ドッキングシミュレーションのフロー . . . . .	22
2.4	MD シミュレーションにおけるインプットファイル構築の流れ . . . . .	28
3.1	DCIP を用いた活性測定メカニズム . . . . .	37
3.2	各結合様式 (mode A-D) の模式図 . . . . .	39
3.3	各結合様式のレセプター-リガンド相互作用図 . . . . .	40
3.4	各結合様式における MD シミュレーション中の <i>q</i> BH2 配向変化 . . . . .	42
3.5	hQDPR-NADH- <i>q</i> BH2 複合体の Protein RMSD . . . . .	43
3.6	800 ns (200 ns 以降) のトラジェクトリ 3 本分の平均コンタクト . . . . .	45
3.7	<i>q</i> DHF に対する還元活性測定 . . . . .	48
3.8	hQDPR-NADH- <i>q</i> BH2 推定複合体 . . . . .	49
4.1	mode B のコンタクトマップフルバージョン . . . . .	52
4.2	基質非結合時/結合時のコノリー表面の比較 . . . . .	54
4.3	mode B 代表構造と 1HDR の構造アラインメント . . . . .	55

4.4	基質結合時 と非結合時の Distance Matrix . . . . .	56
4.5	コンフォメーション変化による K153-基質間相互作用 . . . . .	59
4.6	典型的な SDR ファミリーにおけるコンフォメーション変化の一例 . . . . .	61
4.7	ヒドリドドナーとアクセプター候補間距離の分布 . . . . .	63
4.8	<i>q</i> BH2-NADH 複合体の HOMO/LUMO . . . . .	64
5.1	QDPR をベースに考えた BH4/葉酸代謝の関連 . . . . .	68
6.1	推定反応機構パターン . . . . .	74
S1	mode D の配向変化 . . . . .	89
S2	コンタクトマップのフルバージョン . . . . .	90
S3	1 $\mu$ s、3 回の MD シミュレーションにおける NAM-ring の C4N- <i>q</i> BH2 の N5/C4a 間距離の経時変化 (mode B) . . . . .	91

# 表一覽

1.1	PDB に掲載されている代表的な QDPR 構造 . . . . .	11
3.1	得られたドッキングポーズのリスト . . . . .	38
4.1	hQDPR の変異体活性測定結果 . . . . .	58
5.1	$q$ BH2 と $q$ DHF に対する hQDPR の動力的パラメータ . . . . .	68

# 第 1 章

## 序論

### 1.1 テトラヒドロビオプテリン (BH4)

#### 1.1.1 BH4 の生理機能・特徴

還元型ビオプテリンである BH4 は、様々な生物の細胞内に存在する補酵素であり、以下のような酵素において利用される。

- 芳香族アミノ酸水酸化酵素 (aromatic amino acid hydroxylases, AAH): ドーパミン、セロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質合成の律速段階を担う重要な酵素群である。下記の 3 酵素が存在する。
  1. チロシン水酸化酵素 [1]
  2. フェニルアラニン水酸化酵素 [2]
  3. トリプトファン水酸化酵素 [3]
- 一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS)[4]: 血管拡張 [5] や免疫機構 [6] への関与・神経伝達物質としての機能を持つ一酸化窒素の合成を担う
- アルキルグリセロールモノオキシゲナーゼ [7]: 神経伝達 [8]、神経細胞や精子の発達に寄与する [9] 脂質であるグリセルエーテル類の代謝・濃度調節に関与 [7]

上記酵素群からも分かる通り、BH4 はかなり重要な酵素反応にて利用されている。そのため、生命維持に必須の物質である。従って、何らかの原因で BH4 が不足する\*1と例

---

\*1 これは、「BH4 代謝異常症」呼ばれ、日本国内では小児特定疾患に指定されている。

## 第1章 序論

### 1.1. テトラヒドロビオプテリン (BH4)

例えば高フェニルアラニン血症などの疾患を引き起こす (フェニルアラニン水酸化酵素が機能しなくなるためである)。これは精神遅滞などを伴う [10, 11]。

一方、BH4 が過剰になった場合、炎症や疼痛などとの関連が示唆されている [12]。BH4 代謝が適切に調整されることが生体内では重要となる。

ここからは、BH4 と関連化合物について述べる。BH4 は酸化されやすい性質を持つ。BH4 の 2 電子酸化型がジヒドロビオプテリン (BH2)、BH2 の 2 電子酸化型がビオプテリン (BP) である。また、BH2 の互変異性体として、キノノイド型のジヒドロビオプテリン (*q*BH2) が存在する。*q*BH2 は BH4 酸化過程の中間体として非酵素的に生成される。また、4- $\alpha$  ヒドロキシ BH4 を基質とするプテリン-4 $\alpha$ -カルビノールアミン脱水酵素によって酵素的な生成も起こる。*q*BH2 から BH2 への変換は非酵素的に起こる。また、これら化合物の中で唯一補酵素活性を持つものは最も還元されたテトラヒドロ型のビオプテリン (BH4) である。

また、天然型の上記ビオプテリン化合物の構造はいずれも L- *erythro* 型の側鎖を持つ。このうち、不斉炭素を 6 位に持つ BH4 と *q*BH2 の 6 位は天然型において *R* 体である [13]。一方一部の生物種では D- *threo* 型が生体内に含まれるという報告もある [14]

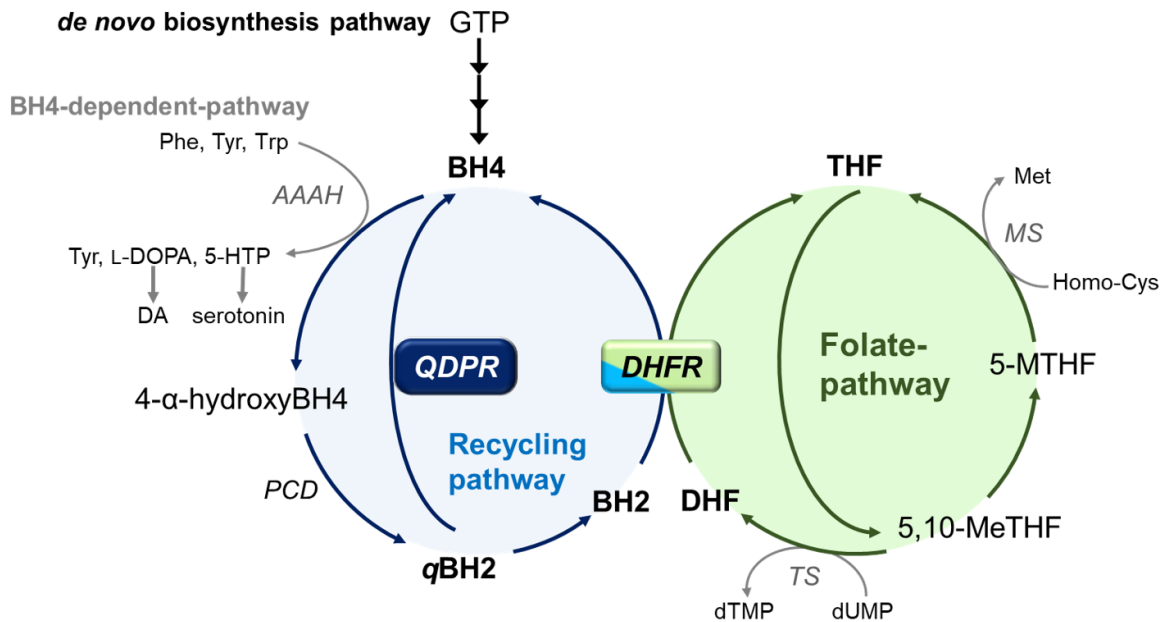
#### 1.1.2 BH4 代謝: 葉酸化合物代謝との繋がり

興味深いことに、BH4 代謝は、同じくプテリジン化合物に分類される生理活性物質である葉酸化合物代謝と関連が深く、一つのスキームとしてまとめて表すことができる。この事は、本論文終盤の Chapter 5 でも再び登場する概念であるが、一旦ここで概要を説明する。細かい経路は生物種により異なるが、大別すると以下の 2 パターンが存在する。

## 第1章 序論

### 1.1. テトラヒドロbioプテリン (BH4)

一般的な生物種 (哺乳類等) の場合



**Figure 1.1.** 一般的な生物における BH4/葉酸代謝 Kennedy (2016)[15] のスキームを参考に作成。5-HTP: 5-ヒドロキシトリプトファン, DA: ドーパミン, PCD: プテリン-4 $\alpha$ -カルビノールアミン脱水酵素, 5,10-MeTHF: 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸, 5-MTHF: 5-メチルテトラヒドロ葉酸, TS: チミジル酸合成酵素, MS: メチオニン合成酵素

Figure 1.1 に BH4/葉酸代謝スキームを示した。まず BH4 から説明する。BH4 代謝に関しては、

1. GTP から 3 段階の酵素反応を経る *de novo* 合成経路
2. AAAH の酵素反応に BH4 が用いられることでスタートするリサイクル経路

の 2 種類に大別することができる。本研究ではリサイクル経路が鍵となるため、スキームはそちらに重点をおいて描画した。リサイクル経路においては、スキームを見ると最終段階 (BH4 再生成段階) が 2 パターン存在する事が分かる。この段階については Section 1.2 でより詳細な説明を行うが、スキームの説明という性質上こちらでも簡単に述べる。

ひとつめのパターンは、本研究のターゲットである QDPR による、qBH2 から BH4 へ

## 第1章 序論

### 1.1. テトラヒドロビオプテリン (BH4)

---

の再還元反応である。

もう1つは、 $q$ BH2の互変異生体であるBH2が葉酸代謝関連酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) によってBH4へ再還元される反応である。この様にビオプテリン代謝に葉酸代謝酵素が登場するのが興味深い特徴となる。

続いて葉酸代謝 (Figure 1.1 右側) について述べる。葉酸化合物もまたPT-ringがテトラヒドロ型 (還元型) であることが重要となる。特にTHFは還元型葉酸化合物のベース構造である。スキーム上からも、「炭素供与体として働くのは5,10-メチレンTHF (5,10-MeTHF) や5-メチルTHF (5-MTHF) であるが、元をたどるとこれらはTHFの誘導体であること」が分かる。つまり、いかにしてTHFを生み出すかがカギとなってくるということだ。ここで重要な役割を果たすのが、BH4リサイクル経路に登場したDHFRである (むしろ名前の通りこちらが本業である)。スキーム上にてDHFRが働く場所は、ジヒドロ葉酸 (DHF) をTHFに還元する過程である (5,10-MeTHFがチミジン合成酵素 (TS) の反応によりDHFへと酸化された後のステップ)。この反応はBH4リサイクルにおけるBH2  $\rightarrow$  BH4に相当する。DHFRがBH4リサイクル経路と葉酸代謝経路にまたがっている。

このように、DHFRを通してBH4/葉酸化合物の代謝は繋がっている。

#### トリパノソーマ科の原生生物の場合

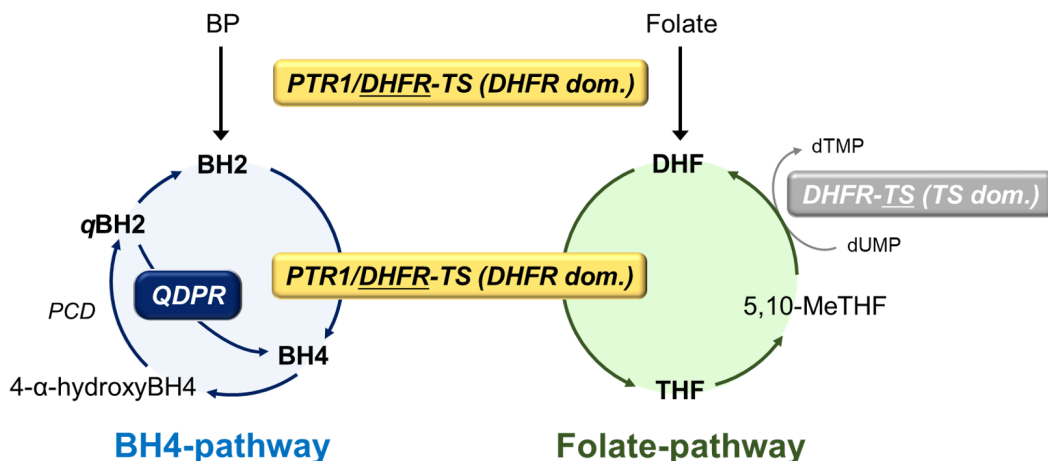
ここからは、トリパノソーマ科の原生生物におけるBH4/葉酸化合物代謝という、イレギュラーケースについて述べる。敢えてこの様なケースに言及するのは、ここで出てくる酵素が研究対象のQDPRと一定の関連性を有し、後の章でも登場するためである。この生物種においては独特なBH4代謝経路を持つ。前述した一般生物のスキームとかなり違うのが見て取れる。

まずBH4生合成についてだが、ここが最も特徴的だろうか。まず出発物質はGTPではない。酸化型のビオプテリン (BP) である。これを、トリパノソーマ科特有の酵素であるプテリジン還元酵素 (pteridine reductase 1, PTR1) によって還元する。このPTR1こそが、QDPRと関連性を持つ酵素である。PTR1は、まずBPをBH2へと還元した後、そのままBH2をBH4へと還元する [16]。この経路はDHFR-TS (Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase) が担うことも出来る (ヒトなどはDHFRとTSは別々の酵素だが一部の生物種はDHFR-TSという両ドメインが一つの酵素になっているものを持つ)。

## 第1章 序論

### 1.1. テトラヒドロビオプテリン (BH4)

葉酸代謝の方はほぼ Figure 1.1 と同じ流れだが、BH4 代謝酵素である PTR1 も DHFR-TS が担う反応については行うことができる [17]。PTR1-葉酸複合体の結晶構造も報告されている [18]



**Figure 1.2.** トリパノソーマ科の BH4/葉酸代謝。Vickers & Beverley (2011)[17], Tassone *et al.* (2021)[19] を参考に作成。

また、これらの代謝経路は *Leishmania* や *Trypanosoma* といったトリパノソーマ科の原生物によってもたらされる熱帯病の治療薬ターゲットにもなっている。現在のところ、ターゲット酵素は PTR1 又は DHFR-TS であり、多数の阻害剤が PDB に登録されている (いくつかの具体例及び PDB 検索結果数など明示)。この背景には、これら酵素の知見が多い点、具体的には、BH4 代謝スキーム上のどこにおいて働くかといった具体的な関与が明らかとなっている上、酵素-基質複合体の立体構造も取得されておりタンパク質の立体構造を基にした阻害剤開発が行いやすいという要素があると思われる。

PTR1 と DHFR-TS (DHFR ドメイン) が、活性の違いは有れど共通の基質を介して互いの代謝に関与できるという事は、類似したリガンド結合部位を有していることを示唆する。実際に、メトトレキサート (MTX) をはじめとした共通の阻害剤が存在する [16, 19] (複合体の pdb もいくつか)。DHFR-TS を薬剤ターゲットとする、あるいは PTR1 をターゲットとした際にも DHFR-TS へ同時作用をするものがあるという点は、薬剤として実用化を考えた際注意しなくてはならない可能性がある。DHFR は生物種によって立体構造の違いが比較的大きいとはいえ、ヒトの DHFR に与える影響を極力減らせば、副作用軽減が期待できる。

代謝スキームに話を戻すと、非トリパノソーマ/トリパノソーマいずれのパターンにも

## 第1章 序論

### 1.2. QDPR

共通するのは、BH<sub>4</sub>、葉酸代謝の双方に DHFR が関与している点である。DHFR は葉酸代謝がメインだが、葉酸系基質と対応する PT-ring を持っていればピオプテリン類の還元も可能である。DHFR 欠損症において脳脊髄液中の BH<sub>4</sub> が減少しているという報告 [20] からも生体内における DHFR と BH<sub>4</sub> 代謝のリンクが示唆される。

## 1.2 QDPR

### 1.2.1 生理的役割・機能

Section 1.1.2 にて述べた通り、QDPR は BH<sub>4</sub> のリサイクル経路で働く酵素である。その酵素反応は NADH 要求性であり、*q*BH<sub>2</sub> を基質として BH<sub>4</sub> の再還元を行う (Figure 1.3 も参照)。

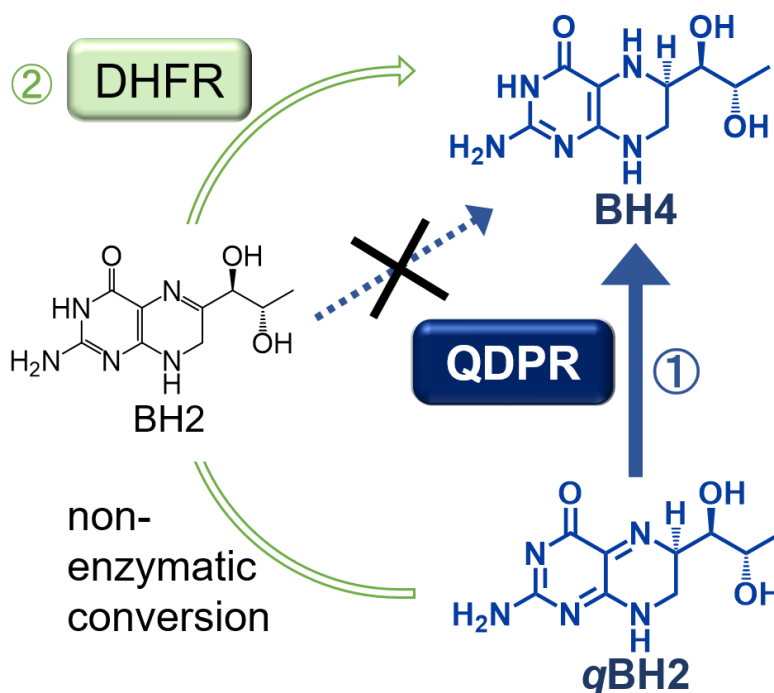


**Figure 1.3.** QDPR による *q*BH<sub>2</sub> から BH<sub>4</sub> への還元反応式。構造式は原子のナンバリングと共に示した。アスタリスクは不斉炭素。この反応では、最終的に 3 位、5 位の窒素原子 (N3, N5) に水素が付加されることが分かる。

QDPR の生理学的重要性と特異な性質を、BH<sub>4</sub> 欠損症という面から見ていく。高フェニルアラニン血症を伴う BH<sub>4</sub> 欠損症において、原因となる酵素としては *de novo* 合成経路の PTPS (3 段階からなる酵素反応の 2 段階目を担う)、リサイクル経路で *q*BH<sub>2</sub> を生成する PCD (プテリン-4 $\alpha$ -カルビノールアミン脱水酵素)、最終的に BH<sub>4</sub> 再生成を行う QDPR などが挙げられる。すなわち、細胞内 BH<sub>4</sub> 濃度を保つには、生合成経路のみならずリサイクル経路も重要ということだ。そして BH<sub>4</sub> 欠損症のうち QDPR 欠損によるものが最も重い症状を示すということが報告されている [11]。このことから、BH<sub>4</sub> の代謝において QDPR がかなり重要な役割を担っていることが分かる。また、QDPR 欠損症では、BH<sub>4</sub> 欠損症の中でも特有の症状として、てんかんや脳内における葉酸の減少が認められる [11]。他酵素由来では起こらないこれらの現象は、QDPR が BH<sub>4</sub> 代謝以外の生理機能を有している可能性を示唆している。QDPR の機能を更に解明することは、疾患メ

カニズムの理解や治療法の改善のためにも重要である。

一方、QDPR が BH4 濃度維持において重要性が高いという点は、リサイクル経路のスキームを見返した時不思議に思うかもしれない。Section 1.1.2 で述べた通り、リサイクル経路の最終段階を担うもう一つのパターンに、*q*BH2 の互変異生体である BH2 を基質とした DHFR による再還元が存在する。Figure 1.4 に、QDPR/DHFR による BH4 リサイクル最終段階のスキームを示した。*q*BH2 から BH2 の互変異性化は、*q*BH2 の不安定性によって非酵素的に起こる (そしてこの BH2 は非キノノイド型であり、QDPR が還元することはできない。Figure 1.4 も参照)。一見すると、DHFR が主体となり BH4 のリサイクルを行うこともできそうに思える。しかしながら、QDPR 欠損症の重症度を考えると、DHFR ではリサイクル経路を補いきれていないことが言える。これは、DHFR の BH2 還元活性が低いことに由来する (特にヒトの DHFR は活性が低い)[21, 22]。すなわち、QDPR による反応は BH4 再還元のメインルートである。これは QDPR が、基質の *q*BH2 を (自らが還元できない非キノノイド型へと互変異性化する前に) 素早く認識し、還元反応を行っていることを意味する。この基質認識と反応のメカニズムがどのようになっているのだろうかという点は、非常に興味深い点である。



**Figure 1.4.** BH4 再還元段階。*q*BH2 は非酵素的に BH2 へと互変異性化するが、QDPR がこれを還元することはできない。QDPR は専らキノノイド型基質の還元を担う。互変異性化が起こった場合、BH2 の還元は DHFR が行う。

### 1.2.2 酵素科学・構造生物学的知見の現状

不安定な基質を如何に認識しているかのメカニズムや BH<sub>4</sub> 代謝以外の機能を持つ可能性などの解明および阻害剤への応用 (BH<sub>4</sub> 過多へのアプローチや熱帯病治療など) にあたり、酵素の諸性質や構造についての知見も重要となる。現時点での知見や仮説を以下にて説明する。

QDPR は、short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) ファミリーに属する [23]。このファミリーには多数の酵素が含まれており、前述の PTR1 も同様である [24]。その特性もアミノ酸配列も様々であるが [25]、ヘリックスとストランドが交互に来るトポロジーや活性部位のモチーフは高度に保存されている。

トポロジーについてももう少し細かく見ていくと、SDR ファミリーは NAD(P)H 要求性酵素ということもあり、Rossmann fold という超二次構造をとる。補酵素結合部位は、6-7 個の平行  $\beta$  シートの上下を 3-4 個の  $\alpha$  ヘリックスでサンドイッチするようなトポロジーであるが、SDR ファミリーの一部ではサンドイッチするヘリックスが 5 つの時などもある [25]。また、SDR ファミリーの特徴として、C 末端側、具体的には  $\beta_F$  から  $\alpha_G$  にかけての間に小さなヘリックスを 1,2 個含む substrate-binding-loop という領域があり、ここは基質特異性に関わっていると考えられているほか、基質結合に伴って構造変化が起きやすい部分である [26]。

QDPR も基本的には SDR ファミリーに準じたトポロジーの特徴を持っている。ただ、珍しいのはストランドが連続する箇所が 2 つ存在する点である。一つは N 末端側の平行ストランドである  $\beta_B \cdot \beta_C$  で、もう一つは C 末端側の逆平行ストランドである。Rossmann fold 領域外とは言え、ストランドの連続は SDR ファミリーのトポロジーとしては独特な要素である。特に逆平行ストランドの存在は珍しいと思われる (Figure 1.5A)。

また、本ファミリーにおいて、活性部位の Tyr-(Xaa)<sub>3</sub>-Lys (YXXXXK) というモチーフは殆どのケースで保存されている [25, 27]。このモチーフの Tyr 残基は、ヒドロキシ基 (またはアニオン) が基質と直接相互作用し、プロトン移動に関与しているとされる。QDPR でも本モチーフは保存されており、hQDPR において当該領域は <sup>149</sup>Tyr-Gly-Met-Ala-<sup>153</sup>Lys となっている [28] (Figure 1.5B, Figure 1.5C)。一方、活性部位の Tyr, Lys 残基より更に上流 (N 末端側) に存在する Asn, Ser 残基も SDR ファミリー間で高度に保存されているが、QDPR ではこの 2 残基は保存されていない (Figure 1.5C)。SDR ファミリーにおい

## 第1章 序論

### 1.2. QDPR

---

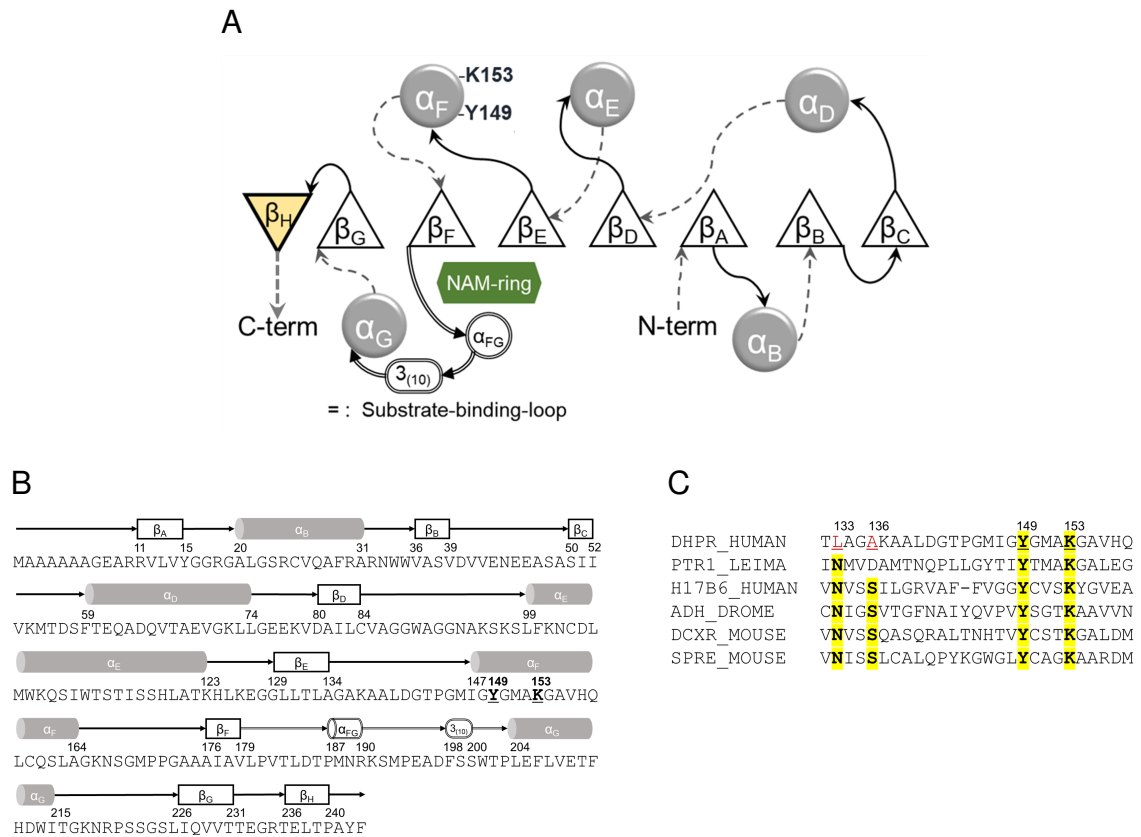
て、Asn, Ser 残基は前述の Tyr-(Xaa)<sub>3</sub>-Lys モチーフの Tyr, Lys 残基と共に触媒四残基を形成することが多いと言われている [27] \*2。これらの残基はプロトンの受け渡し段階を担う部分であり、その中でも Tyr がプロトンソースであるとされる。Lys は Tyr の pK<sub>a</sub> を低下させる「後方支援役」、Ser, Asn は水素結合を介して Tyr-基質間のプロトンリレーに寄与しているとされる。特に Ser 残基のヒドロキシ基は、Tyr 残基のヒドロキシ基同様基質と直接相互作用する [25]。QDPR において、プロトンの受け渡しにおいて中心的とされる Tyr, Lys 残基が保存されているとはいえ、リレー役の残基が保存されておらず非極性残基となっている点は、酵素-基質相互作用や反応機構の理解を難しくする要素だが同時に興味深い性質でもある。触媒四残基のうち半分が保存されていないため、かなり独特な反応機構を持っていると思われるが、それは一体どのような機構なのだろうか。このプロトン移動段階における反応機構については過去にいくつかの議論はあるものの (Chapter 4 参照)、決定打となるスキームはまだ提唱されていない。

---

\*2 従来は Ser, Tyr, Lys の触媒三残基が主流と考えられていたが、現在では Asn の役割も重要であると考えられるようになっている [27]。

第1章序論

1.2. QDPR



**Figure 1.5.** QDPR のトポロジー。(A) QDPR のトポロジーダイアグラム。SDR ファミリー活性部位のモチーフである Tyr, Lys 残基も合わせて示した (残基番号は human QDPR (hQDPR, PDB ID: 1HDR) に対応)。グレー背景の円が  $\alpha$  ヘリックス、黒枠の正三角形が  $\beta$  ストランド (黄色背景のものは逆平行ストランド)、楕円は 3<sub>(10)</sub> ヘリックス、矢印はループ (手前に来るものを実線、奥に位置するものを破線で示している) を表している。NAM-ring (緑背景の六角形) はニコチンアミド環のことである。 $\beta_F$  から  $\alpha_G$  の間にある substrate-binding-loop (二重線表記) は 2 つの短いヘリックス ( $\alpha$  ヘリックスと 3<sub>(10)</sub> ヘリックスが 1 つずつ) を含んでいる。 $\beta_C$  と  $\beta_H$  以外は基本的に SDR ファミリーが有するトポロジーの特徴通りである。(B) hQDPR の二次構造とアミノ酸配列の対応関係。二次構造ごとに開始と終了の残基番号を示している。活性部位モチーフは下線付き太字で示した。黒枠の Box がストランド、グレー背景のシリンダーが  $\alpha$  ヘリックス、楕円が 3<sub>(10)</sub> ヘリックス。(C) SDR ファミリーの活性部位周辺残基のマルチプルアラインメント。上から hQDPR (PDB: 1HDR)、*Leishmania major* PTR1、human 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 6、*Drosophila melanogaster* Alcohol dehydrogenase、mouse L-xylulose reductase、mouse Sepiapterin reductase。触媒四残基に対応するもので保存されているアミノ酸を黄色背景の太字にて示した。hQDPR における非保存配列は下線付きの赤文字で表記。アラインメントは Clustal Omega[29] にて行った。

このようにある一定の知見はあるものの、実のところ「現時点での研究状況を (著者が調べた限り) ほぼ網羅した」のが上記である。「多くの先行研究を体系的に纏めた」訳では

## 第 1 章 序論

### 1.2. QDPR

---

ない。構成の都合上以降のセクションに回している知見もあるとはいえ、QDPR という酵素はその生理学的重要性に対し、酵素機能、構造的側面からの知見（特に構造生物学やメカニズム的側面）が不足している現状は否めない。

しかしこれは、先人達が「酵素の構造」について軽視していたという訳ではない。QDPR について構造面からアプローチするうえで最大の難点は、その基質がキノノイド型という特性である。QDPR の立体構造が初めて報告されたのは 1992 年 [30]、そして本論文執筆時点で最新の立体構造は 2022 年の報告 [31, 32] であるが、この丁度 30 年間において、酵素-基質または基質アナログとの複合体構造についての報告例は未だにない (Table 1.1 も参照)。それほどまでに基質の不安定性という障壁は構造決定においてボトルネックになっている部分なのである。

**Table 1.1.** PDB に掲載されている代表的な QDPR 構造。\*: 金属イオンや塩などは除外

PDB ID	Specie	Ligand*
1HDR	Human	NADH
1DHR	Rat	NADH
3ORF	<i>Dictyostelium discoideum</i>	NADH
8B5T	<i>Leishmania major</i>	-

「酵素-基質複合体の立体構造データがないため、基質結合様式が不明であること」は基質認識メカニズムや反応機構などの解明に大きく影響している課題点である。

#### 1.2.3 基質結合様式の先行研究

少数ではあるが、QDPR の基質結合様式推定を試みた貴重な先行研究が存在する。これらからは本研究の遂行にあたりとりわけ重要な情報を得ることができた。後の考察にも大きく関わってくる部分でもある。ここでは、先行研究で提唱された結合様式についてきちんと説明を行いたい。

いずれもヒトの QDPR ではないが、2つのグループにより異なるモデルがこれまで提唱されている。

ひとつは、1992 年に Varughese らによって報告された。rQDPR-NADH の結晶構造 (PDB: 1DHR) を取得した後、その構造を利用し手動でモデリングを行ったものである

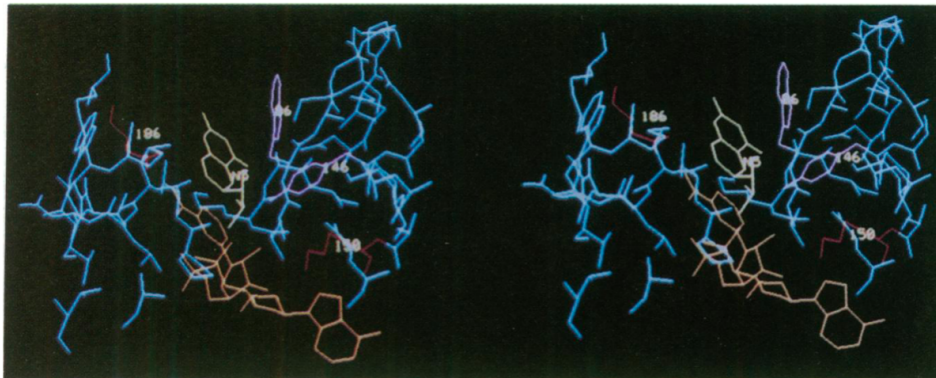
(Figure 1.6A)[30]。

もう一つは、Chen らによって 2011 年に報告された結合様式である。ベースの QDPR 構造は上記と同様の rQDPR と、彼らが構造決定を行った *Dictyostelium discoideum* 由来 QDPR (PDB: 3ORF[14]) の 2 つで、これらをレセプターとして *qBH2* とのドッキングシミュレーションを行い、結合様式のモデリングを行った。いずれの QDPR でもほぼ同様の結合様式を示している (Figure 1.6B)[14]。

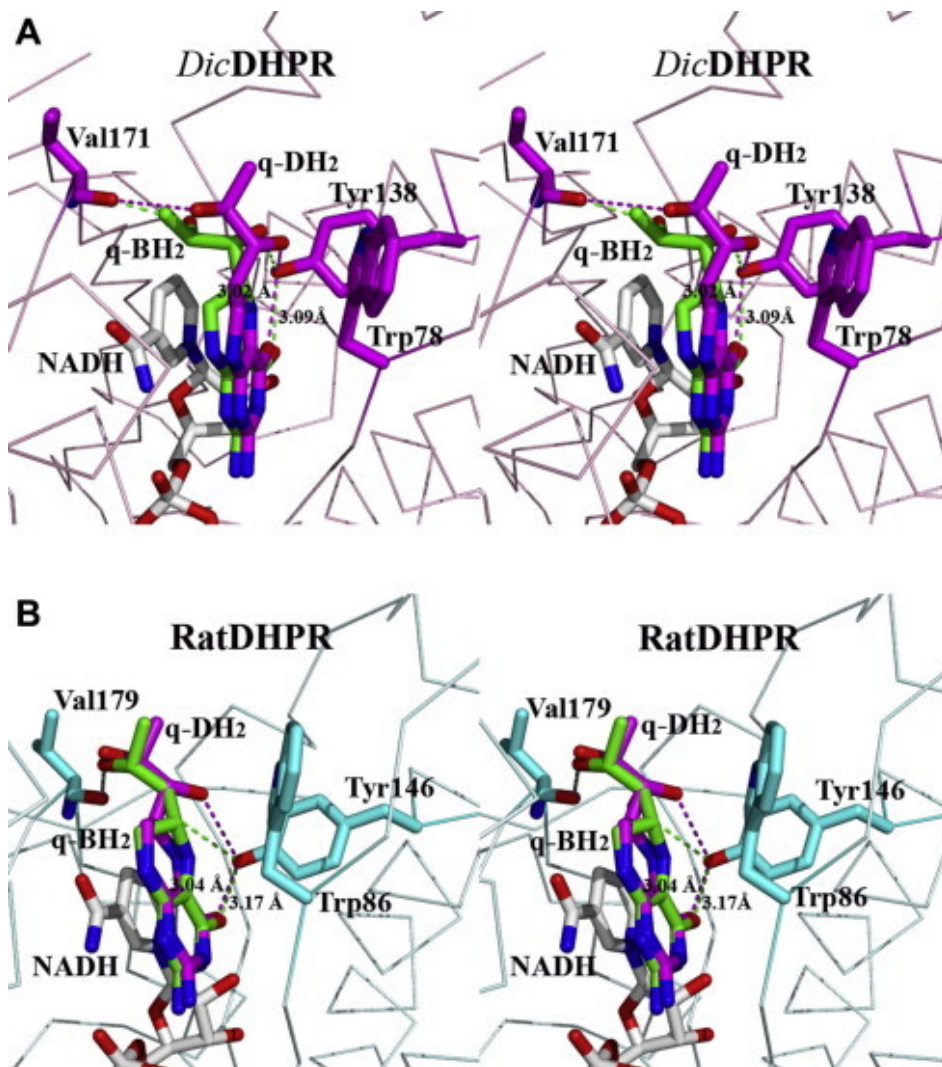
次に、どちらの報告でも用いられている rQDPR での推定結合様式を基に、ふたつの共通点や相違点を見ていく。なお、rQDPR と本研究でベースとして用いた hQDPR の結晶構造 (PDB: 1HDR[28]) は構造アラインメントを行った結果類似しており、rQDPR の情報は hQDPR の結合様式推定に利用できると思った ( $C\alpha$ -RMSD of 1DHR vs 1HDR: 0.251 Å)。

手動モデリングやドッキングポーズの構造データが存在しないため、Figure 1.6 にて引用したステレオ図および文献中に記載されている相互作用情報を基にした判断となるが、これらを見る限り最も顕著な相違点は  $SC_{C6}$  がアデニン方面を向いているか/ニコチンアミド環 (NAM-ring) 側を向いているかくらいではないかと思われる。プテリン環 (PT-ring) の位置などはステレオ図を見る限りほぼ同じと思われる。提唱されているヒドリド転移機構 [33] や SDR ファミリーの一般的なプロトドナーである Tyr 残基との位置関係などを踏まえると、被還元部位を含んでいる PT-ring の位置が大きく変わらないのは妥当と思われる。また、QDPR のリガンド結合領域を構成するクレフト (補酵素である NADH 結合領域も含む全体) がかなり狭いため、結晶構造をそのまま使ったモデリングにおいて NAM-ring と *qBH2* の PT-ring をスタッキングさせるには位置関係の制約が生じることも、両パターンの類似性に影響している可能性がある。

A



B

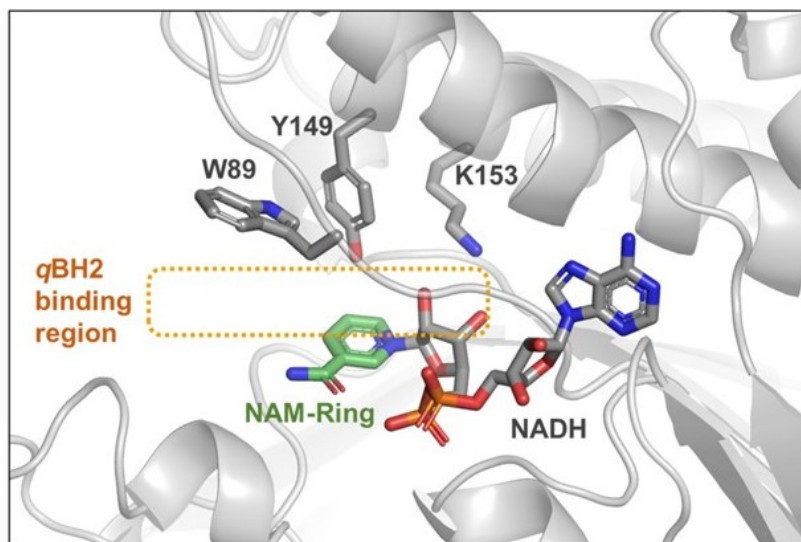


**Figure 1.6.** 先行研究で提唱されている QDPR-NADH-*q*BH<sub>2</sub> 結合様式 2 種。(A) 手動モデリングベースの推定結合様式 (Varughese *et al.* (1992)[30] Fig. 5 より引用)。(B) ドッキングシミュレーションで取得した結合様式 (Chen *et al.* (2011)[14] Fig. 4 より引用)。

## 第 1 章 序論

### 1.2. QDPR

上記の先行研究とその比較によって導き出された共通点から、大まかな binding site の見積もりは可能となった (Figure 1.7 参照)。

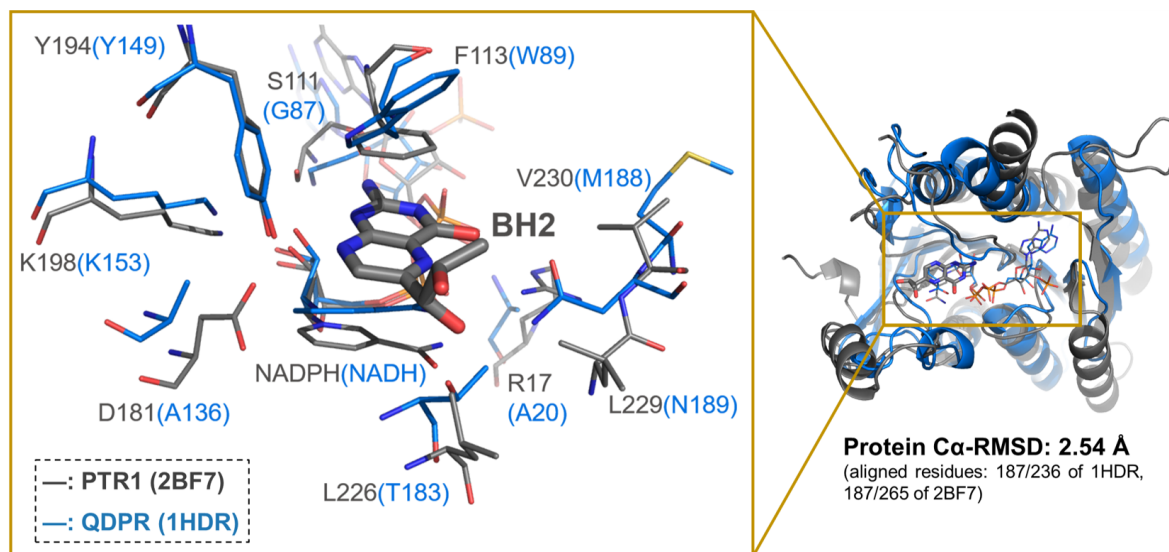


**Figure 1.7.** 先行研究から推定した hQDPR の基質結合領域。Kono *et al.* (In press)[Pub.] Fig. 1A より引用。

とは言え、実際に結合様式が過去に提唱された 2 つのうちどちらかであるかは未だ不明である。また、どちらでもない新しい結合様式の可能性も存在する。例えば PTR1 は hQDPR と構造や基質が比較的近い ( $C\alpha$ -RMSD of 2BF7[16] vs 1HDR: 2.54 Å, 187/236 residues of 1HDR) また、PTR1-NADPH-BH2 複合体においては、芳香族アミノ酸残基、基質の PT-ring、NADPH の NAM-ring という 3 者間で  $\pi$ - $\pi$  スタッキングが形成されているといった特徴は QDPR-NADH-qBH2 複合体の先行研究で提唱されている結合様式と類似している。しかし、PTR1 では基質である BH2 の PT-ring が QDPR における先行研究と比較しちょうど反転している Figure 1.8。このように、ビオプテリン系化合物の基質結合様式には様々な可能性が考えられる (モードの結論が出ていない) ため、従来より詳細なアプローチで結合様式を推定する必要がある。

## 第 1 章 序論

### 1.3. 本研究の目的



**Figure 1.8.** hQDPR と *Leishmania major* PTR1 との構造アラインメント。PTR1 の基質である BH2 の O4 原子は活性部位の Tyr 残基の反対側を向いている。構造アラインメントには、二次構造ベースでの構造アラインメントツールである PDBeFold[34] を使用した。

### 1.3 本研究の目的

これまでに述べた通り、QDPR は BH4 ホメオスタシス維持に不可欠である他、それ以外の生理機能を有する可能性 (特に葉酸代謝との関連) も示唆されている。又、BH4 と葉酸代謝、特に PTR1 や DHFR といった還元酵素に関わる箇所は創薬ターゲットとして研究されており、これら酵素との関連を有する QDPR の知見は創薬的側面からも重要と思われる。一方、QDPR の基質は不安定なキノイド型であるため、構造生物学的知見が不足しており、反応機構など不明な点が多い。そこで本研究では、酵素の機能理解・創薬応用へ向け、不安定な基質に対するアプローチとして分子シミュレーションを用いることにより、酵素-基質複合体の相互作用解析を行った。具体的には下記の 2 項目である。

#### 1.3.1 QDPR-NADH-qBH2 複合体の結合様式解析 (第 3 章, 5 章)

反応機構などの検証に先立ち、まずは基質結合様式について明らかにすべく解析を行った。従来提唱されているパターンのどれなのか、あるいはどちらでもないのかについて、静的状態のシミュレーションのみならず溶液中のダイナミクスも考慮した計算も組み合わせ

## 第 1 章 序論

### 1.3. 本研究の目的

---

せることで、これまで結論が出ていなかった基質結合様式についてある一定の見解を示すことができたので第 3 章で報告する。

さらに、この基質結合様式解析を通して QDPR の生理機能理解、具体的には葉酸代謝への寄与についての考察が可能となった。構成の都合上第 5 章となるが、ここでは「結合様式解析から見えてきた QDPR と葉酸代謝の関連性」について議論する。

#### 1.3.2 推定結合様式をもとにした酵素-基質相互作用および反応機構解析 (第 4 章)

1. BH<sub>4</sub> リサイクル経路において、*q*BH<sub>2</sub> は非酵素的に BH<sub>2</sub> へと互変異性化するため、BH<sub>2</sub> 還元活性のない QDPR は *q*BH<sub>2</sub> を素早く認識し還元する必要がある。基質の認識や触媒反応のメカニズムがどのようなものかという点は非常に興味深い。
2. また、トリパノソーマ科における BH<sub>4</sub> 生合成過程では、PTR1 が BP を出発物質として還元反応を行い、最終的に BH<sub>4</sub> を生成していくが、QDPR はやはり BP に対しても非キノノイド型であるため還元活性を持たない。上記 1. にも関連してくるが、この様にキノノイド型に特化した基質特異性のキーファクターはどこにあるのだろうか？

本研究では、これら 1 および 2 の理解・そのための知見の蓄積を目的とし、酵素-基質相互作用の解析を試みた。解析にあたっては実験的手法にて構造決定された酵素-基質複合体の情報があることが理想だが、QDPR においては前述のとおりその情報が欠けているため、第 3 章で述べる [Section 1.3.1](#) で推定した酵素-基質複合体の立体構造をベースにして相互作用解析・反応機構の考察を行った。

## 第 2 章

# 本研究で用いた主な手法

### 本章の概要

この章は、本研究にて中心的な役割を担った *in silico* アプローチ各種について、

- どのような手法であるか (何を明らかにすることができるか)
- 本研究においてはどのツールを用い、どのようなフローで実行したか

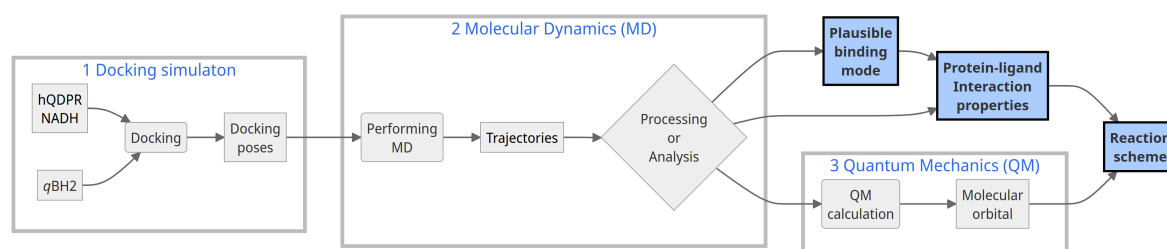
等を中心に述べ、複数のシミュレーションを組み合わせるにあたりそれぞれのどのような意図で採用したのか明確にすることを狙いとしている。以後のチャプターにて共通の手順については本チャプターで説明する方針である。

### 2.1 本研究における *in silico* アプローチの流れ

一旦大まかにどのような流れで行ったかのワークフローを [Figure 2.1](#) に示す。その後各手法に関しての説明を行う。

## 第2章 本研究で用いた主な手法

### 2.2. ドッキングシミュレーション



**Figure 2.1.** シミュレーションの大まかな流れ。大きく分けて3種類のアプローチ (青文字、灰色枠の四角形にて表現) を用いた。角丸四角形が処理 (行ったシミュレーションなど)、通常の四角形がインプット/アウトプットデータ。本研究において重要となるアウトプットデータに関しては太枠四角形、青背景で表した。

## 2.2 ドッキングシミュレーション

### 2.2.1 概要

ドッキングシミュレーションとは、レセプター分子-リガンド分子の複合体コンフォメーションを計算する手法である [35](Figure 2.2)。また、結合親和性の算出も可能である。この手法が用いられるケースとして典型的なもののひとつとして、QDPRのように酵素-基質複合体の構造が未知である場合の複合体構造予測とそれに基づくレセプター-リガンド相互作用解析が挙げられる (2011年にChenらがrQDPRとqBH2のドッキングシミュレーションを行った事例はまさにこのケースである [14])。本研究では、詳細な相互作用解析は以降の分子動力学計算で行ったため、ドッキングシミュレーションの主たる位置づけは「結合様式解析の第一段階としての複合体候補取得」である。また、応用法としては

- 活性測定基質など新規機能性分子の合成において、設計した分子が狙い通りの結合様式を取るか見積もるために用いられる場合 [36]
- *in silico* 創薬\*1において、標的分子と結合親和性の高い阻害剤を大規模な低分子化合物のライブラリを用いたドッキングシミュレーションにてスクリーニングする virtual screening [37]

といったものがあるが、これらは妥当な結合様式の判定基準を事前に得ていないと結果が

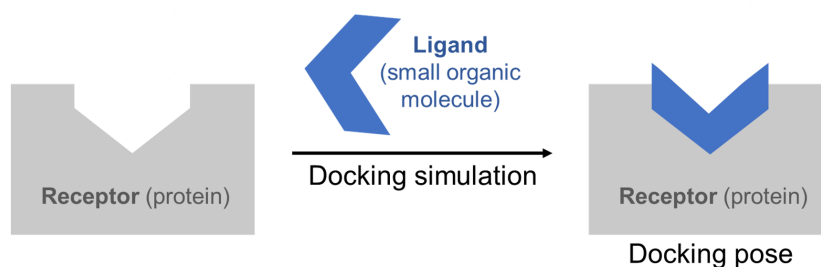
\*1 分子シミュレーションやケモインフォマティクス・バイオインフォマティクスを用いる創薬手法

## 第2章 本研究で用いた主な手法

### 2.2. ドッキングシミュレーション

---

吟味できないので、レセプター-リガンド相互作用の知見が少ない場合難易度が高いものとなる。



**Figure 2.2.** ドッキングシミュレーション (タンパク質 vs. 低分子化合物) のイメージ図

ドッキングシミュレーションにおけるレセプター分子・リガンド分子の組み合わせとしては、

- タンパク質-低分子化合物
- 核酸-低分子
- タンパク質-タンパク質

などのバリエーションが存在する。本研究ではタンパク-低分子間のドッキングシミュレーションのみを行っているため、以降は

- レセプター分子: タンパク質
- リガンド分子: 低分子有機化合物

という前提にて話を進める。

#### 2.2.2 ドッキングシミュレーションの基盤理論

ここでは、ドッキングシミュレーションの理論について簡単にではあるが説明する。ドッキングシミュレーションのソフトウェア内における計算プロセスは大きく分けると

1. ドッキングポーズの探索
2. 探索したポーズのスコアリングと結果の出力

## 第2章 本研究で用いた主な手法

### 2.2. ドッキングシミュレーション

---

の2段階である。シミュレーションを行う際、特にオプションを指定しない限りは2段階全てが実行されるが、オプションの指定によりあるソフトウェアではポーズの探索のみを、別なソフトウェアでスコアリング以降を行うといった事も可能である。具体的な内容は当該箇所にて後述するが、本研究においてもスコアリングのみ行った箇所が存在する。

ここからは、各プロセスについて説明する。

#### ドッキングポーズの探索

- シミュレーション実行時に与えられた条件の範囲内で初期配座はランダムに決定される
- そこから自由回転可能な結合の回転 (基本的にはリガンド分子だが、*induced-fit docking* の場合には指定したタンパク質の残基も含まれる) などを行いながらレセプター分子のどこにどのコンフォメーションで結合するか探索する (この時どの程度探索するかのパラメータなどもある)。
- ドッキングポーズ探索の際、ソフトウェアは水素結合などの分子間力や VDW 半径などを考慮して配座探索を行う。パラメータはソフトによって異なる。配座探索範囲はリガンド結合領域が予め見積もり可能な場合、グリッド形式などで指定することが多い。こうすることで、計算時間を短縮することができる。

#### スコアリング

スコアリング過程では、結合親和性の算出を行い、前述のプロセスで探索した配座をソフトウェア固有のスコアリング関数に基づいてスコアリングする。例えば本研究で用いた AutoDock Vina では、スコアリングに使う要素の一つとして、実験的に得られた結合親和性のデータセットを基にフィッティングを行い算出したパラメータを利用している [38]。結合親和性の算出には、静電相互作用、疎水性相互作用や配座依存性の内部エネルギーなどが考慮される。

こうして行われたスコアリングに基づき、スコアの順位付けをして上位のものから出力していく。

#### 2.2.3 ドッキングシミュレーションの種類

本研究で用いた2種類のドッキングシミュレーションについて述べる。

##### バリエーション 1: receptor-rigid docking

タンパク質-リガンド結合モデルとして基本的かつ単純な「鍵と鍵穴モデル」に基づいた手法。リガンド内で自由回転が可能な部分は回転させながら配座を探索する。一方、レセプター分子は剛体として扱う。

##### バリエーション 2: induced-fit docking

タンパク質にリガンドが結合する際、厳密には上記のような鍵と鍵穴モデルほど単純な理論を適用することは難しい。その理由は、多くのタンパク質において、程度の差はそれぞれであるものの、結合の前後でリガンドの構造によりフィットするよう、リガンド結合領域 (binding site) のコンフォメーションに変化が起こるためである。この様な構造変化を考慮した結合様式モデルを誘導適合モデル (induced-fit model) と呼ぶ。induced-fit docking は、この誘導適合を考慮した手法である。そのため、リガンドのみならずタンパク質の一部残基 (結合領域) について、側鎖を自由回転可能なもの (本研究にて用いたドッキングシミュレーションソフトウェアの AutoDock Vina では "flexible residues" と呼ぶ) として扱い配座探索を行う。配座変化の自由度が receptor-rigid docking よりも多くなるため、計算コストはかかることがデメリットとなる。一方、適切に flexible residues を指定することにより、リガンドによりフィットしたドッキングポーズを得ることや、結合領域がリガンドに対して狭すぎる場合にもドッキングポーズが得られる可能性が高まるのは大きな利点となり得る。

#### 2.2.4 本研究におけるドッキングシミュレーションの流れ

ここでは、詳細な手法ではなく、大まかなステップについて説明し、各工程にて何をしていたか、どのような意図で行ったかをなるべく明確にすることを目標として説明を行う。詳細な手法は後のチャプター内手法欄に譲る。

まずは、ドッキングシミュレーションのワークフローを視覚化したものとして [Figure 2.3](#)

## 第2章 本研究で用いた主な手法

### 2.2. ドッキングシミュレーション

を示す。

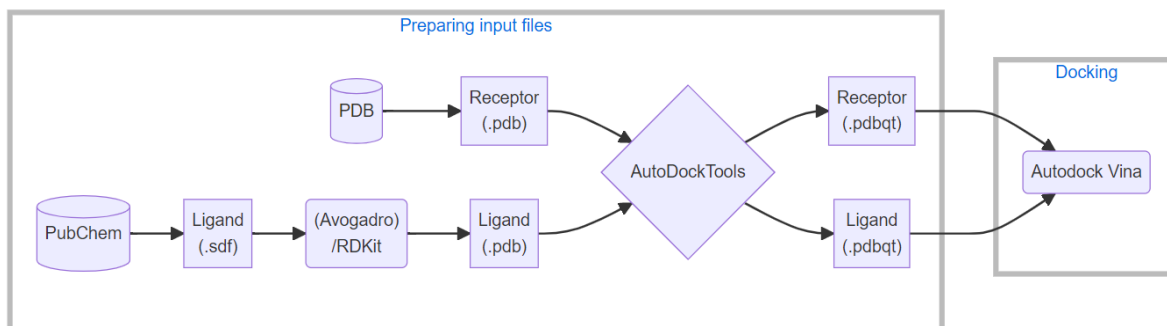


Figure 2.3. ドッキングシミュレーションのフロー。

Figure 2.3 の通り、ドッキングシミュレーションにあたってレセプター分子はタンパク質の立体構造データベースである Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>)\*2から、リガンド分子は低分子化合物のデータベースである PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) からベース構造を取得した。

ワークフローにて登場したファイル形式やソフトウェアについては以下にて順次説明を行う。

#### 使用したファイル形式

##### PDB ファイル (.pdb)

PDB に登録されている構造データベースのフォーマット。原子名、残基番号、xyz 座標などの情報が入っているテキストファイルである。PDB が起源ということもあり高分子によく使われるファイル形式だが、勿論低分子化合物の表記も可能である。専用の分子描画ソフトで読み込むことで、xyz 座標上表などに基づいた立体構造が描画される。現在は新しいファイル形式である PDBx/mmCIF (.cif) フォーマットが標準になっているものの、互換性の上では問題ない事、個人的に使い慣れていることもあり、PDB フォーマットを用いた。本研究のドッキングシミュレーションにおける PDB フォーマットの使い道は、「ドッキングソフトウェア対応のファイル形式 (後述) への変換用ファイル」としてである。特にレセプター分子に関しては、PDB のデータベースから PDB ファイルを直接取得している。

\*2 日本版の PDBj (<https://pdj.org/?lang=ja>)

## 第2章 本研究で用いた主な手法

### 2.2. ドッキングシミュレーション

---

#### MOL ファイル/SD ファイル (.mol/.sdf)

こちらは主に低分子化合物用のファイルフォーマットとして、ケモインフォマティクス (化学情報学) の分野で用いられる。PDB フォーマット同様テキストファイルである。中身は原子数、キラル原子数、座標や結合情報などが含まれている。MOL と SD の違いは、SD ファイルは 1 ファイルに複数化合物を含むことができる点だ (ただし、低分子化合物のデータベースである PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) など、1 化合物でも SD として扱われるケースもある。複数化合物を含む場合は区切り文字の挿入で化合物を区別するだけなので、1 化合物のみのファイルであれば MOL も SD も中身は同じである)。また、2 次元/3 次元構造の 2 種類がある。本研究では、PubChem からリガンド用 SDF を取得し、PDB ファイルに変換するといった用法を取った (その後はレセプター分子同様ドッキングソフトウェア専用ファイル形式へ変換)。

#### PDBQT ファイル (.pdbqt)

こちらに関しては、本研究で用いたドッキングシミュレーションツールである AutoDock Vina (後述) あるいは姉妹ソフトの AutoDock4 専用のインプットファイル形式である。PDB ファイルなどから専用のツール (例: AutoDockTools, 後述) にて変換できる。ファイル形式は PDB と共通する部分もあるが、ドッキングシミュレーション用ということもあり、自由回転可能な結合や電荷、原子タイプに関する情報が含まれている。

#### 使用ツール

ワークフローにおける順番とは異なるが、ステップ上最も重要な「ドッキングシミュレーション本体」を担うソフトウェアの特徴について先に説明する。その後はフローに即した順番でツールを説明していく。

#### ドッキングシミュレーションソフト: AutoDock Vina[38, 39]

Scripps 研究所の Center of Computational Biology (<https://ccsb.scripps.edu/>) にて開発されたフリーのドッキングシミュレーションソフトウェアである。同じ開発元のソフトウェアである AutoDock4 より高精度かつ高速な計算が可能として 2009 年にリリースされたのが最初である [38]。著者としても (実際に他のソフトウェアと比較したわけではないが)、過去に携わったプロジェクトでの経験 [36, 40] に基づき、取得できる複合体構造の精度については信頼を置いている。又、イン

## 第2章 本研究で用いた主な手法

### 2.2. ドッキングシミュレーション

---

プットファイルが非常にシンプルであり使いやすいため、(経験則に基づいた話と  
なってしまうが)他のソフトウェアと比較して習得が容易なのも特長と考えている  
(一方 AutoDock4 と比較した際、出力される情報量が少ないという欠点があり、良  
くも悪くもシンプルなインプット/アウトプットが特徴ともいえる)。本研究では、  
取得構造の精度や使いやすさといった上記理由からこちらを採用した。

AutoDock Vina でのドッキングシミュレーションには、Section 2.2.4 にて述  
べた PDBQT フォーマットの構造ファイルをレセプター・リガンドそれぞれのイン  
プットファイルとして用いる。また、計算時のパラメータもいくつか必要になる。  
これはテキストファイルにまとめて記載するか、計算実行時にコマンドを打ちこむ  
かのどちらかにて可能。以下、特に重要なパラメータを紹介する。後の章の手法欄  
にも登場する用語である。

1 つは"Grid Box"と呼ばれる、リガンドが動く範囲 (レセプター分子中のどこ  
に結合できるか) を定めた箱である。これは、Box 中心の三次元座標及び各辺の  
長さを指定することで定義される。リガンドの結合領域が概ね見積もれるケー  
スでは、その周辺を Grid Box に指定する。この時、Box が小さすぎるとリガンド  
のコンフォメーション次第では Box をはみ出してしまい、適切な結果が得られ  
なくなる可能性がある。本研究では、先行研究 (Section 1.2.3) から大まかな結  
合領域の見立てを行う事は出来たが、リガンドのコンフォメーションや詳細な結  
合位置は不明なため、ボックスはゆとりを持ったサイズに設定してある。もう 1  
つは、"Exhaustiveness" というパラメータとなる。これは「どのくらい徹底的に  
ドッキングポーズの探索を行うか」のパラメータで、数字を大きくするほど探索  
度は高まるが、その分計算時間も当然長くなる。リガンドの自由度が高い場合や  
induced-fit docking でレセプター分子の側鎖も回転可能にする場合は特にここを大  
きくする必要がある。ただし、ここは計算機のスペックとの兼ね合いも出てくる部  
分で、設定値は経験則に基づいて決めている。

#### リガンド分子の構造構築-1: Avogadro[41]

フリーの分子描画/モデリングツール。SD、PDB など各種ファイル形式の読み  
込みが可能。結合次数編集や原子付加、簡易的な構造最適化などが可能な上、分  
子軌道計算ツールなど用のインプットファイル生成も可能となっている。今回は、  
qBH2 のモデリングにおいて第一段階に使用した。PubChem ではキノノイド型の  
BH2 が存在しなかったため、通常の BH2 構造をベースとし、結合次数と水素の結  
合部位をキノノイド型に編集する用途である。その後、下記の第二段階用に SD 形  
式で構造ファイルを保存した。

#### リガンド分子の構造構築-2: RDKit (<https://www.rdkit.org>)

主にケモインフォマティクスで用いられる低分子化合物の描画や編集・解析ツールで、Python 上にて動作するコマンドベースのモジュールである。IPython, Jupyter notebook/Lab と行ったインタラクティブな Python プログラミングツールで使用できるので、インプットファイルの構造描画なども可能。2D 構造から 3D 構造の生成、構造最適化、物性算出など様々な機能がある。今回は、上記で作成 (または PubChem から直接取得) した SD ファイルの構造最適化及び PDB フォーマットへの変換に用いた。実はこの目的であれば Avogadro でも遂行可能であるが、付加した水素原子などの ID が重複してしまい、後の分子動力学計算に向けて重複の修正が必要になったため RDKit で行った。RDKit にて SD ファイルを読み込み、PDB 形式で保存すると、原子 ID が重複しないファイルが生成される。

#### ドッキングシミュレーション用構造ファイル作成: AutoDockTools [42]

AutoDockTools とは、文字通り AutoDock4 や AutoDock Vina でのドッキングシミュレーションを行うための各種ツールが搭載されたソフトウェアである。レセプター分子やリガンド分子の編集、ドッキングシミュレーション用立体構造ファイルである PDBQT フォーマットへの変換、その他シミュレーションに用いるパラメータ設定が可能である。また、生体分子の描画を中心に用いられ、本研究でもドッキングで得られた構造の描画に用いた PyMOL 用のプラグインも用意されている (ref)。

## 2.3 Molecular Dynamics (MD) シミュレーション

※ 本セクションにおける参考文献: [43]

MD シミュレーションは、Molecular Dynamics の和訳である分子動力学を用い、分子動力学シミュレーションや分子動力学計算などとも呼ばれる。本論文では、MD シミュレーションまたは MD という用語を中心に使う。

### 2.3.1 概要

ここでは基本となる概念を簡単にではあるが説明する。古典力学に基づく MD シミュレーションは、原子をある質量を持った粒子 (これを質点と呼ぶ) と見なし、Newton の運動方程式 (Newton の第 2 法則) を解くことで、経時的な分子の運動をシミュレーションする。多原子分子における  $i$  番目の原子 (質点) に関する Newton 方程式は (Equation (2.1)) となる。

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = m_i \mathbf{a}_i \quad (2.1)$$

ここで、 $\mathbf{F}_i$  は  $i$  番目の質点に掛かる力のベクトル、 $m_i$  は質量、 $\mathbf{r}_i(t)$  はある時間  $t$  における質点の位置ベクトル、 $\mathbf{a}_i$  は加速度ベクトルである。

Newton 方程式をどのように解き何を求めるか、説明としては大味ではあるが簡単に述べる。

1. 位置 (座標) の時間微分が速度であり、速度の時間微分が加速度であるという関係性
2. Equation (2.1) で示した Newton 方程式から分かる力と加速度の関係性

を合わせて考えた際、質点に掛かる力のベクトルを時間積分することで速度ベクトルを、速度ベクトルの時間積分で座標のベクトルを得ることができることが言える。尚、力のベクトルを求める際には、力場 (force field) と呼ばれるパラメータをあてがう必要がある。力場には対象分子の種類によって様々なものがあるが、本研究で用いた力場などの説明は後述する。

上記のような考えのもと、実際の MD シミュレーションでは、あるステップ  $t = t_k$  における各原子の速度ベクトルおよび座標ベクトルを数値計算する。各原子の座標を得ることで分子構造を取得できる (ステップごとの分子構造をスナップショットという)。次のステップでは、決められた時間刻み  $\Delta t$  だけ時間を経過させた場合 ( $t = t_{k+1} = t_k + \Delta t$ ) について同様の計算を行う。これを繰り返す事で、スナップショットが蓄積される。そして、取得した一連のスナップショットを順番に繋ぐことで、時間経過に伴う構造変化の情報が得られる。これをトラジェクトリ (trajectory) と呼ぶ。MD シミュレーションの基本はこのトラジェクトリを得ること、得られたトラジェクトリを基に各種解析を行うことである。

#### 2.3.2 座標ファイルとトポロジーファイル

MD シミュレーションに限らず、分子シミュレーションにおいては対象となる分子の情報 (座標や原子名、アミノ酸残基名など) が必ず必要となってくる。例えば、前述した **AutoDock Vina** によるドッキングシミュレーションにおいては、**PDBQT** 形式のファイルにそれらが内包されている ([Section 2.2.4](#) 参照)。一方、MD シミュレーションにおける分子情報の記述はやや独特で、座標ファイルとトポロジーファイルという 2 種類のファイルに分けて記述される。それぞれのファイルについて簡単に説明する。

座標ファイルは、文字通り各原子の座標について記したファイルである (系のセルサイズについての情報なども含まれるが、座標データが根幹である事には変わらない)。時系列毎の座標を格納する事ができるため、MD シミュレーション中に出力される座標ファイルは、時間経過に伴う構造変化のデータ (トラジェクトリ) に相当する。ただし、座標ファイルには原子名、結合情報などは含まれていない。そのため、トラジェクトリの可視化には座標ファイルに対応するトポロジーファイルが必要となる。

トポロジーファイルには、計算対象の分子 (系) を構成する原子の並び順、原子名、残基名および結合情報や電荷など、構造の可視化やシミュレーション時に必要な各種パラメータが含まれている。これらは固定された情報であり時系列に伴う変化が無いため、座標データとは分離したトポロジーファイル内に格納される (つまり、原則として MD シミュレーション中は共有結合の変化 (開裂、生成) が起こらない)。

#### 2.3.3 本研究における MD シミュレーションの流れ

本研究では、MD シミュレーション用ツールとして **Amber** および **AmberTools**[[44](#)] を使用したため、以下はそれらの使用を前提とした説明となる。

##### インプットファイル作成

まずはトポロジーファイルや座標ファイルといったインプットファイルを作成する必要がある。インプットファイル構築の流れは [Figure 2.4](#) となる。

## 第2章 本研究で用いた主な手法

### 2.3. MOLECULAR DYNAMICS (MD) シミュレーション

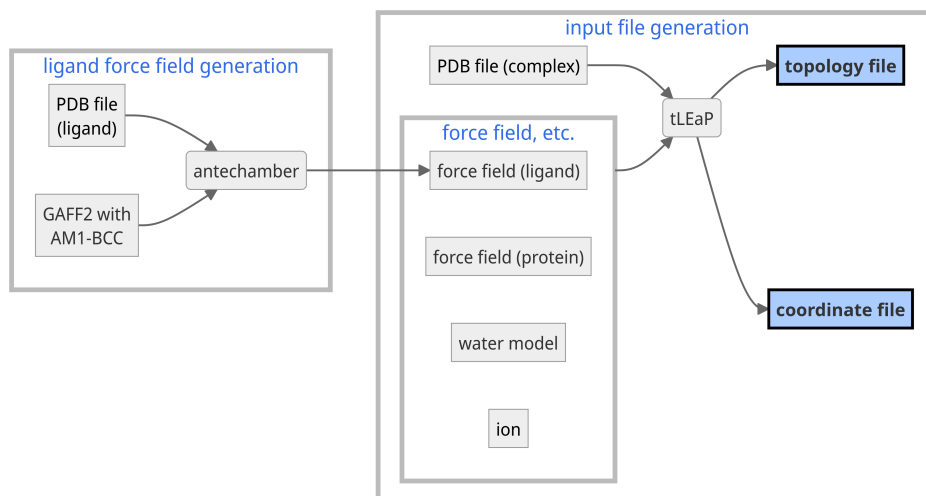


Figure 2.4. MD シミュレーションにおけるインプットファイル構築の流れ

前述した力場 (force field) はトポロジーファイル作成のため必要になる。力場はタンパク質を構成するアミノ酸や核酸などよく用いるものであれば事前に用意されたセットがある。今回はタンパク質用の力場セットとして ff19SB [45] を用いた。この力場は Amber が用意するタンパク質の力場セットの中で最新の物である。

一方、リガンドについてはよほど一般的なものでない限り力場は用意されていない。用意されていないものについては AmberTools に含まれている antechamber モジュールにて力場を生成する事ができる。今回は *q*BH2 と NADH の力場を antechamber にて構築した。この時リガンド用の汎用力場として、GAFF2 (2nd generation general amber force field) を用いた [46]。

また、計算は水溶液中を想定して行った。今回は溶媒を露わに配置する Explicit Solvent Model を利用した。そのため、溶質であるタンパク質-リガンド複合体の周りに水分子を配置する必要がある。この時用いた水分子のモデルは OPC[47] である。これは、ff19SB において併用が推奨されている [45] ため採用した。水分子は溶質の周辺 10.0 Å に、切隅八面体モデルで配置した。MD シミュレーションにおいてよく用いられるのは六面体モデルだが、今回八面体モデルを採用した。これは、OPC モデルが 4 原子系の水分子モデルであることに関係する。八面体モデルを用いることで、配置する水分子数を減らす。これにより 4 原子系の水分子モデルであっても系の原子数増加を最小限に留めることができる。

## 第 2 章 本研究で用いた主な手法

### 2.4. QUANTUM MECHANICS (量子力学, QM) 計算

---

#### 構造最適化

これは初期構造で不自然に近すぎる結合距離などを修正するステップである。構造最適化により、計算が破綻しないようにする。

#### 平衡化

温度や密度を安定化させる、いわば系をなじませる過程である。今回は NVT 平衡化 (粒子数、体積、温度一定条件下の平衡化)、NPT 平衡化 (粒子数、圧力、温度一定) の 2 種類を実施した。NVT 平衡化では、温度を 0 K から 300 K に上昇させた。NPT 条件下の設定圧力は 1 bar である。また、NPT 平衡化段階では、系の重原子を位置拘束しながら平衡化を行った。

#### プロダクションラン

平衡化後の、本番の計算段階である。NPT 条件下で実施した。解析に使うトラジェクトリをサンプリングするのがこのステップとなる。

## 2.4 Quantum Mechanics (量子力学, QM) 計算

MD シミュレーションなどにかけたコストと比べた場合、かなり簡易的なものになるが、本研究では量子力学計算も行っている。本研究で用いた量子力学的計算は、分子軌道法 (Molecular Orbital Method) と呼ばれる手法である。こちらについて簡単に解説を行う。

### 2.4.1 概要

原子やその構成要素である電子といったような非常に小さい粒子の振る舞いを厳密に述べるには、量子力学の理論が必要になる。ここでは、量子力学と古典力学の違いとして重要であり、分子軌道法を述べる上でも欠かせない概念を一つ述べる。それが「粒子は波としての性質も有する」という概念である。古典力学では、粒子と波は独立して扱われるが、量子力学では粒子について波動関数を適用することでその振る舞いを議論する。「ボルの解釈」によると、粒子を見出す確率の確率密度は、その領域における波動関数の絶

対値の2乗となる。

粒子を波として扱うことにより、化学結合の変化という「電子のやり取り」を「波の重ね合わせによる強め合い/弱め合い」で考えることができる。分子軌道法は、ある分子を構成する電子一つ一つがそれぞれ分子全体に広がっていると考え、各電子についての波動関数 (1 電子波動関数、分子軌道) を考える。この波動関数は厳密解を求めることがほぼ不可能に等しいため、近似解を求める事になる。

### 2.4.2 半経験的分子軌道計算

MD シミュレーションでは、粒子に対して Newton 方程式を解くのが根幹であった。それに対し量子力学計算の軸となる演算は、Schrödinger 方程式 (Equation (2.2)) を解くことで粒子の波動関数  $\psi$  の計算を行うプロセスである。

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + V\psi = E\psi \quad (2.2)$$

ここで、 $m$ 、 $V$ 、 $E$  はそれぞれ粒子の質量、ポテンシャルエネルギー、エネルギーを表す。 $\hbar$  はディラック定数とも呼ばれる値で、プランク定数  $h$  を以下のように変形したものである。

$$\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1.054 \times 10^{-34} \text{Js} \quad (2.3)$$

分子軌道計算にて Schrödinger 方程式を解く方法として主たるものは、「半経験的分子軌道法」と「非経験的分子軌道法 (*ab initio* 法)」の2つである。

本研究で用いたのは前者である。この方法は、Schrödinger 方程式中の積分の一部を実験値などから決定したパラメータに置き換える。すなわち、計算ステップを簡略化させることで計算コストを抑える手法である。当然ながら積分過程を飛ばさない非経験的手法より精度は落ちるものの、計算条件の設定が比較的シンプルな上、結果の検証をきちんと行えば定性的な議論は可能と考えたため、本研究では半経験的分子軌道法を用いている。

### 2.4.3 本研究で行った QM 計算の流れ

#### ソフトウェア

Gaussian や GAMESS など、非経験的量子化学計算が可能なソフトウェアは基本的に半経験的分子軌道計算にも対応しており、これらのソフトウェアは本研究において使用した本学保有のスーパーコンピューター TSUBAME3.0 にも導入されている。しかし、前述の通り今回は簡易的な計算を目的に半経験的分子軌道法を用いた。そのうえ、対象分子もタンパク質全体のような原子数の多いものではない。これらのことから、オーバースペックな物ではなく、計算本体には半経験的分子軌道計算のみに対応したソフトウェアを採用した。実行環境もワークステーションなどではないノート PC である (Windows 11)。以下に使用したツールを掲載する。

#### ■計算全般

##### MOPAC2016 version 22.0.6 (<http://openmopac.net/>)[48]

フリーの半経験的分子軌道計算ツールである。上記の公式 HP によると、前版の MOPAC2012 と比較し生体分子のシミュレーションが改善されているとのことだ。利用可能なハミルトニアンなど各種パラメータは MOPAC2012 同様と思われる。現在はオープンソースとなり、LGPL ライセンスで公開されている (<https://github.com/openmopac/mopac>)。対応プラットフォームは Windows, Linux, Mac, Android (つまり、Android スマートフォンでも半経験的な量子化学計算が可能である) と幅広く、インストールも容易なため、今回こちらを採用した。

#### ■計算支援ツール (インプットファイル作成・結果の可視化など)

##### Winmostar v11.3.4 (X-Ability, Tokyo, Japan)

こちらは量子化学計算・分子動力学計算など様々な分子シミュレーションのインプットファイル作成・計算実行・及び結果の確認などが行える統合ソフトウェアである。今回は MOPAC 2016 を利用した計算ジョブ投入及び結果の確認、分子軌道のファイルエクスポートなどに利用した。

#### 行った計算の概要・流れ

今回は最終的に HOMO/LUMO のデータを取得することを目的として計算を行った。それにあたり必要な計算手法について概要を説明する。具体的な手法は該当チャプターの手法欄に譲る。

#### 構造最適化

HOMO/LUMO を確認したい目的分子の構造最適化を行う。最適化手法は Eigen-following routine (EF 法)[49] を用いた。これは最適化アルゴリズムの一つである。与えられた分子の初期構造についてエネルギーのテイラー展開を第二項まで行い二次近似をする。ここから、一次微分にて曲面の勾配を求め、エネルギーの二次微分 (つまり曲面における曲率) であるヘッシアンを推定し、固有ベクトルと固有値算出を行う。これらの指標は、どちらに進めば曲面の谷へと近づくかの判定に用いられ、その判定に基づき構造を変化させる。ポテンシャル曲面上の谷へたどり着くまでこのステップが繰り返される。計算の途中で用いられるパラメータは繰り返し毎に更新され、各サイクルにおける適切な探索方向判定 (構造変化) を可能とする。

#### 振動解析

これは、構造最適化で取得した構造が適切かを確認するために行う。最適化計算後、IR スペクトル計算を行い、虚振動 (振動数が負の値を示すもの) が無いか確認する。ローカル/グローバルミニマムの構造が得られていれば振動数はすべて正の値を示す。もし虚振動が1つだけ見られた場合それは遷移状態の可能性がある。

#### HOMO/LUMO 可視化

振動解析で無事正の振動数のみを得られたら、構造最適化時に得られている分子軌道データの可視化を行う。分子軌道データは、CUBE ファイルという形式で出力し、PyMOL にて描画した。

## 第3章

# QDPR-NADH-*q*BH2 複合体の結合様式解析

### 本章の概要

本チャプターでは、

1. hQDPR-NADH-*q*BH2 複合体の結合様式を、ドッキングシミュレーションや MD シミュレーションを活用して解析した。
2. その結果、1つの結合様式を推定することができ、またこの様式は *in vitro* によるアプローチでも妥当性が確認できた

という点について述べる。

### 3.1 手法

特に断りのない場合、シミュレーション全般は本学保有のスーパーコンピューター、TSUBAME3.0 上で行った。

#### 3.1.1 レセプターの構造最適化

初めに、ドッキングシミュレーション用のレセプターとして、結晶構造由来の human QDPR (hQDPR)-NADH 複合体 (PDB: 1HDR [28]) のモノマー構造を利用し、receptor-rigid 条件にて *q*BH2 のドッキングシミュレーションを行った (詳細な手法は後述)。その結果、結合領域が非常に狭いため *q*BH2 の PT-ring が NAM-ring 上に来てスタッキングを形成することができなかつた上、Y149 との距離も遠くなっていた\*1。そのため、基質が結合できる十分な cavity を確保する事を目的とし、induced-fit docking と MD シミュレーションを組み合わせてレセプターの構造を最適化することにした。

まずは、AutoDockTools-v1.5.6.rc3[42] を用い、レセプターとなる hQDPR-NADH 複合体初期構造 (PDB: 1HDR) の W89, Y149, K153 の側鎖, そして NADH の自由回転可能な部位をすべて "flexible residues" として割り当てた。リガンドとなる *q*BH2 については、PubChem に登録されている BH2 の 3 次元 SD ファイル (BH2 PubChem CID: 135398687) を取得し、これをベースとして Avogadro v1.2.0[41] にて水素や結合次数を編集して生成した。生成後、RDKit 2018\_09\_3 (Q3 2018) Release (<https://www.rdkit.org>) にて MMFF94 力場 [50] を用いて構造最適化を行った。レセプター及びリガンドの電荷割り当ては、AutoDockTools-v1.5.6.rc3 上で Gasteiger partial charge model[51] を用いた。

上記で生成した構造を基に AutoDock Vina v1.1.2[38] にて induced-fit docking を行った。この時の Exhaustiveness は、系の自由度がかなり高いため 500 に設定した (default = 8)。その結果、*q*BH2 の PT-ring と NADH の NAM-ring がスタッキングするようなドッキングポーズ (後の解析にて "mode D" と定義されるポーズ) が得られた。

続いて、induced-fit docking にて構造が変化したレセプターを用い、今度は側鎖を固定した receptor-rigid docking を行った。リガンドは *q*BH2 である。ここでは、induced-fit docking にて示されたドッキングポーズを含む、4 種類の結合様式を取得した (後の mode A-D に相当 このカテゴリーについては後述)。最後に、ここで取得した複合体構造を最適化するため、得られた結合様式の中から mode B に相当するドッキングポーズを選び、100 ns の MD シミュレーションを行った。100 ns のサンプリングにおいて、PT-ring と

---

\*1 この時取得したドッキングポーズのうち、「一番妥当そうな結合様式を示した物」を念のため MD シミュレーションにかけたものの、結合領域が開くことはなく、リガンドの挙動は不安定であった。

## 第3章 QDPR-NADH-*q*BH2 複合体の結合様式解析

### 3.1. 手法

---

NAM-ring のスタッキングの安定性といった面から、82 ns 付近のスナップショットを取得し、この構造を「構造最適化後のレセプター」として定めた。以後のシミュレーションでは、レセプターは原則としてこの最適化後の構造を用いている。

計算をした日時の場合、MD シミュレーションは Amber18[52]、水分子のモデルは TIP3P[53] を用いている。後述する MD シミュレーションでは Amber20 を用いている。MD シミュレーションのその他条件についてはその部分で述べる。

#### 3.1.2 最適化後の receptor-rigid docking による複合体構造候補取得

構造最適化後の hQDPR-NADH 複合体をレセプター、前述のステップにて構造を生成した *q*BH2 をリガンドとして AutoDock Vina v1.1.2 と v1.2.2 [38, 39] を用いて receptor-rigid docking を行った。旧バージョンである AutoDock Vina v1.1.2 はドッキングポーズの取得に、2021 年に公開された v1.2.2 は得られたポーズのリスコアリングに用いた\*2。Grid Box のサイズは x=30, y=40, z=30 (それぞれ Å) に設定し、Exhaustiveness は 50 とした (デフォルトは 8)。ドッキングポーズの描画は PyMOL 2.5.0 (<https://pymol.org/2/>) を用いた。

#### 3.1.3 MD シミュレーションによる結合様式選別

前述のドッキングシミュレーションによって、4 種類の *q*BH2 結合様式をとる hQDPR-NADH-*q*BH2 複合体を取得できたため、それぞれについて 100 ns の MD シミュレーションを 3 回ずつ行った。各複合体の計算系構築条件は以下の通りである。

##### インプットファイル構築

溶媒は水分子とし、各複合体の周囲 10.0 Å に切隅八面体で配置した。水分子のモデルは OPC[47] を採用した。また、電荷の中和用にカウンターイオンとしてナトリウムイオンを 2 つ配置した。力場に関してはタンパク質用に AMBER ff19SB 力場を用いた。また、リガンドである *q*BH2 と NADH の力場を生成するために、AmberTools20[54] 内の力場生成ツールである antechamber モジュールを用いた。この時、リガンド用の汎

---

\*2 旧バージョンではドッキングスコアのデフォルト表示が小数点以下第一位までであり、ランク付けが難しかったので新バージョンにてリスコアリングを行った。第二章で説明した、スコアリングのみを行う使い方がこれである。

## 第3章 QDPR-NADH-*q*BH2 複合体の結合様式解析

### 3.1. 手法

---

用力場として 2nd generation general amber force field (GAFF2[46]) を用い、電荷の割り当てには AM1-BCC[55] を用いた。トポロジーファイル、座標ファイルの作成には、AmberTools20 の tLEaP モジュールを用いた。

#### 構造最適化からプロダクションランまで

上記で作成したトポロジーファイル、座標ファイルを用い、エネルギー最小化計算(構造最適化)を 7000 ステップ行った。その後、NVT 条件下での平衡化計算を 500 ps、NPT 条件下での平衡化を位置拘束付きで 1000 ps 行った。この時の温度制御は Langevin dynamics を用い、設定温度は 300 K とした。圧力制御は Berendsen barostat を用い、1 bar を設定圧力とした。

平衡化後、位置拘束なしの NPT アンサンブルにて 100 ns のプロダクションランを 3 回ずつ行った。時間刻みは SHAKE 法を用いることで 2 fs とした。計算はすべて周期境界条件下で行い、相互作用を考慮する距離のカットオフは 10 Å に設定した。

また、100 ns の MD シミュレーション結果の解析により、妥当な結合様式候補を 2 種類に絞ることができたため、ここから 1 種類に絞り込むためにプロダクションランを 1  $\mu$ s に延長した。プロダクションランは 3 回ずつ行っている。その後、各プロダクションランについて 200 ns 以降のトラジェクトリを用い、重原子間レベルの相互作用解析を行うことで結合様式の優位性を検証した。

上記 MD シミュレーションはすべて Amber20[44, 54] を用いた。トラジェクトリの解析には、AmberTools21[56] 内の ccpptraj v5.1.0 及び pytraj v2.5.0[57, 58] を用いた。トラジェクトリの可視化には NGLview v3.0.3[59] を用いた。

#### 3.1.4 *q*BH2, *q*DHF を基質とした QDPR 活性測定

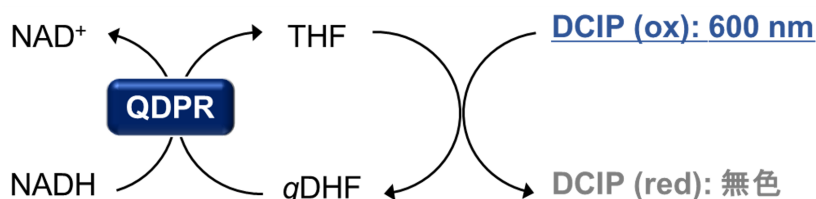
この *in vitro* アッセイは、当研究室の原によって行われた部分である。キノノイド型基質の活性測定手法は少し特殊であるため原理の説明などを簡単に行う。

キノノイド型ジヒドロプテリジン化合物は、テトラヒドロ型プテリジン化合物の酸化により生成される [60]。キノノイド型基質は不安定であるため、活性測定はこの酸化反応を利用して行った。今回は、酸化剤として 2,6-dichloroindophenol (DCIP) を用いてキノノイド型基質 (*q*BH2 および *q*DHF) を生成した。DCIP は酸化状態で極大吸収波長が 600 nm であり青色を呈するが、還元されると無色になる。そのため、600 nm における吸光

## 第3章 QDPR-NADH-*q*BH2 複合体の結合様式解析

### 3.2. 結果

度変化を測定することで、基質の定量が行える [61] (Figure 3.1)。今回は 25°C, pH7.5 の条件下で DCIP を用いた hQDPR 活性測定を行った。*q*BH2 生成には BH<sub>4</sub>、*q*DHF 生成には THF を用いた。



**Figure 3.1.** DCIP を用いた活性測定メカニズム。基質が *q*DHF の場合を示している。*q*BH<sub>2</sub> の場合は THF が BH<sub>4</sub> となる。

## 3.2 結果

### 3.2.1 hQDPR-NADH と *q*BH<sub>2</sub> のドッキングシミュレーション

Section 3.1.1 にて述べた構造最適化後の hQDPR-NADH をレセプター、*q*BH<sub>2</sub> をリガンドとして AutoDock Vina によるドッキングシミュレーションを行った結果、W89 のインドール環と NAM-ring の間に PT-ring が入り込みスタッキングのような状態になったドッキングポーズを 20 個取得した。これらのポーズは、*q*BH<sub>2</sub> の PT-ring 上にあるカルボニル酸素 (O4 原子) および SC<sub>C6</sub> の配向に基づき、mode A-D と今回名付けた 4 種類の結合様式 (binding mode) に分類できた (Table 3.1)<sup>\*3</sup>。各モードは以下の通り定義した (Figure 3.2 も参照)。

- mode A: PT-ring の O4 が hQDPR の Y149 側を向き、SC<sub>C6</sub> は NADH のアデニン側を向く
- mode B: O4 が Y149 側を向き、SC<sub>C6</sub> は NAM-ring 側を向く
- mode C: O4 は Y149 と反対側、SC<sub>C6</sub> は NAM-ring 側を向く
- mode D: O4 は Y149 と反対側、SC<sub>C6</sub> はアデニン側を向く

<sup>\*3</sup> この傾向に再現性が見られることは確認済みである。また、この時のドッキングポーズ取得自体は AutoDock Vina v1.1.2 で行っているが、新バージョンである v1.2.2 でも同様の傾向が見られることも合わせて確認済みである。

### 第3章 QDPR-NADH-qBH2 複合体の結合様式解析

#### 3.2. 結果

---

ちなみに、Varughese らによって提唱された mode[30] が mode A, Chen らがドッキングシミュレーションにて得た mode[14] は mode B に相当する。また、PTR1 と基質の結合様式は mode C に相当する。mode D については新規となる。

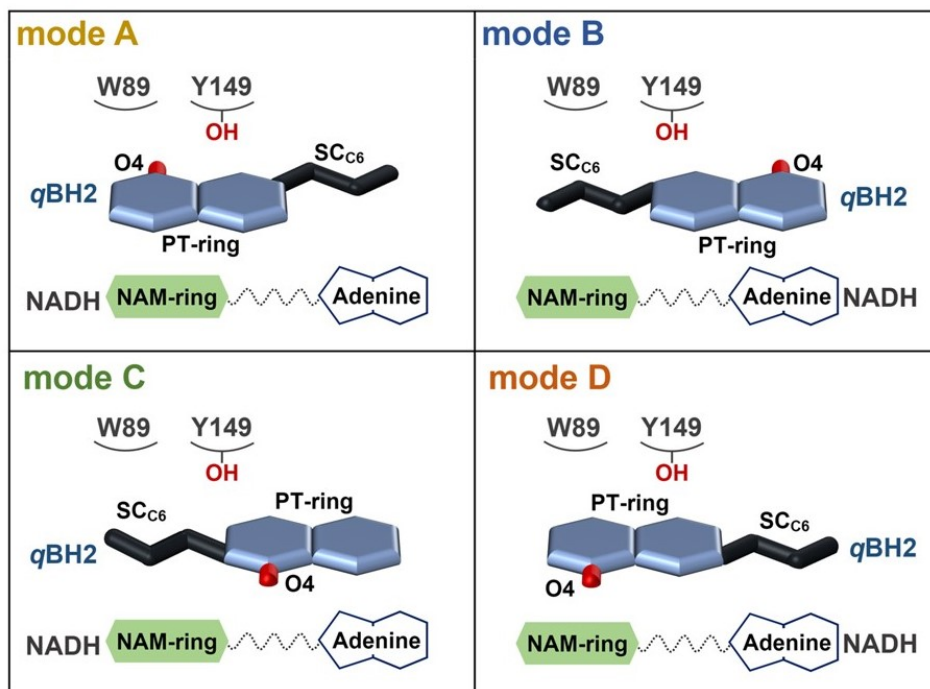
**Table 3.1.** 得られたドッキングポーズのスコアと結合様式分類のリスト。スコアの良い順から記載。各結合様式で最もスコアのよいものにアスタリスクを付けている Kono *et al.* (In press)[Pub.] Fig. 2A 部分を表にしたもの。

Rank	Score (kcal/mol)	Mode
1	-7.213	C*
2	-7.029	A*
3	-6.816	B*
4	-6.723	D*
5	-6.708	B
6	-6.707	B
7	-6.662	A
8	-6.617	C
9	-6.460	A
10	-6.443	A
11	-6.401	D
12	-6.295	D
13	-6.293	C
14	-6.254	C
15	-6.124	B
16	-6.102	B
17	-5.902	A
18	-5.863	B
19	-5.804	D
20	-5.791	A

---

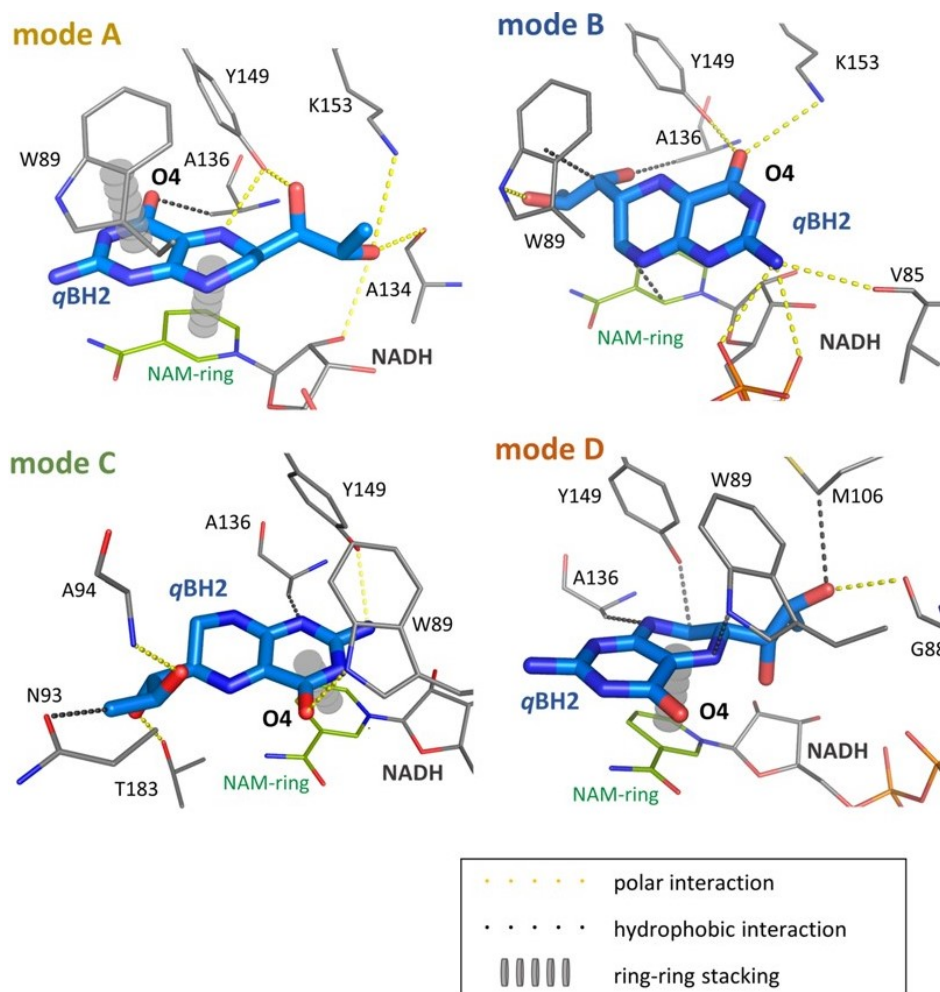
### 第3章 QDPR-NADH-qBH2 複合体の結合様式解析

#### 3.2. 結果



**Figure 3.2.** mode A-D の模式図。PT-ring については O4 原子のみ明記し、その他ヘテロ原子などは省略している。側鎖 (SC<sub>C6</sub>) に関しては、炭素鎖のみ表記した。NAM-ring とアデニンの間にあるリボースやリン酸基等は波線にて省略した。Kono *et al.* (In press)[[Pub.](#)] Fig. 1B より引用。

詳しい相互作用解析は後の MD シミュレーションにて行ったものの、ドッキングポーズによる各モードにおけるレセプター-リガンド相互作用についても少し述べる。相互作用を LigPlot<sup>+</sup>[62, 63] による解析に基づき PyMOL で描画したものが Figure 3.3 である。図で示した各モードに全てにおいて基質と相互作用しているのは W89, A136, Y149, NADH であるが、その相互作用先や種類には差が見られた。例えば、その位置などから PT-ring と  $\pi$ - $\pi$  スタッキングを形成すると予想した W89 のインドール環については mode A でのみスタッキングが見られた。同様にスタッキングを形成すると思われた NADH の NAM-ring は mode B を除く全てでスタッキングのような相互作用が見られた。SDR ファミリーにおいて触媒残基とされている Y149 の O $\eta$  原子は、mode B においてのみ PT-ring の O4 とコンタクトしている。Y149 と共に活性部位モチーフである K153 は、mode A, B において基質と水素結合を形成していた。



**Figure 3.3.** 各結合様式におけるレセプターリガンド相互作用の3D図。極性相互作用(黄色点線)、疎水性相互作用(黒点線)、スタッキング(グレーのリング)の3種類に分類して描画した。スタッキングに関しては、相互作用している原子ペアや位置関係から推定している。相互作用している主な残基をline、*q*BH2をstickで示した。Kono *et al.* (In press)[Pub.] Fig. 2B より引用。

ドッキングシミュレーションでは、上述の通り複数の結合モードが得られた。そのため、どれが最も妥当かの検証をMDシミュレーションにて行うことにした。そのために用いる構造として、各モードのうちドッキングスコアが最も良いものを選び([Table 3.1](#)のアスタリスク付きの物)、MDシミュレーションの初期構造とした。次の項目では、4モードの内、mode A, B, C についての比較を述べる。なお、ここでmode Dを除外した要因は、ドッキングスコアが-6.723 kcal/molであり、1位(mode C, -7.213 kcal/mol)と比較しギャップが0.5近くある(mode A, Bはいずれも0.4 kcal/mol以内に収まっている。[Table 3.1](#)も参照)事、100 nsのMDシミュレーションにて一貫性のない不安定な挙動を

示した事である (3 回行ったが、内 1 回は mode B に配向が変わった (Figure S1)。それ以外については傾向がバラバラであった)。

#### 3.2.2 100 ns の MD シミュレーション

mode A, B, C のダイナミクスから結合様式の選別を行うため、各結合様式について 100 ns の MD シミュレーションを 3 回ずつ実行した。その結果、興味深い挙動が観測されたのでこちらについて述べる。この挙動を可視化するため、C $\alpha$  (Y149)-C4a (*q*BH2)-C4 (*q*BH2)-O4 (*q*BH2) の二面角経時変化をプロットし、基質の配向変化を解析した (Figure 3.4A)。このプロットは、PT-ring の O4 原子が Y149 側を向いているかどうかを反映している。mode A の場合正の値、B, C の場合負の値を示していれば O4 原子は Y149 側を向いていることになる。

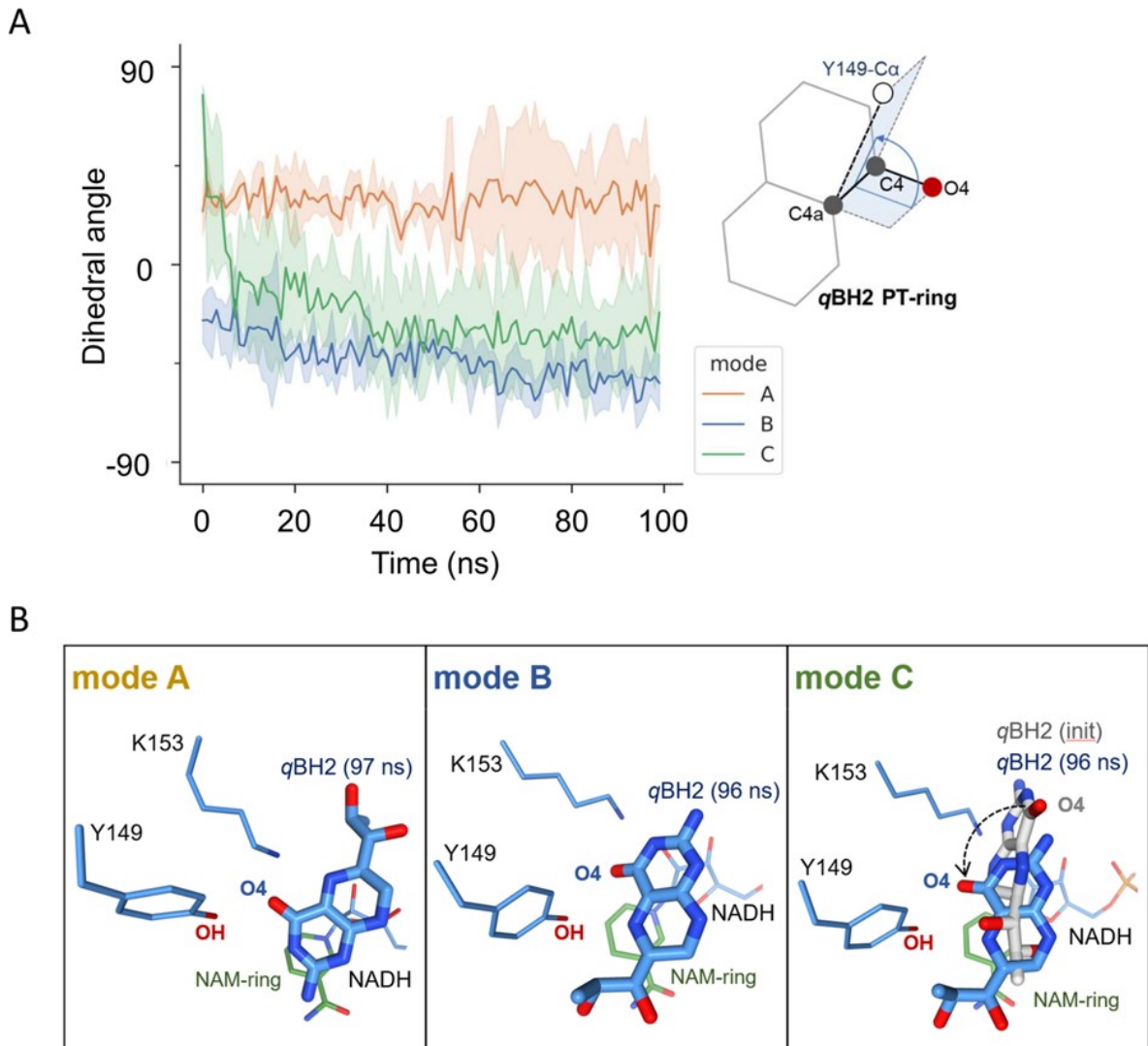
mode A では二面角が +30° ほどで維持されており、B では -30° から -50° に緩やかな下降を示すものの負の値で推移していることから、A, B では O4 原子が Y149 側を向くという配向が維持されているといえる。実際に 100 ns 付近のスナップショットで配向維持を確認できた (Figure 3.4B)。

一方、興味深いのは mode C である。初期には +80° ほどを示していた二面角が、10 ns ほどで急激に -20° 程に変化した。その後は、mode B と似たような推移を示した。これは mode C が反転し、mode B と同じ配向になったことを示唆している。実際にプロダクションラン初期フレームと 100 ns 付近のスナップショットを比較すると、確かに mode B と同じ配向に変化していることが分かる (Figure 3.4B)。この反転は 3 回のプロダクションランすべてで観測された。なお、mode C において、この後プロダクションランを 1  $\mu$ s に延長した場合においても mode B のままであったため、この反転現象は一時的なものではないと考えられる。

これは、溶媒を考慮しないドッキングシミュレーションにて最もスコアが良かった mode C が水溶液中では不安定であることを示唆している。このことから、妥当な結合様式は mode A, B のいずれかであり、mode C は不適切な結合様式と判定し、以後の解析からは除外した。

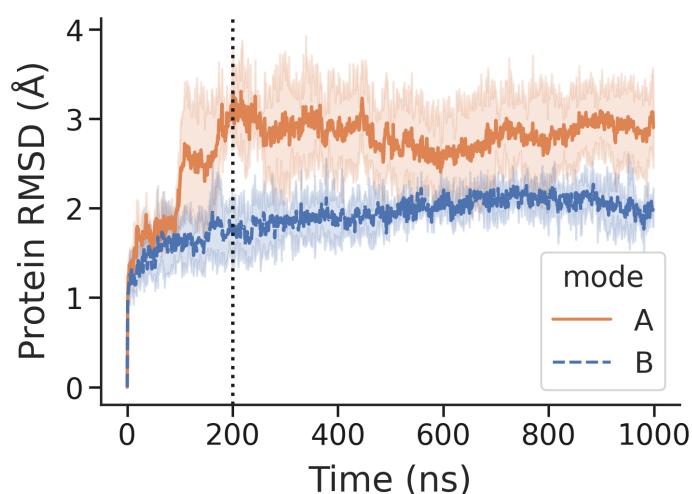
### 第3章 QDPR-NADH-*q*BH2 複合体の結合様式解析

#### 3.2. 結果



3.2.3 1  $\mu$ s の MD シミュレーション

上述の解析にて mode C を除外したことで、残るは mode A, B となった。どちらがより妥当な結合様式かを判別するため、1  $\mu$ s 3 本分のトラジェクトリをベースに重原子レベルのコンタクト解析を行った。解析には、ある程度タンパク質の構造変化 (初期構造からのずれ具合) が落ち着いてからのトラジェクトリを用いることにした。そのために hQDPR のタンパク質主鎖 C $\alpha$  原子についての RMSD を算出したのが Figure 3.5 である。



**Figure 3.5.** hQDPR-NADH-*q*BH2 複合体の Protein RMSD 平均。n=3 で、エラーバンドは標準偏差である。参照構造は各プロダクションランの初期フレームとした。

1  $\mu$ s の MD に 3 回分において、Figure 3.5 から、RMSD がある程度落ち着いてきた 200 ns 以降のトラジェクトリ (800 ns 分) を用いてコンタクト解析を行い、3 回分の平均でマップを算出した。ここでは、レセプターは、hQDPR-NADH のうち、SDR ファミリーの活性部位モチーフである Y149, K153 そして補酵素の NADH に絞り、リガンドは *q*BH2 とした。重原子間距離のカットオフは 4.0 Å 以下である。

また、コンタクトマップの頻度カットオフは以下の 2 つを全て満たす物とした。

1. 3 回分の平均相互作用頻度  $\geq 0.3$
2. 各回ごとのコンタクト頻度について、少なくとも 3 回中 2 回においては相互作用頻度が 0.2 以上

## 第3章 QDPR-NADH-qBH2 複合体の結合様式解析

### 3.2. 結果

---

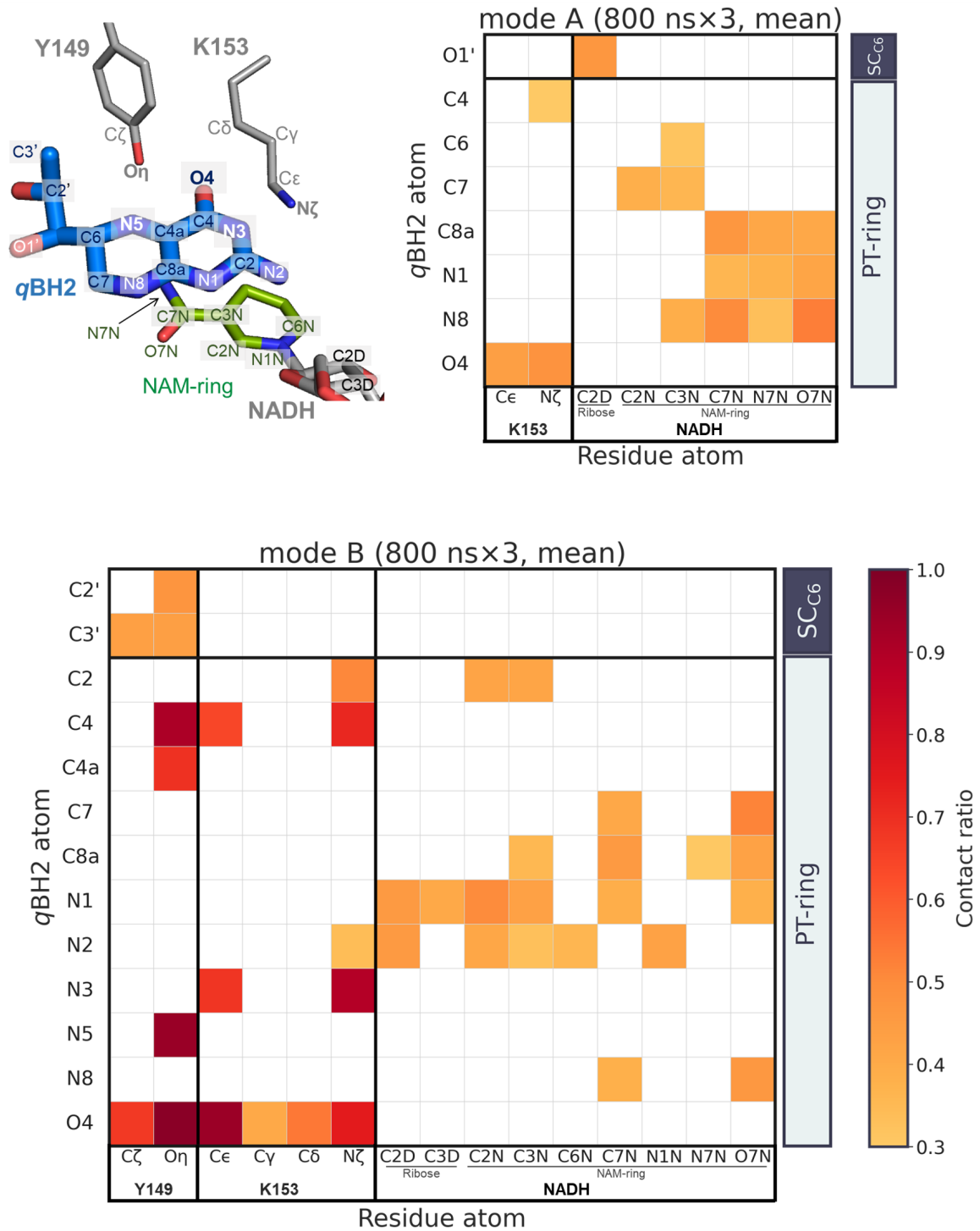
これは、

- 単にカットオフを3回の平均頻度  $\geq 0.3$  としてしまうと、1/3回の頻度が0.9以上であれば、残りの2回で頻度0であっても閾値をクリアしてしまう
- 3回すべてにおいて頻度0.3以上とすると、2/3回で高頻度相互作用が見られても、残り1回で頻度が0.2などの「ある一定頻度で相互作用しているケース」を弾き落としてしまう

といった問題が考えられたため、その対策としての基準である。コンスタントに相互作用している物をカバーする目的がある。上記の条件で作成したコンタクトマップが [Figure 3.6](#) である。

第3章 QDPR-NADH-qBH2 複合体の結合様式解析

3.2. 結果



**Figure 3.6.** 800 ns (200 ns 以降) のトラジェクトリ 3 本分の平均コンタクト (レセプター側は Y149, K153, NADH のみ)。カットオフは前述の通り。図左上は atom id と立体構造の対応図 (mode B の構造を使用) である。

\* マップ上で見える相互作用はあくまで上記クライテリアをクリアしたものであり、白い部分では全く相互作用が無かったとも言い切れない。厳密には「一定以上の相互作用」などの表現を用いるべき部分だが、ここでは便宜上、マップに色がついている部分に関して「相互作用している」あるいはそれに相当する表現を用いる。以降の章でも同様の表記とする。

コンタクトマップから分かる mode A、B の共通点は、K153 の末端窒素原子である N $\zeta$  原子と *q*BH2 の O4 原子の相互作用、そして NADH の相互作用内訳は NAM-ring 構成原子が中心という点である。

一方大きな相違点は、Y149 のヒドロキシ酸素である O $\eta$  と *q*BH2 の O4 原子との相互作用が mode B にしか見られない点である。

## 3.3 考察

### 3.3.1 原子レベルのコンタクト解析に基づいた結合様式推定

上記のコンタクト解析における mode A、B の決定的な違いは、Y149 構成原子との相互作用頻度である。mode A では、構成原子すべてとの相互作用が閾値を超えなかった(特に Y149 のヒドロキシ水素である O $\eta$  原子と、*q*BH2 の O4 原子との相互作用はコンタクトマップに現れないだけでなく、各プロダクションランでほとんど観測されなかった)。一方、mode B に関しては O $\eta$  原子と O4 原子が非常に高頻度で相互作用している。SDR ファミリーにおける Active site の Tyr 残基 (hQDPR における Y149) は基質とのプロトン受け渡しに直接関与している場合が殆どで、特にヒドロキシ基は基質と直接水素結合を形成することが知られている [25]。すなわち、Y149 のヒドロキシ酸素と基質は安定した相互作用が必須と考えられる。このことから、Y149 との相互作用が殆ど見られない mode A よりも、ヒドロキシ酸素と PT-ring のカルボニル酸素 (O4) が高頻度で相互作用している mode B の方が結合様式としては優位性が高いと考えた。

また、Y149 の O $\eta$  のみならず、PT-ring と相互作用している NAM-ring 原子数が多いことも、PT-ring と NAM-ring のスタッキングを考えた際 mode B の優位性を示す材料になると思われる。NAD(P)H 依存性酵素においては、NAM-ring 上の *pro-S/R* 水素がハイドライドドナーとなる。また、QDPR の結合様式を予測した先行研究を見る限り、*q*BH2 と NAM-ring はスタッキングを形成している可能性が高い [14, 30]。そのため、PT-ring と相互作用する NAM-ring 構成原子数の多さはスタッキングを示唆すると考えた。

以上の点から、コンタクト解析に基づいた判定としては、mode B が優位な結合様式であると判断した。

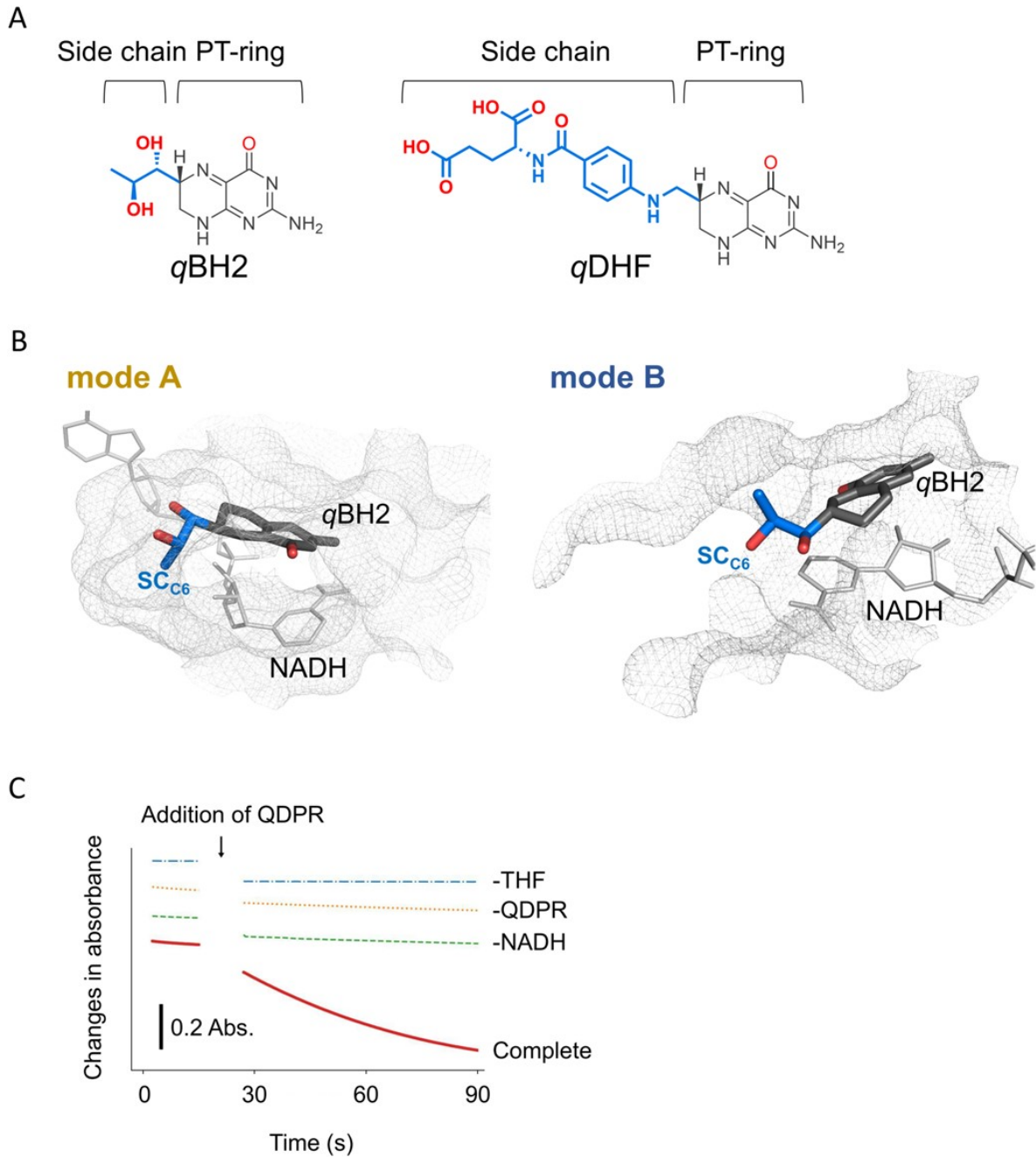
#### 3.3.2 *in vitro* での *q*DHF アッセイによる裏付け

上記の考察で導いた mode B の優位性を *in vitro* 解析によって裏付けられないかと考えた。各モードの cavity に注目し、SC<sub>C6</sub> がかさ高い葉酸系基質であるキノノイドジヒドロ葉酸 (*q*DHF, Figure 3.7A) を用いた活性測定を行うことで mode A/B の選別が行えるのではないかと予想した。Figure 3.7B に各モードの cavity を示したが、これを見ると、mode A ではかさ高い側鎖を持つ基質の結合は難しいと考えられる。すなわち、hQDPR が *q*DHF 還元活性を有していれば、mode B で結合している可能性が高いという事になる。

この仮説に基づき、当研究室の原によって行われた *q*DHF を基質とした活性測定結果が Figure 3.7C である。*q*DHF に対する還元活性を hQDPR が有していることが明らかとなった。このことから、mode B の妥当性がより高まったといえる。

### 第3章 QDPR-NADH-*q*BH2 複合体の結合様式解析

#### 3.3. 考察



**Figure 3.7.** *q*DHF に対する還元活性測定。(A) *q*BH2 (左) と *q*DHF (右) の 2D 構造。PT-ring は同じだが、SC<sub>C6</sub> (青い太線で描画) のサイズが大きく異なることが分かる。*q*DHF の SC<sub>C6</sub> のコンフォメーションを考慮したとしても、明らかにこちらの方がかさ高くなる。(B) hQDPR-NADH-*q*BH2 複合体の *q*BH2 に対する cavity (ワイヤフレーム)。左が mode A、右が mode B である。cavity の描画には Figure 3.4B のスナップショットを用いた。(C) *in vitro* による活性測定結果 (当研究室の原によって行われた)。DCIP による活性測定系を用い、600 nm の吸光度変化を測定したものの。-THF, -QDPR, -NADH はネガティブコントロールである。Kono *et al.* (In press)[Pub.] Fig. 5 より引用。

### 3.3.3 推定複合体構造

一連の解析により、hQDPR-NADH-*q*BH<sub>2</sub> 複合体は mode B であり、結合領域付近は Figure 3.8 のようになるという結論に至った。

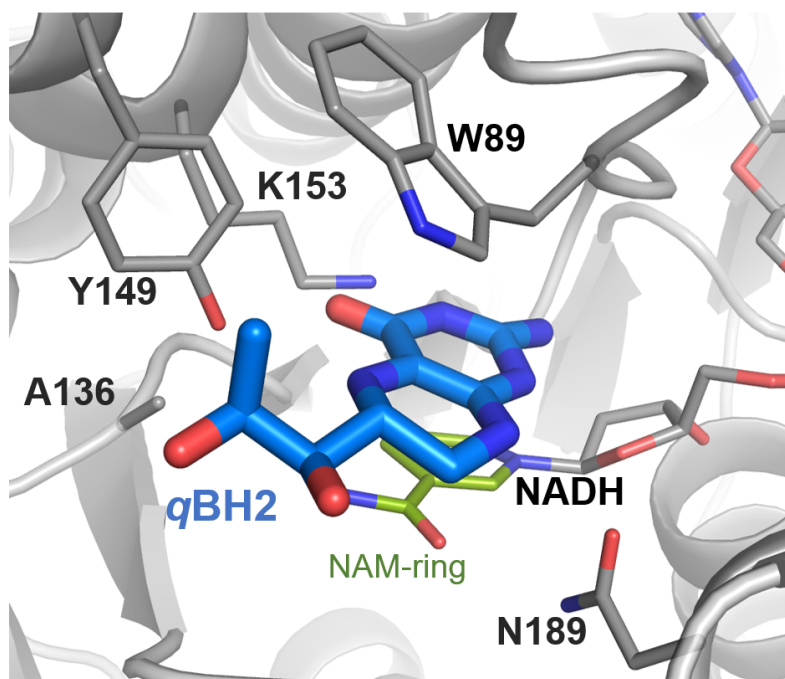


Figure 3.8. hQDPR-NADH-*q*BH<sub>2</sub> 推定複合体 Kono *et al.* (In press)[Pub.] Fig. S4 より引用。

mode B という結果は、先行研究における 2 パターンの予測モデルのうち、Chen らの予測 [14] と同様のものになったが、本研究は MD シミュレーションなども含めより詳細な解析で mode B の可能性を裏付けることができた。また、興味深いことに、BH<sub>4</sub> 代謝関連酵素であり、同じ SDR ファミリーである PTR1 の結合様式である mode C とは PT-ring が反対という結果となった。

## 第 4 章

# 酵素-基質相互作用・反応機構解析

### 本章の概要

本チャプターは、研究目的の [Section 1.3.2](#) に対応する部分となる。主な内容は以下となる。

1. Y149 以外の残基にも着目して hQDPR の酵素-基質相互作用を再解析した。その結果、hQDPR は通常の SDR ファミリーでは見られないユニークな相互作用を持つ興味深い可能性が見えてきたのでこれについて述べる。また、QDPR が qBH2 と相互作用するためのキーファクターを更に探るべく、hQDPR-NADH 複合体の結晶構造やダイナミクスを mode B と比較した。
2. 先行研究や前章で決定した推定複合体および上記 1. の解析で得られた知見を利用し、hQDPR の反応機構 (ヒドリド転移段階および活性部位の役割) について検討した。

## 4.1 手法

### 4.1.1 mode B における重原子レベルでの相互作用解析

前章ではレセプター側を Y149, K153, NADH に絞りコンタクト解析を行ったが、今回はコンタクト解析対象をレセプター全体に拡張した。この場合におけるレセプターの定義は、hQDPR-NADH および qBH2 の PT-ring 周辺にある水分子 20 個である。この水分

### 4.1. 手法

---

子抽出は、`pytraj` の `closest` コマンドを用いて行った。`closest` コマンドは、特定の領域周辺にある溶媒分子を指定した数だけ抽出するコマンドである。この時、距離が近い順から抽出を行い、指定された分子数だけ抽出を繰り返す。従って原子間距離のカットオフは存在しない (付近に溶媒分子が無い場合、かなり遠くの溶媒分子を抽出する可能性もあるということだ)。尚、コンタクト頻度の算出に使ったトラジェクトリや判定基準は前章と同様である。

#### 4.1.2 hQDPR-NADH 複合体の MD シミュレーション

基質結合時特有の構造変化について確認するため、基質が無い状態である QDPR-NADH 複合体の MD シミュレーションを行った。

初期構造として hQDPR-NADH 複合体 (PDB: 1HDR) を利用した点を除き、MD シミュレーションの手順については前章 [Section 3.1.3](#) と同様である。1  $\mu$ s のプロダクションランを3回行った。

#### 4.1.3 qBH2-NADH 複合体の HOMO/LUMO 計算

ヒドリド転移過程について、先行研究では NADH の NAM-ring にある *pro-S* 水素がドナーとなり [64, 65]、qBH2 の N5 原子がアクセプターであるという説が提唱されている [33, 66]。これについて簡単な確認を行うため、分子軌道計算を行った。ヒドリド転移は、ヒドリドによる求核反応ともいえるため、HOMO (最高被占軌道)/LUMO (最低空軌道) に着目した。qBH2-NADH 複合体 (計算コスト削減のため、リガンドのみを抽出して計算した) の HOMO がヒドリドドナーである NAM-ring 側にあり、LUMO が PT-ring 側にあれば、*pro-S* 水素が求核剤であり、PT-ring がそれを受け入れることができるといえる。また、LUMO の軌道サイズを解析することで、電子の入る確率を議論することができる。最もサイズの大きい軌道が位置する原子は電子が入る確率が高く、ヒドリドアクセプターであると言える。

この理論に基づき、qBH2-NADH 複合体の HOMO/LUMO 計算解析を MOPAC2016 v22.0.6 (<http://openmopac.net/>) にて行った。qBH2-NADH 複合体は、mode B のプロダクションラン3回のうち2回目の312 nsのスナップショットから抽出した。系の総電荷は-2とし、NADHのリン酸基に1つずつ負電荷を割り当てた。qBH2の総電荷は中性とした。

## 4.2. 結果

HOMO/LUMO の分子軌道は eigen-following routine (EF 法 [49]) を用いた構造最適化によって取得した。得られた最適化構造が遷移状態などでないことを確認するため、振動数解析を行い、虚振動が存在しないことを確かめた。

上記計算はすべて、ハミルトニアンに PM7[67] を用い、また溶媒効果の考慮は COSMO 法 [68] を用いた。溶媒は水とした (水の比誘電率  $\epsilon = 78.39$ )。分子軌道は、Winmostar v11.3.4 (X-Ability, Tokyo, Japan) にて CUBE ファイルを出力させ、PyMOL にて読み込むことで可視化した。

## 4.2 結果

## 4.2.1 複合体相互作用解析

mode B について、カットオフ値を満たす全原子のコンタクトマップを示す (mode A も含めたフルバージョンのコンタクトマップは Figure S2)。

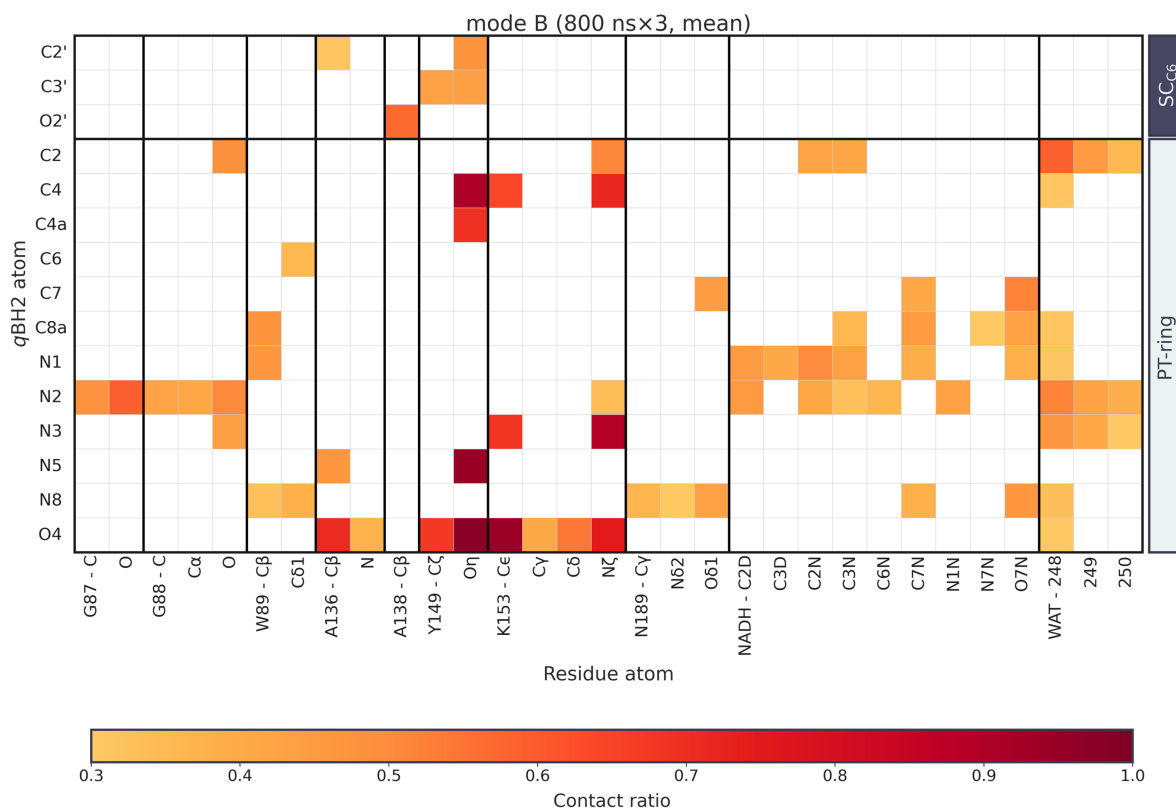


Figure 4.1. mode B のコンタクトマップフルバージョン

### 4.2. 結果

---

NADH や K153 についてのコンタクトマップは前章でも示したが、mode A との比較といった意味合いが強く、個々のコンタクトの特徴についてはほぼ述べていなかったためマップから分かる相互作用の特徴をこちらで述べる。

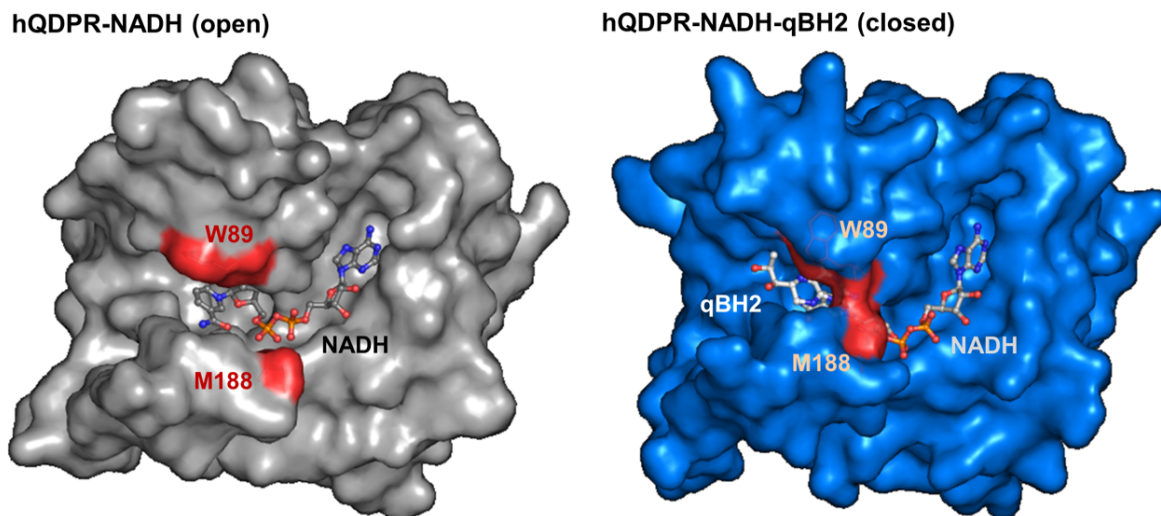
- PT-ring と NADH の相互作用を見ると、NAM-ring が相互作用の中心であることが分かる。ただし、NAM-ring と相互作用している PT-ring の原子は、N1, C8a といった環の溶媒側半分 (O4 などの反対側) となっている。また、NAM-ring 側の原子に C4N や C5N は含まれていない。これは、PT-ring と NAM-ring がスタッキングに近い相互作用を構成しているものの、環同士が平行ではなく、少し斜めになっている傾向を示唆する。
- K153 が *q*BH2 の O4, N3 と高頻度で相互作用していることも確認できる。Y149 に関しては、N3 との一定頻度の相互作用は見られなかったが K153 は N3 とも二股で相互作用できる点と同じ active site の SDR モチーフでも違う部分となる。ただ、O4 と N3 で比較した場合特に N3 との相互作用頻度が非常に高い。
- 水分子は 20 個抽出したが、コンスタントに相互作用している数は 3 分子と少ない結果になった。また、頻度も決して高くはない。特に O4 とは 1 分子のみかつ頻度も低めである。N3 の方は 3 分子の水と相互作用が見られた上、内一つとはそれなりの頻度で相互作用している。

#### 4.2.2 hQDPR-NADH 複合体と mode B の比較

ここまではレセプター対リガンドといった分子間相互作用の解析を行ってきた。この相互作用を更に理解するため、次はタンパク質側の分子内相互作用に着目した。hQDPR-NADH-*q*BH2 複合体と hQDPR-NADH 複合体を比較することで、基質結合時特有のイベントを解析した。

##### hQDPR-NADH 複合体と mode B 代表構造の静的状態比較

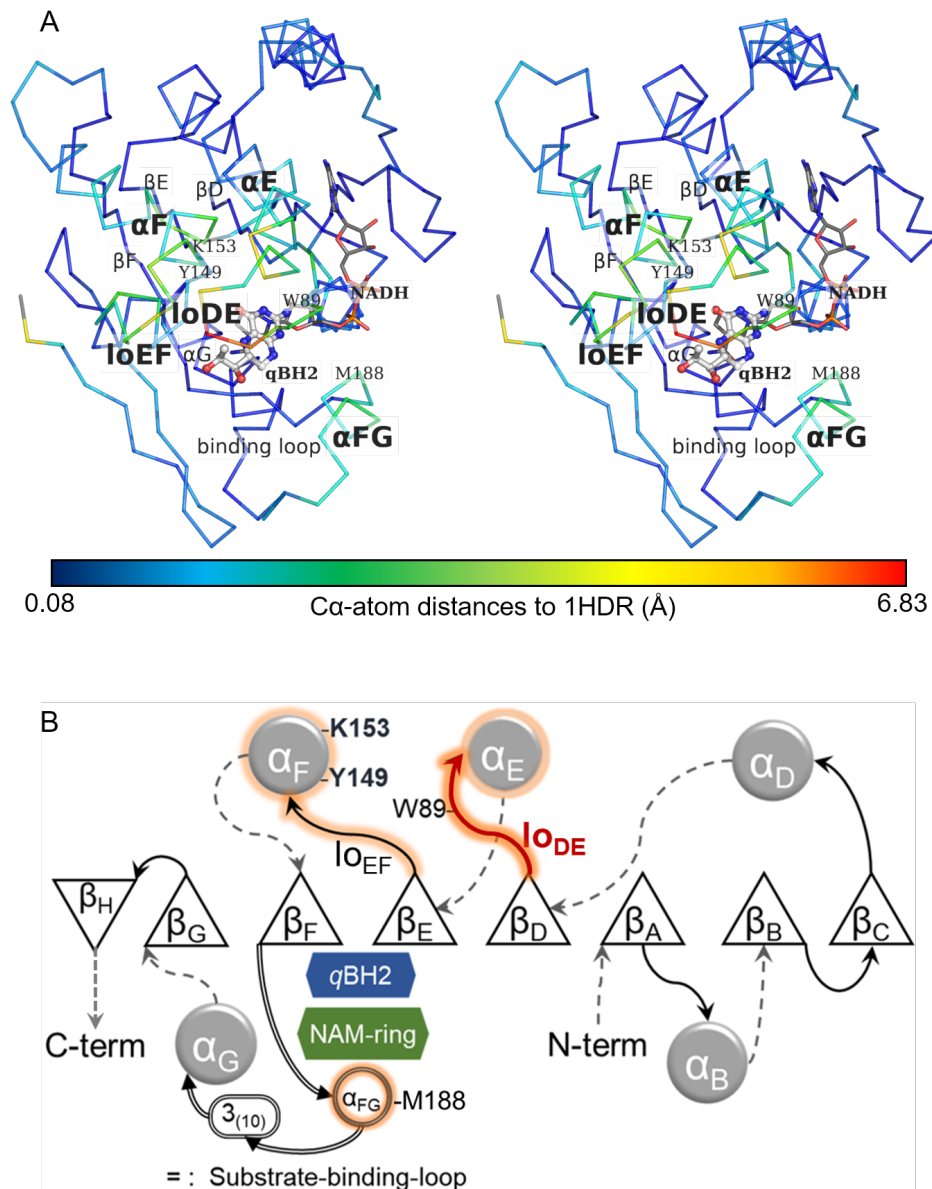
まずはコノリー表面を比較した。Figure 4.2 を見ると hQDPR-NADH 複合体ではリガンド結合領域のクレフト入口が開いたコンフォメーション (open) を取っているのに対し、mode B 代表構造では、*q*BH2 結合領域の一部が閉じた状態 (closed) になっている事が分かる。代表構造における closed コンフォメーションの「フタ」として機能している残基は W89 および M188 である。



**Figure 4.2.** hQDPR-NADH 複合体 (PDB: 1HDR、左側ダークグレー) と hQDPR-NADH-*q*BH2 複合体 (mode B 代表構造、右側青) のコノリー表面。リガンドは ball-stick 表記。closed コンフォメーション形成に関わっていた W89, M188 は赤色で示した。

また、代表構造と 1HDR との構造アラインメントを行った。 $C\alpha$ -RMSD は  $1.48 \text{ \AA}$  であった。更に、どの領域が特に大きく変化しているか、 $C\alpha$  原子の距離を残基ごとに比較したのが Figure 4.3A である。SDR ファミリーに属する酵素群は、substrate-binding-loop と呼ばれる、小さなヘリックスを 1,2 個含む flexibility の高い領域を C 末端側 Figure 4.3B に持ち、基質結合に伴う induced fit に関与しているとされる [69]。hQDPR においてもこの領域を構成している  $\alpha_{FG}$  の構造が基質結合によりある程度動いていることが図から分かる。

一方、substrate-binding loop よりも N 末端側に位置する領域が大きく動いていることも分かる。その領域として該当するものには、SDR ファミリーの活性モチーフである  $^{149}\text{Tyr-Gly-Met-Ala-}^{153}\text{Lys}$  が存在する  $\alpha_F$ 、closed コンフォメーション形成に寄与していた W89 が位置する  $l_{oDE}$  などがある。特に、 $l_{oDE}$  は他の領域と比べ顕著に構造が変化している。

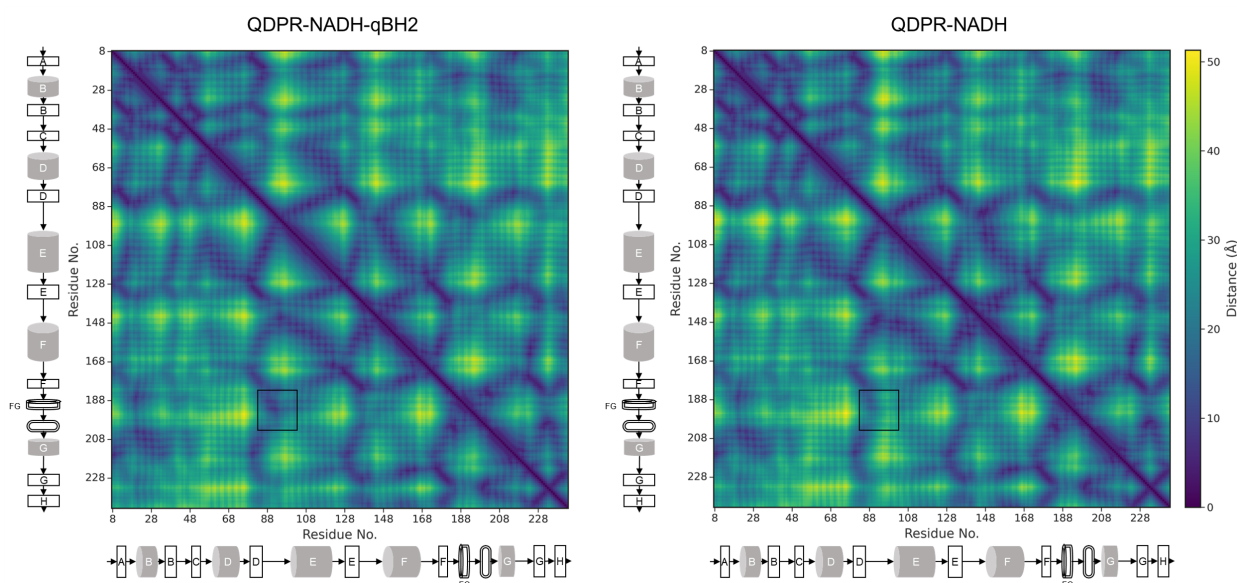


**Figure 4.3.** mode B 代表構造と 1HDR の構造アラインメント。A: mode B 代表構造ステレオ図。1HDR と構造アラインメントを行った後の状態である。色分けは 1HDR (hQDPR-NADH 複合体結晶構造) との C $\alpha$  原子間距離を示す。アラインメント結果の色分けは、PyMOL のサードパーティープラグインである ColorByRMSD (<https://github.com/Pymol-Scripts/Pymol-script-repo/blob/master/colorbyrmsd.py>) にて行った。sans-serif 体のラベルは主な二次構造 (Io<sub>DE</sub>、Io<sub>EF</sub> はそれぞれ  $\beta_D$ - $\alpha_E$ 、 $\beta_E$ - $\alpha_F$  間のループを示す)、serif 体のラベルでリガンドと主要残基を示した。B: 構造アラインメント結果を反映させたトポロジーダイアグラム。結晶構造と比較し C $\alpha$  原子間距離が比較的大きかった箇所をオレンジの枠で囲んだ。特に変化が大きく、また基質結合時の closed コンフォメーション形成に必要な W89 を含む Io<sub>DE</sub> は赤い太矢印にて表記。

## ダイナミクスの比較

上述のコンフォメーション変化が基質結合時特有のものかを確認するため hQDPR-NADH の結晶構造を用いた  $1 \mu\text{s}$  の MD シミュレーションを 3 回行い、mode B と比較をした。比較に用いるトラジェクトリは、mode B, hQDPR-NADH 複合体共に k-mean クラスタリングにて算出した代表構造を含むクラスター (mode B: 1599 ns 分、hQDPR-NADH: 849 ns 分) を用いた。

hQDPR-NADH-qBH2 複合体と hQDPR-NADH 複合体について、上記トラジェクトリから求めた残基ごとの  $\text{C}\alpha$  原子間距離の平均 (Distance Matrix) が Figure 4.4 である。各複合体を比較した際、殆どの領域で大きな差はないものの、ヒートマップ中の黒枠部分は例外的に差が大きい。ここは基質結合時の方が距離が近くなっている。二次構造を辿っていくと、ちょうど  $\text{I}\text{O}_{\text{DE}}$  と substrate-binding loop に相当する箇所である事が分かる。これら 2 つの領域が近づいて closed コンフォメーションを形成することが基質結合時特有の過程であると示唆された。



**Figure 4.4.** 基質結合時 (左) と非結合時 (右) の Distance Matrix。各軸には二次構造を合わせて示した。黒枠の長方形が  $\beta$  ストランド、グレーのシリンダーがヘリックスである。

## 4.3 考察

### 4.3.1 ユニークな相互作用

#### K153 と基質の相互作用

Asn-Ser-Tyr-Lys の触媒四残基を形成すると考えられる典型的な SDR ファミリー酵素 [27] では、Tyr-(Xaa)<sub>3</sub>-Lys の Lys 残基は Tyr の背後 (結合部位の反対側) にいて Tyr の pK<sub>a</sub> を下げる働きをしていると考えられる。このパターンが提唱されている酵素においては、Tyr のヒドロキシ酸素と Lys のアミノカチオン部分の窒素原子との距離は 4 Å 前半から半ばほどである [69]。一方、少しイレギュラーな例として、PTR1 のように Tyr-Lys 間距離がやや遠い酵素も存在し (5 Å 程度 [16])、こちらは Lys 残基が Tyr の pK<sub>a</sub> 低下に寄与しないと考えられている。

ただ、上記いずれのケースでも Lys 残基と基質との距離は 6 Å 程度と遠く、相互作用は無いと考えられる。

QDPR の場合、結晶構造を見る限りでは、Tyr の O<sub>η</sub> 原子と Lys の N<sub>ζ</sub> 原子間の関係性が PTR1 と似ている。やはり原子間距離が 5 Å 程度離れているのだ。そして、この距離は MD シミュレーション中もほぼ変化が無かった (800 ns、3 回分の平均 ± 標準偏差 = 5.03 ± 0.92 Å)。Lys 残基の N<sub>ζ</sub> 原子は、結晶構造では NADH のリボース水酸基と相互作用していた (この相互作用については SDR ファミリーとして普遍的な特徴である)。ところが、基質との複合体においては興味深いことに、K153 の末端窒素原子 (N<sub>ζ</sub>) は基質の N3 や O4 原子と一定頻度で相互作用できることがコンタクト解析から示唆された。この時、NADH のリボース水酸基と相互作用をほとんど形成しない結果となったことも確認している。基質のヘテロ原子が相互作用相手であることを考えると、水素結合などの静電的な分子間力が働いていると予測される。

このことから、QDPR における SDR モチーフの Lys の役割は、基質結合前は NADH との相互作用形成、基質が結合した際は基質との相互作用形成による複合体の安定化にあり、SDR ファミリーの定説である Y149 の pK<sub>a</sub> 低下補助は行っていないと考えた。

この仮説を、K153 についての変異体アッセイにて検証した (アッセイは当研究室の原によって行われた)。先行研究で作成されていた Lys 残基の変異体は Gln 変異体であるが、これは恐らく Lys 残基の役割が通常の SDR ファミリーと同じであり、基質とは相

## 4.3. 考察

相互作用しないという考えに基づいた設計だと思われる。今回は、基質との静電相互作用形成能を確認するため、新規変異体として K153I を設計し、野生型 (Wild-type, WT) や K153Q と動力的パラメータを比較した。その結果、K153I では WT や K153Q に比べ  $q\text{BH}2$  に対する  $K_m$  が大きく上昇していた (Table 4.1)。つまり、MD シミュレーションの結果およびそれに基づいた上記仮説と矛盾しないと言えるだろう。

**Table 4.1.** hQDPR の変異体活性測定結果 (Kono *et al.* (In press)[Pub.] Table 1 一部改変)。基質は  $q\text{BH}2$ 。測定系は前章と同様 DCIP を用いている。Y149F、K153Q は先行研究でも報告されているが、同一測定系で比較するためにアッセイを行った。測定から動力的パラメータ算出までの全て当研究室原によって行われた。

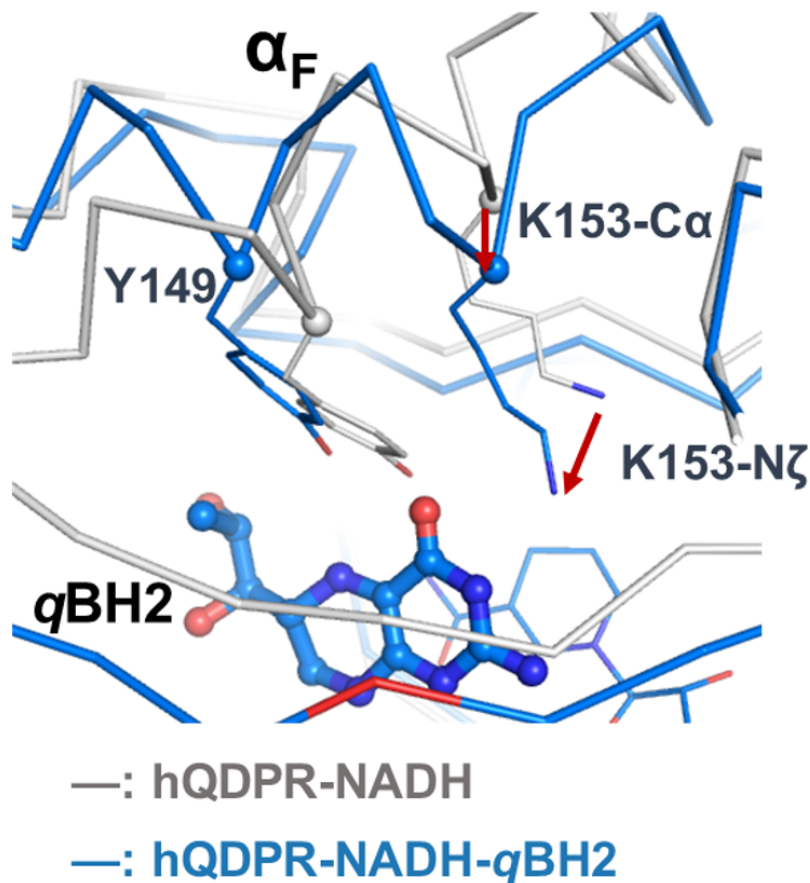
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Wild-type	$18.7 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.05$	$17.9 \pm 0.7$
Y149F	$41.8 \pm 1.9$	$90.6 \pm 4.9$	$0.5 \pm 0.005$
K153Q	$28.9 \pm 0.7$	$10.5 \pm 0.9$	$2.8 \pm 0.2$
K153I	$24.0 \pm 1.5$	$40.9 \pm 2.8$	$0.6 \pm 0.01$

活性部位の Lys 残基が Tyr 残基から離れているのみならず、Lys 残基が基質と相互作用できるという特徴は QDPR ならではのユニークなものと思われる。

また、Section 4.2.2 にて述べた基質非結合時/結合時の構造比較により、K153 が位置する  $\alpha_F$  が基質結合に伴いコンフォメーション変化を起こしている事が明らかになった。K153 と基質の相互作用が可能になるキーフクターはこの現象ではないかと考えている。 $\alpha_F$  の中でも K153 付近に着目し、基質結合前後の構造比較を行った図が Figure 4.5 である。これを見ると、ヘリックスのコンフォメーション変化に伴い、K153 が全体的に基質側へ近づいていることが言える。このヘリックスは Gly-rich という、 $\alpha$  ヘリックスとしては非典型的な特徴を持つが、先行研究ではこの特徴について、Flexibility を向上させる上で有利なのではないかという議論がなされている [23]。

K153 付近のコンフォメーション変化を示唆する別な報告もある。Tyr149 の各種変異体 (His, Ser, Phe, Glu) を用いたアッセイの結果から、hQDPR 活性部位のコンフォメーション変化が起こる可能性と、それにより K153 の末端アミノカチオンが N3 原子に直接プロトンを供与できる可能性について述べられている [70]。プロトンのダイレクト転移については議論が難しい箇所であるが、コンフォメーション変化により Lys 残基が基質と直接相互作用できるという点については、本研究によって酵素-基質複合体を用いた解析

で視覚化することができた。



**Figure 4.5.** コンフォメーション変化による K153-基質間相互作用。hQDPR-NADH 複合体 (PDB: 1HDR, ライトグレー) と mode B 代表構造 (ブルー) の構造アラインメントを行い、 $\alpha_F$  付近を拡大したものである。

#### A136 の $\beta$ 炭素と基質の相互作用

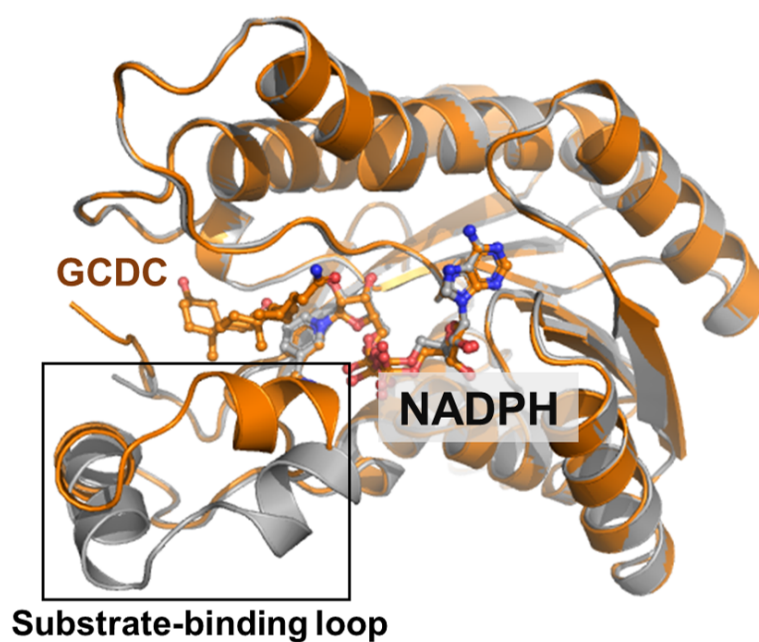
K153 以外の注目残基として、A136 について述べる。この残基の特筆性としてまず挙げられるのはその存在そのものである。Chapter 1 にて、SDR ファミリー酵素の多くは Asn, Ser, Tyr, Lys という触媒四残基を形成すること、特に Ser 残基は高度に保存されており、酵素反応過程で末端の水酸基が基質と水素結合を形成することを述べた。そして QDPR では前半 2 残基が保存されておらず、Ser 残基に対応する部分が Ala になっている事にも触れた。このとき触れた Ala 残基こそが、1HDR の 136 番目に位置する Ala で

ある。

この A136 であるが、コンタクトマップを見ると  $\beta$  炭素と  $qBH2$  の O4 原子が高頻度で相互作用している。当初の予想では、非極性残基とは言え主鎖の酸素原子や窒素原子であれば静電的な相互作用を形成してもおかしくないと考えていたが、予想に反して主鎖の窒素原子よりも  $\beta$  炭素と基質のカルボニル酸素の相互作用頻度が高いという結果になった。窒素原子の相互作用頻度は低めである。つまり、何かの分子間力が働いているとしてもそれは疎水的な相互作用の可能性が高い。尚、先行研究でこの A136 を SDR ファミリーのセオリー通りである Ser 残基に置換しても酵素の動力的パラメータに与える影響はほとんどないことが報告されている [71]。A136 と基質の相互作用が持つ意味は、基質結合部位のコンフォメーション上たまたま基質との距離が近いだけで、分子間力というよりは結合部位の形状形成的な意味合いが強いのだろうか。もしコンフォメーション的な意味合いが強いとすれば、Ser ではなくサイズが更に大きい残基の変異体アッセイにより動力的パラメータへの変化があるかもしれない。

#### 4.3.2 基質結合前後の特徴比較: 「第2の substrate-binding-loop」

Section 4.2.2 でも述べたが、SDR ファミリーの酵素は、C 末端側に substrate-binding loop と呼ばれる領域を持つ。ここは基質結合時にコンフォメーション変化を起こしやすい場所である。コンフォメーション変化の度合いによっては、open (非結合時)  $\rightarrow$  closed (結合時) といった大きい変化を生じる場合もある (Figure 4.6)。



**Figure 4.6.** 典型的な SDR ファミリーにおけるコンフォメーション変化の一例。大腸菌 7 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (7 $\alpha$ -HSDH)-NADPH 複合体 (グレー、open コンフォメーション) と 7 $\alpha$ -HSDH-胆汁酸 (GCDC) 複合体 (オレンジ、closed コンフォメーション) の結晶構造をとりあげた。PDB ID はそれぞれ 1AHH, 1AHI[69] である。この酵素は基質の GCDC 結合に伴い closed コンフォメーションを取っているが、hQDPR と異なり大きく構造変化している部分は substrate-binding loop 領域のみである。

Section 4.2.2 で述べた通り、hQDPR の場合もまた基質結合によりクレフトが closed コンフォメーションを形成していた。興味深いのは、closed コンフォメーション形成に寄与している領域として、 $lo_{DE}$  があった点である。ここは、substrate-binding loop より N 末端側の領域であるが、closed コンフォメーションを形成していた残基の 1 つ W89 を含む。W89 は、substrate-binding loop を構成する M188 と共にクレフト (closed) の「フタ」となっていた。基質結合に伴う大きな構造変化と closed コンフォメーション形成という働きは、substrate-binding loop の特徴ともいえる。そのため、本来の substrate-binding loop と共にクレフトの「開け閉め」をになっていた  $lo_{DE}$  は、hQDPR における「第二の substrate-binding loop」と言えるのではないだろうか。

### 4.3.3 反応機構の検討

通常ヒドリドのような求核剤は、C=C 結合や C=O 結合、C=N 結合などにおける  $sp^2$  炭素を狙うのが有機化学における定説である。酵素反応においてもこれは共通であり、SDR ファミリー酵素のうち還元酵素の基質はカルボニル基や C=C 結合などを有していることが多い。 $qBH2$  の PT-ring には C=N 結合が存在するため、セオリーを  $qBH2$  に適用するならば、C=N 結合の  $sp^2$  炭素である C4a がヒドリドアクセプターと考えるのが一見妥当なように思える。

ところが、重水素置換などを用いた解析により、 $qBH2$  においては被還元部位である N5 原子が NADH の *pro-S* 水素を直接受け取るという見解がこれまで定説となっていた [33, 66]。

一方、今回の MD シミュレーションでは、NAM-ring 上の C4N (*pro-S* 水素が位置する炭素) と  $qBH2$  の N5 がいずれもコンタクトマップ上に現れなかった。そこで、実際の原子間距離をプロットしたところ、いずれも距離が遠いものの、C4a の方が近い傾向にあることが分かった (Figure 4.7, Figure S3)。そのため、実際に N5 へのヒドリド転移は理論上妥当なのかについて PT-ring と NAM-ring のスタッキングが良好な状態の  $qBH2$ -NADH 複合体を用いた HOMO/LUMO 計算にて検証した。

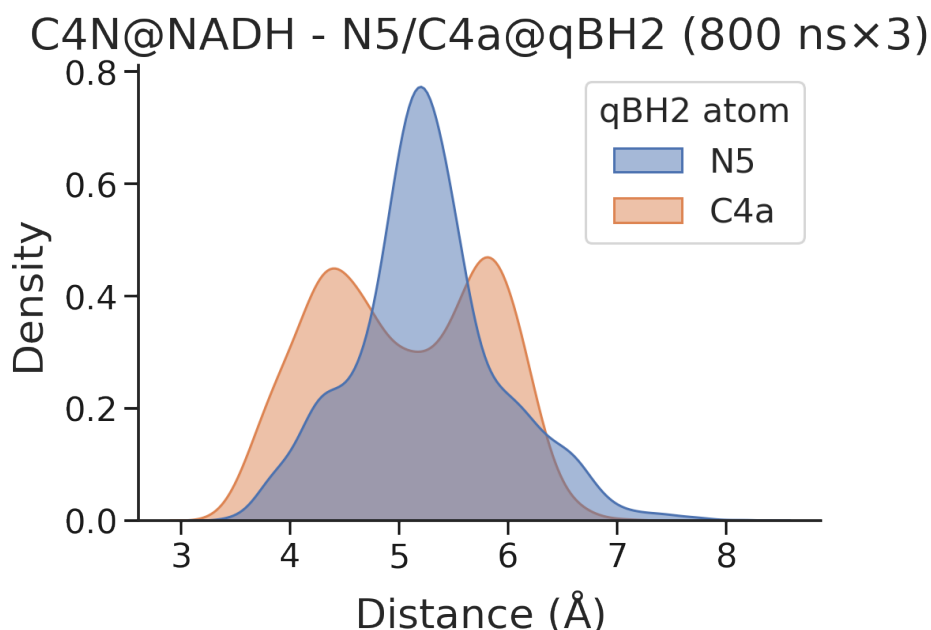
その結果が Figure 4.8 である。これを見ると、複合体において HOMO はほとんど NADH の NAM-ring 上に位置し、LUMO は  $qBH2$  の PT-ring 上に位置することが分かる。更に、LUMO の電子密度が最も高い部分は PT-ring 上の N5 原子であることも判明した。これは、C4a よりも N5 の方がヒドリドアクセプターになり得ることを示唆する。更に、NAM-ring の HOMO における *pro-S* 水素の軌道と、PT-ring の N5 節面の軌道 (下

## 4.3. 考察

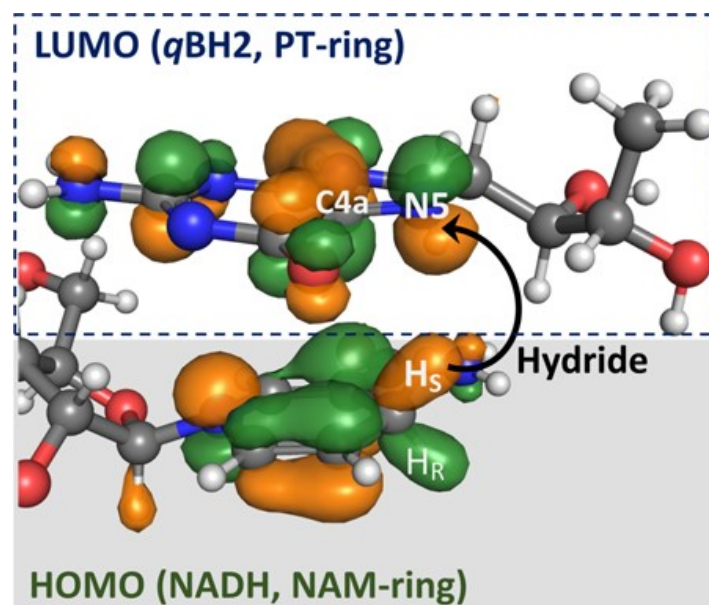
部)は同位相 (Figure 4.8 において同じ色である) となっていることから、結合を生成する可能性がより示唆される。

また、C4a=N5 結合の軌道は逆位相 (Figure 4.8 において異なる色で示した) であることから、ここは反結合性軌道であり、N5 にヒドリドが転移した際、二重結合の開裂がここで発生することも予測される。

これにより、従来の定説であった N5 がヒドリドアクセプターであるという説をより確かにすることができた。興味深いことに、N5 原子にヒドリドが転移するという機構は、NAD(P)H をヒドリドドナーとするフラビン要求性酵素におけるフラビン環へのヒドリド転移と同様である。実はこの酵素群も従来は C4a がヒドリドアクセプターと言われてきた [72] が、現在は様々な知見 [73–75] により、ヒドリドアクセプターは N5 であるという事が定説となっている。フラビンと PT-ring は共役系が全く同じ箇所があるので、今回の HOMO/LUMO 計算とも合わせて考えた際 qBH2 も N5 がヒドリドアクセプターというのはほぼ間違いないのではないかと考えている。



**Figure 4.7.** ヒドリドドナーとアクセプター候補間距離の分布。従来の定説である N5 との距離が青、N5 の隣に位置し、C=N 結合を構築している C4a との距離がオレンジである。C4N-C4a 間距離の分布ピークが 2 つ存在する原因については Figure S3 を参照。



**Figure 4.8.** *q*BH<sub>2</sub>-NADH 複合体の HOMO/LUMO。 mode B の 2 回目のプロダクションラン 312 ns のスナップショットから抽出した複合体を PM7 ハミルトニアンを用いた構造最適化により算出した。色が同じ軌道は同位相のもの、異なるものは逆位相の軌道である。Kono *et al.* (In press)[Pub.] Fig. 6 より引用。

ヒドリド転移過程については一定の結論を導き出すことができたが、その次の過程であるプロトン移動段階については

- 活性部位である Y149, K153 の変異体アッセイで ( $K_m$  が上がるため触媒効率としては落ちるものの)  $k_{cat}$  が上昇したこと (これは先行研究でも同様である [71])
- 2 残基間距離が遠いため、Tyr が Lys による  $pK_a$  低下補助をおそらく受けていない事
- 触媒四残基のうち Asn, Ser の 2 残基が非極性残基に置き換わっていること

など SDR ファミリーとしては「型破り」の要因が複数あり、解析が難しい部分である。また、*q*BH<sub>2</sub> 還元反応における律速段階は生成物の BH<sub>4</sub> リリース部分であると考えられている [71]。活性部位の変異体で  $k_{cat}$  が上昇した原因には律速段階の問題が関係していると思われる。

一方、律速段階が生成物のリリースという説は、変異体アッセイによる触媒残基や反応機構解析が難しいという要素だけではなく、QDPR の反応は分子認識過程が非常に重要であるという視点も提供する。相互作用解析と合わせて考えた際、活性部位である Y149

## 第4章 酵素-基質相互作用・反応機構解析

### 4.3. 考察

---

および K153 の役割として「分子認識への貢献」が軽視できない事を意味するのではないだろうか。とは言え、SDR ファミリーとして保存されたモチーフである以上プロトン付加段階への寄与について更なる解析も必要である。プロトンドナー - アクセプターの関係性を知るためには、酵素-基質複合体相互作用だけではなく  $pK_a$  に関する知見が欠かせない。反応中間体と活性部位の  $pK_a$  解析が今後の課題となってくるであろう。

## 第 5 章

# QDPR と葉酸代謝

### 本章の概要

本研究で得られたデータと先行研究を繋ぎ合わせることで、これまで示唆されていた QDPR と葉酸代謝の関連 (→ BH4 代謝と葉酸代謝のリンク) がより明確になったのでこれについて述べる。

## 5.1 QDPR と葉酸化合物代謝: 先行研究の整理

Section 1.1.2 で述べた通り、BH4 代謝と葉酸代謝は DHFR(-TS) や PTR1 を介して互いにリンクしている。一方で、QDPR に関しても、BH4 リサイクルのみならず葉酸代謝へも寄与している可能性は兼ねてから示唆されており [76]、それを支持する様々な報告も存在する。その中でも重要と思われる例を以下で述べていく。

### 5.1.1 THF の非酵素的分解と中間体としての qDHF

葉酸化合物が生理機能を有するにあたっては、BH4 同様テトラヒドロ型の PT-ring がカギとなるが、そのうちの 1 つ THF は不安定な物質であり、37°C 水溶液中で半減期は 30 分未満 [76] と報告されている。また、不安定な THF は非酵素的に中間体 qDHF へ酸化されるが、こちらもかなり不安定なため SC<sub>C6</sub> のところで開裂してしまい、最終的にジヒドロプテリンとホルムアルデヒド、*p*-アミノベンズイルグルタミン酸に分解してしまう

## 第5章 QDPR と葉酸代謝

### 5.2. 基質結合様式解析から見えた QDPR と葉酸代謝の関連

---

という報告 [77] が存在する。これは BH4 代謝において  $qBH_2$  が非酵素的に BH<sub>2</sub> へと互変異性化する過程とは全く異なる。 $qDHF$  の互変異性体は DHF であり、こちらは DHFR によって THF へと再還元ができるが、分解ルートを通った場合これは不可能となってしまう。

近年では、*in vitro* の実験により、QDPR, NADH 添加によって THF 濃度が長時間維持されるというデータ [78] や、DHFR の逆反応 (THF → DHF) をターゲットとした時間分解 X 線結晶構造解析において、キノノイド様中間体の構造が得られた [79] という報告がある。

#### 5.1.2 *in vivo* での解析による報告

上記では *in vitro* の話について述べたが、*in vivo* のアプローチにおいても QDPR と葉酸代謝の関連が示唆されている。当研究室 Xu らは 2014 年、*Qdpr*-KO マウスを用いて組織内の葉酸化合物濃度を定量している。この報告によると、KO マウスの肝臓では THF とその誘導体である 5-MTHF が WT と比較して有意に減少しているのに対し、酸化型である DHF に関しては有意差が見られなかった。一方、脳や腎臓ではこれら 3 種の化合物いずれも有意な変化が見られないというように、臓器ごとに異なる結果が示されている [21]。また、Zheng らのグループ (前項で THF 濃度の経時変化を報告したチーム) は、三重陰性乳癌患者由来の細胞 MDA-MB-468 を用いた *in vivo* の実験も行っており、*Qdpr*-KO により THF の分解が起こることを報告している [78]。

## 5.2 基質結合様式解析から見えた QDPR と葉酸代謝の関連

これらの先行研究から、QDPR が  $qDHF$  を基質として葉酸代謝に関与していることはほぼ確定しているように一見思えるが、欠けている重要な情報がある。 $qDHF$  を基質として用いた活性測定、そしてそこから得られる動力的なパラメータだ。逆に考えるならば、これが得られれば QDPR と葉酸代謝の関連はかなり確実なものといえることができる。

Chapter 3 にて述べた通り、MD シミュレーションをもとに推定した mode B という結合様式を裏付けるための  $qDHF$  アッセイにて、hQDPR の  $qDHF$  還元活性が明らかとなった。以下 (Table 5.1) に示すのは  $qDHF$  アッセイの結果から得られた動力的パラメータであるが、これを見ると  $qDHF$  は  $qBH_2$  ほどでは無いものの hQDPR の生理学的基質となるには十分な値を示していると考えられる。これまで述べてきた QDPR と葉酸

第 5 章 QDPR と葉酸代謝

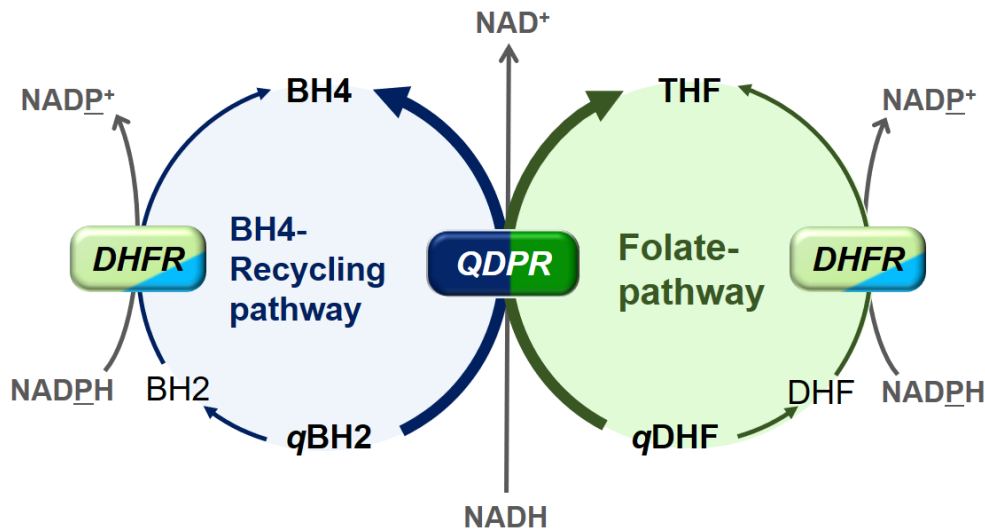
5.2. 基質結合様式解析から見えた QDPR と葉酸代謝の関連

代謝の関連をより明確にすることができた。

**Table 5.1.** *q*BH2 と *q*DHF に対する hQDPR の動力的パラメータ (Kono *et al.* (In press)[Pub.] を基に作成)。

substrate	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1}s^{-1}$ )
<i>q</i> BH2	$18.7 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.05$	$17.9 \pm 0.7$
<i>q</i> DHF	$25.2 \pm 1.5$	$9.6 \pm 0.5$	$2.6 \pm 0.3$

QDPR においても *q*DHF  $\rightarrow$  THF という反応を組み込むことで、DHFR や PTR1 と同様、Figure 5.1 のような代謝パスウェイを描くことで BH4 と葉酸代謝の関連性を可視化することが可能となったことは大きい。



**Figure 5.1.** QDPR をベースに考えた BH4/葉酸代謝の関連。Kono *et al.* (In press)[Pub.] Fig. S5 より引用。

QDPR を介した BH4 リサイクルと葉酸代謝の関連性という可能性は、生理学的な QDPR の機能理解は勿論、酵素の性質や構造といった側面からも興味深い概念である。というのも、QDPR 同様 BH4/葉酸代謝双方に寄与する DHFR と QDPR は酵素の特徴がかなり異なるのだ。例えば、QDPR は SDR ファミリーに属するのに対し、DHFR は DHFR ファミリーに所属している。また、hQDPR と hDHFR のアミノ酸配列類似性は 23.9% と低い similarity を示す。立体構造に関しても、hQDPR-NADH (PDB: 1HDR) と

## 第 5 章 QDPR と葉酸代謝

### 5.2. 基質結合様式解析から見えた QDPR と葉酸代謝の関連

---

hDHFR-NADPH 複合体 (PDB: 4M6J[80]) という、酵素-補酵素複合体という同一条件下で構造アラインメントをしたところ、 $C\alpha$ -RMSD は  $5.86 \text{ \AA}$  と類似性が低い結果となった。さらに、補酵素要求性も異なってくる。QDPR は NADH だが、DHFR は NADPH 要求性である。

このように全く性質の異なる酵素が関与する BH<sub>4</sub>/葉酸代謝のクロストークは非常に興味深い点である。この現象がどのような意味を持つのか。解明に向けては、配列解析をはじめとしたバイオインフォマティクスのアプローチに基づく分子進化解析など更なる検証が求められる。

## 第 6 章

# 結論

### 6.1 QDPR-NADH-*q*BH2 の結合様式及び相互作用等の解析

Chapter 3 および Chapter 4 のまとめに相当する。

#### 6.1.1 成果

本研究で得られた顕著な成果として以下が挙げられる。

hQDPR の結晶構造は NADH にフィットしすぎているためか、*q*BH2 が結合領域に入り込めないほど cavity が狭かったが、induced-fit docking と MD シミュレーションを組み合わせる事でこれを打開、基質の結合が可能な構造を取得できた。

上記構造をレセプターとして用いたドッキングシミュレーションにより 4 種類の結合様式を取得し、短い時間の MD シミュレーションにて短時間で起きるリガンドの配向変化観測や、より長い MD シミュレーションのトラジェクトリを用いた重原子レベルでの相互作用解析を行った。その結果、これまで結論が出ていなかった結合様式について mode B という見解を示すことができた。これは *in vitro* の結果とも矛盾ないものであった。

また、mode B について、残基レベルよりも詳細な重原子レベル相互作用解析により、QDPR 特有の相互作用を明らかにした。特に Tyr-(Xaa)<sub>3</sub>-Lys モチーフの Lys 残基末端の窒素原子 N $\zeta$  が基質のヘテロ原子である O4 や N3 と高頻度で相互作用するという点はユニークな性質であり興味深い要素である。通常の SDR ファミリーにおいて活性部位モチーフの Lys 残基は Tyr の pK<sub>a</sub> を低下させるといった役割があり、基質との相互作用を

## 第6章 結論

### 6.1. QDPR-NADH-QBH2 の結合様式及び相互作用等の解析

---

しない。尚、変異体アッセイによる確認も行ったところ、K153I 変異体は *q*BH2 に対する  $K_m$  が大きく上昇した。これにより、シミュレーションによる相互作用解析結果の妥当性が示された。

更に、基質結合前後の構造比較により、基質の結合に伴う構造変化についても解析した。その結果、hQDPR は他の SDR ファミリー同様の位置に substrate-binding loop を持つ一方で、その更に N 末端側も大きく構造変化する領域が存在している事、特に  $\beta_D$  と  $\alpha_E$  の間に位置するループである  $lo_{DE}$  の変化が大きく、ここは substrate-binding loop と共に基質結合時の closed コンフォメーション形成に寄与している事を明らかにした。 $lo_{DE}$  は、QDPR において第二の substrate-binding loop ではないかと考えている。また、前述した K153 と基質の相互作用について、 $\alpha_F$  のコンフォメーション変化が関与していることを見出した。

反応機構については、水素同位体置換による先行研究 [33, 66] で有力とされていたものの、確定するには違う角度からのエビデンスが必要と考えた「N5 原子がヒドリドアクセプターである」という点について、これまで行われていなかった *q*BH2-NADH 複合体の HOMO/LUMO 解析を実行し、その妥当性を確認できた。興味深いことに、フラビン系化合物を補酵素とする酵素群におけるフラビン化合物のヒドリドアクセプターと同様の結果となり、先行研究でも指摘されていた QDPR とフラビン系酵素群との関係性 [30] をより支持する結果となった。

尚、酵素反応における活性部位のモチーフ (Y149, K153) の役割としては、プロトンアクセプター候補との高頻度相互作用や変異体アッセイの結果から、基質や反応中間体の安定性への貢献度が高いと考えている。

上記解析結果や考察を今後どのように生かすかといった展望としては、以下が考えられる。

- QDPR の変異によっておこる高フェニルアラニン血症などのメカニズムを構造から理解する。QDPR 欠損症は、どこに変異が入るかで重症度、治療法のひとつである BH4 製剤投与に対する応答性に違いがある。基本的には、NADH 結合領域に変異が入った場合においては重症で *q*BH2 結合領域と思われるところだと軽症という傾向がみられる [10]。反応が NADH 要求性であり、第一段階が NAM-ring からのヒドリド転移であることから妥当な傾向であるが、一部の変異はこれらの考えのみでは説明が難しい部分も存在する。基質結合に伴うコンフォメーションへの影響や *q*DHF との相互作用といった点を踏まえることで、これまでより明確に

変異箇所と症状の関連が考察できるのではないか。

- 阻害剤開発/創薬への応用に繋げる

- これまで BH4 や葉酸代謝をターゲットとした創薬、特にリーシュマニア病などの熱帯病治療薬の開発を目的として、DHFR-TS や PTR1 の阻害剤が盛んに開発されていること・その背景の 1 つとして両酵素とも酵素-基質複合体の立体構造が明らかになっており、構造生物学的見地からの阻害剤設計が行いやすい点は [Chapter 1](#) にて言及した。
- 本研究で解析した酵素-基質複合体の立体構造や相互作用は、これら阻害剤の開発にあたり選択性の向上などにおいて一定の有用性を持つ可能性がある。特に PTR1 に関しては、QDPR と同一ファミリーであり、ビオプテリン類や葉酸系化合物といったプテリジン化合物を基質とする点で類似している。このとき、NAM-ring の上に PT-ring がスタッキングするといった性質を持つ。また、立体構造も (全残基をカバーしていないアラインメントとは言え QDPR の 75% ほどはカバーしている) 3 Å 未満と比較的近い。特に、SDR ファミリーとしての Active site である Tyr-(Xaa)<sub>3</sub>-Lys モチーフのコンフォメーションはよく重なっている [Figure 1.8](#)。その一方で、PTR1 の基質結合様式は mode C であり QDPR とは異なる。また、QDPR はホモダイマーなのに対し、PTR1 はホモテトラマーであるなどの違いも存在する。この違いを考えると、QDPR が PTR1 阻害剤のオフターゲットになる可能性や PTR1 選択的阻害剤開発への寄与具合は決して高くない可能性もあるだろう。しかしながら、ここに関しての検証は QDPR の構造生物学的知見の不足もありこれまで行われていない。前述の通り Active site など一定の類似性を有することもあり、PTR1 阻害剤の QDPR に対する親和性検証の価値はあると考えている。創薬とは逸れてしまいが、少なくとも、特性が近い 2 酵素が共存するというトリパノソーマ科の独特な BH4/葉酸代謝の生理学的な意味合い・PTR1 の存在意義などの理解には繋がるのではないだろうか。
- また、よりシンプルな話として、QDPR の阻害剤そのものを設計し、薬剤として実用化することが展望として考えられる。これに関してはまず [Chapter 1](#) にて述べた BH4 過多による疼痛 [12] への対応といった面での応用を想定している。上述の熱帯病治療薬については、原因となる原虫特有の酵素である PTR1 選択的阻害剤の方が有用ではないかと考えているが、疼痛コントロールであれば過剰な BH4 を抑える必要が考えられる。その点で、BH4 濃度維持に関わる QDPR も創薬ターゲットになり得るのではないだろうか。

#### 6.1.2 課題点とその解決案

一方、今回提唱した複合体構造やその過程での MD シミュレーションにおいて、ヒドリドドナーの水素が結合している NADH の C4 原子と、アクセプターとされる qBH2 の N5 原子が遠いこと (特にシミュレーション後半で遠ざかってしまう傾向がある) は課題である。相互作用解析における PT-ring と NAM-ring 構成原子の相互作用を見るに「スタッキングの平行性の問題」により、N5 原子側が NAM-ring から遠ざかってしまう傾向が見られた。

この問題を解決するためには、量子力学計算の活用が有用と考えている。PT-ring と NAM-ring の相互作用は  $\pi$ - $\pi$  スタッキングが基本となる (ただし PT-ring のうち側鎖側の環は芳香環ではないため、スタッキングのためには一部  $\pi$ - $\sigma$  相互作用が関係してくる。\* 通常  $\pi$ - $\sigma$  スタッキングは垂直になるが、リゾチームなど基質と残基の  $\pi$ - $\sigma$  平行スタッキングが見られるケースもある [40])。古典力学に基づいた MD シミュレーションの場合、このスタッキングは疎水性相互作用やクーロン力などに基づいて疑似的に形成されているが、 $\pi$  電子についてきちんと考慮する場合はやはり量子力学計算を行うべきだろう。全原子について高精度な量子力学計算を行うことは計算コストの面からも現実的ではないので、以下のいずれかを行うことが必要と考えている。

- HOMO/LUMO 計算に用いた半経験的分子軌道法ツールの MOPAC にある、生体分子用の計算オプション "MOZYME" を用いた計算 (全原子を対象としているが半経験的分子軌道法を使い、コストダウンを図る)
- 活性部位付近のみ量子力学 (QM) 計算の対象とし、それ以外の領域は通常分子力学 (Molecular Mechanics, MM) 計算を行う手法である QM/MM 法
- 計算する分子について、全原子ではなく、アミノ酸残基単位などフラグメント毎に分子軌道計算を行うフラグメント分子軌道法 (Fragment Molecular Orbital Method, FMO 法)

また、反応機構に関しては、ヒドリド転移以降のプロトン移動段階について更に解析していく必要がある。化学的に考えると、ヒドリド転移後の電子移動パターンは負電荷が PT-ring の O4 に行くか N3 に行くかどちらかであり、どちらのパターンを取るかでドナー候補も変わってくる。レセプター-リガンド相互作用をベースにして考えると、Figure 6.1 のような機構が考えられる。ここからパターンを絞り込むには  $pK_a$  の予測や

## 第6章 結論

### 6.1. QDPR-NADH-QBH2 の結合様式及び相互作用等の解析

分子軌道法による反応経路計算などを行うことが必要だと考えている。

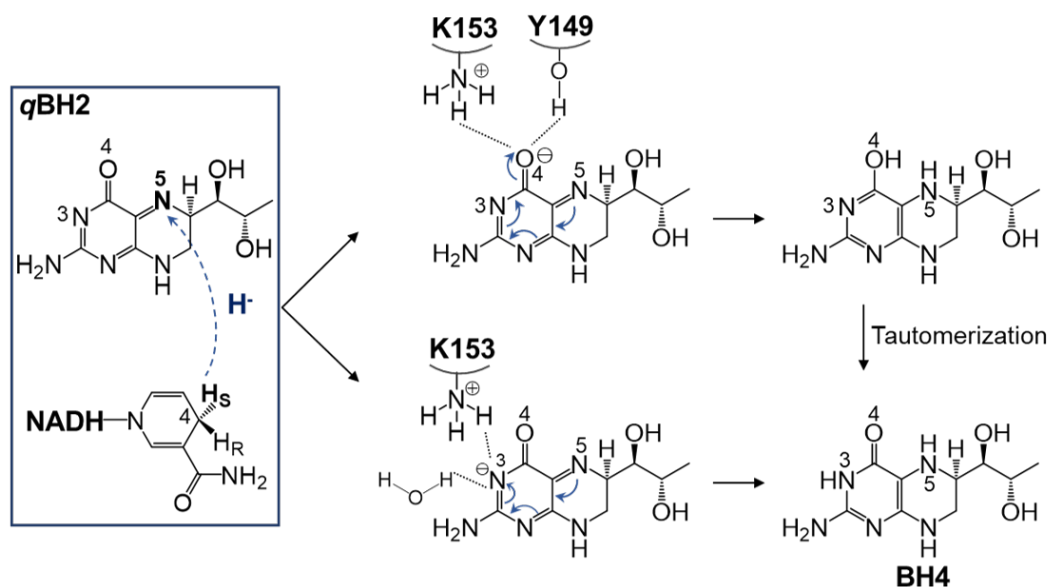


Figure 6.1. 推定反応機構パターン。

その他、本研究では酵素-基質複合体について結合自由エネルギーの定量化まで行うことができなかった。MM-PBSA あるいはフラグメント分子軌道法計算で求められるフラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) の算出にて、で各アミノ酸残基の相互作用への寄与を定量化するなどが今後求められるだろう。

そして、更なる疑問点として残るのは、狭いクレフトが広がって基質を受け入れる具体的なプロセスである。本研究において、SDR ファミリーにおいてコンフォメーション変化を引き起こす substrate-binding loop 以外の領域も hQDPR ではよく動いていることが示された。しかし、hQDPR-NADH 複合体がどのようにしてドラスティックなコンフォメーション変化を起こすのかは未解明である。今回は induced-fit docking と MD シミュレーションを組み合わせた構造最適化によってクレフトを広げたが、hQDPR-NADH 複合体の MD シミュレーション中において最適化構造に近い状態、あるいは異なるコンフォメーションではあるものの基質結合が可能な状態のトラジェクトリは得られなかった。今後はリガンドに対しクレフト方向に力を掛けながら MD シミュレーションを行うなどサンプリングを工夫した MD シミュレーションにより、過剰とも言えるほど NADH にフィットした状態のクレフトが開き、基質が結合する過程について明らかになることが期待される。

## 6.2 QDPR と葉酸代謝の関連解析:

### 6.2.1 成果

Chapter 1 や Chapter 5 で述べた通り、DHFR (DHFR-TS の DHFR ドメイン) や PTR1 といった酵素はそれぞれ DHF、BP/BH<sub>2</sub> を本来の基質とする一方、互いの基質についても還元反応が行えることが明らかとなっていた。

一方、QDPR もまた、*q*DHF を基質として THF へ還元することで葉酸代謝に寄与している可能性が示唆されていた。本研究では、QDPR-NADH-*q*BH<sub>2</sub> 複合体の基質結合様式解析過程で行った *q*DHF を基質とした活性測定結果に基づき動力的パラメータを算出したところ、QDPR が *q*DHF を生理学的基質としている可能性を定量的に示すことができた。

これにより、Chapter 5 で示した通り、PTR1 や DHFR 同様生体内における QDPR の BH<sub>4</sub>/葉酸代謝双方における寄与をスキームとして示すことができた。そして、QDPR の生理学的重要性 (QDPR 欠損がもたらす影響) を以下のように説明できる。

- BH<sub>4</sub> 代謝の場合は、リサイクル経路における DHFR の寄与が少ない (特にヒト) ため、BH<sub>4</sub> リサイクル量が落ちることで細胞内濃度減少を招く
- 葉酸代謝の場合は、*q*DHF が即座に還元され THF とならない場合、*q*DHF が PT-ring と SC<sub>C6</sub> に開裂してしまうパターンがある。こうなると DHFR によるリカバリーは不可能となり、THF やその誘導体が減少する

また、得られた知見を基に、BH<sub>4</sub>/葉酸代謝双方に寄与する QDPR、DHFR について性質を比較し、全く異なる性質の酵素同士が同じ代謝経路を担っている興味深い点について述べた。

今後の展望としては、QDPR 欠損症特有の症状についてのメカニズム解明に繋がること期待されるほか、QDPR が葉酸代謝に寄与することを動力的パラメータ算出によって定量的に示すことができたため、葉酸代謝をターゲットとした創薬にも QDPR 阻害剤が応用できる可能性も考えられる。QDPR を創薬ターゲット酵素とする場合、その独特な結合様式を鑑みると DHFR がオフターゲットになる可能性も低く、副作用低減も期待できると考えている。

### 6.2.2 課題・解決案

今回 QDPR-NADH-*q*DHF 複合体構造を得るところまでは行えなかった。mode B の可能性が高いが、SC<sub>C6</sub> のコンフォメーションが結合時にどうなっているか、また、大きな基質に対する QDPR の挙動について理解するには、QDPR-NADH-*q*DHF の複合体についてもシミュレーションを行い結合様式解析をする必要がある。

更に、留意すべき点としては、DHFR が生物種ごとに活性や構造など違いが大きい事 (*Qdpr-KO* マウスで BH4 濃度が比較的維持される [21] 一方、ヒトの場合は欠損の影響が大きい。BH4 の減少で高フェニルアラニン血症などが引き起こされる。)、臓器ごとの細胞内環境の違いなどによって、BH4 と葉酸代謝の寄与も生物種間や臓器間で差があるかもしれないという点だ。*in vivo* がマウスやがん細胞での報告なので、生物種や細胞内環境の違いに留意する必要がある。今後ピオプテリン代謝と葉酸化合物代謝の関連を明らかにする上で、これら要因を考慮し更に解析を進める必要がある。例えば THF の分解生成物のでき方が細胞内環境によって差がある可能性もあるため、臓器ごとに QDPR の葉酸代謝への貢献度は違うかもしれない。代謝産物や分解生成物を網羅的に測定するなど、今後更に研究が進展していくことを期待する。

## 6.3 *in silico* 解析結果と *in vitro* データの比較

基質結合のためにダイナミックな構造変化を必要としたことや独特な相互作用などが得られた本研究では、MD シミュレーションを複数回行ってダイナミクス傾向を確認しているのみならず、シミュレーションにて得られた結果から仮説を立て実験系を構築し、*in vitro* の実験にて仮説を検証するというプロセスも生じた (実験部分については全て当研究室の原が行った)。

基質結合様式の解析においては、MD シミュレーションを基にしたコンタクトマップにて Y149, K153, NADH と基質との相互作用を比較し、mode A よりも mode B が妥当な結合様式であるという見解に至った。そしてこれを裏付けるためにレセプターの cavity に注目し、*q*BH2 より SC<sub>C6</sub> がかさ高い *q*DHF の PT-ring が活性部位に留まるためには mode B で結合必要があるため、活性測定を行い還元活性が見られれば mode B の妥当性をより示すことができるという見立てを行った。

## 第6章 結論

### 6.3. *IN SILICO* 解析結果と *IN VITRO* データの比較

---

また、K153の変異体アッセイにおいて、Gln変異体は先行研究でも設計されており、これはLys残基がTyr残基の $pK_a$ を下げるといった役割が行えなくなる事を意図した変異設計である(今回はK153Iとの比較や先行研究とのアッセイ系の違いから改めてK153Qのアッセイも行っている)。

本研究ではMDシミュレーションで得られたトラジェクトリを用いた相互作用解析結果に基づき、K153の役割は従来考えられていたような、あるいは通常のSDRファミリー酵素群のようなTyrの $pK_a$ 低下という「後方支援」ではなく、リガンドとの静電的な相互作用にあると考えた。これを裏付けるため、末端がアミドであるGlnではなく「リガンドのヘテロ原子との相互作用能」を失わせる意図でLysと比較的サイズが近く、非極性残基であるIle変異体、K153Iを初めて設計した。

いずれのアッセイについても、シミュレーション結果と実験結果が矛盾しなかったことから、本研究で行った計算には一定の信頼性があると考えている。また、前述した通り「シミュレーションの結果から仮説を立て実験系を構築し、裏付けを行う」という過程により結果の信頼度の向上を計ることができた。

この様に、分子シミュレーションを中心としながらも、必要に応じて実験的アプローチを取り入れることは共同研究が基本となる生命科学分野では(計算機の性能向上やオープンソースソフトウェアの発展により、実験をメインとする研究者が計算を取り入れることも含め)近年では決して珍しくないかもしれないが、本研究を通し、実験的解析のみでは解明が難しい研究対象へこのようなアプローチを適用することの有効性を改めて示すことができたと考えている。

# 参考文献

## 公表論文

Pub. Kono, H., Hara, S., Furuta, T. & Ichinose, H. Binding profile of *quinonoid*-dihydrobiopterin to *quinonoid*-dihydropteridine reductase examined by *in silico* and *in vitro* analyses. en. *The Journal of Biochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvad062> (In press) (cit. on pp. 14, 38–40, 42, 48, 49, 58, 64, 68, 89).

## その他参考文献

1. Nagatsu, T. & Nagatsu, I. Tyrosine hydroxylase (TH), its cofactor tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), other catecholamine-related enzymes, and their human genes in relation to the drug and gene therapies of Parkinson's disease (PD): historical overview and future prospects. en. *Journal of Neural Transmission* **123**, 1255–1278. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-016-1596-4> (2016) (cit. on p. 1).
2. Kaufman, S. THE STRUCTURE OF THE PHENYLALANINE-HYDROXYLATION COFACTOR. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **50**, 1085–1093. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.50.6.1085> (1963) (cit. on p. 1).
3. Lovenberg, W., Jequier, E. & Sjoerdsma, A. Tryptophan Hydroxylation: Measurement in Pineal Gland, Brainstem, and Carcinoid Tumor. en. *Science* **155**,

- 217–219. <http://dx.doi.org/10.1126/science.155.3759.217> (1967) (cit. on p. 1).
4. Marletta, M. Nitric oxide synthase structure and mechanism. en. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12231–12234. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31375-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31375-9) (1993) (cit. on p. 1).
5. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. en. *Nature* **327**, 524–526. <http://dx.doi.org/10.1038/327524a0> (1987) (cit. on p. 1).
6. Hibbs Jr., J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. & Rachlin, E. M. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. en. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **157**, 87–94. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80015-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80015-9) (1988) (cit. on p. 1).
7. Watschinger, K. *et al.* Identification of the gene encoding alkylglycerol monooxygenase defines a third class of tetrahydrobiopterin-dependent enzymes. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 13672–13677. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1002404107> (2010) (cit. on p. 1).
8. Mandal, A., Wang, Y., Ernsberger, P. & Kester, M. Interleukin-1-induced Ether-linked Diglycerides Inhibit Calcium-insensitive Protein Kinase C Isotypes. en. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20306–20311. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.32.20306> (1997) (cit. on p. 1).
9. Gorgas, K., Teigler, A., Komljenovic, D. & Just, W. W. The ether lipid-deficient mouse: Tracking down plasmalogen functions. en. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**, 1511–1526. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.038> (2006) (cit. on p. 1).
10. Dianzani, I. *et al.* Dihydropteridine reductase deficiency: physical structure of the QDPR gene, identification of two new mutations and genotype-phenotype correlations. *Human mutation* **12**, 267–73. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:4%3C267::AID-HUMU8%3E3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:4%3C267::AID-HUMU8%3E3.0.CO;2-C) (1998) (cit. on pp. 2, 71).

11. Ponzzone, A., Spada, M., Ferraris, S., Dianzani, I. & de Sanctis, L. Dihydropteridine reductase deficiency in man: From biology to treatment. en. *Medicinal Research Reviews* **24**, 127–150. <http://dx.doi.org/10.1002/med.10055> (2004) (cit. on pp. 2, 6).
12. Arai, H. *et al.* Peripheral tetrahydrobiopterin is involved in the pathogenesis of mechanical hypersensitivity in a rodent postsurgical pain model. en. *Pain* **161**, 2520–2531. <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001946> (2020) (cit. on pp. 2, 72).
13. SUGIMOTO, T., MURATA, S., MATSUURA, S. & NAGATSU, T. Chemistry and biological function of biopterin cofactor and related compounds. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan* **46**, 564–573. <http://dx.doi.org/10.5059/yukigoseikyokaiishi.46.564> (1988) (cit. on p. 2).
14. Chen, C. *et al.* Structural insights into the dual substrate specificities of mammalian and *Dictyostelium* dihydropteridine reductases toward two stereoisomers of quinonoid dihydrobiopterin. en. *FEBS Letters* **585**, 2640–2646. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.018> (2011) (cit. on pp. 2, 12, 13, 18, 38, 46, 49).
15. Kennedy, D. B. Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. en. *Nutrients* **8**, 68. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8020068> (2016) (cit. on p. 3).
16. Gourley, D. G. *et al.* Pteridine reductase mechanism correlates pterin metabolism with drug resistance in trypanosomatid parasites. *Nature structural biology* **8**, 521–5. <http://dx.doi.org/10.1038/88584> (2001) (cit. on pp. 4, 5, 14, 57).
17. Vickers, T. J. & Beverley, S. M. Folate metabolic pathways in *Leishmania*. en. *Essays in Biochemistry* **51** (ed Docampo, R.) 63–80. <http://dx.doi.org/10.1042/bse0510063> (2011) (cit. on p. 5).
18. Dello Iacono, L., Di Pisa, F. & Mangani, S. Crystal structure of the ternary complex of *Leishmania major* pteridine reductase 1 with the cofactor NADP<sup>+</sup>/NADPH and the substrate folic acid. *Acta Crystallograph-*

- ica Section F Structural Biology Communications* **78**, 170–176. <http://dx.doi.org/10.1107/S2053230X22002795> (2022) (cit. on p. 5).
19. Tassone, G. *et al.* Evidence of Pyrimethamine and Cycloguanil Analogues as Dual Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Pteridine Reductase and Dihydrofolate Reductase. en. *Pharmaceuticals* **14**, 636. <http://dx.doi.org/10.3390/ph14070636> (2021) (cit. on p. 5).
20. Banka, S. *et al.* Identification and Characterization of an Inborn Error of Metabolism Caused by Dihydrofolate Reductase Deficiency. en. *The American Journal of Human Genetics* **88**, 216–225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.01.004> (2011) (cit. on p. 6).
21. Xu, F. *et al.* Disturbed biopterin and folate metabolism in the *Qdpr*-deficient mouse. en. *FEBS Letters* **588**, 3924–3931. <http://dx.doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.09.004> (2014) (cit. on pp. 7, 67, 76).
22. Whitsett, J. *et al.* Human endothelial dihydrofolate reductase low activity limits vascular tetrahydrobiopterin recycling. en. *Free Radical Biology and Medicine* **63**, 143–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.035> (2013) (cit. on p. 7).
23. Varughese, K. I., Xuong, N. H., Kiefer, P. M., Matthews, D. A. & Whiteley, J. M. Structural and mechanistic characteristics of dihydropteridine reductase: a member of the Tyr-(Xaa)<sup>3</sup>-Lys-containing family of reductases and dehydrogenases. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 5582–5586. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.12.5582> (1994) (cit. on pp. 8, 58).
24. Luba, J. *et al.* *Leishmania major* Pteridine Reductase 1 Belongs to the Short Chain Dehydrogenase Family: Stereochemical and Kinetic Evidence. en. *Biochemistry* **37**, 4093–4104. <http://dx.doi.org/10.1021/bi972693a> (1998) (cit. on p. 8).
25. Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B. & Oppermann, U. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. en. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**. <http://dx.doi.org/10.1007/S00018-008-8588-Y> (2008) (cit. on pp. 8, 9, 46).

26. TANAKA, N. Structure and Function of the enzymes belonging to the SDR(Short-chain Dehydrogenase/Reductase) Family. *Nihon Kessho Gakkaishi* **38**, 235–243. <http://dx.doi.org/10.5940/jcrsj.38.235> (1996) (cit. on p. 8).
27. Filling, C. *et al.* Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases. en. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25677–25684. <http://dx.doi.org/10.1074/JBC.M202160200> (2002) (cit. on pp. 8, 9, 57).
28. Su, Y. *et al.* The crystallographic structure of a human dihydropteridine reductase NADH binary complex expressed in *Escherichia coli* by a cDNA constructed from its rat homologue. en. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 26836–26841. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)74187-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74187-8) (1993) (cit. on pp. 8, 12, 34).
29. Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**, 539–539 (2014) (cit. on p. 10).
30. Varughese, K. I., Skinner, M. M., Whiteley, J. M., Matthews, D. A. & Xuong, N. H. Crystal structure of rat liver dihydropteridine reductase. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 6080–6084. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.13.6080> (1992) (cit. on pp. 11–13, 38, 46, 71).
31. Robinson, D. & Fairlamb, A. *Crystal structure of Quinonoid dihydropteridine reductase from Leishmania major* 2022. <http://dx.doi.org/10.2210/pdb8B5T/pdb> (cit. on p. 11).
32. Robinson, D. & Fairlamb, A. *Crystal structure of Quinonoid dihydropteridine reductase from Leishmania donovani* 2022. <http://dx.doi.org/10.2210/pdb8B5U/pdb> (cit. on p. 11).
33. Armarego, W. L. Hydrogen transfer from 4-R and 4-S (4-3H) NADH in the reduction of d,l-cis-6,7-dimethyl-6,7(8H)-dihydropterin with dihydropteridine reductase from human liver and sheep liver. en. *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications* **89**, 246–249. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)90970-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(79)90970-7) (1979) (cit. on pp. 12, 51, 62, 71).
34. Krissinel, E., Henrick, K. & IUCr. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **60**, 2256–2268. <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444904026460> (2004) (cit. on p. 15).
35. Hernandez-Santoyo, A., Yair, A., Altuzar, V., Vivanco-Cid, H. & Mendoza-Barrer, C. in *Protein Engineering - Technology and Application* (InTech, 2013). <http://dx.doi.org/10.5772/56376> (cit. on p. 18).
36. Matsui, M., Kono, H. & Ogata, M. Molecular Design and Synthesis of a Novel Substrate for Assaying Lysozyme Activity. en. *Journal of Applied Glycoscience* **65**, 31–36. [http://dx.doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2018\\_003](http://dx.doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2018_003) (2018) (cit. on pp. 18, 23).
37. Ramakrishnan, C. *et al.* Identification of type I and type II inhibitors of c-Yes kinase using *in silico* and experimental techniques. en. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **36**, 1566–1576. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2017.1329098> (2017) (cit. on p. 18).
38. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. en. *Journal of Computational Chemistry*, NA–NA. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334> (2009) (cit. on pp. 20, 23, 34, 35).
39. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F. & Forli, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. en. *Journal of Chemical Information and Modeling* **61**, 3891–3898. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203> (2021) (cit. on pp. 23, 35).
40. Ogata, M. *et al.* A novel analytical procedure for assaying lysozyme activity using an end-blocked chitotetraose derivative as substrate. en. *Analytical Biochemistry* **538**, 64–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.09.015> (2017) (cit. on pp. 23, 73).

41. Hanwell, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. en. *Journal of Cheminformatics* **4**. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-4-17> (2012) (cit. on pp. 24, 34).
42. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. en. *Journal of Computational Chemistry* **30**, 2785–2791. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256> (2009) (cit. on pp. 25, 34).
43. Kamiya, N., Higo, J.-i., Fukunishi, Y. & Nakamura, H. *Computational Protein Science: Basic Theories and Medicinal Applications* (KYORITSU SHUPPAN CO., LTD., 2009) (cit. on p. 25).
44. Case, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. en. *Journal of Computational Chemistry* **26**, 1668–1688. <http://dx.doi.org/10.1002/JCC.20290> (2005) (cit. on pp. 27, 36).
45. Tian, C. *et al.* ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. en. *Journal of Chemical Theory and Computation* **16**, 528–552. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591> (2019) (cit. on p. 28).
46. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. en. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1157–1174. <http://dx.doi.org/10.1002/JCC.20035> (2004) (cit. on pp. 28, 36).
47. Izadi, S., Anandakrishnan, R. & Onufriev, A. V. Building Water Models: A Different Approach. en. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **5**, 3863–3871. <http://dx.doi.org/10.1021/jz501780a> (2014) (cit. on pp. 28, 35).
48. Stewart, J. J. P. *et al.* MOPAC2016 version 22.0.6. 2022. <http://openmopac.net/> (cit. on p. 31).
49. Baker, J. An algorithm for the location of transition states. en. *Journal of Computational Chemistry* **7**, 385–395. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540070402> (1986) (cit. on pp. 32, 52).
50. Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **17**,

- 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6%3C490::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6%3C490::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-P) (1996) (cit. on p. 34).
51. Gasteiger, J. & Marsili, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. en. *Tetrahedron Letters* **19**, 3181–3184. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)94977-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(01)94977-9) (1978) (cit. on p. 34).
52. Case, D. *et al.* *AMBER 2018, University of California, San Francisco*. 2018 (cit. on p. 35).
53. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. en. *The Journal of Chemical Physics* **79**, 926–935. <http://dx.doi.org/10.1063/1.445869> (1983) (cit. on p. 35).
54. Case, D. A. *et al.* *AMBER 2020 version 20 update 8*. 2020 (cit. on pp. 35, 36).
55. Jakalian, A., Jack, D. B. & Bayly, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. en. *Journal of Computational Chemistry* **23**, 1623–1641. <http://dx.doi.org/10.1002/JCC.10128> (2002) (cit. on p. 36).
56. Case, D. A. *et al.* *Amber 2021 version 21*. 2021 (cit. on p. 36).
57. Roe, D. R. & Cheatham III, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. en. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9**, 3084–3095. <http://dx.doi.org/10.1021/ct400341p> (2013) (cit. on p. 36).
58. Nguyen, H., Roe, D. R., Swails, J. & Case, D. A. *PYTRAJ: Interactive data analysis for molecular dynamics simulations* version 3.0.3. 2016 (cit. on p. 36).
59. Nguyen, H., Case, D. A. & Rose, A. S. NGLview-interactive molecular graphics for Jupyter notebooks. *Bioinformatics (Oxford, England)* **34**, 1241–1242. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx789> (2018) (cit. on p. 36).
60. Kaufman, S. The Nature of the Primary Oxidation Product Formed from Tetrahydropteridines during Phenylalanine Hydroxylation. en. *Journal of Biological*

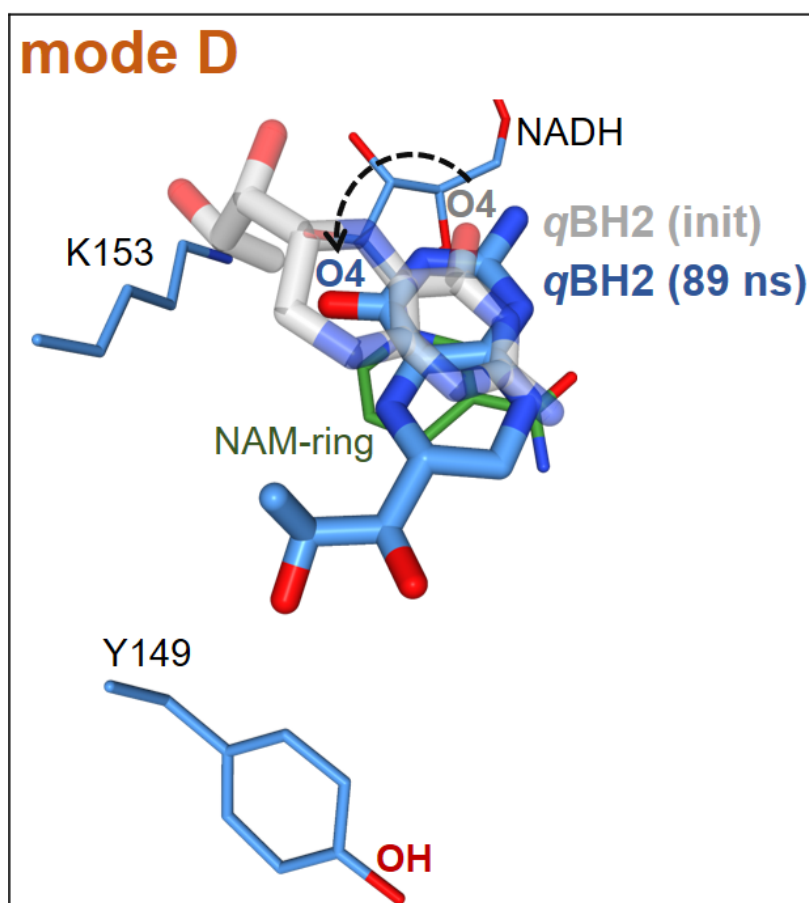
- Chemistry* **236**, 804–810. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64312-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64312-1) (1961) (cit. on p. 36).
61. Nielsen, K. H., Simonsen, V. & Lind, K. E. Dihydropteridine Reductase. A Method for the Measurement of Activity, and Investigations of the Specificity for NADH and NADPH. en. *European Journal of Biochemistry* **9**, 497–502. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00636.x> (1969) (cit. on p. 37).
62. Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. en. *"Protein Engineering, Design and Selection"* **8**, 127–134. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/8.2.127> (1995) (cit. on p. 39).
63. Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. en. *Journal of Chemical Information and Modeling* **51**, 2778–2786. <http://dx.doi.org/10.1021/ci200227u> (2011) (cit. on p. 39).
64. You, K.-S. & Oppenheimer, N. J. Stereospecificity for Nicotinamide Nucleotides in Enzymatic and Chemical Hydride Transfer Reaction. en. *Critical Reviews in Biochemistry* **17**, 313–451. <http://dx.doi.org/10.3109/10409238509113625> (1985) (cit. on p. 51).
65. Toseland, C. P., McSparron, H. M. & Flower, D. R. DSD - An integrated, web-accessible database of Dehydrogenase Enzyme Stereospecificities. en. *BMC Bioinformatics* **6**. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-6-283> (2005) (cit. on p. 51).
66. Armarego, W. L. F., Randles, D. & Taguchi, H.  $K_m$  and  $k_{cat}$  values for [6,6,7,7- $^2H$ ]7,8(6H)-dihydropterin and 2,6-diamino-5-iminopyrimidin-4-one with dihydropteridine reductase. en. *Biochemical Journal* **211**, 357–361. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2110357> (1983) (cit. on pp. 51, 62, 71).
67. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters.

- en. *Journal of Molecular Modeling* **19**, 1–32. <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x> (2013) (cit. on p. 52).
68. Klamt, A. & Schüürmann, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. en. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 799–805. <http://dx.doi.org/10.1039/P29930000799> (1993) (cit. on p. 52).
69. Tanaka, N. *et al.* Crystal Structures of the Binary and Ternary Complexes of 7 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Escherichia coli*. en. *Biochemistry* **35**, 7715–7730. <http://dx.doi.org/10.1021/bi951904d> (1996) (cit. on pp. 54, 57, 61).
70. Zhang, H.-P., Yang, N. & Armarego, W. L. F. In vitro Mutagenesis of Human Dihydropteridine Reductase at the Active Site and at Altered Sites Found in the Reductases of Deficient Children. en. *pteridines* **7**, 123–136. <http://dx.doi.org/10.1515/pteridines.1996.7.4.123> (1996) (cit. on p. 58).
71. Kiefer, P. M., Grimshaw, C. E. & Whiteley, J. M. The Comparative Interaction of Quinonoid (6R)-Dihydrobiopterin and an Alternative Dihydropterin Substrate with Wild-Type and Mutant Rat Dihydropteridine Reductases. en. *Biochemistry* **36**, 9438–9445. <http://dx.doi.org/10.1021/BI970585I> (1997) (cit. on pp. 60, 64).
72. Beaupre, B. A. & Moran, G. R. N5 Is the New C4a: Biochemical Functionalization of Reduced Flavins at the N5 Position. *Frontiers in Molecular Biosciences* **7**. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2020.598912> (2020) (cit. on p. 63).
73. Karplus, P. & Schulz, G. E. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2Å resolution. en. *Journal of Molecular Biology* **210**, 163–180. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90298-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(89)90298-2) (1989) (cit. on p. 63).
74. Johannissen, L. O., Hay, S. & Scrutton, N. S. Nuclear quantum tunnelling in enzymatic reactions - an enzymologist's perspective. en. *Physical Chemistry Chem-*

- ical Physics* **17**, 30775–30782. <http://dx.doi.org/10.1039/c5cp00614g> (2015) (cit. on p. 63).
75. Yoneda, K., Sakuraba, H., Araki, T. & Ohshima, T. Stereospecificity of hydride transfer and molecular docking in FMN-dependent NADH-indigo reductase of *Bacillus smithii*. en. *FEBS Open Bio* **11** (ed Soares, C.) 1981–1986. <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.13200> (2021) (cit. on p. 63).
76. Pollock, R. J. & Kaufman, S. DIHYDROPTERIDINE REDUCTASE MAY FUNCTION IN TETRAHYDROFOLATE METABOLISM. en. *Journal of Neurochemistry* **31**, 115–123. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb12439.x> (1978) (cit. on p. 66).
77. Reed, L. S. & Archer, M. C. Oxidation of tetrahydrofolic acid by air. en. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**, 801–805. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60230a044> (1980) (cit. on p. 67).
78. Zheng, Y. *et al.* Mitochondrial One-Carbon Pathway Supports Cytosolic Folate Integrity in Cancer Cells. en. *Cell* **175**, 1546–1560.e17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.041> (2018) (cit. on p. 67).
79. Cao, H. & Skolnick, J. Time-resolved x-ray crystallography capture of a slow reaction tetrahydrofolate intermediate. en. *Structural Dynamics* **6**. <http://dx.doi.org/10.1063/1.5086436> (2019) (cit. on p. 67).
80. Bhabha, G. *et al.* Divergent evolution of protein conformational dynamics in dihydrofolate reductase. en. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**, 1243–1249. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2676> (2013) (cit. on p. 69).

# 付録

## 補足図表



**Figure S1.** mode D の配向変化。100 ns の MD シミュレーションを 3 回行った際、1st run でこの mode B への変化現象が見られた。残り 2 回では決まった傾向のダイナミクスは見られなかったが、いずれも mode A, B と比較した際配座や位置が不安定であった。Kono *et al.* (In press)[[Pub.](#)] Fig. S2

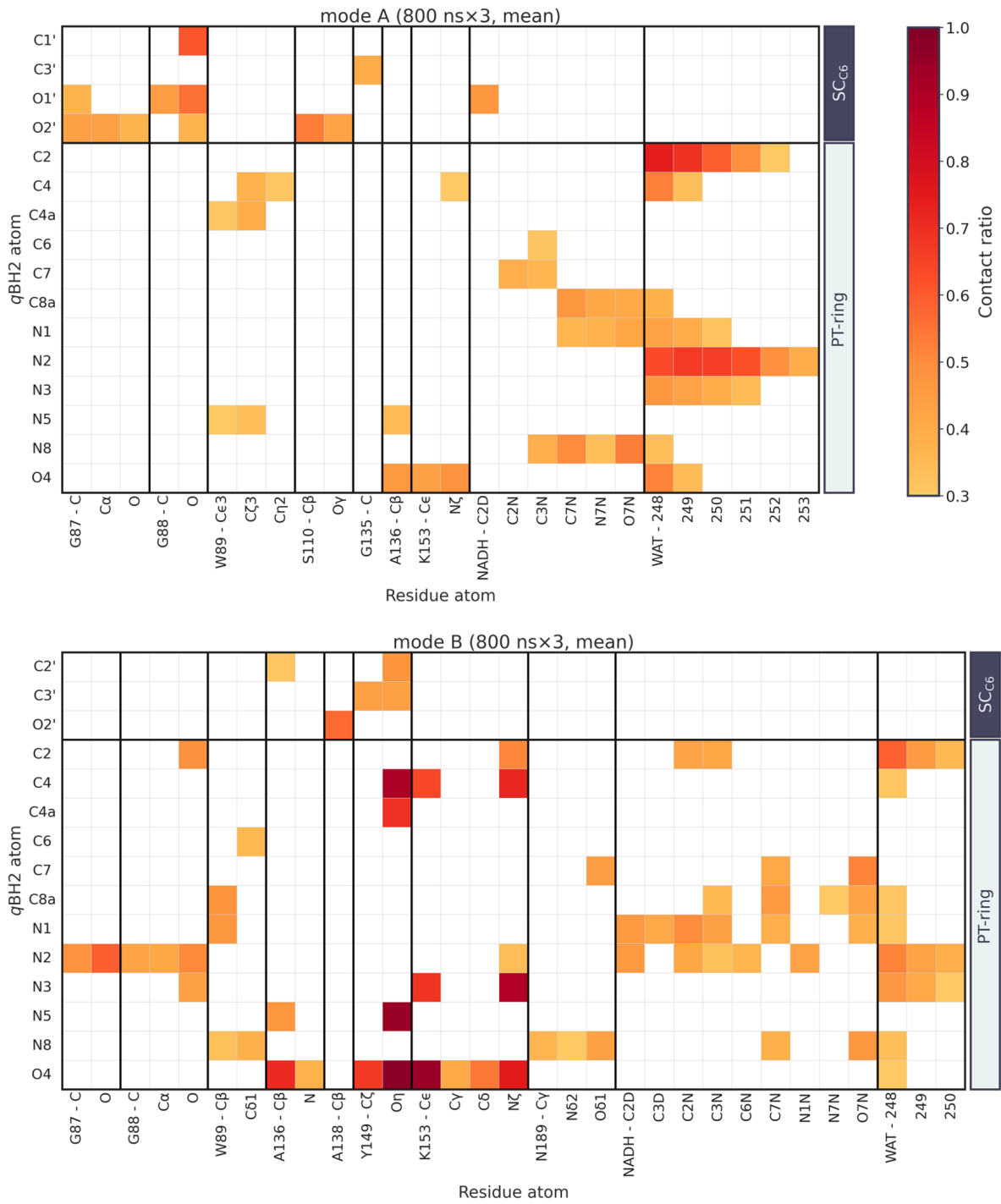
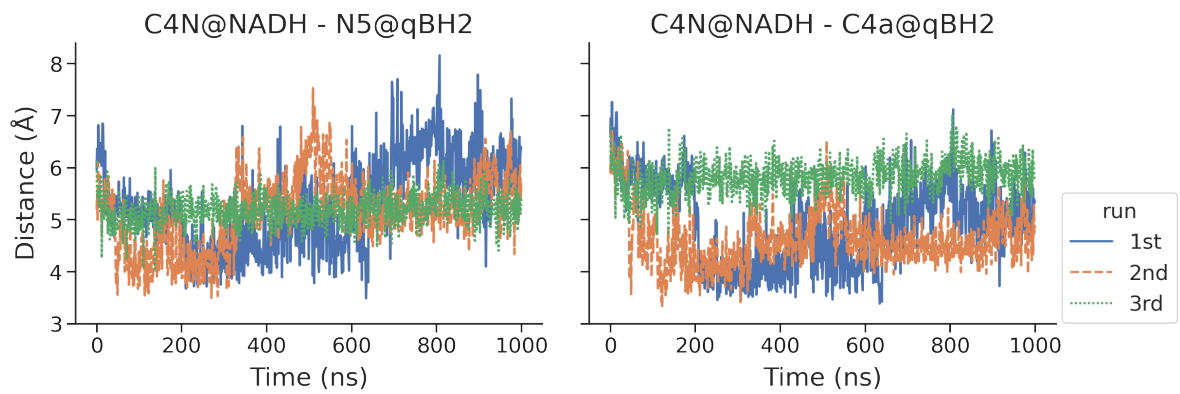


Figure S2. コンタクトマップのフルバージョン (mode A, B)



**Figure S3.** NAM-ring の C4N-*q*BH2 の N5/C4a 間距離の経時変化 (mode B)。本文の図で C4N-C4a 間の距離分布の山が 2 つ見られた理由は、3 回目のプロダクションラン由来であり、残り 2 回は基本的に C4a の方が距離が近い傾向にある。

## 謝辞

ここまで辿り着く道中、当初の自分でも予想できないほど様々な出来事がありました。あらゆる方々のサポート無しには、本研究の遂行が不可能であったことは間違いありません。拙いながらもここで感謝の念を述べたいと思います。

まずは、本研究の遂行全般にあたり、丁寧なご助言・ご指導頂いた一瀬 宏教授に深く感謝申し上げます。実験的アプローチを主体としていることを承知で本研究室を自ら希望したにも関わらず（※これは、神経・精神疾患などに興味があった故それに関連する研究を行いたかった背景があります）、アプローチとしては計算を中心に行いたいというわがまをいきなり言ってしまった事、一瀬先生がこのわがまを聞き入れてくださったことが本研究のきっかけになる大きな出来事でした。まだスーパーコンピューターの事を微塵も理解していない状態からのスタートでしたが、TSUBAMEの講習会日程を教えていただいたり、古田先生を紹介していただいたり、シミュレーション関連学会の個人的な参加についても了承いただいたりと、私がQDPRについて分子シミュレーションを心置きなく行えるよう全面的にバックアップしていただいた点は感謝してもしきれません。更には、体調面を含め研究以外での大学生活についてもお気遣いいただいた事も、何かと体調を崩す事が多く、数回の入院やその手前相当の状況に至り亀の歩みのような進捗の私が研究を遂行するにあたって大きな支えとなりました。本当にありがとうございました。

*in vitro*の解析全般を行ってくださり、QDPRの結合様式確認や葉酸代謝への寄与について明らかにしてくださった原 伶 助教（現：鹿児島大学 医歯学域医学系 医歯学総合研究科 寄附講座 特任助教）に深く感謝申し上げます。本研究がある程度進んだところからの懸案として「如何に実験的アプローチを取り入れてより結合様式の妥当性を示すか」というのがディスカッションなどで話題に上る課題でしたが、*qDHF* アッセイや変異体アッセイとシミュレーション結果をリンクできたことで研究がかなり前進したといっても過言ではありません。本当に感謝しております。ちなみに、実は私も数日だけピペットを握り、QDPRの活性測定をしたことがあります。原先生には、そのご指導もいただきました。結

局その後実験はすべて原先生にお願いする形となってしまった点は大変恐縮ですが、わずかながら自分で手を動かしたことで、キノイド型を基質とする場合のアッセイ原理などをしっかり理解することができました。この場を借りて感謝申し上げます。

また、分子生物学、生化学などの基盤がシミュレーションには欠かせません。お二人の先生方には、シミュレーションの質を上げるために必要不可欠なこれら実験的知見について、一瀬先生からは生理学的知見を中心に、原先生からはタンパク質の機能・酵素科学的知見を中心にご助言を頂いた点も大変有難く思います。

シミュレーション面、特に MD シミュレーションに関しては、本学生命理工学院 古田忠臣助教にご指導頂きました。心より感謝申し上げます。古田先生には、他研究室にも関わらず MD シミュレーションを一から始める私に対し丁寧にご指導頂きました。タンパク質のステレオ図の見方を習得しただけで喜んでいたらを時々思い出しては懐かしさを感じるのですが、あの頃はこうして MD シミュレーションを駆使した解析を行える想像がついていませんでした。古田先生のご指導のおかげで、今のスキルがあること、本当に感謝申し上げます。また、学会等の発表資料についても計算部分の記述についてノウハウを持っていなかった私に詳細なアドバイスをしてくださりました。研究に関するディスカッションでも、お忙しい中じっくり時間をかけてアドバイスを頂きました。本当にありがとうございました。

そして、色々な意味で滅茶苦茶である私を温かく見守って下さった一瀬研究室の学生の皆様に深く感謝申し上げます。私の特性を受け入れてくださったおかげで、研究など安心して取り組むことができました。(皆さんが私をどう思っているかは分かりませんが)、私にとってはとても過ごしやすい研究室でした。もう少し体調面がクリアできていて、顔を合わせる機会を増やしたかったなと思っています。

研究遂行にあたり、日常生活を無事に送るといふ個人的鬼門を乗り越えるためにサポートしてくださっている主治医・訪問看護ステーションの職員の皆様および入院先でお世話になったスタッフの皆様にもここで改めて感謝申し上げます。

最後に、進路面について意思を尊重してくれた上経済的にもサポートしてくださる父親・私の幼少期に早逝したとは言えおそらくどこかで見守ってくれているであろう母親、母親の死後から地元を離れるまでの約 20 年間一つ屋根の下で暮らし、母親の代わりに担ってくれた母方の祖父母(祖母は予備審査の翌日他界しましたが、母親とともにどこかで見守ってくれているかと思っています)をはじめとした家族・親族やこれまでお世話になった友人や知人への感謝を記し、謝辞を締めさせていただきます。