T2R2東京工業大学リサーチリポジトリ Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報 Article / Book Information

論題(和文)	│ │ 理論生物物理と生化学を組み合わせた薬効研究: キサンチン酸化還元 │ 酵素と阻害剤フェブキソスタットの結合機序
Title(English)	Combined biophysical and biochemical study of enzyme effects: binding mechanism of an inhibitor febuxostat with xanthine oxidoreductase
著者(和文)	藤崎 弘士, 古田 忠臣, 岡本 研, 菊地 浩人
Authors(English)	Hiroshi Fujisaki, Tadaomi Furuta, Ken Okamoto, Hiroto Kukuchi
出典(和文)	日本医科大学医学会雑誌, vol. 8, no. 3, pp. 222-227
Citation(English)	Nihon Ika Daigaku Igakkai Zasshi, vol. 8, no. 3, pp. 222-227
発行日 / Pub. date	2012, 8

一基礎科学から医学・医療を見る一

理論生物物理と生化学を組み合わせた薬効研究

キサンチン酸化還元酵素と阻害剤フェブキソスタットの結合機序

 藤崎
 弘士¹²
 古田
 忠臣³
 岡本
 研⁴
 菊地
 浩人¹

 ¹日本医科大学基礎科学物理学

 ²理化学研究所次世代計算科学研究開発プログラム分子スケール研究開発チーム

 ³東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻

 ⁴日本医科大学生化学・分子生物学

Combined Biophysical and Biochemical Study of Enzyme Effects: Binding Mechanism of an Inhibitor Febuxostat with Xanthine Oxidoreductase

Hiroshi Fujisaki¹², Tadaomi Furuta³, Ken Okamoto⁴ and Hiroto Kikuchi¹ ¹Department of Physics, Nippon Medical School ²Computational Science Research Program, RIKEN ³Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology ⁴Department of Biochemistry, Nippon Medical School

Abstract

We review our recent collaborative study, performed by computational physicists and biochemists, of the enzyme effects due to the drug called febuxostat. Febuxostat, which was recently approved in the US, European Union and Japan for treatment of gout, inhibits xanthine oxidoreductase (XOR)-mediated generation of uric acid during purine catabolism. Experiments have shown that febuxostat has strong effects on mammalian XOR but not on bacterial XOR, although the two enzymes have similar three-dimensional structures. To clarify the difference in the inhibitory power of febuxostat, we performed docking and molecular dynamics simulations for mammalian and bacterial XORs. We found that the static structures are not sufficient to explain the binding difference and that important interactions occur between febuxostat and the active region of the enzymes which suggests a better strategy for drug design.

(日本医科大学医学会雑誌 2012; 8: 222-227)

Key words: xanthine oxidoreductase, inhibitor, molecular dynamics, docking, binding free energy

1. 理論生物物理とは何か

物理学には二つの方向性がある.一つは物事の究極

の姿を明らかにするというものであり,例えば,宇宙 とはどういうものなのか,ものを小さくしていったら どうなるのか,時間や空間とは何なのか,時間はどう して過去から未来にしか流れないのか,といった非常

Correspondence to Hiroshi Fujisaki, Department of Physics, Nippon Medical School, 1–1–5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8603, Japan E-mail: fujisaki@nms.ac.jp

Journal Website (http://www.nms.ac.jp/jmanms/)

日医大医会誌 2012;8(3)

に基本的な問いに答えようとするものである. これは 基礎物理学と呼ばれ,基本的で「単純な」数式で表さ れる法則を求めることが目標である.

一方,基礎物理学で求められた法則を使って,自然 界の様々な現象を説明・予測するという方向性もあ り,これは応用物理学と呼ばれる.応用物理の研究は, 半導体や超伝導体に始まって,それらを含む電子機器 (携帯電話や医療機器を含む),電化製品,コンピュー タ,車,飛行機,ロケット,人工衛星などといった, われわれの生活を支える様々なテクノロジーを生み出 した.

この応用物理の産物であるコンピュータは、現在は 非常に安価かつ高速になってきており、これを使って 複雑な現象を物理的に細かく調べるというアプローチ が可能となった.これは計算物理と呼ばれる分野を生 み出し、様々な応用分野を作り出している.コンピュー タを用いると、生体分子の原子・分子レベルのモデル を作ることも可能である.生命現象も細かく分けてい けば、タンパク質や DNA などの巨大分子の運動にほ かならない¹ので、これを物理的に理解できる道が開 かれたということである.このようにコンピュータな どを援用しながら、生命現象にアプローチしていく物 理の分野は理論生物物理と呼ばれる.もちろん、理論 に対応する実験生物物理もあり、生命現象を理解する にはそのアプローチも欠かせない.

また、最近は細胞レベルや臓器レベルの生命現象を モデリングする研究も盛んであり、神戸にできた世界 最速(2012 年現在)の京コンピュータをフルに活用 することで、これらの研究の質が飛躍的に向上し、生 体現象の分子レベルから個体レベルまでの理解が可能 になるものと期待されている².

ここではわれわれが最近発表した,酵素(キサンチ ン酸化還元酵素)と薬(痛風薬フェブキソスタット) の相互作用に関する分子レベルでの解析³について簡 潔に紹介する.この研究は理論生物物理学者(藤崎, 古田,菊地)と生化学者(岡本,Leimkühler,西野) の共同研究の結果であり,理論(計算)と実験を組み 合わせることで,医学も含めた学際的な分野におい て,新しい結果が出た好例となっている.このような 理論と実験の共同作業は今後も重要になっていくもの と思われる.なお,本稿では主に理論計算の側面に関 して解説するが,実験的な側面やフェブキソスタット 以外の阻害剤の役割などに関しては,解説'を参照し てほしい.



Fig. 1 Molecular structures of mammalian XOR (PDB code: 1FO4, up) and bacterial XOR (PDB code: 1JRO, down).

キサンチン酸化還元酵素の生体内での機能と 阻害剤

複合金属酵素(鉄とモリブデンを含む)であるキサ ンチン酸化還元酵素 (xanthine oxidoreductase= XOR)は2量体からなる分子量30万の巨大タンパク 質である (Fig. 1). 近年, X線結晶構造解析によっ て、1.6Å分解能で、その立体構造がわかっている⁵. この酵素は、核酸(DNA, RNA)が分解されてでき るキサンチン (Fig. 2a) を代謝して尿酸に変換する 機能を持つ. この機能が働きすぎると、過剰に尿酸が 生成され、痛風の原因となる、そこで、キサンチンの 代わりに XOR と結合するものを阻害剤として用い, 痛風を予防するという薬学的な戦略が取られてきてい る. キサンチンと似た構造をもつアロプリノール(Fig. 2b) は化学的にデザインされた代表的な阻害剤であ り、40年以上もの間、抗痛風薬として実際によく用 いられている.(日本ではザイロリックなどの商品名 で使用されている.)

従来,こういった阻害剤の開発には、ヒトやほかの 哺乳類の酵素の構造情報を用いるが、それらの結晶構 造解析が困難な場合、活性中心付近の立体構造がよく 似ている細菌由来の酵素が用いられることが多い(哺 乳類と細菌由来のXORに対する、アミノ酸相同性は



allopurinol

febuxostat

Fig. 2 Natural substrate and inhibitors for XOR. (a) Xanthine substrate. (b) Alloprinol for the treatment of gout. (c) Febuxostat, newly approved drug for gout.

61% である⁶). ただ, それにもかかわらず, ある種の 阻害剤に対しては, 生物種が異なるとその結合の強さ が異なることが分かった.

帝人ファーマが開発した TEI-6720 (**Fig. 2c**) という阻害剤 (2011 年から日本でも認可され,フェブリクの商品名で売られている痛風の新薬である)は,哺乳類由来の XOR (以下,bXOR と呼ぶ)に対して非常に強く(阻害定数 $K_i = 10^{-10}$ M)結合し,結合部位の隙間を埋めるようにしてコンタクトすることが X線結晶解析から示された⁷.一方,細菌由来の XOR (以下, *Rc*XOR と呼ぶ)に対しては,その阻害能力は非常に小さい(阻害定数 $K_i = 10^{-5}$ M).このことは,痛風治療薬を開発する際,細菌由来の XOR を薬品開発の実験材料とすることが,無意味になることを示唆している.すなわち,分子標的薬のような薬品の開発実験をする際には,生物種を選ぶ必要があることを示唆している.

実際、bXOR と RcXOR では、本来の基質と結合す る活性部位のアミノ酸残基は保存されているが、詳細 に薬と酵素の結合部位を調べると、活性部位ではない 結合部位の残基の一部に違いがあり、これらが薬効の 違いを生み出しているものと考えられる.よって、こ れらの分子的な詳細を調べることが必要である.実験 的には、重要そうな残基をミューテーション(異なる 残基に変える)して調べることができるが、それはコ ストや時間がかかる上、酵素の3次元構造が変化して しまう恐れもある.上にも述べたように現在、生体分 子内の分子的な相互作用は物理的によくモデル化でき るようになってきているので,計算機上で薬と酵素の 間の相互作用を調べることにした.

計算機シミュレーションによる阻害剤の効能への アプローチ

二種類の XOR に対するフェブキソスタットの薬効 の違いを理論的に解明するために、bXOR (PDB コー ド:1FO4) と RcXOR (PDB コード:1JRO) をター ゲットにして、ドッキング・シミュレーションと分子 動力学 (molecular dynamics=MD) シミュレーショ ンを行った.

ドッキング・シミュレーションとは、タンパク質の 構造と、薬(リガンド)の化学組成が与えられたとき に、リガンドがどのようにタンパク質に結合するかと いうことを経験的な相互作用関数を使ってサーチする ものであり、大量の薬の候補を絞り込む(スクリーニ ングする)ときにとられる実際的なアプローチであ る.その計算時間は非常に短く、コストがかからない が、その替わり精度は悪い、一方、分子動力学(MD) はタンパク質やリガンドを原子レベルでモデル化し、 その間の相互作用を物理的に取り入れて、ニュートン 方程式を解く手法であり、ドッキングと比べると非常 にコストはかかるが、その分詳細な情報が得られる.

リガンドと XOR の相互作用を調べるのが主たる目 的なので, PDB 座標からリガンド結合部位を含む, 800 残基ほどのモリブドプテリン・ドメインを切り出した (Fig. 3a). ただし, 1JRO に関しては, X 線構造解析 で得られなかった 20 ほどの欠損残基があるが, その 部分はキャップした (切断部分に中性になるようにア セチル基とアミン基を付加した).後で分かるように, RcXOR のほうの揺らぎが大きいという結論なので, この欠損残基を入れて揺らぎが抑えられるとは思われ ない.

3.1. ドッキング・シミュレーション

ドッキングの計算には、Discovery Studio 2.5 (Accerlrys Inc.)というソフトウェアに組み込まれ ている LigandFit というモジュールを用いた.このモ ジュールにおいて結合具合を表すコスト関数は、結合 自由エネルギーとよく相関していることが知られてい る⁸.これを用いて、2種類の XOR にフェブキソスタッ トをドッキングさせると、ともに bXOR の結晶構造 に近い結合状態が得られた.また、その際のコスト関 数の値も非常に似たものであった.しかし、この計算 結果は実験事実とは異なる.これはドッキング用の経



Fig. 3 (a) Molybdopterin domain for MD simulations, containing ~ 800 amino acid residues. (b) Definition of the distance between molybdopterin and febuxostat. (c) The time courses of the distance for mammalian and bacterial XORs.

験的な相互作用関数の精度が十分でない(水の効果を 十分に取り込めていない)こと、タンパク質の(特に 側鎖の)揺らぎや変形を考慮していない計算であるこ となどがその原因として考えられる.

よって,これは単純にタンパク質の静的な構造を決 めれば薬効が決まるという話ではないことが分かる. そこで,動的な効果も十分考慮できる MD シミュレー ションを行った.

3.2. MD シミュレーション

MDを行うために,現在は様々な力場(原子間の相 互作用を記述するもの,ポテンシャル関数とも呼ばれ る)とソフトウェアが用意されており,用途に応じて 取捨選択することができる.ここでは,リガンドに関 する力場が作りやすい,amber力場を用い,その力 場を使って MD 計算を実行する代表的なソフトウェ アである,Amber 11°を用いることにした.

また、このときの MD シミュレーションを難しく している要因の一つに金属原子の存在がある.モリブ ドプテリン・ドメインはその名の表すようにモリブデ ンを含むので、その部分は量子化学計算ソフトウェア Gaussian09¹⁰を使って、部分的な電荷を決め、モリブ デン周りのその他の力場も手作業で決定した.

安定した MD 計算のために,モリブドプテリンド メインの周りに溶媒水を配位させ,それを周期境界条 件をもつ箱の中に入れた.その際は全体の電荷を中和 させるためにイオンもいれた.その結果,二つの XOR は,それぞれ約 10 万原子ほどが含まれる系となった. この研究では,二つの XOR の結合部位に初期状態と して適当な位置(後述)にフェブキソスタットを置い て,それがその後の時間発展によってどう変化するか ということを調べた.bXOR の場合は,実際に結晶 構造(PDB コード:1NX5)で得られる状態に近い位 置(Fig. 4a)に置き, RcXOR に対しては,それと似 たような位置(Fig. 4b)に置いた.

その後の時間発展の様子が Fig. 3c と Fig. 4c~f に 示されている.まず、モリブデンとフェブキソスタッ トの距離を Fig. 3b のように測ることにすると, bXOR の場合はその距離はほぼ一定であり安定だが、RcXOR の場合は 10 ナノ秒の時間スケールで離れていく傾向 にあることが分かった(Fig. 3c).この結果から RcXOR の方が薬との相互作用が不安定であり、薬効 が少ないことが予測されるが、実際、これは実験結果 と一致している.



Fig. 4 Initial conditions for mammalian (a) and bacterial (b) XORs for MD simulations. The corresponding simulated results are (c, e) and (d, f) for mammalian and bacterial XORs, respectively.

また、この原因をより細かく調べるために、結合部 位にある残基とフェブキソスタットの間の距離を調べ てみた、すると、Fig. 4c~fに示されているように、 フェブキソスタットの末端部分とその周りの残基は、 bXOR の場合はほぼ一定だが、RcXOR の場合は激し く運動していることが分かった、Fig. 2c から分かる ように、フェブキソスタットの末端部分はメチル基で あり、その部分と親和性があるのは、疎水性の残基で ある。bXOR の場合はまさにそうなっており、その 間の結合は安定であることが予想されるが、RcXOR の場合は親水性の残基も含み、安定性は弱い、MD 計 算はこの化学的な直感が正しいことを示唆している。

また,ここでは示していないが,フェブキソスタットにはニトリル基(-CN)があり(Fig.2c),それがbXORの場合は周りの残基と水素結合しているが,RcXORの場合はそれが失われていることも分かった.しかし,この部分の残基を変えて,計算・実験してみても,結果はそんなに大きく変わらず,この水素

結合がどれくらい効いているのかということに関して は定量的な結果を出すに至っていない.これは今後の 課題である.

このような分子的な知見を積み重ねていくことで, 薬を改良していくことも可能となる.例えば,薬の末 端部位を計算機上で変えることで,活性部分との相互 作用がどのように変わるか,もっと系統的に調べてい くことができる.もちろん,MD計算には様々な限界 があるので,実験によるフィードバックは欠かせな い.このように実験と理論計算が協調しながら研究を 進めていくことで,薬効の物理的理解が可能となり, それがひいてはドラッグ・デザイン,ドラッグ・ディ スカバリーへの有効な生物物理学的アプローチとなる かもしれない.

4. まとめと展望

本稿では、理論と実験を組み合わせた共同研究から

新たな結果が出た好例としてわれわれの最近の研究を 主に理論的な側面から紹介した.

本研究では、二種類のキサンチン酸化還元酵素 (XOR)のドッキング・シミュレーションとMDシ ミュレーションを行い、抗痛風薬として使われている フェブキソスタットと結合部位の間の相互作用の解析 を行った.その結果、哺乳類由来のXORに関しては 薬との相互作用は安定であり、細菌由来のXORに関 しては不安定であることが分かった.これは実験事実 をサポートするものである.また、その相互作用を詳 細に調べることで、薬の末端部分と結合部位の相互作 用が重要であることが示唆され、この知見をもとによ り薬を改良していくための手がかりが得られた.

しかし、本研究はまだ不十分な点も多い. 薬と酵素 の親和性に関して定量的にアプローチするためには、 結合自由エネルギーを計算する必要がある. そのため には膨大な計算コストが必要となるが、薬の化学的な 装飾を変えたとき、また酵素の残基をミューテーショ ンしたときに結合がどうなるかということを調べるに は、単純な MD 計算では不十分であり、そのような 計算をしなければならない. 結合自由エネルギーの計 算は、従来は難しいと考えられていたが、現在は様々 な新しいアルゴリズムの開発により、比較的容易に なってきている¹¹. 直近の課題として是非やらなけれ ばならないテーマである.

本研究では、モリブドプテリンドメイン (Fig. 3a) だけを切り出して計算しているが、細胞内では Fig. 1 にあるような複合体として存在しているので、これを 丸ごと計算する必要がある.原子数が膨大となって計 算コストがかかるが、より自然な状況でどうなってい るか調べるためにはやらなければならない.

また、結合部位では阻害剤(Fig. 2b, c)が入り込 むだけでなく、天然の基質(Fig. 2a)が入りこんで 酵素反応を起こす.このプロセスはもちろん生化学的 には重要であり、それに対しても理論計算を用いたア プローチは可能である。しかし、酵素反応は化学結合 が切れたり、つながったりするプロセスなので、つな がっているボンドを仮定している MD 計算で扱うの は容易ではない.そこで、化学反応を扱える量子化学 計算と MD 計算を組み合わせて対処していかねばな らない.これは難しい課題だが、このようなハイブリッ ドなシミュレーション手法は、現在、ホットなトピッ クスとなっている¹².

本稿では阻害剤と酵素の相互作用について取り上げ

たが、本物理学教室ではほかにも、筋肉タンパク質分 子ミオシンに関する量子化学計算¹³、免疫系における ペプチドと MHC との相互作用の計算¹⁴、酵素の構造 変化経路の計算¹⁵、生体分子内の振動エネルギー緩和 に関する計算¹⁶などを行っており、物理学と生物学も しくは化学の境界に属するような問題に関した研究を 推進している.

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究(研究課題番号:23570198(C),22540421(C),16205021(A))と文 部科学省最先端・高性能汎用スーパーコンピュータの開発 利用「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの 研究開発」の支援を受けている。

文 献

- Zuckerman DM: Statistical Physics of Biomolecules: An Introduction, 2010; CRC Press, Phillips R, Kondev J, Theriot J, Physical Biology of the Cell, Garland Science, 2009.
- 2. http://www.nsc.riken.jp/index_j.html
- Kikuchi H, Fujisaki H, Furuta T, Okamoto K, Leimkühler S, Nishino T: Scientific Reports 2012; 2: 331: DOI:10.1038/srep00331.
- 岡本 研:結晶構造からみた尿酸生成抑制剤の阻害機 構.日本医科大学医学会雑誌 2007; 3: 83-88.
- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF: Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 10723– 10728.
- Truglio JJ, Theis K, Leimkuhler S, Rappa R, Rajagopalan KV, Kisker C: Structure 2002; 10: 115– 125.
- Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF, Nishino T: J Biol Chem 2003; 278: 1848–1855.
- Venkatachalam CM, Jiang X, Oldfield T, Waldman M: J Mol Graph Model 2003; 21: 289–307.
- 9. Case DA et al.: AMBER. 2010; 11, University of California, San Francisco.
- 10. Frisch MJ et al.: Gaussian 09, Revision A.1. 2009; Gaussian, Connecticut.
- 11. Zhou HX, Gilson MK: Chem Rev 2009; 109: 4092-4107.とその参考文献.
- 12. Major DT et al.: Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 20734-20739.とその参考文献.
- Kagawa H, Mori K: J Phys Chem B 1999; 103: 7346– 7352.
- Nakagawa Y, Kikuchi H, Takahashi H: Biophys J 2007; 92: 2570–2582.
- Matsunaga Y, Fujisaki H, Furuta T, Moritsugu K, Terada T, Kidera A: PLoS comp biol. (in press);藤 崎弘士,生体分子におけるパスサーチ・パスサンプリ ング,日本医科大学基礎科学紀要,2011;40:83-98.
- Fujisaki H, Zhang Y, Straub JE: Adv Chem Phys 2011; 145: 1–33.

(受付:2012年3月29日) (受理:2012年4月27日)