

哺乳動物キサンチン酸化還元酵素の FAD、モリブドプテリン  
近傍の微細構造

## Structural Analysis of Mammalian Xanthine Oxidoreductase.

岡本研\*

日本医科大学 生化学(代謝・栄養)、〒113-8605 東京都文京区千駄木 1-1-5

Ken Okamoto\*

Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Tokyo, 113-8602, Japan

## 1 はじめに

哺乳類キサンチン酸化還元酵素(XOR)は分子量 30 万のホモ2量体蛋白質であり、1量体に4つの反応中心(Mo-pt; molybdopterin, 2個の[2Fe-2S], 1 個の FAD)を持つ。Mo-pt にて基質キサンチンを尿酸に変え、電子を酵素蛋白質に与える。既に構造決定(1.7 Å分解能)した結果では、反応中心はほぼ一列に並び、それぞれが電子伝達する距離範囲(それぞれ 14 Å以下)に位置する。キサンチンは Mo-pt において水酸化されて尿酸になるが、その際電子は Mo 原子に渡り Mo(VI)→Mo(IV)となる。この反応中心は痛風治療薬などの創薬のターゲットとなる。我々は日本の製薬各社と抗痛風薬の開発に参加してきており、その中の1つはすでに国際的に認可された日本発の抗痛風薬(フェブリク)となっている。それら化合物の阻害機構解析の結果、基質結合ポケット付近の「動的ゆらぎ」と水素結合の存否が強い阻害作用の鍵となっている[1]。

Mo に渡った電子は、2個の[2Fe-2S]を経て最終的に FAD に渡され、還元された FAD はもう一方に基質 NAD<sup>+</sup>または O<sub>2</sub>と反応する。FAD の周囲蛋白構造の環境の差が FAD の反応性の違いをもたらす。O<sub>2</sub>と反応した場合は活性酸素を生成し、様々な病態の原因になるとされている。FAD の周囲蛋白構造の差と変換の機構については構造生物学的に概略の解明は終えている。現在の疑問点は FAD セミキノンの安定性と反応性につき化学的な説明を行うことである。今までに得られたもっとも高分解能な結晶構造(1.7 Å分解能、*JACS*, 2012)からは特異なCH...O水素結合という存在の関与が示唆されているが、十分解っていない。以上のように Mo 部位および FAD 部位とも水素結合の解明がやはり鍵となっており、超高分解能の構造決定が焦点の課題となっている。

FAD のC6原子は近傍の Asp428 カルボキシル基酸素原子と 3.5 Åの距離にある。両原子間の距離、予想されるCH...Oが形成する角度(160°)はとくに文献にある数値(D=3~4 Å, θ=90~180°)とよく合致し、CH...O水素結合形成が強く示唆されている。近年タンパク質結晶構造内にもCH...O水素結合が観察されるという報告があるが、それらはおもにフォールディングの維持

に関与するとされている。一方、申請者が Asp428 をアラニンに変異させた変異酵素を作成し解析した結果、FAD の電位が 90mV も低下し、活性を消失することが確かめられており(申請者未発表データ)、もしこの箇所にCH...O水素結合が存在するならば、補酵素の反応性に大きく影響を与える特異な例と言える。

Mo-pt における水酸化反応で導入される水酸基の酸素原子は水分子由来であり、反応の過程で Mo に 2 電子渡る。この反応は XOR に特有のもので酸化的水酸化反応といわれ、オキシゲナーゼである P450 による水酸化とは異なる反応様式である。申請者は還元状態モリブデンと尿酸の複合体結晶の構造を決定することで、水酸基として導入される酸素原子を介して Mo 原子とキサンチンの炭素原子が共有結合をしている反応中間体を捉えることに成功した[2]。哺乳類と細菌 XOR は活性中心の構造がほぼ同じであるにもかかわらず抗痛風薬フェブリクの Ki 値は 10<sup>5</sup>も異なる。MD シミュレーションの結果、両酵素の基質結合ポケットの揺らぎの違いが阻害作用の差となっていることが示唆された。また両 XOR は Kcat が 10 倍異なっており、これも揺らぎの差に起因すると考えられている。

以上のように機能解明のためには Mo および FAD の両部位とも水素結合の解析が鍵となっているため、超高分解能の構造決定および水素結合を断つ部位特異的変異法による総合的解析が焦点の課題となっている。

## 2 実験

本課題においては FAD 近傍に位置し、保存されている残基である N350 に着目した。N350 は FAD のピリジン環と水素結合をしており、FAD の反応性に寄与すると考えられる。この残基を Thr と Asp に変異させた酵素を作成し、それぞれ基質フリーの構造、NADH 結合型構造を 1.8~2.1 Åの解像度で構造決定した。

## 3 結果および考察

N350T、N350D ともに主鎖、FAD の位置関係はほぼ同じであった。N350T の NADH 結合型では NADH の電子密度が薄くなっており、結合が弱くなっている可能性があり、このことは分光学的解析結果ともよく一致した。

N350D は D350 の側鎖カルボキシル基(図)が FAD の O2 原子と 2.5 Å の距離に位置するとともに、酸素を基質とする活性が失われており、酸化酵素型に変換した際に FAD 周囲に構造的、静電的に大きな変化が生じている可能性がある。今後は N350D の酸化酵素型の構造を決定し、解析を進める予定である。

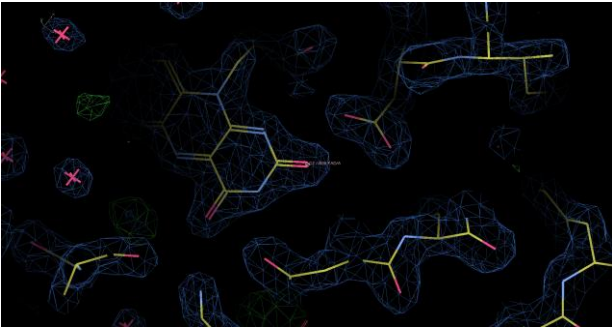


図 ラット XOR N350D 変異酵素の FAD 近傍の電子密度図 NW12A にてデータ収集した。Asp350 側鎖はイソアロキサジン環の O2 と 2.5Å の距離に存在した。

#### 参考文献

- [1] Kikuchi K, Fujisaki H, Furuta T, Okamoto K, Leimkühler S, Nishino T, *Sci. Rep.* **2** (2012)
- [2] Okamoto K, Kawaguchi Y, Eger BT, Pai EF and Nishino T, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010)

\*okamoto@nms.ac.jp