

酵素—基質複合体、反応中間体類似体の構造解析によるキサンチン酸化還元酵素の基質結合様式、反応機構の解明

岡本研(日本医科大学)、松村智裕(同上)、草野輝男(同上)、松本浩二(同上)

キサンチン酸化還元酵素(XOR)はプリン分解系におけるヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への水酸化を触媒する酵素である。その基質特異性は低く、多くのヘテロ環化合物の窒素原子に隣接する部位を水酸化する。我々は slow substrate との反応中間体の構造を明らかにすることで反応機構を解明したが、反応機構における現在の興味は、天然の基質であるキサンチン、ヒポキサンチンの結合様式と、活性中心周囲アミノ酸による基質活性化機構の詳細を知ることである。活性中心のポケットは全ての生物種で保存されている5個のアミノ酸(ウシ酵素においては Glu802, Arg880, Phe914, Phe1009, Glu1261)から構成される。我々は非活性型酵素である desulfo XOR(モリブデンに配意している硫黄原子の一つが酸素原子に置換されている)とヒポキサンチン、キサンチンの複合体結晶構造の結晶構造を元に反応機構、基質結合様式を解析した。

FYX-051、4-(5-pyridin-4-yl-1H-[1,2,4]triazol-3-yl)pyridine-2-carbonitrileはキサンチン酸化還元酵素(XOR)の強力な阻害剤である。FYX-051はXORの遅い基質であり、安定な反応中間体を作ることで阻害を及ぼす。中間体の半減期は25°C、空気中において20.4時間である。このときFYX-051は水酸化され2-hydroxy-FYX-051になる。水酸化体の解離に伴い酵素活性は徐々に回復したが、一部阻害が残っていた。そこで、水酸化体による阻害作用およびさらなる水酸化反応が示唆されたため、FYX-051とXORの相互作用について詳細に検討した。FYX-051のXOR阻害は時間依存的に強くなり、酵素阻害の初期相においてFYX-051は競合型阻害を示した($K_i = 5.3 \times 10^{-9} \text{M}$)。2-Hydroxy-FYX-051による阻害も同様に時間依存的であったが、弱い混合型阻害を示した($K_i = 1.6 \times 10^{-6} \text{M}$ および $K_i' = 1.0 \times 10^{-5} \text{M}$)。長時間インキュベートした酵素-阻害剤複合体のHPLC、質量分析計による解析を行ったところ、2-hydroxy-FYX-051を経て2または3個の水酸基が付加した代謝物が生成したことが確認された。FYX-051-XOR複合体を嫌気下で5日間インキュベートしたところ600nm付近に顕著なスペクトル変化がみられ、水酸化が進んだ代謝物と酵素との相互作用が示唆された。この状態の複合体を嫌気下で結晶化し、X線結晶構造解析を行った結果、上記のスペクトル変化は3個の水酸基が付加したFYX-051が酵素モリブデンと共有結合した複合体に由来するものであった。FYX-051および2-hydroxy-FYX-051とXORとの相互作用の詳細について報告する。