学会賞受賞論文

(論文賞)

平成 17 年度論文賞対象論文の概要とその研究背景

柿 谷 均 *

東ソー株式会社 東京研究所
財団法人相模中央化学研究所

(平成 17 年 5 月 20 日受理)

Keywords: 4-HPPD, enzyme inhibitor, homology modeling, SWISS-MODEL.

はじめに

4-ヒドロキシピルビン酸ジオキシゲナーゼ (4-HPPD, EC 1.13.11.27) は 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸に分子状酸素を添加してホモゲンチジン酸 (HGA) と CO_2 を生成する酵素であり、多くの動植物やカビ、細菌などから見出されている。4-HPPD の生理的な役割は多岐にわたっているが、光合成を行う生物（高等植物、ラン藻）においては反応生成物である HGA からプラストキノンやトコフェロールが合成されるため、この酵素の阻害剤は白化型除草剤としての作用を有する。

4-HPPD を標的酵素とする除草剤の多くはトリケトンあるいはジケトン構造を有するか、もしくはそれらのプロドラッグ体である。こうした共通性は薬剤と標的酵素との間に厳密な相互作用が存在することをうかがわせるが、その詳細は明らかにされていない。我々は標的酵素の側からこの問題にアプローチするために植物 4-HPPD の立体構造を予測し、種々の薬剤との相互作用を推測した。

ホモロジーモデリング

ホモロジーモデリングは、立体構造が既知であるタンパク質を鋳型としてアミノ酸配列が明らかになっているタンパク質の立体構造を予測する手法であるが、近年バイオインフォマティクスの一領域として急速に発達し、医薬品の標的タンパク質の構造予測に多く用いられている。我々は、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) からインターネット上で一般に公開されているモデリングサーバである SWISS-MODEL¹⁻³⁾ (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) を利用して植物 4-HPPD の立体構造予測を試みた。研

究着手当時において 4-HPPD の中で立体構造が明らかになっていたのはグラム陰性細菌 *Pseudomonas fluorescens* 由来の酵素⁴⁾ (PDB エントリー: 1CJX) のみであったが、この酵素と植物由来酵素とのアミノ酸配列相同性は 30% 未満であり、しかも多くの挿入／欠失を考慮する必要があった。そのため植物由来酵素のモデリングは困難であると思われたが、植物や動物、カビ、放線菌、細菌由来の合計 18 種の配列を比較することにより、活性発現に重要と考えられる領域には極めて高い保存性のあることや挿入／欠失位置に規則性のあることを見出した。そこで挿入／欠失位置を少しずつずらしたアラインメントを作成し、SWISS-MODEL ウェブサーバ上での計算を行った結果モデリングが可能になり、しかも予想に反して非常に安定なモデル構造が得られた。

上記の方法をオオムギ、コレウス、ニンジン、シロイヌナズナの配列に適用することにより、それぞれの 4-HPPD 構造モデルを得ることができたが、オオムギ酵素のモデルを用いてより詳細な検討を行った。まず出力されたモデル構造に水素を付加して GROMOS96 力場計算により全エネルギーを算出した ($-10,300 \text{ kJ/mol}$)。次に酵素活性に必須であると考えられる Fe(II) を鋳型酵素と同じ位置に挿入してオオムギの 4-HPPD 酵素モデルを完成させた (Fig. 1)。

オオムギ酵素モデルの特徴

オオムギ酵素モデルは *P. fluorescens* 由来酵素と比較してアラインメント上は相同性が低く（一致率 26%, 89/342 アミノ酸残基）、多くの挿入／欠失（15 ヶ所、60 アミノ酸残基）が導入されていたが、酵素分子全体の折りたたみ方はよく保存されており、挿入／欠失領域は分子表面に集中していた。植物に特徴的な C 末端近傍の 15 アミノ酸残基より形成される挿入部分 (Fig. 1 矢印部分、オオムギ酵素の Gly385-Gly399) は活性中心に隣接しており、基質や阻害剤

* 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1

E-mail: kakidani@tosoh.co.jp

© Pesticide Science Society of Japan

Fig. 1. Structural model of barley 4-HPPD. (a) Fe (II) in the C-terminal domain is included (space-filled). Arrow indicates inserted 15-amino acid sequences. (b) Magnified view of the C-terminal domain (right half of (a)). Fe(II) is included (ball and stick). His211, His293 and Glu379 are highlighted. Arrow indicates inserted 15-amino acid sequences as in (a).

との結合に影響を与えると推測された。結果としてはこの部分がループとして酵素分子の外側に突出したかたちでモデリングされ、ループの先端は若干内側に曲がって周辺のアミノ酸残基との間の水素結合により安定化されていた。このループは植物に共通した特性を与えている可能性があるが、さらに基部にグリシン残基を有することから可動性が高いものと推測された。一方 Fe(II) を中心とする活性中心近傍における保存性は高く、Fe(II) から 10Å 以内にある 34 アミノ酸残基のうち 24 アミノ酸残基が *P. fluorescens* 由来酵素と同一であった。この中には Fe(II) が配位する 2 つのヒスチジン残基（オオムギ酵素の His211, His293）と 1 つのグルタミン酸残基（Glu379）が含まれる。またこの領域はすべての生物種の 4-HPPD を通して保存性が高かった。

酵素と阻害剤との結合様式

代表的な 4-HPPD 阻害剤として NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione) を選択し、この化合物のオオムギ酵素に対する結合様式を推測した。既に 2002 年に Wu ら⁵⁾によって *P. fluorescens* 酵素に対する結合モデルが提示されていたが、我々は彼らとは異なる方法（HyperChem 5 を用いた化合物の構造最適化とグラフィクス画面上での目視による挿入）によってオオムギ酵素との結合モデルを作成した。その結果は Wu らの提示したものと極めて近く、NTBC の酵素に対する結合様式はオオムギと *P. fluorescens* の間でほぼ同じであると考えられた。すなわち NTBC は酵素の C 末端側ドメインにある 8 枚の β シートと 1 本の

α ヘリックスによって形成された細長い空隙に入り込み、1,3-ジケトン構造の 2 つの酸素原子が Fe(II) に配位結合して安定な 6 員環を形成することにより酵素活性を阻害すると推測された (Fig. 2a, 2b)。一方酵素反応基質である 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の場合にはカルボニル酸素原子とカルボン酸酸素原子が Fe(II) と配位結合し、この複合体に酸素分子が近づくと脱炭酸反応が起きるものと考えられる (Fig. 2c)。これは 4-HPPD による反応が脱炭酸、酸素添加、転位という 3 つの連続する反応が組み合わさったものであるという仮説⁶⁾と一致する。

次にプロドラッグ化された除草剤の活性本体と考えられる化合物 3 種類を NTBC と同様にオオムギ酵素モデルに挿入した。その結果、いずれもが NTBC と同様の結合様式をとっているものと推測された。また Fig. 2a 中においてベンゼン環のオルト位の置換基が許容される方向は左手前側であること、パラ位（あるいはメタ位）の置換基は左上側にかなり長く伸ばすことができることも明らかになった。

お わ り に

この論文が掲載された翌年の 2004 年に海外の 3 つの研究チームから相次いで 4-HPPD の X 線結晶解析結果が発表された⁷⁻⁹⁾。それらは放線菌、シロイヌナズナ、ラットおよびトウモロコシ由来酵素であり、そのうちのいくつかは阻害剤との複合体であった。これらの解析結果によって、我々が行った酵素の立体構造予測が概ね正しかったこと、また阻害剤との結合様式推測が極めて正確であったことが裏づ

Fig. 2. Model of barley 4-HPPD-NTBC complex. (a) All atoms (except for hydrogen atoms) within 12 Å of the C(8) atom of NTBC are shown. (b) Schematic representation of Fe(II) coordination for (a). (c) Supposed coordination formed in the catalytic reaction.

けられた。同時に酵素のC末端にある α ヘリックスの傾きの違いが生物種ごとに無視できないほど大きいことも示された。我々は酵素と阻害剤の結合を定量的に取り扱うためのソフトウェア (AutoDock 3.0) を用いて上記の研究結果の解析を進めている。これについてはいずれ稿を改めて紹介したい。

標的酵素あるいは受容体との結合予測に基づく薬物設計は医薬品開発において広く行われている。農薬の開発においては分子レベルの薬効がフィールドテストの結果に反映されにくいという事情があるものの、今後はこうした手法が分子設計の一助として利用される機会が増えてくるであろう。近年の4-HPPDに関する研究の流れはまさにその方向を指し示しているように思われる。

最後になりましたが、このたび日本農薬学会論文賞を受賞する栄誉に浴したことは望外の喜びであり、ご推奨いただいた先生方には厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) M. C. Peitsch: *Bio/Technology* **13**, 658–660 (1995).
- 2) M. C. Peitsch: *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 274–279 (1996).

- 3) N. Guex and M. C. Peitsch: *Electrophoresis* **18**, 2714–2723 (1997).
- 4) L. Serre, A. Sailand, D. Sy, P. Boudec, A. Rolland, E. Pebay-Peyroula and C. Cohen-Addad: *Structure* **7**, 977–988 (1999).
- 5) C.-S. Wu, J.-L. Huang, Y.-S. Sun and D.-Y. Yang: *J. Med. Chem.* **45**, 2222–2228 (2002).
- 6) C. W. Jefford and P. A. Cadby: *Experientia* **37**, 1134–1137 (1981).
- 7) J. M. Brownlee, K. Johnson-Winters, D. H. T. Harrison and G. R. Moran: *Biochemistry* **43**, 6370–6377 (2004).
- 8) I. M. Fritze, L. Linden, J. Freigang, G. Auerbach, R. Huber and S. Steinbacher: *Plant Physiol.* **134**, 1388–1400 (2004).
- 9) C. Yang, J. W. Pflugrath, D. L. Champer, M. L. Foster, D. J. Pernich and T. A. Walsh: *Biochemistry* **43**, 10414–10423 (2004).

略歴

柿谷 均

最終学歴：東京大学大学院理学研究科修士課程修了（東京大学理学博士号取得）

研究テーマ：酵素の工業的利用技術に関する研究

趣味：園芸、語学