

## 結晶構造からみた尿酸生成抑制剤の阻害機構

岡本 研

日本医科大学学生化学第一

## Inhibition Mechanisms of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors

Ken Okamoto

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

## Abstract

Xanthine oxidoreductase (XOR) catalyzes the conversion of hypoxanthine to xanthine and of xanthine to uric acid. Inhibitors of XOR block conversion of the oxypurines (hypoxanthine and xanthine) to uric acid, thus decreasing serum concentration of uric acid. Crystal structures of XOR-inhibitor complexes reveal that each inhibitor has different inhibition mechanisms, utilizing the enzyme structure and the reaction mechanism. Such variation of the inhibition mechanism affects *in vivo* hypouricemic effects of the inhibitors.

(日本医科大学医学会雑誌 2007; 3: 83-88)

**Key words:** xanthine oxidoreductase, inhibitor, gout drug

## はじめに

薬物とそのターゲットとなるタンパク質はかぎと鍵穴の関係にたとえられる。従来の創薬は膨大な数の天然、人工の化合物からタンパク質（鍵穴）の形に合うような低分子化合物（鍵）をスクリーニングすることであり、多大な時間と労力を要した。その後、構造生物学の発展やたんぱく 3000 プロジェクトなどの推進により多くのタンパク質の立体構造が明らかになってくるにつれ、現在の創薬のプロセスは改変期に来ている。タンパクの立体構造の情報を元に特異的に結合する化合物を設計する創薬（構造ベース創薬）が行われ、成果をあげつつある。構造ベース創薬を行うためにはタンパク質と小分子化合物が強い結合を形成するための相互作用の立体構造上の解析が不可欠である。また、創薬のターゲットのタンパク質の多くは酵素であ

り、触媒機構を有するため、酵素の反応機構についての理解も不可欠となる。この項では抗痛風薬とそのターゲットであるキサンチン酸化還元酵素（XOR）を例にあげ、タンパク質立体構造と薬剤阻害剤との相互作用を解説する。

核酸を構成するアデニンやグアニン、生体内でエネルギーとして用いられるアデノシン三リン酸はキサンチン、ヒポキサンチンを経て尿酸として腎臓から体外に排泄される。尿酸は XOR により作られるので、この酵素の働きを抑える薬剤（阻害剤）を投与すれば尿酸の生成量が減り、血中の尿酸濃度が低下する。この考えに基づき当時ウェルカム社の Elion らにより痛風治療薬アロプリノールが開発され<sup>1</sup>、30 年以上にわたり臨床的に使用され尿酸生成阻害剤の有効性が確認されている。しかし、その後数多くの阻害剤が合成され報告されているもののアロプリノール以外の阻害剤は臨床で使用されることはなかった<sup>23</sup>。アロプリノール

Correspondence to Ken Okamoto, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: okamoto@mms.ac.jp

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

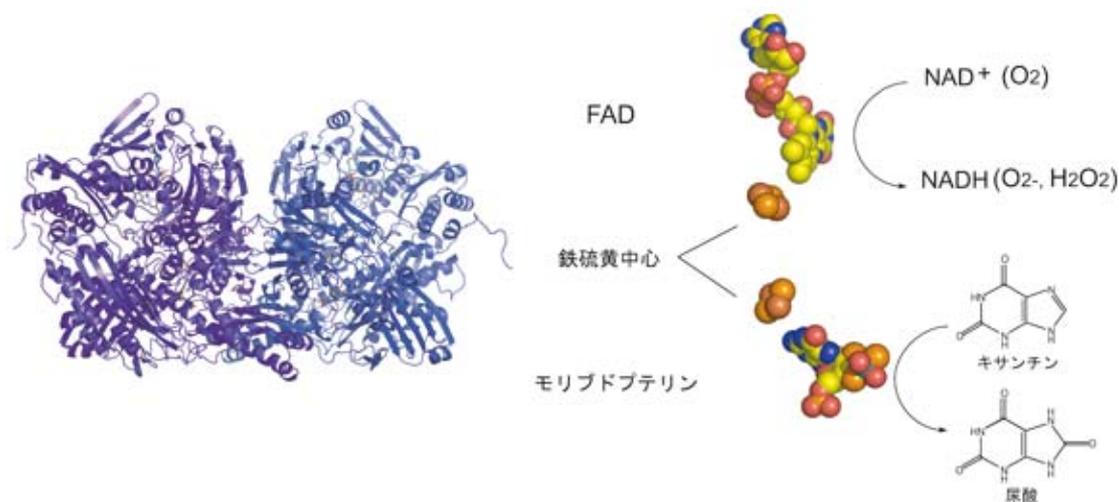


図1 ウシ XOR (PDB ID ; 1FO4) の結晶構造と補酵素  
生体内では主に2量体として存在する(左). 3種類, 4個の補酵素とその位置関係(右). 基質との反応部位を示す.

は有効で副作用も少ない優れた薬剤ではあるが, 近年幾つかの副作用が報告され, また有効使用にはその阻害機構から服用頻度と量が必要であり, 優秀な尿酸生成阻害剤の開発が望まれてきた. 最近になって, 国内製薬会社からいくつかの強力な阻害剤が開発され, 開発が先行している febuxostat (帝人) は日米それぞれにおける臨床試験の結果アロプリノールをしのぐ効果を認めたため<sup>45</sup>, 国際的な注目を集めている<sup>67</sup>. 著者らのグループは阻害のメカニズムを解明した<sup>8-11</sup>. その結果, 阻害剤は酵素の構造や機能を巧みに利用し, 酵素と強く結合することがわかった. この項では X 線結晶構造解析法を用いた酵素と阻害剤の複合体立体構造から阻害の強さは何に起因するかを解説する.

#### キサンチン脱水素酵素について

キサンチン脱水素酵素 (XDH) は分子量が 15 万のタンパク質が 2 量体を形成して分子量の合計は 30 万にも及ぶ巨大な酵素タンパク質であり, 2 個の鉄硫黄中心, FAD, モリブドプテリンの 3 種類の補酵素を持つ (図 1 左)<sup>12,13</sup>. ヒポキサンチン, キサンチンは XDH の補酵素モリブドプテリンで水酸化され, その際 2 個の電子が酵素に渡る. 酵素に渡った電子は鉄硫黄中心を経て FAD に渡り, さらにもう一方の基質である  $\text{NAD}^+$  を還元する (図 1 右)<sup>14</sup>. 哺乳動物の酵素に限っては FAD 周囲に構造変化を起こし,  $\text{NAD}^+$  ではなく  $\text{O}_2$  を電子受容体とするキサンチン酸化酵素 (XO) に変換することが知られており<sup>15,16</sup>, 酵素反応の生成物として発生する活性酸素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ) が虚

血再還流障害などの種々の病態の原因であると言われている<sup>17</sup>. XDH の阻害剤は XDH による活性酸素生成を抑制することで, これら病態の治療薬としても期待されている.

#### 補酵素モリブドプテリンの構造と活性中心

モリブデン原子はプテリン環と 2 個の硫黄原子を介して結合している. モリブデンにはさらにひとつの硫黄原子と 2 個の酸素原子が配位する (図 2 上). モリブデンとそれに配位する原子が反応にあずかる. 酸素原子の一方は基質に水酸基として取り込まれ, その後水分子の酸素が入って再生される<sup>14</sup>. 酵素反応にはモリブデンだけではなく周囲アミノ酸も関与する. これらのアミノ酸は基質結合ポケットの最奥部を構成している. キサンチンは 2 個のグルタミン酸, 2 個のフェニルアラニン, アルギニンにより活性部位に固定される (図 2 下). 阻害剤は同じ場所に結合し, キサンチンの結合を妨害する.

#### アロプリノールによる XDH 阻害機構 —擬似的反応中間体形成による阻害—

アロプリノールは現時点で痛風の治療薬として用いられている唯一の XOR 阻害剤であり, 30 年以上にわたる臨床での使用実績がある. アロプリノールはドラッグデザインの考え方に基づき開発された最初の化合物のひとつである<sup>1</sup>. 開発者である Elion らはヒポキサンチンの 8 位の C と 7 位の N を入れ替えること

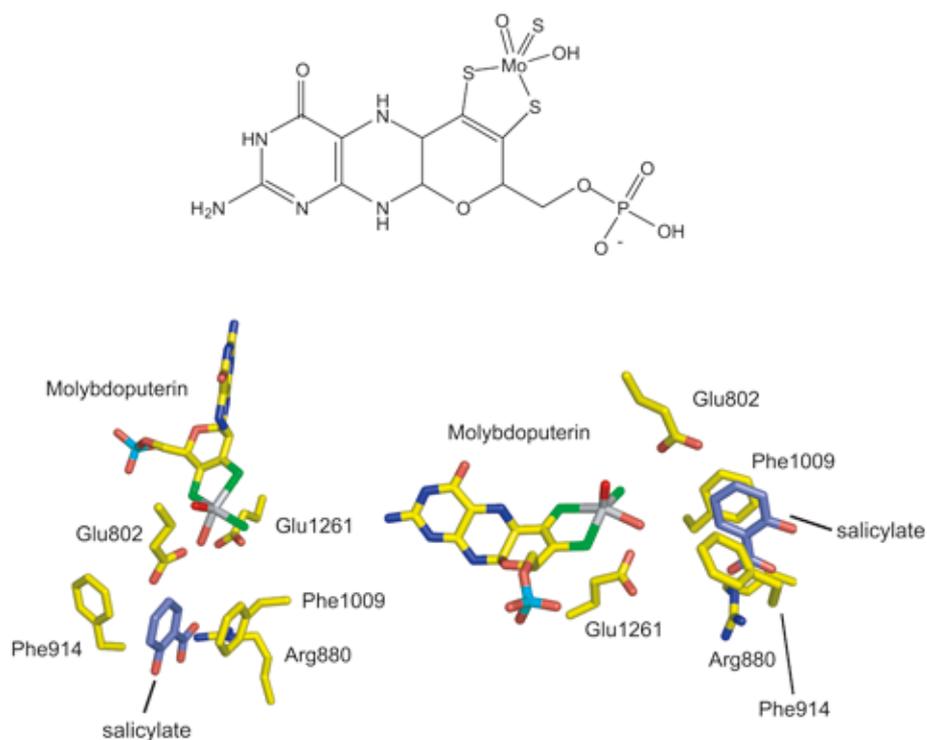


図2 ウシ XOR モリブドプテリンの構造

上：モリブドプテリンの化学構造式

下：モリブドプテリン、酵素活性と基質認識に関与するアミノ酸をスティックモデルで示した（左右は異なる方向から眺めたもの）。

結晶作成時に使用したサリチル酸（弱い阻害剤）が結合している。

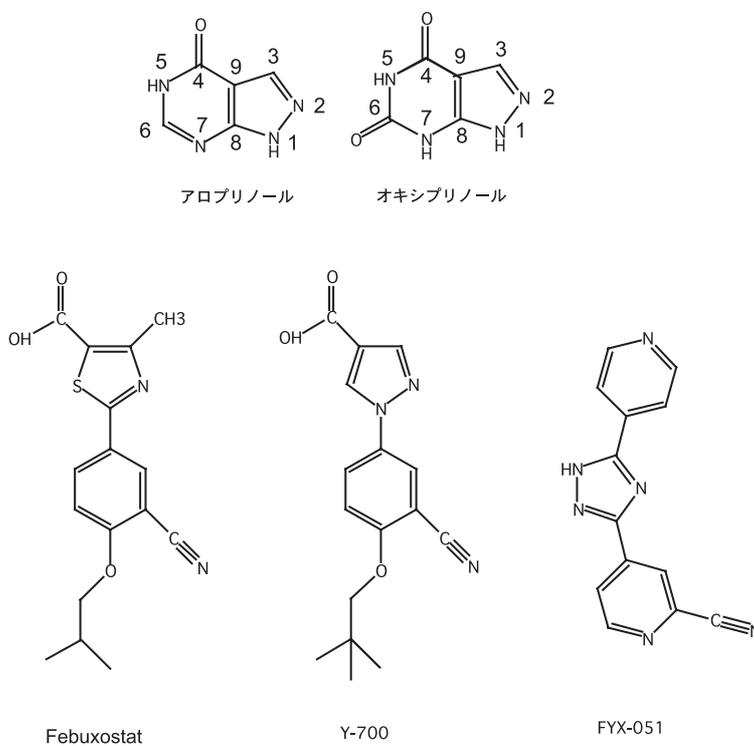


図3 XOR 阻害剤の構造

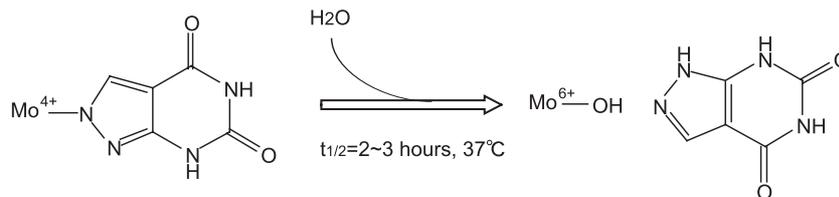


図4 オキシプリンールと酵素の複合体の模式図

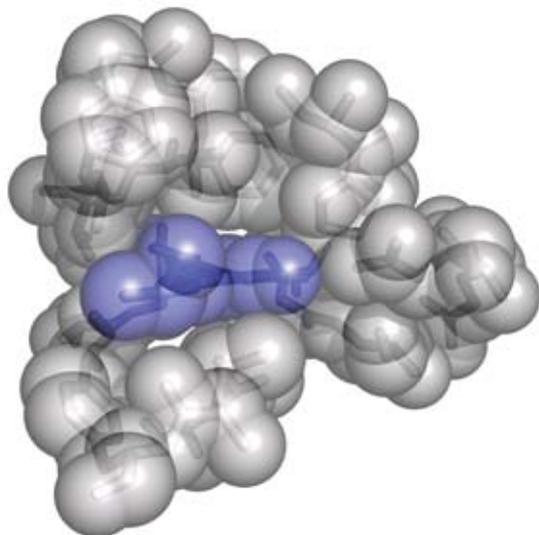


図5 febxostat と XOR 複合体結晶構造  
febxostat と隣接するアミノ酸を原子半径で示す。濃いグレーが febxostat, 淡いグレーが隣接するアミノ酸。阻害剤が溶媒チャンネルを隙間なく充填している。

で、XOR に結合はするが酵素反応を起こさない阻害剤として働くことを期待した。そのため当初は競争阻害剤として働くこと想定され、阻害定数 ( $K_i$ ) は  $10^{-6}$  M であると報告されたが、その後の研究で阻害機構は複雑で、阻害作用も想定以上に強いことが判明した<sup>18</sup>。Massey らの報告によれば、アロプリノールの 6 位 (プリン の 2 位に相当する部位) は XOR によって水酸化されオキシプリンール (4, 6 ダイヒドロキシピラゾロピリミジン) になる (図 3)。オキシプリンールは活性中心のモリブデンが基質によって還元されたモリブデン ( $\text{Mo}^{4+}$ ) と共有結合により結合し、酵素反応を阻害する。酵素との共有結合の形成がアロプリノールの阻害作用の実態である。オキシプリンールは  $\text{Mo}^{4+}$  のみと共有結合するが、 $\text{Mo}^{4+}$  は時間とともに再酸化され  $\text{Mo}^{6+}$  となるため (半減期は  $37^\circ\text{C}$  で 2~3 時間)、共有結合が消失する (図 4)。後述する新規開発の阻害剤と異なりオキシプリンールは共有結合なしでは酵素との相互作用は少なく、阻害作用が弱いので、酵素の活性は復活する。この特性は臨床的にも反映さ

れる。尿酸値を正常値に維持するためにはアロプリノールを頻繁に服用し (1 日 3 回)、オキシプリンールと還元型モリブデンの結合体を維持し続ける必要がある。

#### febxostat, Y-700 による XOR 阻害機構 —基質結合ポケットを認識する阻害機構—

新世代の尿酸生成阻害剤である febxostat と Y-700 は基本骨格として 5 員環と 6 員環を持ち、その骨格に側鎖に CN 基とメチル基の追加したものである (図 3)。キサンチンとの構造上の類似性は低く、より大きな分子である。febxostat は溶媒チャンネルの形によくフィットしており、チャンネル内には開いたスペースはほとんど存在しない (図 5)。アロプリノールとは異なりモリブデンとの間に共有結合はないが、イオン結合、水素結合、 $\pi$ - $\pi$  相互作用 (チアゾール環とフェニルアラニン残基間の相互作用)、ファンデルワールス相互作用、疎水相互作用など個々では弱い結合が多数複合して、総体として強い阻害を生み出している。また阻害剤自身も 2 個の環の間にねじれを作ることによって、酵素の構造により適合している。酵素の基質結合部の構造を巧みに利用した阻害剤である。注目すべき点は CN 基と酵素の相互作用である。CN 基は酵素の構造を利用する阻害剤 (febxostat, Y-700, FYX-051) 全てに共通の構造であり、強い阻害作用を得るために必須の構造である。CN 基は活性中心から離れた基質認識、酵素反応には直接関わっていないアスパラギン残基を認識し、水素結合を形成し、阻害をおよぼす。febxostat のような基質に比べて大きな薬剤は酵素反応には関与しない活性中心から遠いアミノ酸とも相互作用し、有利に働くことがわかる。このような相互作用は酵素—阻害剤複合体の結晶構造を解析することではじめて明らかになった。febxostat の阻害形式は反応速度論的には混合型を示すが、これは酸化型モリブデンと還元型モリブデンに対する阻害の強さが異なるためであり、酸化型モリブデンに対して  $K_i =$

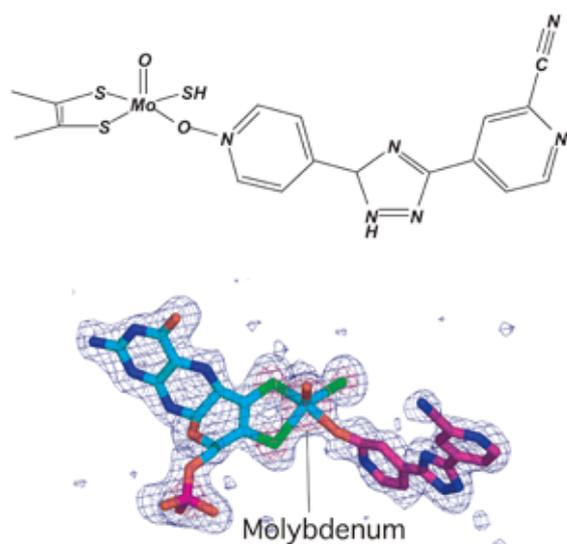


図6 FYX-051とモリブドプテリンの複合体構造  
上; FYX-051とモリブドプテリンの複合体化学構造  
(モリブドプテリンは一部のみ表示).  
下; 電子密度図 (fo-fc map) を網掛けで表す. 両者間の  
電子密度のつながりは共有結合の形成をしめす.  
FYX-051, モリブドプテリンをスティックモデル  
で表示する.

$10^{-10}$  M, 還元型モリブデンに対して  $K_i = 10^{-9}$  M を示す<sup>9</sup>. しかしアロプリノールとは異なりモリブデンの価数による阻害の差は小さく, 常に強く結合すると考えてよい. このことより酵素が生合成されてから分解されるまで (およそ 36 時間) 安定に結合し, アロプリノールに比べ少ない投与回数と投与量で有効性が維持されると予想される. 実際に日本と米国での臨床試験でそれを裏付ける結果が示されている. febuxostat はアロプリノールより少ない投与量, 投与回数で血中尿酸値を低下させている<sup>45</sup>.

febuxostat がプリン誘導体としての構造を持たないことも利点となる. 構造的にプリンとの類似点が少ない阻害剤は XOR 以外のプリン代謝酵素を阻害する可能性は低く, 重大な副作用をおこす恐れは少ないと予想される. 実際に febuxostat についてグアニンデアミナーゼ, プリンヌクレオシドフォスフリラーゼ, サルベージ酵素 HGPRTase に対して阻害作用を検討した結果では  $10^{-4}$  M 以下の濃度では阻害を示さなかった<sup>19</sup>.

Y-700 (図 3) は febuxostat と化学構造がよく似ている.  $K_i$  値は  $6 \times 10^{-10}$  M と febuxostat よりやや大きい, *in vivo* での尿酸低下作用の持続時間はアロプリノール, febuxostat より長い<sup>5</sup>. Y-700 もウシ XDH との複合体結晶構造が決定された. Y-700 は febuxostat と同じ部位に結合しており, 酵素との共有結合はない

が, 多数の相互作用が確認された. febuxostat に比べて Y-700 の *in vitro* での阻害作用が若干弱い理由は 5 員環の構造にあると考えられる. febuxostat のチアゾール環の硫黄原子に相当するものは Y-700 では窒素原子であり径が小さい. この部位でファンデルワールス力が低下することが阻害の強さに影響していると考えられる. *in vivo* における Y-700 の作用が強い理由は酵素との結合の強さではなく, 血中濃度が長く維持されるためである<sup>5</sup>.

### FYX-051 による XDH 阻害機構 —安定な反応中間体を形成する基質による阻害機構—

FYX-051 (図 3) は XDH の基質であり水酸化を受ける<sup>11</sup>. しかし安定な反応中間体を形成するため, 反応速度がキサンチンに比べきわめて遅く, 結果としてキサンチンの結合をさまたげ, 尿酸生成を阻害する. FYX-051 は還元型モリブデンと安定な反応中間体を形成し, 水酸基として基質に導入される酸素原子を介してモリブデンと共有結合をしている (図 6). 酵素の反応機構の最終段階で酵素と生成物が離れる時には水分子による置き代わりが必要である. しかし FYX-051 は溶媒チャンネルのモリブデン近くから水分子を排除するような位置をとっているため, 水酸化された FYX-051 の解離ができず, 共有結合が安定であると考えられる (25°C における半減期はおよそ 22 時間). このように FYX-051 は酵素反応がおこる仕組みを巧妙に利用して阻害している. FYX-051 の場合は共有結合の形成に加えて febuxostat, Y-700 と同様に, 周囲アミノ酸との相互作用も多数存在する. つまり FYX-051 は上で述べた 2 種の阻害剤の利点を兼ね備えたハイブリッド型の阻害剤だと言える.

### 結 語

XOR と阻害剤複合体結晶構造の解析は阻害機構の詳細を明らかにした. 立体構造から得られた情報は反応機構, 基質結合部位の情報, 基質ガイド機構など多岐に渡る. また, 酵素反応とは直接関係のないアミノ酸残基が阻害作用上重要であることも確認された. このことはタンパク質立体構造の解明によってのみ明らかにされた点であり, 今後の構造ベースの創薬には不可欠の情報となるだろう. また阻害機構から予想される尿酸低下作用が *in vivo* での効果とよく相関した点も重要である.

XOR と阻害剤をモデルとして得られた知見は大き

く二つに分けられる。一つは阻害剤と周囲アミノ酸との相互作用である。水素結合、イオン結合、疎水相互作用、ファンデルワールス相互作用などが多数複合して強力な阻害を形成している。この知見は XOR 特異的なものではなく、他のタンパク質を標的とした構造ベースの創薬にもすぐさま応用できうるものである。もう一点は酵素反応中間体形成が強い阻害を生むということである。生体内で酵素が触媒する反応は多岐にわたり、その反応機構は酵素により異なるので、酵素反応を利用する創薬を行う場合はターゲット酵素それぞれについて詳細な解析をする必要がある。今後の構造ベース創薬はこのような構造、機能の解析を両輪として複合的な設計を行ってゆくものと考えられる。

### 文 献

1. Elion GB: The purine path to chemotherapy. *Science* 1989; 244: 41-47.
2. Hille R, Massey V: Tight binding inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmacol & Ther* 1981; 14: 249-263.
3. Borges F, Fernandes E, Roleira F: Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9: 195-217.
4. Kamatani N, Fujimori S, Hada T, Hosoya T, Matsuzawa Y, Ueda T, Yamanaka H, Kato R: Febuxostat, a Novel non-purine Selective Inhibitor of Xanthine Oxidase, in a Phase III Placebo-controlled Double-blind Clinical Trial in Japanese Subjects with Gout or Hyperuricemia. *Arthritis Rheum* 2004; 50 Suppl: S337.
5. Becker MA, Schumacher HR Jr, Wortmann RL, MacDonald PA, Eustace D, Palo WA, Streit J, Joseph-Ridge N: Febuxostat Compared with Allopurinol in Patients with Hyperuricemia and Gout. *N Engl J Med* 2005; 353: 2450-2461.
6. Wortmann RL: Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 319-324.
7. Chatham WW, Saag KG: Is febuxostat a more effective treatment for hyperuricemia and gout than allopurinol? *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2006; 2: 240-241.
8. Okamoto K, Nishino T: Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor. *J Biol Chem* 2005; 270: 7816-7821.
9. Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF, Nishino T: An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *J Biol Chem* 2003; 278: 1848-1855.
10. Fukunari A, Okamoto K, Nishino T, Eger BT, Pai EF, Kamezawa M, Yamada I, Kato N: Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid]: A Potent Xanthine Oxidoreductase Inhibitor with Hepatic Excretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 519-528.
11. Okamoto K, Matsumoto K, Hille R, Eger BT, Pai EF, Nishino T: The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7931-7936.
12. Bray RC: *The Enzymes XII* (Boyer PD, ed), 1975; pp 300-419, Academic Press, New York.
13. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF: Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10723-10728.
14. Hille R: *The Mononuclear Molybdenum Enzymes*. *Chem Rev* 1996; 96: 2757-2816.
15. 岡本 研, 桑原慶充, 西野朋子, 西野武士: キサンチン脱水素酵素から酸化酵素への蛋白質構造・機能変換の分子機構. *蛋白質核酸酵素* 2004; 49: 625-633.
16. 岡本 研, 西野武士: XOR による活性酸素生成機構: レドックスシグナル発生の分子基盤. *実験医学* 2006; 24: 1724-1730.
17. Hille R, Nishino T: Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *FASEB J* 1995; 9: 995-1003.
18. Massey V, Komai H, Palmer G, Elion GB: On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *J Biol Chem* 1970; 245: 2837-2844.
19. Takano Y, Hase-Aoki K, Horiuchi H, Zhao L, Kasahara Y, Kondo S, Becker MA: Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sci* 2005; 76: 1835-1847.

(受付: 2007年1月12日)

(受理: 2007年2月21日)