

原 著**FAD および FADH₂ 存在下における D-アスパラギン酸酸化酵素と
D-アスパラギン酸のドッキングシミュレーション**

小林 佳奈,* 村上 知之, 吉田 崇志, 小田 彰史, 高橋 央宜

**Prediction of Complex Structures between D-Aspartic acid and
D-Aspartate Oxidase with Cofactor FAD or FADH₂**

Kana KOBAYASHI,* Tomoyuki MURAKAMI, Takashi YOSHIDA, Akifumi ODA, and Ohgi TAKAHASHI

(Received November 20, 2011)

Recently, D-amino acids have been found to exist in the human body both as free amino acids and as residues in proteins. The free D-Asp is degraded by D-aspartate oxidase (DDO). DDO with cofactor FAD catalyzes the oxidative deamination of D-Asp and oxaloacetic acid is generated. On the other hand, it is reported that DDO with cofactor FADH₂ can also form a complex with D-Asp. In this study, computational docking between D-Asp and DDO was carried out with FAD or FADH₂ as the cofactor. The results of docking studies indicate that D-Asp can be recognized both by DDO with FAD and DDO with FADH₂, and the difference in binding affinity between the oxidative and reductive states is caused by difference of hydrogen bonding patterns.

Key words — D-Asp; D-aspartate oxidase; FAD; FADH₂; computational docking

アミノ酸にはL-体とD-体の光学異性体が存在するが, 生体内にはL-体のみが存在していると考えられてきた。これは進化の過程においてD-体が排除され, L-体のアミノ酸のみからなる現在の生命システムが構築されたためである。しかし, 近年の光学異性体分析技術の発展に伴い, D-アミノ酸が遊離型, 結合型のどちらにおいても生体内に広く存在していることが明らかになってきた。¹⁾ タンパク質中のD-アミノ酸は白内障やアルツハイマー型認知症などの加齢性疾患と関連していることが報告されており,^{1,2)} 近年注目されている。また, ペプチド中のD-アミノ酸や遊離型D-アミノ酸は, さまざまな生理活性や機能を有していることが明らかになってきている。^{1,2)} タンパク質・ペプチド中のアスパラギン酸(Asp)は最もラセミ化しやすい

残基である。また, D-アスパラギン酸(D-Asp)はヒトを含めた哺乳類の体内に遊離型としても存在し, 松果体実質の細胞のメラトニン合成・分泌の抑制, 下垂体前葉のプロラクチン分泌の促進, 視床下部や下垂体後葉のバソプレシン・オキシトシンの産生調節, 精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生の亢進などの生理活性が報告されており,³⁾ N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)の前駆体としても働くことが知られている。

このD-Aspを分解する酵素としてD-アスパラギン酸酸化酵素(D-aspartate oxidase, DDO)がある。哺乳類にはD-アミノ酸を分解する酵素が2種類存在しており, 中性と塩基性のD-アミノ酸を基質とするD-アミノ酸酸化酵素(DAO)と, 酸性D-アミノ酸を基質とするDDOとが知られている。Fig. 1に示す

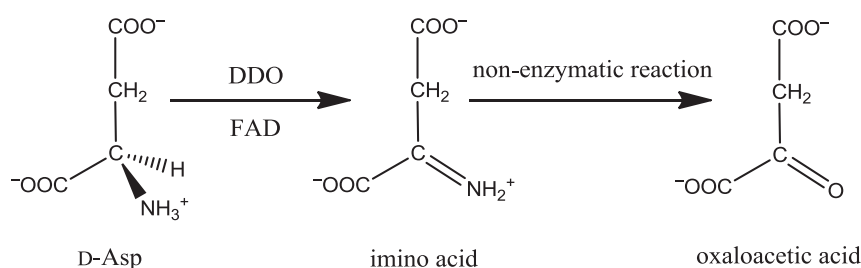


Fig. 1. The Metabolism of D-Asp by DDO

ように DDO は酸化型補酵素 FAD の存在下で D-Asp に対して酸化的脱アミノ化活性を示し、オキサロ酢酸を生成する。⁴⁾ D-Asp の α 位水素が FAD のイソアロキサジン環 (Fig. 2) の窒素原子に接近することによりプロトンが引き抜かれると考えられる。DDO ノックアウトマウスを用いた研究では、脳内における D-Asp の増加とともに、NMDA 受容体アンタゴニスト投与時に観察される統合失調症様症状の緩和が報告されている。また、DDO ノックアウトマウスは抗うつ作用を示すことが示唆されている。これらの結果から、DDO を阻害することによって NMDA 受容体に関連した疾病の症状を改善できるのではないかと期待されている。⁵⁾

前述のように DDO は D-Asp の酸化を行う酵素であるため、D-Asp と複合体を形成する際の補酵素は当然酸化型の FAD であると考えられていた。しかし近年、この DDO の基質活性化過程において、酸化型補酵素である FAD 存在下の DDO のみならず還元型補酵素である FADH₂ 存在下の DDO についても、D-Asp と複合体を形成するという報

告がなされた。⁵⁾ Fig. 3 に DDO の基質活性化メカニズムを、Fig. 4 に FADH₂ 中のイソアロキサジン環構造を示した。ここに示したように FADH₂ を含む DDO が D-Asp を認識して複合体を形成し、複合体の状態では補酵素の酸化が行われるという機構が提案されている。通常の条件下では D-Asp を認識するのは酸化型補酵素 FAD を含む DDO であると考えられているが、酵素および基質の量によって還元型補酵素 FADH₂ を含む DDO が基質認識に関与する可能性が示唆されている。

上述のように D-Asp およびその代謝酵素は生体機能において重要な役割を果たすことが知られているが、FAD 存在下の DDO、FADH₂ 存在下の DDO ともにまだ立体構造は実験的に解明されていない。まして DDO が D-Asp をどのように認識するかはまだ明確にされていない。そこで本研究ではドッキング法を用いて、FAD および FADH₂ 存在下での DDO が D-Asp をどのように認識するかシミュレーションを行った。また、FAD と FADH₂ とで基質認識に違いがあるかを検証した。

方 法

始めに Discovery Studio 2.1 を使用し、基質である D-Asp を作成した。次に北里大学の中込らが既存の D-アミノ酸酸化酵素を参考にしてホモロジーモデリングによって作成した DDO の構造⁶⁾ をもとに、FAD を含む DDO と FADH₂ を含む DDO の 2 種類の立体構造を作成した。Fig. 5 に FAD 存在下の DDO の予測構造を示した。DDO の分子量は 38 kDa、アミノ酸残基数は 330 である。さらに Discovery Studio 2.1 に実装されている LibDock⁷⁾ を使用して、それぞれの DDO と D-Asp のドッキングを行った。

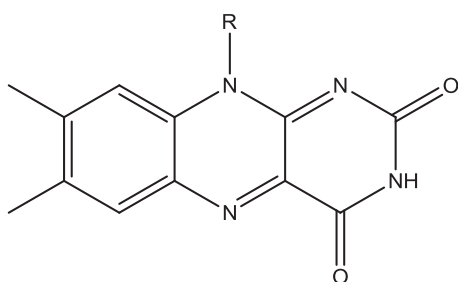


Fig. 2. The Isoalloxazine Ring in FAD

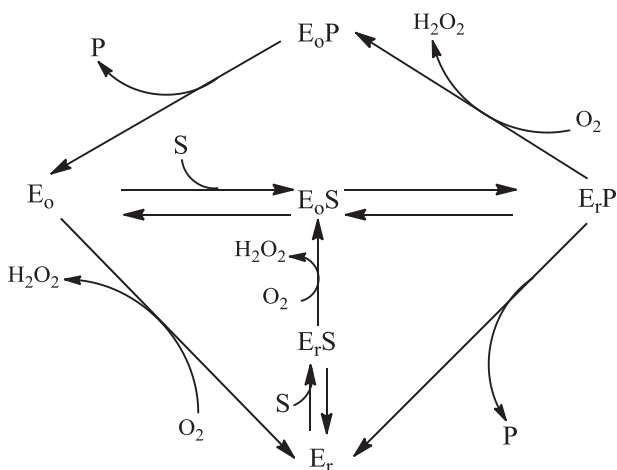


Fig. 3. The Substrate Activation Mechanism of DDO

E₀: DDO with cofactor FAD, E_r: DDO with cofactor FADH₂, S: D-Asp, P: imino acid

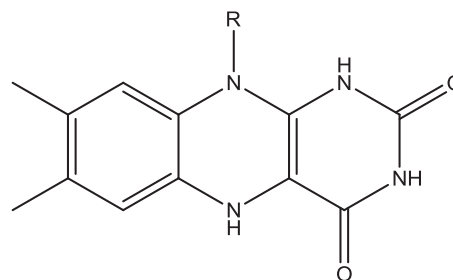


Fig. 4. The Isoalloxazine Ring in FADH₂

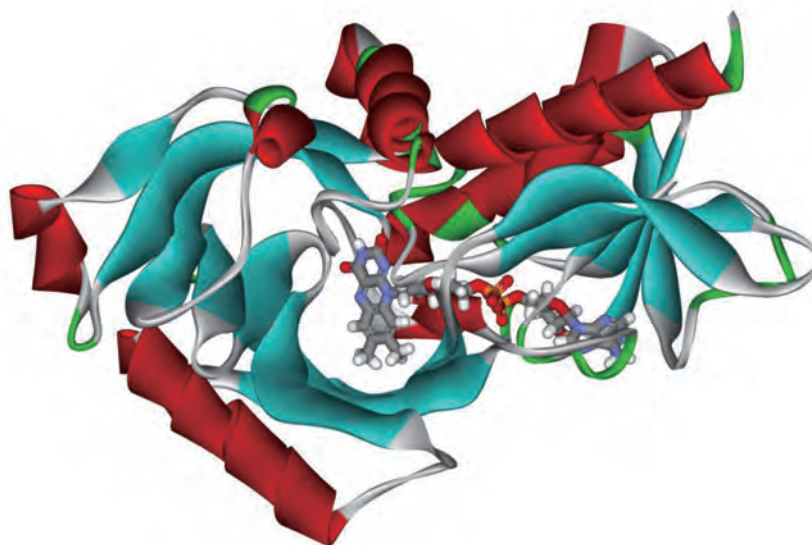


Fig. 5. Three-dimensional Structure of DDO with Cofactor FAD

ドッキングとはタンパク質と低分子化合物がどのような相互作用様式を形成するかを予測する方法である。⁸⁾ 活性部位に結合する候補化合物を仮想データベースから抽出する *in silico* スクリーニングや、活性化合物の相互作用様式を詳細に検討することでの活性化合物の課題克服などに用いることができる。本研究では LibDock を用いて計算を行った。LibDock は Diller と Merz により開発されたドッキング法である。これはまずリガンド結合部位を指定し、その部位に化合物の大きさを考慮した球を設定する。その球の中において標的タンパク質表面の極性部位と無極性部位を推定する。推定されたグリッド点のことをホットスポット (hotspot) と呼ぶ。なお、この推定においてタンパク質内部は無視される。ホットスポットは多数存在し、その極性または無極性のホットスポット 3 点に化合物の原子 3 点を重ね合わせる。極性のホットスポットには化合物の極性原子を、無極性のホットスポットには化合物の無極性原子を割り当てることになる。化合物の 3 個の原子が作る三角形と、タンパク質表面の 3 つの点で作る三角形は、ほぼ合同でなければならない。3 個の原子が割り振られた化合物は、その結合部位で最適になるようにその都度構造を構築される。このときの最適化は分子間の結合作用エネルギーと化合物のひずみエネルギーなどを極小化することで求められる。この計算により不安定なコンフォメーションは候補から外される。化合物がドッキングした複

合体の候補は多数得られるが、この候補のことをドッキングポーズと呼ぶ。また、このとき精度は高くないが結合自由エネルギーが計算され、候補が順位付けされる。本研究では LibDock をデフォルトの設定で使用し、DDO の機能を考慮した上で得られたドッキングポーズを選別した。

結果および考察

FAD 存在下の DDO と D-Asp とのドッキングにより得られた構造の 1 つを Fig. 6 に示す。D-Asp の α 位水素と、イソアロキサジン環の 1 位および 5 位窒素の間の距離は、それぞれ 3.16 Å および 3.10 Å であった。この構造では D-Asp の α 位水素がイソアロキサジン環に接近しており、DDO による酵素反応機構と矛盾しない構造となっている。すなわち FAD 存在下で DDO が D-Asp を認識し、複合体を形成することが再現できたと考えられる。また、D-Asp の α -カルボキシル基と DDO の Arg237 および Arg278 の側鎖の間でイオン結合を、D-Asp のアミノ基と DDO の Ser308 の主鎖のカルボニル基の間で水素結合を形成していた。

一方、FADH₂ 存在下の DDO と D-Asp とのドッキングにより得られた構造の 1 つを Fig. 7 に示す。D-Asp の α 位水素と、イソアロキサジン環の 1 位および 5 位窒素の間の距離は、それぞれ 3.13 Å および 3.26 Å であった。従って FADH₂ 存在下の DDO においても D-Asp の α 位水素がイソアロキサ

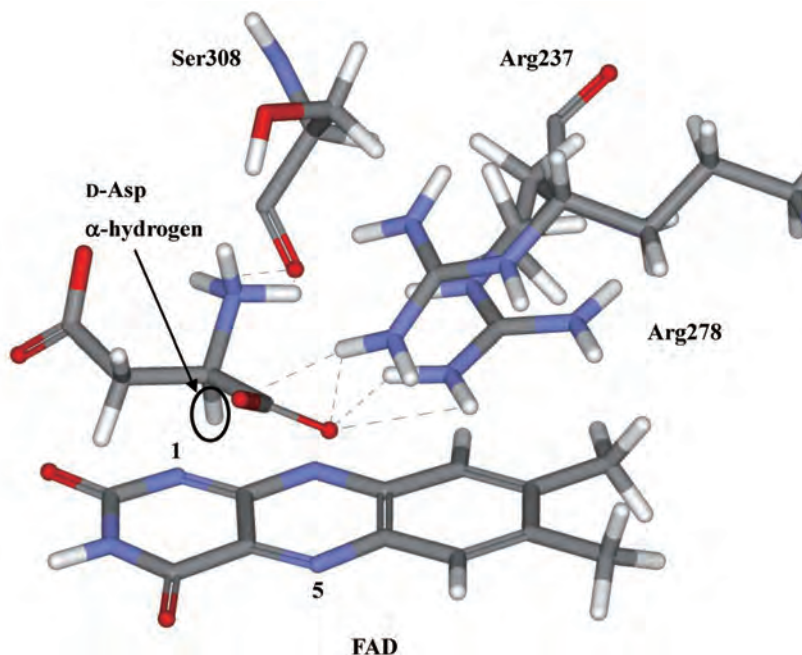


Fig. 6. A Complex Structure between D-Asp and DDO with Cofactor FAD
Broken lines indicate hydrogen bonds.

Table 1. The Number of Docking Poses and LibDockScore

| Cofactor | The number of docking poses | LibDockScore (kcal/mol) | |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | | The best pose ^{a)} | The nearest pose ^{b)} |
| FAD | 88 | 87.87 | 80.87 |
| FADH ₂ | 94 | 86.95 | 85.52 |

^{a)} The pose whose LibDockScore is the best of all poses.

^{b)} The pose in which the distance between the α -hydrogen of D-Asp and the isoalloxazine ring of the cofactor is the shortest.

ジン環に接近した構造が得られており, FADH₂ 存在下で DDO が D-Asp を認識し, 複合体を形成することが再現できた. また, D-Asp の α -カルボキシル基と DDO の Arg278 の側鎖の間でイオン結合を, D-Asp のアミノ基と DDO の Ser308 の主鎖のカルボニル基の間で水素結合を形成していた.

ここで得られた複合体構造を用いて, FAD および FADH₂ 存在下での DDO の基質認識の比較を行った. 基質認識を比較する方法の一つとしてドッキング候補数の比較を行った. LibDock を用いた場合, 複合体の候補 (ドッキングポーズ) が計算され順位付けされる. この得られたドッキングポーズの数から, DDO の立体構造中の複合体を形成するスペースの広さを評価した. もう一つの比較方法として LibDockScore の比較を行った. LibDockScore は計算によって得られたドッキングポーズと標的との結合自由エネルギーを概算した

値と対応しており, 数値が高いほど安定な構造であると予測していることになる. 本研究では, 全ドッキングポーズ中で LibDockScore 値が最良であったポーズを構造の詳細を見ずに注目した場合と, α 位水素がイソアロキサジン環に接近しているポーズのみを抽出した後に最も LibDockScore 値が高かったポーズに注目した場合の両方に対して LibDockScore の比較を行った. 前者はハイスループットなヴァーチャルスクリーニング等で用いられる評価基準であり, 後者は DDO の機能を考慮した上での評価となる. Table 1 に FAD, FADH₂ それぞれの存在下における DDO のドッキング候補数および LibDockScore をまとめた. ドッキング候補数は, FAD 存在下では 88 個, FADH₂ 存在下では 94 個であった. FADH₂ 存在下の DDO の方が多くの候補数が得られているものの, いずれもデフォルトの設定における上限値 (100) に近い数のポー

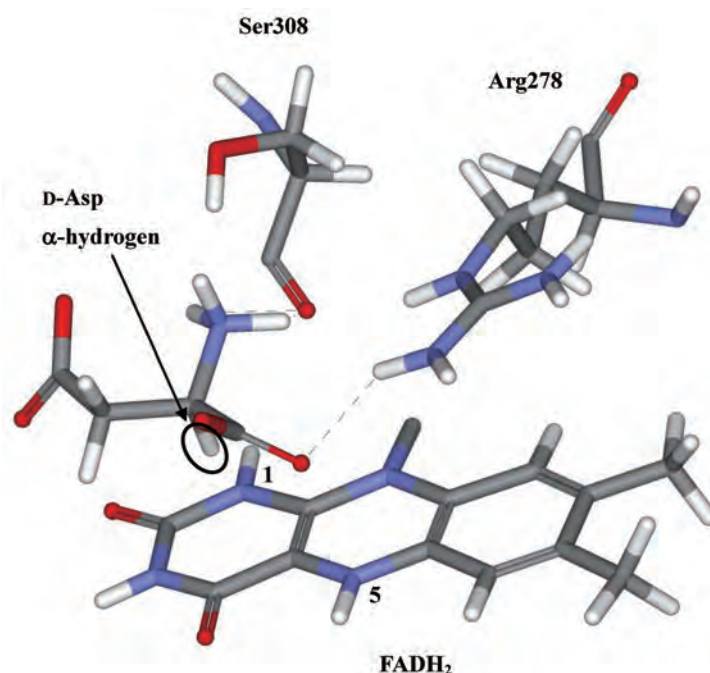


Fig. 7. A Complex Structure between D-Asp and DDO with Cofactor FADH₂
Broken lines indicate hydrogen bonds.

ズが得られており、いずれの DDO においてもリガンドが結合するスペースが十分にあるものと考えられる。また、LibDockScore の数値の比較では、 α 位水素がイソアロキサジン環に接近しているポーズの場合、FADH₂ 存在下の DDO の方が高い数値となっている。しかし、FAD 存在下で得られたポーズのうち一番接近している構造の LibDockScore は 80.87 kcal/mol であるが、他にも接近している構造はあり、その数は FADH₂ 存在下の DDO よりも多い。また、得られたドッキングポーズ全体の中で最も安定と予測された構造同士の比較では、FAD 存在下の DDO におけるドッキングポーズの LibDockScore の方が、FADH₂ 存在下の DDO に対するドッキングポーズの LibDockScore より高い値となっていた。

ここまで述べたように、FAD、FADH₂ それぞれの存在下における DDO と D-Asp とのドッキング結果から、DDO の基質活性化過程において酸化型補酵素である FAD 存在下の DDO のみならず、還元型補酵素である FADH₂ 存在下の DDO についても D-Asp と複合体を形成するという結果を再現することができた。また、複合体形成には主にイオン結合および水素結合が関与していると考えられる。このタンパク質-リガンド間の相互作用について、FAD 存在下の DDO の方がリガンドとの

間に Discovery Studio の設定によって見出される相互作用が多く、距離も短かった。これは FAD 存在下の DDO の方がリガンドとの間に相互作用を構築しやすい可能性を示唆している。一方で Fig. 6 と Fig. 7 からわかるように、DDO が D-Asp を認識するに際して疎水性の残基はあまり重要な役割を果たしていない。これは基質が酸性アミノ酸の D-Asp であることを反映しているが、この点については DDO 阻害剤のデザインの際に留意する必要があるものと考えられる。疎水性の高い化合物は特異性の点で問題を起こすことがしばしばあるが、この基質結合部位に対する阻害を考慮することでその問題を回避できるかもしれない。その点から、DDO は優れた薬物標的となる可能性がある。

ま と め

LibDock を用いたドッキング計算により、DDO が FAD および FADH₂ 存在下で D-Asp と複合体を形成することを再現できた。補酵素に FAD および FADH₂ を用いた場合、どちらの複合体も数値上では安定性に差はほとんど見られなかったが、水素結合様式の違い等に差異が存在していた。複合体の安定性をより詳しく確認するためには、今回得られたドッキングポーズに対して分子動力学シ

ミュレーションを行うなど, より詳細な検討をする必要があると考えられる.

謝辞 本研究は科研費 (23790137) の助成を受けたものである.

REFERENCES

- 1) Fujii N., Homma H., *Experimental Medicine*, **26**, 1278–1284 (2008).
- 2) Fujii N., *Chemistry Today*, 42–47 (2010).
- 3) Nagata Y., Homma H., Lee J.-A., Imai K., *FEBS Lett.*, **444**, 160–164 (1999).
- 4) Tanaka H., Yamamoto A., Ishida T., Horiike K., *Protein Nucleic Acid Enzyme*, **54**, 1190–1196 (2009).
- 5) Errico F., Rossi S., Napolitano F., Catuogno V., Topo E., Fisone G., D'Aniello A., Centonze D., Usiello A., *J. Neurosci.*, **41**, 10404–10414 (2008).
- 6) Katane M., Saitoh Y., Hanai T., Sekine M., Furuchi T., Koyama N., Nakagome I., Tomoda H., Hirono S., Homma H., *Biochim.*, **92**, 1371–1378 (2010).
- 7) Diller D. J., Merz K. M., Jr., *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **43**, 113–124 (2001).
- 8) Inoue A., Kawakami Y., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **52**, 130–136 (2004).