

酵素阻害剤の設計と合成研究

Design and Synthesis of Enzyme Inhibitors

京都大学化学研究所 生体機能化学研究系 生体触媒化学研究領域 渡辺 文太

【背景と目的】

植物ホルモンの1つであるブラシノステロイド (BR) は、細胞伸長、細胞分裂、発芽、暗所における形態形成といった生理作用を有する。1979年にGroveらによって最初のBRであるbrassinolideがアブラナの花粉から単離されて以来 (Grove et al., 1979)、これまでに70種類以上の類縁体が発見されている。1990年代には、同位元素標識体を用いた研究によって、BR生合成の主要経路が明らかにされた。さらに、BRの生合成酵素が欠損した変異体植物を用いた精力的な研究により、BR生合成経路の概要がほぼ解明された。一方、BR生合成と対をなして重要な意味を持つのがBRの不活性化である。BRの不活性化は植物体内で絶えず起こっており、内生のBR量を調節する機構として不可欠である。このようなBRの不活性化を触媒する酵素を阻害する化合物は、BRの生理学的意義の解明に役立つばかりではなく、新しい植物生長調節剤として極めて有望と考えられる。選択性の高いBR不活性化酵素阻害剤を開発するためには、不活性化経路や不活性化酵素遺伝子の解明が重要であるが、これらについての知見はほとんど得られていなかった。このような状況のもと、2005年にactivation-tagging法によって矮性を示すシロイヌナズナ変異体 (*chibi2*) が発見された (Nakamura et al., 2005)。そして、その原因遺伝子が一原子酸素添加酵素であるcytochrome P450 familyに属するCYP72C1であること、さらに、*chibi2*変異体では内生BR量が野生株に比べて著しく減少していることが明らかになった。以上より、CYP72C1はBR不活性化酵素であると推定されたが、CYP72C1の生理学的機能は全く明らかになっていない。

そこで、本研究ではCYP72C1の基質を明らかにすることを目的とし、CYP72C1と各種BRとのドッキングシュミレーションを行った。CYP72C1タンパク質の結晶構造解析は現在のところ明らかとなっていないため、京都大学化学研究所スーパーコンピューターシステムが提供しているタンパク質モデリングソフトウェアDiscovery Studioを用いてCYP72C1のホモロジーモデリングを試みた。

【方法および結果】

モデリングテンプレートを探索するため、Discovery StudioおよびKEGG websiteにあるBlastを用いてCYP72C1に高い相同性を示す遺伝子を探索した。その結果、すでに結晶構造が明らかになっている微生物由来の可溶性P450酵素遺伝子を見出した。次に、CYP72C1とテンプレート候補P450遺伝子のアミノ酸配列について、KEGG websiteにあるClustalWを用いてアライメント作業を行った。アミノ酸配列を比較した結果、それぞれ20%以下の同一性しか示さなかったが、各P450酵素の基質認識部位 (SRS1-SRS6) を比較した結果、複数の領域において相同性があったため、見出した微生物由来P450酵素をテンプレートとした。さらに、Discovery Studioを用いてCYP72C1のホ

モロジモデリングを行った結果、プリズム型をもつ標準的なP450酵素の三次元構造を有することが明らかとなった。そこで、P450酵素の活性部位に不可欠なポルフィリン環をテンプレート酵素の立体情報に基づいてCYP72C1ホモロジーモデルに組み込み、CYP72C1ホモロジーモデリング構造とした。これまでに、*chibi2*変異体と野生株の内生BR量を比較した結果、*chibi2*変異体においてBR生合成経路上の6-deoxocastasterone、castasterone、brassinolideが著しく減少していることが報告されている (Nakamura et al., 2005)。そこで、6-deoxocastasterone、castasterone、brassinolideを基質候補としてCYP72C1ホモロジーモデリング構造とドッキングシミュレーションを行った。その結果、3つの基質候補化合物はいずれも物理的に大きいため、CYP72C1ホモロジーモデリング構造の基質ポケットと結合することができなかった。このことは、P450酵素の三次元構造は生物間で共通しているとはいえ、相同性の高い領域においても基質認識部位の具体的な構造までは類似していないことを示している。すなわち、*in silico*解析においてはアミノ酸配列の類似性のみではなく、基質ポケット、具体的には「基質」の化学構造類似性を重要視する必要があることが明らかとなった。今後、BRと構造類似性を有するステロイド化合物を基質とし、すでに結晶構造解析がなされているP450酵素をテンプレートとして、CYP72C1のホモロジーモデリングを行っていく予定である。

#### 【参考論文】

Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen Jr., J. D., Steffens, G. L., Flippen-Anderson, J. L., Cook Jr., J. C., 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**, 216-217.

Nakamura, M., Satoh, T., Tanaka, S., Mochizuki, N., Yokota, T., Nagatani, A., 2005. Activation of the cytochrome P450 gene, *CYP72C1*, reduces the levels of active brassinosteroids *in vivo*. *J. Exp. Bot.* **56**, 833-840.