

ラットカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ  
アポ、ホロ体の構造生物学的研究  
及びリガンド複合体の構造解析研究

医歯薬学総合研究科 薬学専攻 創薬科学講座 創薬合成化学研究室

辻 英一 (D076109)

序論	4
第一章 COMT 蛋白質	8
1-1 COMT による <i>O</i> -メチル化反応メカニズム	8
1-2 COMT 蛋白質の Catalytic cycle	10
第二章 ヒト COMT の結晶構造解析	13
2-1 3,5-dinitrocatechol-ヒト COMT 複合体の構造	13
2-2 ラット COMT とヒト COMT の構造比較検討	14
第三章 ラット COMT Apo, Holo 体の立体構造解析	16
結果考察の部	
3-1 全体構造 (Apo 体)	16
3-2 全体構造 (Holo 体)	18
3-3 全体構造比較	19
3-4 Apo 体の構造に関する他の研究結果との比較	20
3-5 AdoMet サイト	21
3-6 リガンド結合サイト	24
3-7 Apo 体における新規相互作用サイトの提案	28
3-8 COMT の基質認識メカニズムの解釈	30
第四章 ラット COMT リガンド複合体の構造解析とドラッグデザイン	34
結果考察の部	
4-1 4PCM-COMT 複合体全体構造	36

4-2	活性部位における4PCMとCOMTの相互作用	37
4-3	ドラッグデザインに対する指針	40
実験の部 (第二章)		
2-1	蛋白質発現及び精製	42
2-2	ヒト COMT 複合体結晶化	50
2-3	回折データ収集及び構造解析	51
実験の部 (第三章)		
3-1	蛋白質発現及び精製	55
3-2	ラット COMT の Apo, Holo 体複合体結晶化	62
3-3	回折データ収集及び構造解析	63
実験の部 (第四章)		
4-1	4PCM-COMT 複合体結晶化	70
4-2	回折データ収集及び構造解析	70
配列表 第二章 (ヒト COMT)		75
配列表 第三章 (ラット COMT)		77
謝辞		79
参考文献		81
本学位論文に直接関係のある学術論文及び特許		86

## 序論

COMT (COMT : EC 2.1.1.6) は、生体内において、神経伝達物質であるカテコールアミン類およびカテコール構造を有する種々の化合物の代謝に重要な役割を果たしており、ヒトでは様々の臓器に分布している (Karhunen et al., 1994)。薬理的には、Fig. 1 に示す L-dopa, carbidopa などの不活性化に関与し、生体内の dopamine の代謝を調節する酵素である。従って、脳内の dopamine 不足による運動機能障害を病態とするパーキンソン病治療薬の標的蛋白質として位置づけられている (Guldborg et al., 1975)。

パーキンソン病は、神経変性疾患であり、dopamine を生産する中脳の黒質部分の神経細胞が変性脱落するのが特徴である。その結果、運動のスムーズな遂行が障害され、“筋肉が固くなる”、“手足がふるえる”、“動作が緩慢になる”などの症状が徐々にあらわれて進行し、やがては死にいたる難病である。Fig. 2 に示すようにパーキンソン病の治療法は基本的には dopamine の補充療法である。しかし、dopamine は血液脳関門 (Blood-brain barrier) を通過できないため、血液脳関門を通過できる dopamine の前駆物質である L-dopa の経口投与でその補充がなされている。しかしながら、L-dopa は末梢でドパ脱炭酸酵素による dopamine への代謝のほか、COMT による 3-O-methyldopa (3-OMD) への代謝も受ける為、COMT を阻害することにより L-dopa の脳内移行を促進し、パーキンソン病治療に効果を示すことになる (Mannisto et al., 1989), (Kaakkola et al., 1990)。

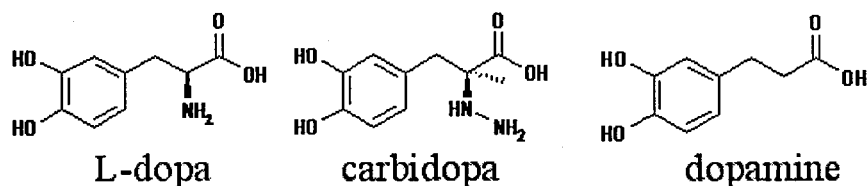


Fig. 1: Molecular structures of substrates of COMT.

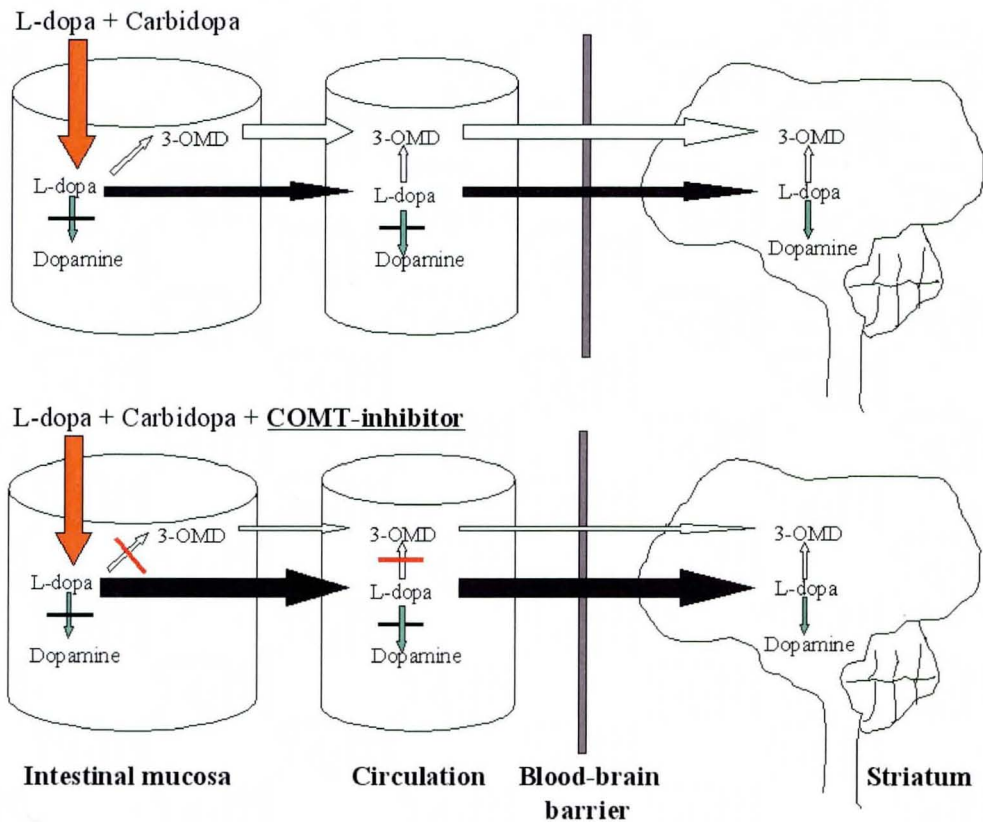


Fig. 2: The rationale of COMT inhibition as adjunct in the L-dopa therapy of Parkinson's diseases. (Reproduced from Structure-Based Drug Design Veerapandian Eds. Marcel Dekker Inc.)

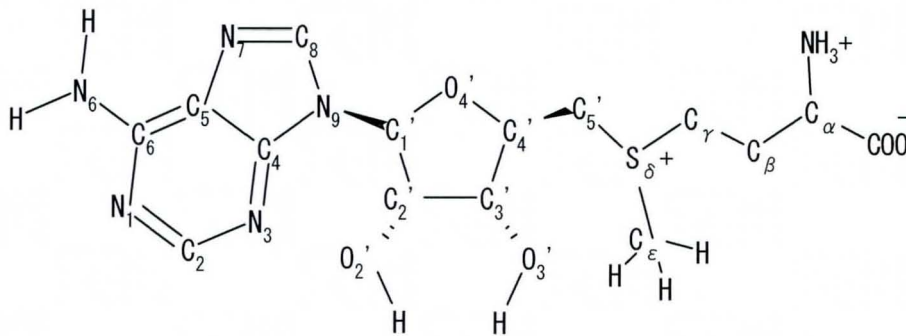


Fig. 3: Molecular structure of AdoMet.

COMT は、補酵素としてマグネシウムイオンと (AdoMet) S-アデノシル-L-メチオニン (Fig. 3) を必要とし、カテコール基質へのメチル基の転移を触媒する酵素である。 COMT の四成分複合体 (COMT-AdoMet-マグネシウムイオン-リガンド) の立体構造情報はラット、ヒトにおいて公知である (Vidgren et al., 1994) が、Lotta らが提唱した catalytic cycle (Lotta et al., 1995) に存在する Apo 体もしくは Holo 体の立体構造情報は得られていない。 catalytic

cycle における酵素の立体構造情報を得ることは、COMT 蛋白質のメカニズムを理解するだけでなく、理論的薬物設計においても重要な役割を果たす。

本研究では、第一章において、現在までに解明されている COMT の基質認識メカニズム、ヒト COMT の catalytic cycle、COMT 蛋白質の立体構造上の特徴について述べた。

第二章においてヒト COMT を大量発現および高純度精製し、その立体構造を決定した。その結果よりラットとヒト COMT の 3 次構造の相同性が非常に高く保存されている事及び、ラット COMT の構造解析を行う事の妥当性を述べた。

第三章において、ラット COMT を大量発現および高純度精製し、Apo 体および Holo 体の結晶を調整し、その立体構造を決定した。その結果、Apo 体は四成分複合体構造に比較して大きなコンフォメーション変化を起こし、AdoMet サイトは完全に消滅していた。Apo 体の構造は開いた構造をとり、リガンド結合サイトの明確な溝は形成されていなかった。一方、Holo 体では AdoMet とマグネシウムイオンは四成分複合体と同様な位置関係で相互作用していたが、一部、ディスオーダー領域があり、リガンド結合サイトは部分的に形成されたのみであった。四成分複合体と Apo、Holo 体の構造比較をすることで初めて COMT の補酵素の認識メカニズムおよび、リガンド結合サイトの形成メカニズムを明らかにすることができた。更に、Apo 体では新たな”Y”字型のくぼみが形成されており、新規 COMT 阻害剤デザインのターゲット部位を提示できた。

第四章では、蛋白質の立体構造を基にした *in-silico* スクリーニングから見出された新規リガンド (4PCM) とラット COMT の複合体結晶を調整した。その複合体構造解析より相互作用パターンを解析した。構造解析より得られた情報より、より高活性な阻害剤を創製する為のドラッグデザイン指針を提示した。

# 第一章 COMT 蛋白質

## 1-1 COMT による *O*-メチル化反応メカニズム

COMT の AdoMet, マグネシウムイオンおよび基質様リガンドの認識パターンについては種々の四成分複合体の結晶構造解析より幅広く研究されている (Vidgren et al., 1994), (Palma et al., 2006), (Bonifacio et al., 2002), (Lerner et al., 2001)。 Fig. 4 には *O*-メチル化反応の模式図を示す。カテコールは2つのヒドロキシル基によりマグネシウムイオンに配位し、AdoMet のメチル基により、*O*-メチル化反応を受ける。 Lys144 はメチル化を受ける側のカテコールヒドロキシル基の水素原子を脱プロトン化する一般塩基触媒の役割があり、Glu199 は反応中間体を安定化する役割があるとされている (Ovaska et al., 1998), (Woodard et al., 1980)。 マグネシウムイオンには水分子、Asp141, Asp169, Asn170 が配位し、計6配位で存在する。 次に Fig. 5 にラット COMT の四成分複合体の立体構造を示す (Vidgren et al., 1994)。 ここでは、アミノ酸の機能別に色分けして表示してある。 青は基質の大きさや選択性に関与する残基で、Trp38, Pro174 はカテコール環を両側から挟むような位置にあり、"gate keeper" と言われている (Vidgren et al., 1999), (Vidgren et al., 1997)。 Leu198 および Trp143 も同様にリガンドの大きさを規定するとされている (Learmonth et al., 2004), (Palma et al., 2006)。 赤で示す残基は AdoMet を水素結合で固定している。 アデニン環は Ser119, Gln120 が6位の窒素原子(N6)と水素結合し、リボース環の O2' と O3' は Glu90 と、また、メチオニン部分は Gly66, Val42, Ser72, Tyr71 の主鎖とそれぞれ水素結合している。 Met40 は AdoMet の  $-S_6^+(C_6H_3)$  の上部に位置し、*O*-メチル化反応が適切に行われるように  $-S_6^+(C_6H_3)$  を固定化しているとされている (Vidgren et al., 1997)。



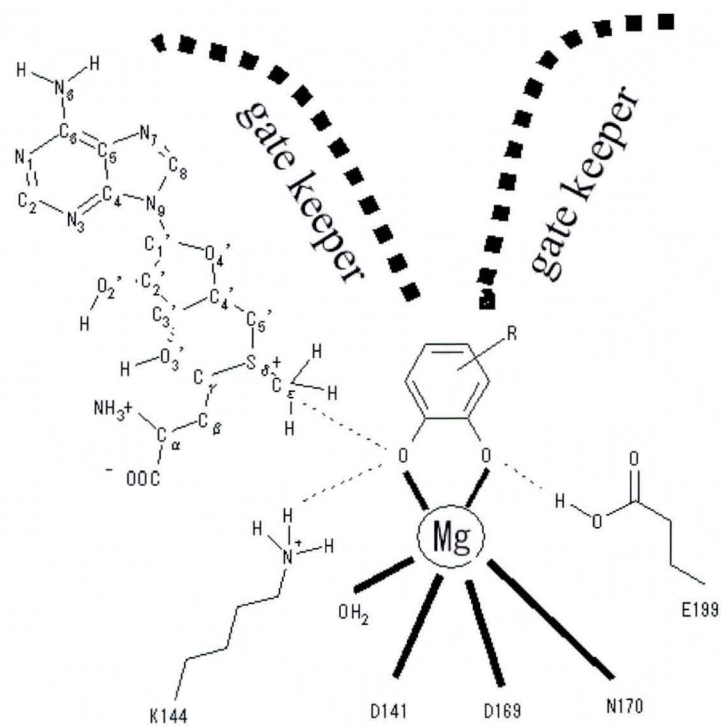
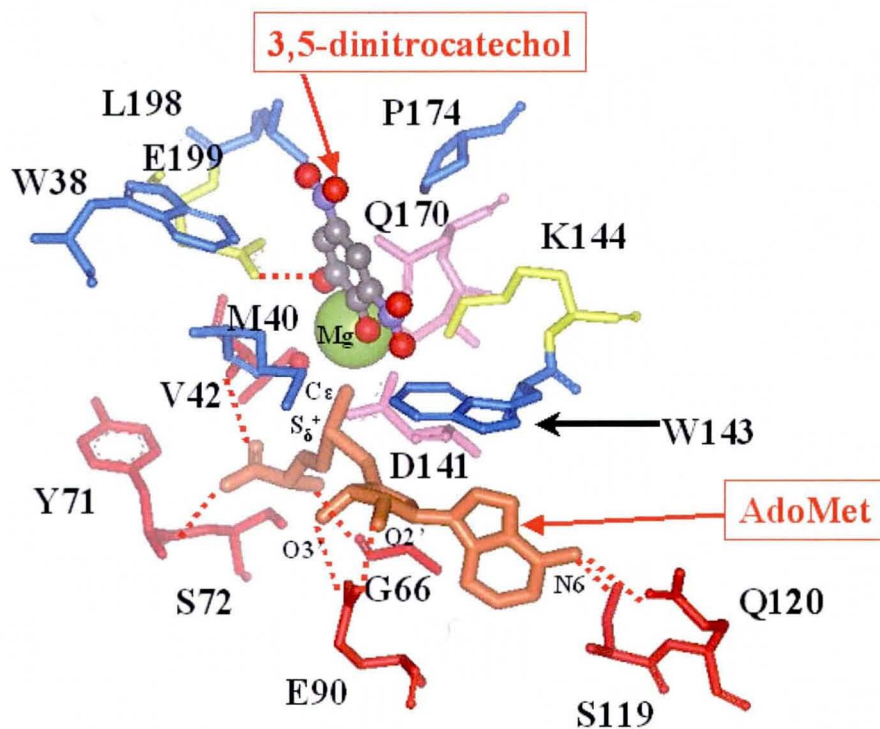


Fig. 4: Schematic drawing of ligand site of COMT.



PDB: 1VID Vidgren et al., Nature 368 (1994) 354-358

Fig. 5: Three-dimensional structure of quaternary complex of COMT (1VID). Pink stick represents residues that coordinating to  $Mg^{2+}$  ion. Red stick represents residues that hydrogen bond to AdoMet. Yellow stick represents residues that participate to *O*-methylation reaction. Blue stick represents residues that participate the selectivity of substrate.

## 1-2 COMT 蛋白質の Catalytic cycle

ヒト COMT のカインेटィクスについては Lotta らにより研究されており (Lotta et al., 1995)、sequential ordered mechanism と呼ばれている (Fig. 6)。それによると、補酵素が結合していない Apo 体に AdoMet が先ず結合し、次いでマグネシウムイオンが結合して Holo 体になるというものである。Vidgren らによるラット COMT の四成分複合体構造 (Vidgren et al., 1994)、及び筆者らによるヒト COMT の四成分複合体結晶構造 (特開 2006-23<sup>3)</sup>) の活性部位は、AdoMet (Kd=23 $\mu$ M) の方がマグネシウムイオンより酵素内部に位置し、溶媒から遮蔽されている。この事は Apo 体が活性型 (Holo 体) になるには、まず AdoMet が結合した後にマグネシウムイオンが結合するという Lotta らの生化学的な実験結果を立体構造の面から支持するものである。また、COMT の酵素カインेटィクスが成立するためには O-メチル化反応の後に AdoMet の脱メチル体である AdoHcy (S-Adenosyl-L-homocysteine), 並びにマグネシウムイオンを放出して Apo 体になる必要があり、catalytic cycle の中で COMT がコンフォメーション変化を起こす過程が存在することが推測できる。

## Catalytic cycle of human COMT(\*)

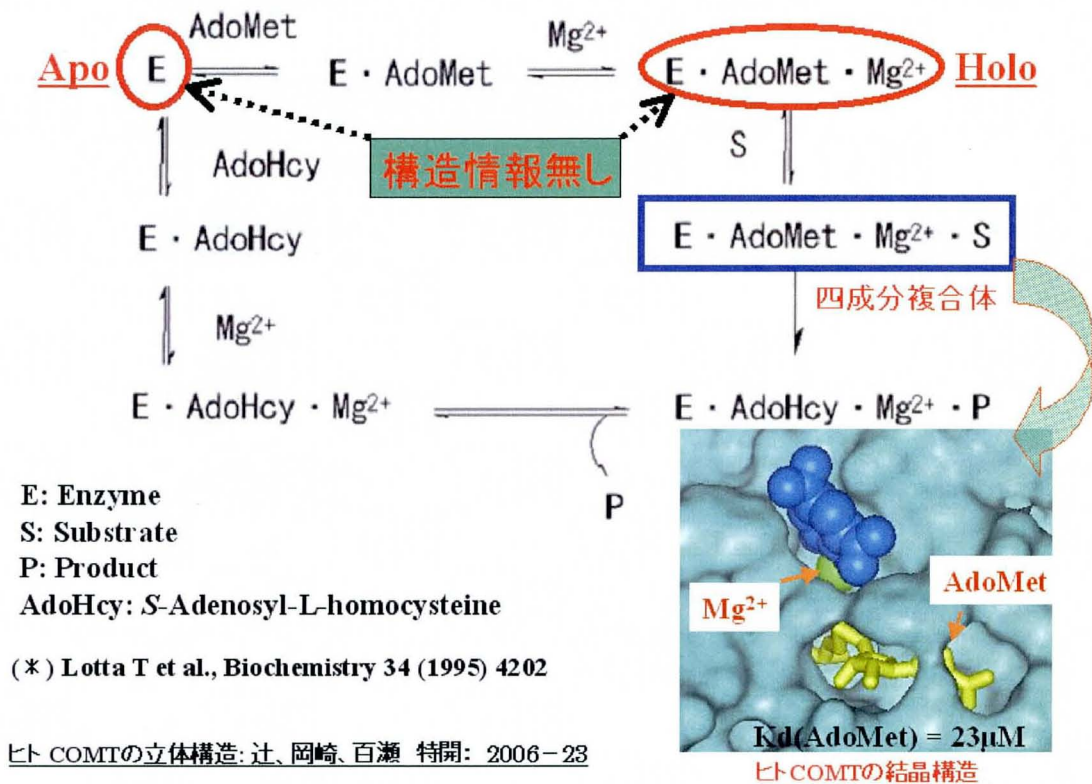


Fig. 6: Catalytic cycle of COMT (E = enzyme, S = catechol substrate, P = O-methylated catechol product, AdoHcy = S-Adenosyl-L-homocysteine)

次に Fig. 7 に、COMT 蛋白質の二次構造比較を示す。 アミノ酸の種類毎に色分けし、アステリスクは完全一致をまた、コロンは 3 種の内、1 つのアミノ酸が違う事を示す。 2 次構造上に併記してある “α” は α-ヘリックスを、“β” は β-シートを示す。 本研究においては、S\_COMT (Soluble COMT) を構造解析の対象とした。(尚、MB\_COMT とは膜結合型の COMT を指す。) 二次構造比較の結果、ヒトとラットの全体の相同性は 81%と高い値を示した。 また、基質及び補酵素が相互作用しているアミノ酸主鎖と側鎖をそれぞれ赤の囲みと黄色の囲みで示しているが、この部分の相同性は 96%と更に高い二次構造相同性を示した。 この結果からも、ヒトとラットの構造と機能の類似性が高い事が推測できる。 次章では、ヒト COMT の立体構造解析の結果を示し、ラット COMT との比較を行う。

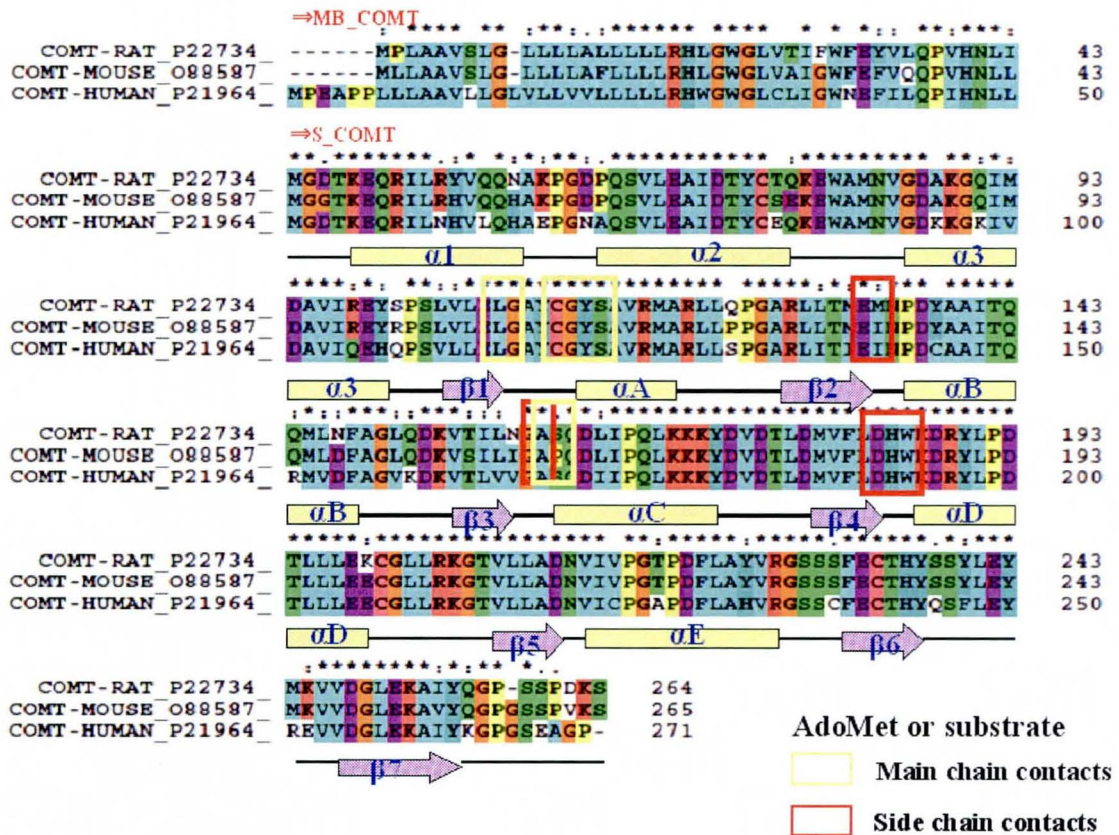


Fig. 7: Amino acid sequence alignments of known COMT sequences. Asterisk represents identical amino acids. The main chain contacts with AdoMet or substrate are highlighted as yellow rectangle. The side chain contacts with AdoMet or substrate are highlighted as red rectangle. Each sequence is given from SWISS\_PROT database. (Alphabet with five digits number shows data base code.) Amino acid sequence alignments were performed by CLUSTALX Version 1.81.

## 第二章 ヒト COMT の結晶構造解析

### 結果及び考察の部

#### 2-1 3,5-dinitrocatechol-ヒト COMT 複合体の構造

ヒト COMT 四成分複合体構造 (特開 2006-23<sup>3)</sup>) は中央にある 7 つのシートを 8 つのヘリックスが囲む構造をとり (Fig. 8)、この構造は後述するラット四成分複合体構造 (Vidgren et al., 1994, PDB accession code: 1VID) と一致していた。

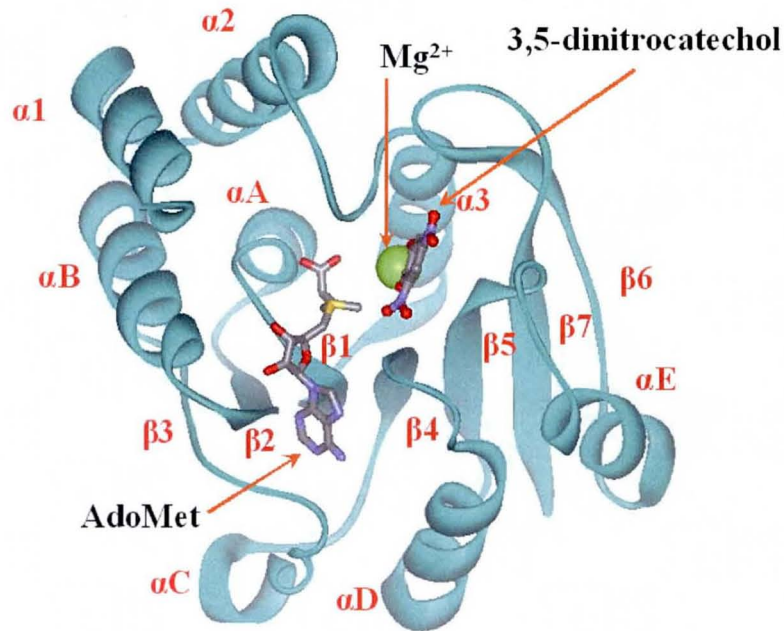


Fig. 8: The overall structure of 3,5-dinitrocatechol-Human COMT complex.

AdoMet, マグネシウムイオン, 3-5-dinitrocatechol はラット四成分複合体構造 (PDB accession code: 1VID)と同じく、蛋白質表面の溝に結合していた (Fig. 9)。また、 $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループ及び  $\beta 6$ - $\beta 7$  ループは、活性部位に向かって折れたたまった構造を取っていた。Fig. 10 に  $C\alpha$  でヒト COMT 四成分複合体構造と 1VID を重ねた図を示す。これによると、全体構造を  $C\alpha$  で重ねた場合の RMSD 値は  $0.38\text{\AA}$  となり、両者は非常に類似した構造を取っていることが分かる。尚、重ね合わせはプログラム LSQKAB (Kabsch et al., (1976) により行った。

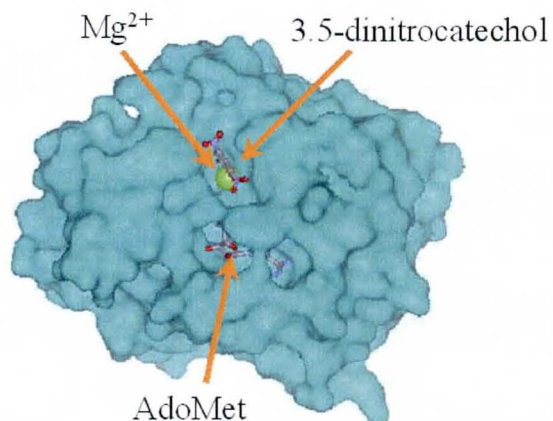


Fig. 9: AdoMet and 3,5-dinitrocatechol are shown in stick representation colored by atom type.  $Mg^{2+}$  is shown in green CPK. The protein surface is shown in light blue.

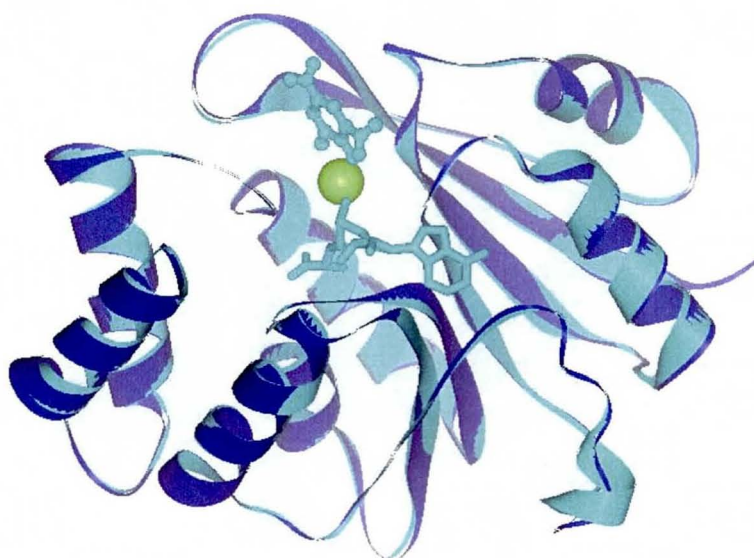


Fig. 10: Overlay drawing of the three-dimensional structures of Human and Rat COMT (Human COMT: JP 2006-23, Rat COMT: 1VID). Blue: 1VID, Light blue: Human COMT.

## 2-2 ラット COMT とヒト COMT の構造比較検討

前章で述べたように、Lotta らの生化学的実験の結果を立体構造の情報から考察する為にはヒ

ト COMT の立体構造が必須である。 筆者らは本研究に際して、ヒト COMT の四成分複合

体構造解析（特開 2006-23<sup>3)</sup>）以外に、ヒト COMT の Apo、及び Holo 体の結晶化実験を試み

た。 しかしながら、延べ 10,000 条件の探索にも関わらず結晶を得ることは出来なかった。

そこで、ラットとヒトの二次構造及び三次構造の比較より、ラット COMT の構造解析を行う

事の妥当性について言及する。 Fig. 11 (a) にはヒト COMT のリガンドと補酵素結合部位をラット四成分複合体構造と同様にアミノ酸の機能別に表示した。 Fig. 11 (b) にはラットとヒトのリガンドと補酵素結合部位の重ね合わせ図を示す。

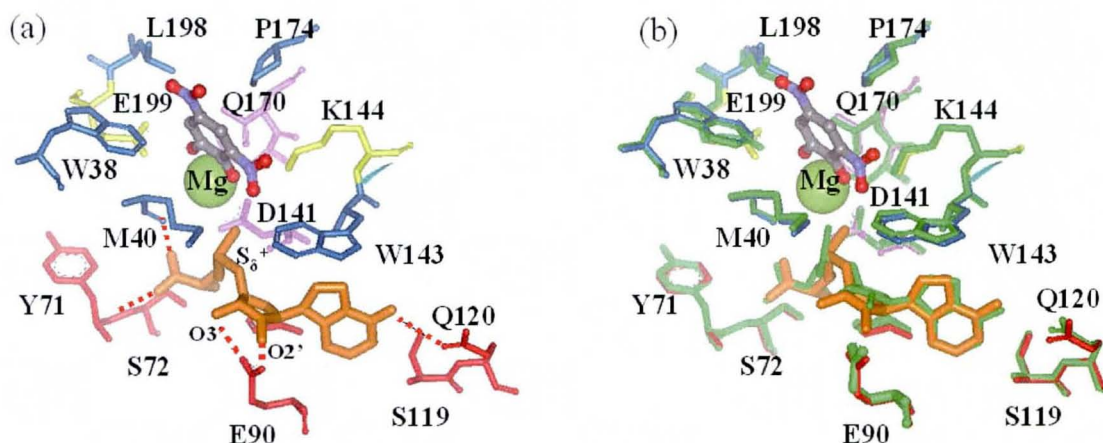


Fig. 11: (a): Three-dimensional structure of quaternary complex of 3,5-dinitro catechol - human COMT complex (JP 2006-23). Pink stick represents residues that coordinating to Mg<sup>2+</sup> ion. Red stick represents residues that hydrogen bond to AdoMet. Yellow stick represents residues that participate to O-methylation reaction. Blue stick represents residues that participate the selectivity of substrate (b): Overlay drawing of the three-dimensional structures of Human and Rat COMT (Human COMT: JP 2006-23, Rat COMT: 1VID). Green stick representation is 1VID.

その結果、ラットとヒトは二次構造のみならず活性部位を含む三次構造の類似度も非常に高く保存されていることが証明できた。 よってラットとヒトの補酵素及び基質の認識メカニズムは構造と機能の両面で保存されていると推測できる。 そこで、以降の実験の全てと考察はラット COMT にて行った。

## 第三章 ラット COMT の Apo, Holo 体の立体構造解析

### 結果及び考察の部

#### 3-1 全体構造 (Apo 体)

組換えラット COMT は中央にある 7つのシートを 8つのヘリックスが囲む構造 (Eiichi T, et al., 2009<sup>1)</sup>, PDB accession code: 2ZLB) をとる (Fig. 12 (a))。この構造は四成分複合体構造と一致していた。β1-αA ループ構造部分にはメチルトランスフェラーゼ群に共通に保存された AdoMet 相互作用アミノ酸配列 (Vidgren J et al., 1994) がある。Apo 体のヘリックス構造とシート構造の総体的な位置関係は四成分複合体のそれとほぼ同じであった。しかし、α1 と αB ヘリックスはそれぞれ 2.0Å、2.2Å その位置を変えていた。最も大きな違いは β6-β7, α2-α3, β5-αE 及び β4-αD を結ぶループ構造であった (Fig. 12 (b))。α2-α3 を結ぶループ部分には AdoMet と直接相互作用する Met40 と Val42 が含まれているが、四成分複合体構造 (PDB accession code: 1VID) と比較して最大で 11.9Å (Cα) 動いていた。β4-αD を結ぶループは AdoMet のアデニン環を収容するポケットを構成しているが、His142 残基の Cα 原子は 1VID と比較して 3.8Å 移動していた。His142 と Trp143 は β4-αD ループに含まれているが、この両残基の側鎖は AdoMet 相互作用サイトを占有していた。



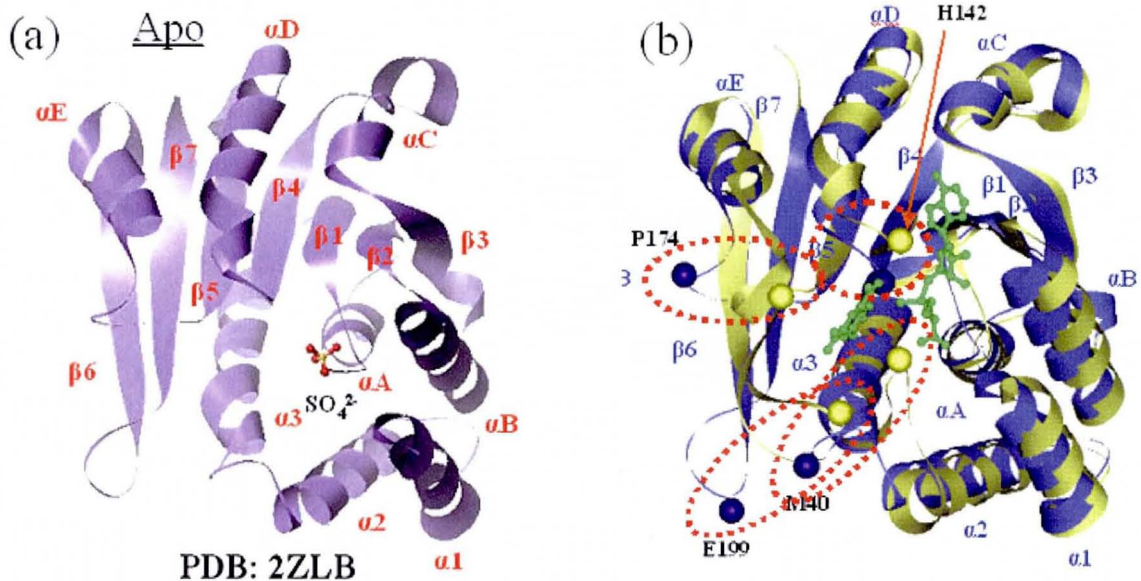


Fig. 12 (a): Ribbon representation of the Apo form of COMT (PDB accession code: 2ZLB). The sulfate ion is depicted as a ball and stick representation. (b): The Apo form of COMT is superimposed with the quaternary structure of COMT (PDB code: 1VID). Blue represents Apo form, Pale yellow represents 1VID, and Blue and pale yellow CPK represent the C $\alpha$  atoms. Red broken circles show the structural changes between the Apo and complex form. The ball-and-stick models represent AdoMet and 3,5-dinitrocatechol. For clarity, the sulfate ion derived from the crystallization buffer in the Apo structure and Mg<sup>2+</sup> ion from the Holo structure are not shown.

$\beta 6$ - $\beta 7$  ループに含まれる Glu199 は AdoMet によるメチル化反応に直接関与する残基だが (Ovaska et al., 1998)、その C $\alpha$  原子は四成分複合体構造 (PDB accession code: 1VID) に比して 13.7Å 動いていた。同様に  $\beta 5$ - $\alpha E$  ループに含まれる Pro174 は基質の立体的な大きさの選択性に関与する残基だが、その C $\alpha$  原子は四成分複合体構造 (PDB accession code: 1VID) に比して 8.6Å 移動していた。様々な阻害剤との複合体の構造より、 $\beta 6$ - $\beta 7$  と  $\beta 5$ - $\alpha E$  ループに含まれる残基はリガンド結合ポケットを形成していることが分かっているが (Learmonth et al., 2004), (Palma et al., 2006)、Apo 体では溶媒側に露出しており、明確なりガンド結合サイトは形成されていなかった。すなわち、Apo 体では部分的に“開いた”構造をとっている事が分かった。ここで、Apo 体 (PDB accession code: 2ZLB) の溶媒接触面積 (Solvent Accessible Surface Area: SASA) から、四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) の SASA を残基毎に差し

引いた結果を示す (Fig. 13)。 縦軸の SASA の差分値が大きいほど、溶媒により接触している事を示す。 それによると、 $\alpha 2\text{-}\alpha 3$  ループ、 $\beta 5\text{-}\alpha E$  ループ、 $\beta 6\text{-}\beta 7$  ループ および  $\beta 4\text{-}\alpha D$  ループの溶媒接触面積は四成分複合体に比較して優位に広く、これらの 4 ループが溶媒側に張り出し、蛋白内部の残基を露出させている事を示している。

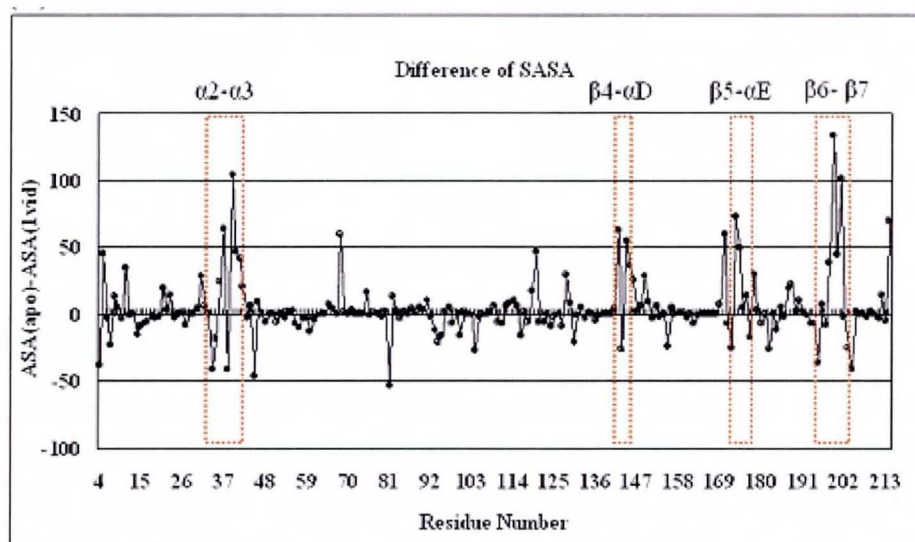


Fig. 13: Differences in the solvent-accessible surface areas between the Apo form (PDB accession code: 2ZLB) and quaternary complex structure of COMT (PDB accession code: 1VID). Residue numbering coincides with the quaternary complex of COMT. Solvent-exposed residues are demarcated by dotted orange rectangles. Solvent-accessible surface area was calculated with AREAIMOL software (CCP4 Version. 6.0.1).

### 3-2 全体構造 (Holo 体)

Holo 体 (Eiichi T, et al.,2009<sup>1)</sup>, PDB accession code: 2ZTH) では、 $\alpha 2\text{-}\alpha 3$  ループ部分のディスオーダーが激しく、電子密度を捉える事が出来なかった。  $\beta 5\text{-}\alpha E$  ループおよび  $\beta 4\text{-}\alpha D$  ループは四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) が示す位置とほぼ同じ位置まで動くが、興味深いことに Glu199 を含む  $\beta 6\text{-}\beta 7$  ループは完全には閉じない、部分的に閉じたコンフォメーションを取っていた (Fig. 14)。

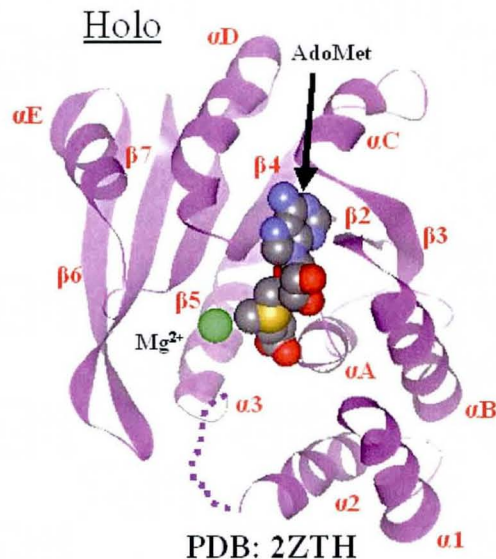


Fig. 14: Ribbon representation of the Holo form of COMT. (PDB accession code: 2ZTH). The AdoMet is depicted as a CPK model. The broken line represents the missing electron density corresponding to residues 36-41 (Lys36-Glu37-Trp38-Ala39-Met40-Asn41) .

### 3-3 全体構造比較

全体構造の比較を四成分複合体と Apo、Holo 体で行った結果を (Fig. 15) に示す。

ここで特徴的なのは、ヘリックス及びシート構造の相対的な位置は三種類の構造の間で殆ど変化していないという事である。コンフォメーション変化を起こしているループ部分には AdoMet とリガンドの相互作用に関与する残基の殆どが集中している。AdoMet 認識に関与する残基は、 $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループ以外は Apo 体と四成分複合体でほぼ同じ位置であるが、リガンド認識に関与する残基は非常に大きく動くことが分かった。この事より、リガンド結合サイトは様々なサイズのリガンドに合わせてコンフォメーションを変えうる事を示唆している。

青:Apo (2ZLB), 紫:Holo (2ZTH), 黄:4成分複合体(1VID)

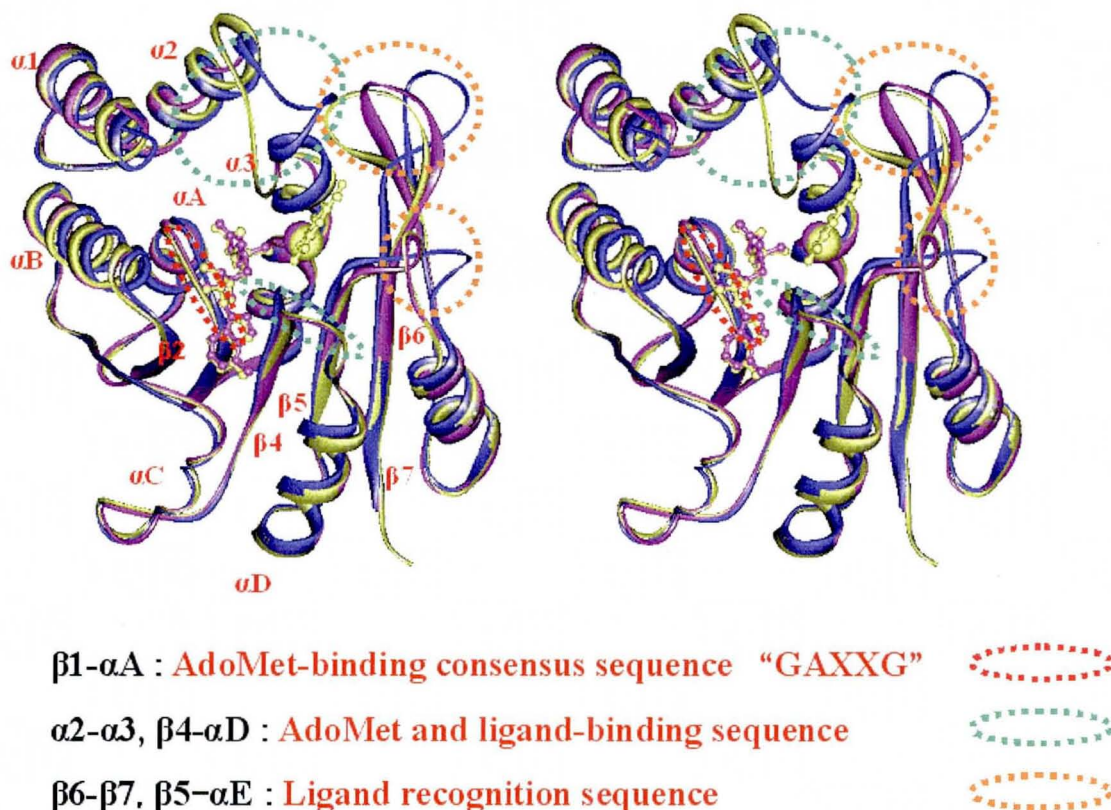


Fig. 15: Apo and Holo forms of S-COMT are superimposed with quaternary structure (PDB code: 1VID). Blue represents Apo, Cyan represents Holo, and Pale yellow represents 1VID. AdoMet and the  $Mg^{2+}$  ion are depicted as ball and stick representations.

### 3-4 Apo 体の構造に関する他の研究結果との比較

近年、計算化学的手法でラット及びヒト COMT の Apo 体の MD シミュレーション (分子動力学シミュレーション) に基づく構造変化の研究が成されている (Bunker et al., 2008), (Rutherford, K. et al., 2006)。それによると、四成分複合体座標から、補酵素を除いた状態を Apo 体構造として作製し、溶媒を含めたシミュレーションから Apo 体への構造変化を考察している。Bunker らの結果によると、ラット COMT の Apo 体はヘリックス及びシートの相対的位置は大きく動き、全体的に“緩んだ”構造を取っていた。MD シミュレーション後に行った構造最適化のステップにおいて、ヘリックス-ヘリックス、ヘリックス-シート、シート

ーシート間に働く水素結合による相互作用が崩れたことによるものと考えられる。 Bunker らの結果は本研究で導いた結果と異なる点である。

一方で、Bunker らは Tyr200, Met40, Gly175 を中心とするループ部分の揺らぎが他に比べて大きい事を見いだしている。 筆者らによる Apo 体の結晶構造 (PDB accession code: 2ZLB)では、 $\alpha 2-\alpha 3$  (Met40 を含む)、 $\beta 5-\alpha E$  ループ (Gly175 を含む) の温度因子が他に比して高いことが分かっており、方法論の違いに依らず同一の結果を与えたことは興味深い。

### 3-5 AdoMet サイト

AdoMet サイトに相互作用するアミノ酸残基は四成分複合体構造において Vidgren らにより研究されている (Vidgren J et al., 1994)。 特に  $\beta 1-\alpha A$  ループに含まれるアミノ酸残基 "GAXXG" は AdoMet 依存性メチルトランスフェラーゼにおいて高度に保存されている (Schluckebier et al., 1995)。 この領域は AdoMet のメチオニン部分が水素結合し、 $\beta 2$  ストランドにある Glu90 は AdoMet のリボース環のヒドロキシル基と水素結合を形成している。 Met91 はアデニン環と van der Waals 相互作用し、His142 が反対の面から edge-to-face の CH/ $\pi$  相互作用を形成している。 更に、Trp143 はアデニン環の C8 原子の水素原子と edge-to-face の CH/ $\pi$  水素結合をしている。

Apo 体 (PDB accession code: 2ZLB) では His142, Trp143 の側鎖同士が edge-to-face の CH/ $\pi$  相互作用を、また Arg144 の側鎖が Trp143 と  $\pi/\pi$  スタッキング相互作用して AdoMet 結合部分を占有していた (Fig. 16 (a), (b))。

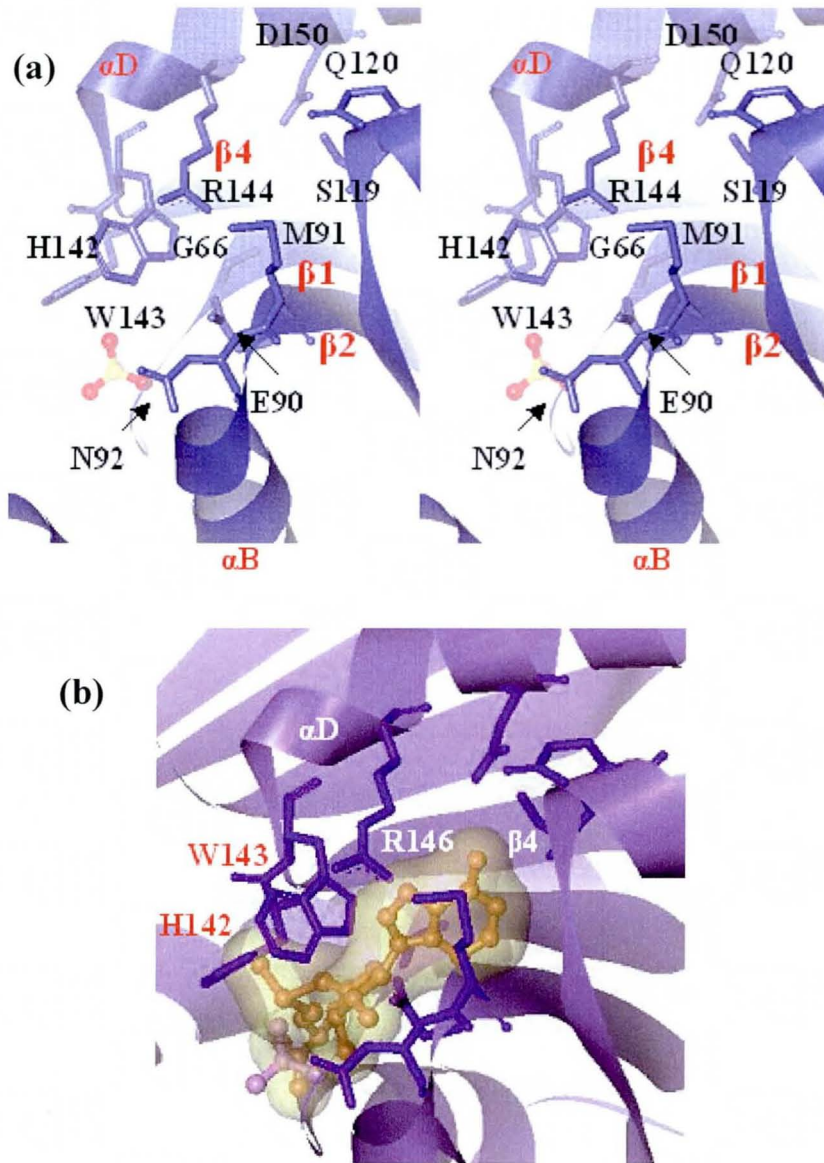


Fig. 16 (a): Close-up view of the AdoMet-binding site of the Apo form (PDB accession code: 2ZLB). The sulfate ion is depicted as a ball and stick representation. (b) : Close-up view of AdoMet site of Apo form of COMT. Ball-and stick representation with van der Waals surface is AdoMet (PDB accession code: 1VID).

その為、Apo 体には AdoMet サイトは存在しないことが分かった。 Glu90 は  $\beta$ 4- $\alpha$ D ループにある Trp143 のインドール環 NE1 位の水素原子と水素結合していた。 また、 $\beta$ 1- $\alpha$ A ループの Ala67 と  $\beta$ 2- $\alpha$ B ループの Asn92 のアミド水素とも水素結合していた。 Met40 の Ca 原子は AdoMet サイトから大きく動き、四成分複合体の位置から 11.9Å 移動して溶媒領域に露出していた。 その Met40 の主鎖カルボニル酸素原子は Val42 主鎖のアミドと水素結合し、側鎖は

Tyr200 の側鎖と van der Waals 相互作用していた。Ser119 の O $\gamma$  は Asp150 の OD1 と水素結合していたが、Met91 と Gln120 はアデニン環が無い場合、水素結合は消失していた。AdoMet サイトの N 末側には結晶化バッファー由来の硫酸イオンが Tyr68 から Ser72 によるループ部分と水素結合による相互作用をしていた。マグネシウムイオンに配位する Asp141 は Ser72 と水素結合し、更に Lys46 の Nz 原子と salt bridge を形成していた。四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) では Gly66 の主鎖カルボニル酸素原子は AdoMet のメチオニン残基の NH<sub>2</sub> と水素結合していたが、Apo 体ではループ部分が四成分複合体を基準として約 31.5° 振れていた。

Fig. 17 に AdoMet サイトの模式図を示す。

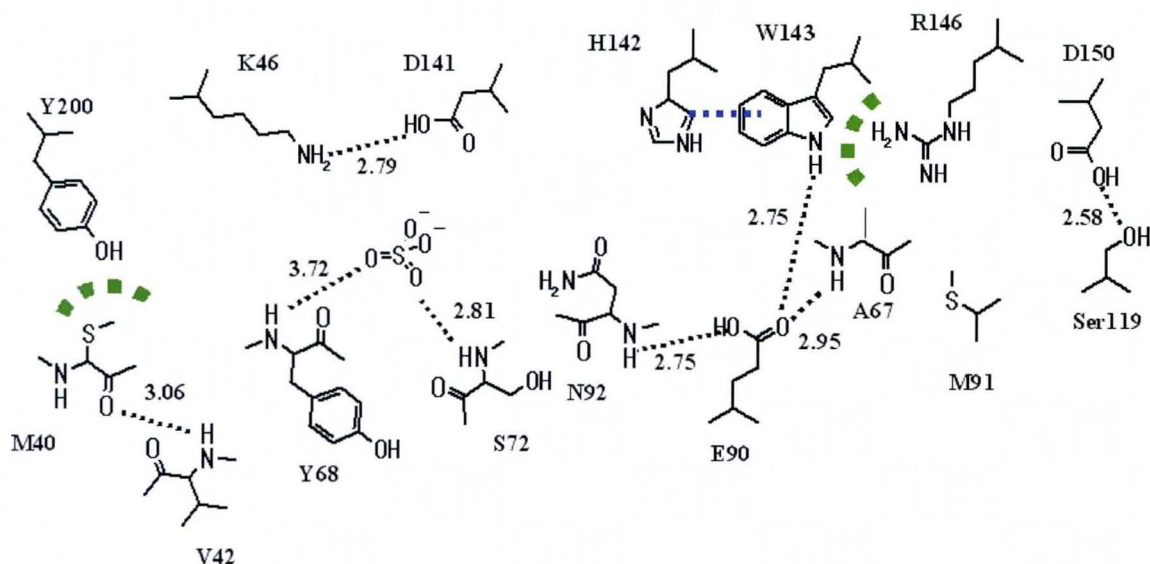


Fig. 17: Schematic representation of the AdoMet binding site in the Apo form of S-COMT (PDB accession code: 2ZLB). Expected hydrogen bond interactions are shown as dotted black lines. Observed distances are given in Å. A dotted blue line indicates a CH/ $\pi$  interaction.  $\pi$  -  $\pi$  interactions are indicated as dotted green lines. The figure was produced with ISIS Draw (MDL).

Holo 体 (PDB accession code: 2ZTH) においては  $\beta$ 1- $\alpha$ A ループにある AdoMet 認識配列は四成分複合体と同様な相互作用 (水素結合ネットワーク) を形成していた (Fig. 18)。 $\beta$ 4- $\alpha$ D ループは四成分複合体と同じ位置まで動き、アデニン環収容ポケットを形成していた。このループ

内にある Trp143 は隣接する Glu56 の側鎖と相互作用していることが確認できた。これは、結晶化バッファー中で、 $\beta 4$ - $\alpha D$  ループがコンフォメーション変化を起こす過程の中間状態にトランプされたと考えられる。

Apo 体で消滅していた AdoMet サイトが Holo 体において獲得されるためには  $\beta 4$ - $\alpha D$  ループのコンフォメーション変化が必須である。Apo 体と Holo 体では  $\beta 1$ - $\alpha A$  ループの位置が保存されている事より、まず、 $\beta 4$ - $\alpha D$  ループのコンフォメーション変化に伴うアデニン環収容ポケットの形成が最初に行われると考えられる。

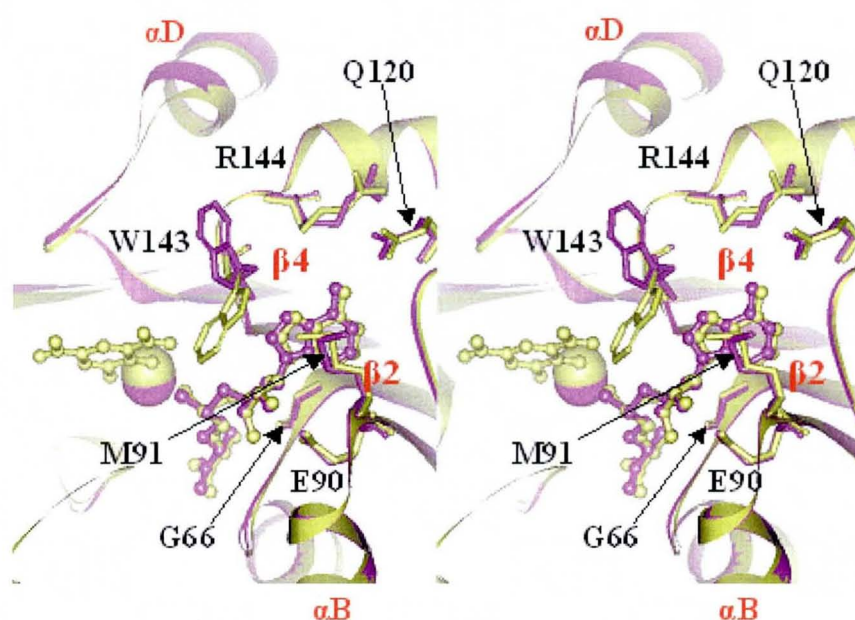


Fig. 18: Close up stereo view of the AdoMet-binding site of the Holo form (PDB accession code: 2ZTH) and complex structure (PDB accession code: 1VID). Cyan represents Holo, and Pale yellow represents 1VID. AdoMet is depicted as a ball and stick representation.

### 3-6 リガンド結合サイト

Apo 体におけるマグネシウムイオンに配位する Asp141, Asp169, Asn170 の Ca 原子の位置は四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) とほぼ同じであった。一方で、マグネシウムイオンとの配位子場を持たないため、側鎖のコンフォメーションは大きく違っていた。Asp141



は硫酸イオン及び Lys46 とそれぞれ 2.56Å, 2.79Å で水素結合し、Asp169 は Lys46 と 2.60Å で水素結合していた。しかし、Asn170 は溶媒側にあり、他の残基とは相互作用していなかった (Fig. 19 (a))。次に、四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) との構造比較について示す (Fig. 19 (b))。Fig. 19 (b) には四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) の残基である P174 と E199 を、更にマグネシウムイオンと 3,5-dinitrocatechol を重ねて表示してある。O-メチル化反応に関与する Glu199 ( $\beta 5$ - $\beta 6$  ループ) の Ca は 13.7Å 溶媒側に移動していた。また、側鎖は Tyr200 の側鎖と  $\pi/\pi$  スタッキング相互作用していた。同様に Lys144 も溶媒側にあった。 $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループ (Trp38 を含む) と  $\beta 5$ - $\alpha E$  ループ (Pro174 を含む) の両ループは四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) に比して開いたコンフォメーションを取り、Trp38 は Cys33, Val42 の側鎖と van der Waals 相互作用していた。更に、Tyr71 とも CH/ $\pi$  相互作用があり、 $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループの主鎖は Apo 体において単一のコンフォメーションで存在していた。Pro174 は溶媒側に突き出しており、他のアミノ酸との相互作用は確認できなかった。後に Holo 体についても言及するが、Apo 体 Trp38 の側鎖インドール環部分の電子密度は一部不鮮明であった。Apo 体においても Holo 体同様  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループは本質的に高いエネルギー状態にあるものと推察できる。

以上の結果より、Apo 体のリガンド結合サイトは三つのループ ( $\beta 5$ - $\beta 6$ ,  $\alpha 2$ - $\alpha 3$ ,  $\beta 5$ - $\alpha E$ ) が開いた構造をとることにより、四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) に見られる明確なサイトは無いことが分かる。

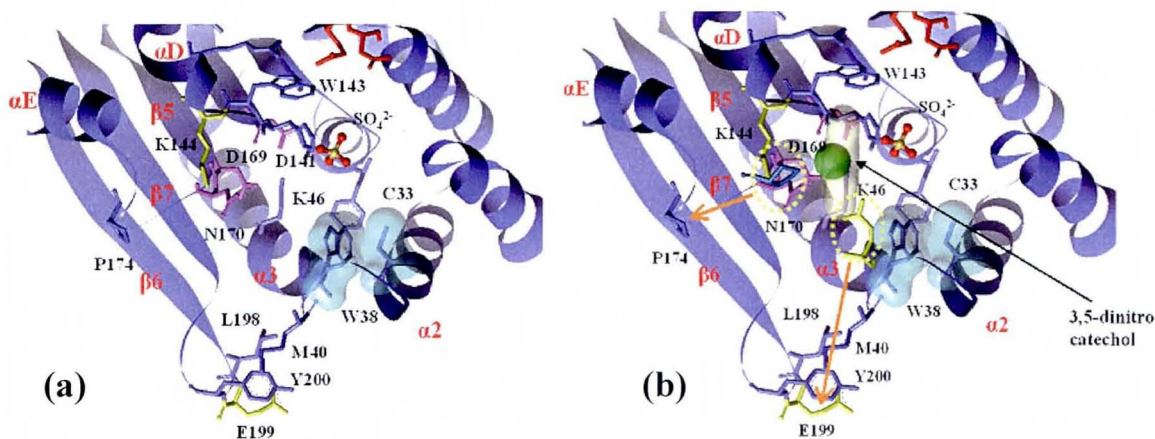


Fig. 19 (a): Close up view of the ligand-binding site of the Apo form (2ZLB). The sulfate ion is depicted as a ball and stick representation. Yellow represent the side chain of K144 and E199 respectively. Cyan represents the side chain of D141, D169 and N170 respectively. Blue stick with van der Waals surface represents the side chain of W38 and C33. (b): Close up view of ligand-binding site of the Apo form. Yellow dotted circle represent the side chain of P174 and E199 respectively (1VID). Pale yellow surface represents 3, 5-dinitro catechol and the CPK represents the  $Mg^{2+}$  ion respectively (1VID).

次に、Holo 体に関して示す (Fig. 20 (a), (b))。 Holo 体ではマグネシウムイオンは Asp141, Asp169, Asn170 により三配位の配位子場を形成していた。 マグネシウムイオンの 3 配位はあまり例がないが、大腸菌 *DhaL* 蛋白質サブユニットの結晶構造 (PDB accession code: 2BTD) では確認されている (Oberholzer, A. E. et al., 2006)。 Holo 体のループ部分では、 $\beta 5$ - $\alpha E$  ループのみが四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) と同じコンフォメーションをとっていた。恐らく Pro174 は "gate keeper" としてマグネシウムイオンの配位子場に適切にリガンドを配向させる役割があると考えられる。 同様に、Leu198 も側鎖が四成分複合体とほぼ同じ位置まで移動していた。 Leu198 は *ortho*-, *meta*-nitro 置換の阻害剤の活性部位における配向に関与するとされている (Learmonth et al., 2004), (Palma et al., 2006)。 Apo 体、Holo 体、四成分複合体の構造を比較すると、Apo 体から活性コンフォメーションに変化する際に Pro174 と Leu198 は *O*-メチル化されるべき基質の向きや大きさを規定する役割があると考えられる。 Glu199 を

含む  $\beta 6$ - $\beta 7$  ループは Apo 体と四成分複合体の中間の位置にあり、部分的に閉じたコンフォメーションをとっていた。また、Holo 体の  $\beta 6$ - $\beta 7$  ループは温度因子が高く、Tyr200 は四成分複合体で観察されるような Asn41 側鎖との水素結合は形成していなかった。 $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループのディスオーダーと合わせると、Holo 体においても Apo 体と同様、明確なリガンドサイトは形成されていなかった (Eiichi T et al., 2009<sup>1)</sup>)。

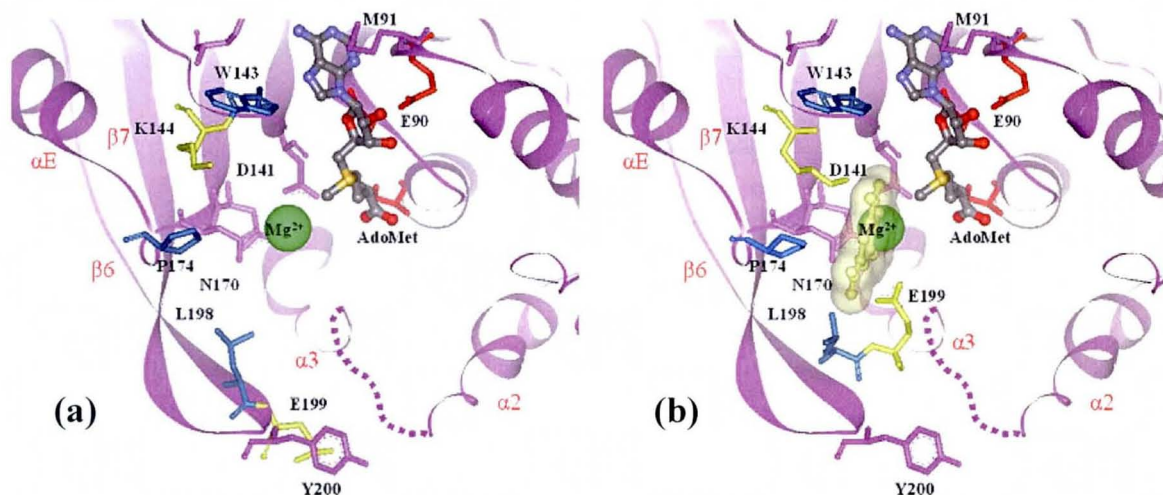


Fig. 20 (a): Close up view of the ligand-binding site of the Holo form (PDB accession code: 2ZTH). The AdoMet is depicted as a ball and stick representation. The CPK represents the  $Mg^{2+}$  ion Yellow represent the side chain of K144 and E199 respectively. Cyan represents the side chain of D141, D169 and N170 respectively. Blue stick represents the side chain of P174, L198 and W143 respectively. The broken line represents the missing electron density corresponding to residues 36-41. (b): Close up view of ligand-binding site of the Holo form. Yellow stick represents the side chain of K144 and E199 of quaternary complex structure (1VID). Pale yellow ball-and-stick model with van der Waals surface represents 3,5-dinitrocatechol and the CPK represents the  $Mg^{2+}$  ion respectively (1VID).

Fig. 20 (b) には Holo 体の構造に四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) の P174, L198, E199, K144 の側鎖を、また、3,5-dinitrocatechol を重ねて表示してある。 Fig. 20 (a) と (b) を比較すると、*O*-メチル化に関与する Lys144, Glu199 は Holo 体においても、活性部位より遠位にあることが分かった。つまり四成分複合体になって初めて活性部位が形成されて、反応に適切な位置まで移動してくる事になる Fig. 20 (b)。この事実は四成分複合体の構造解析の結果か

らは全く推測できない結果であった。 Holo 体が Apo 体に比してコンフォメーションのディスプレイオーダー（つまり多様な構造を取りやすい）という現象は Koshland らによって提唱された KNF (Koshland-Némethy-Filmer) sequential model, (Koshland, D. E. et al., 1966) に類似していると考えられる。 Koshland によると、

- (1) リガンドが無い場合は、蛋白質は単一のコンフォメーションで存在する
- (2) リガンドが結合することにより、コンフォメーション変化が惹起され、隣接するサブユニットの構造変化も引き起こす
- (3) 伝播された構造変化に伴い、基質認識及び酵素反応に関与する残基が正しい配向をとる

というモデルである。 Koshland のモデルを COMT に当てはめてみると、Apo 体ではディスプレイオーダーの無い単一のコンフォメーションであったが、補酵素の結合に伴いコンフォメーションが変化し、基質が結合することで O-メチル化反応に関与する残基が正しく配向するという事になる。 これはまさに "induced-fit" そのものであり、シングルドメインの COMT があってもサブユニット構造を有する酵素（例：ヘモグロビン）の様な振る舞いをする事を示している。 以上の結果は AdoMet 依存性のメチルトランスフェラーゼでは初めて解明された知見である。 また、ラット COMT の Holo 体の結晶構造は特願 2004-265207 <sup>4)</sup>としても出願済みである。

### 3-7 Apo 体における新規相互作用サイトの提案

Apo 体では、リガンド結合サイトは明確には存在しなかった。 しかしながら、新規に Y 字型の相互作用サイトが存在することが分かった。 Holo 体においては、 $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループのディ

スオーダーがあるために COMT 蛋白質に様々なコンフォメーションが存在することが分かったが、Apo 体は単一且つ、隣接 COMT の影響が無いコンフォメーションで存在する。この新規サイトは Y 字型を呈し、(1) Val42, Cys33 及び Trp38 が脂溶性且つ  $\pi$  電子系リッチなサイト、(2) Asp169, Asp141, Lys46, Ser72 などの電荷を有したアミノ酸からなるサイト、(3) 硫酸イオンがあるアニオンホール、以上の三種類のサイトで特徴付けられる (Fig. 21 (a), (b))。

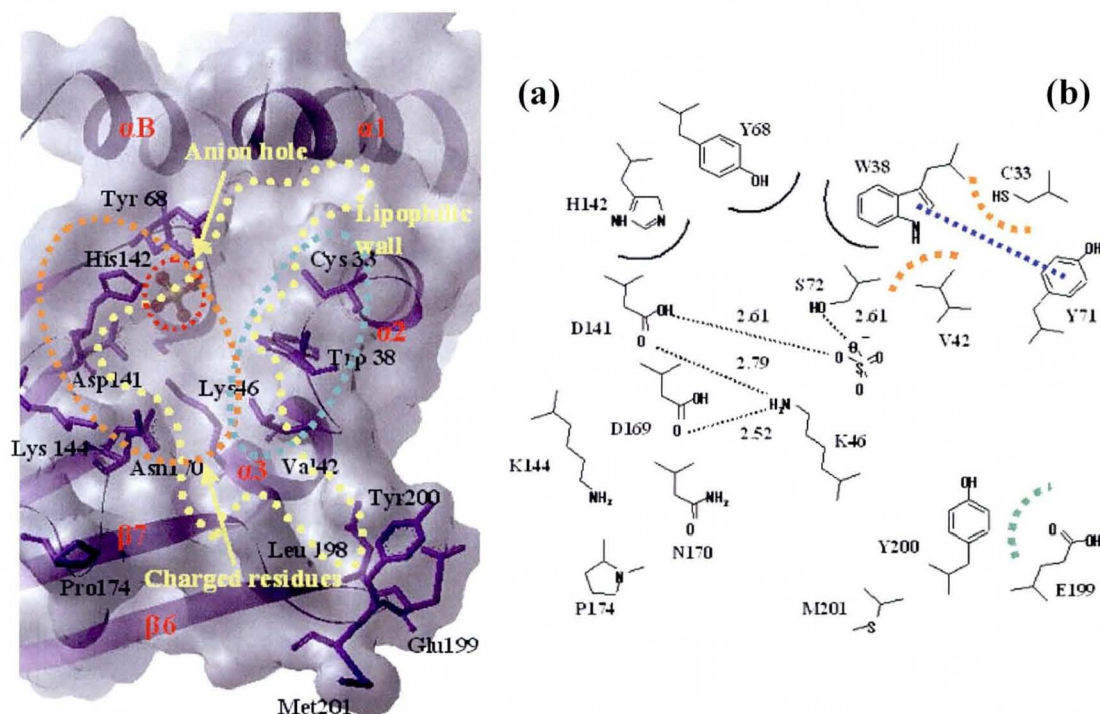


Fig. 21 (a): Solvent accessible surface area representation of Apo form of Rat COMT (PDB accession code: 2ZL8). The ball and stick model with atom color is sulfate ion. The Figure was produced with WebLab Viewer Lite 5.0 Accelrys, Japan). (b): A schematic representation of the newly created site of Apo form of Rat COMT. Expected hydrogen bond interactions are shown as dotted lines. Observed distances are given in Å. CH/ $\pi$  interaction is indicated as blue lashes.  $\pi$ - $\pi$  interactions are indicated as green lashes. Van der Waals interactions are represent by orange lashes. The Figure was produced with ISIS Draw (MDL).

この Apo 体で確認された新規相互作用サイトに対してフィットするような化合物をコンピュータによる *in-silico* スクリーニングすることにより、骨格的に新規な COMT 阻害剤を創製できる可能性があると考えられる。

### 3-8 COMT の基質認識メカニズムの解釈

Apo 体、Holo 体の構造と四成分複合体構造の比較より、COMT の基質認識メカニズムについて解釈する。まず、Apo 体に AdoMet が正しく認識される為には、 $\beta 4$ - $\alpha D$  ループがフリップして、Trp143 と His142 がアデニン環を収容するサイトを形成する必要がある。アデニン環の N6 原子は Ser119, Gln120 と水素結合し、Met91 のアデニン環への "induced-fit" 及び、アデニン環の C8 水素と Trp143 との CH/ $\pi$  相互作用がアデニン環を正しい位置に固定化する "driving force" と考えられる。次いで、AdoMet 依存性メチルトランスフェラーゼ類で高度に保存されている Glu90 は (Schluckebier et al., 1996) Trp143 側鎖との水素結合を失う代わりに、リボース環のヒドロキシル基 (O2' 及び O3') と水素結合する。 $\beta 1$ - $\alpha A$  ループの Gly66 の主鎖カルボニル酸素と AdoMet のメチオニン残基の-NH<sub>2</sub> との水素結合、また AdoMet の-COOH と Val42, Ser72, Tyr71 主鎖アミドとの水素結合ネットワークを介して、AdoMet 分子全体が固定化される。AdoMet の結合において、アデニン環相互作用サイト形成の重要性は bi-substrate タイプの阻害剤における構造活性相関の結果からも支持されている (Lerner et al., 2001), (Masjost et al., 2000), (Paulini et al., 2006)。それによると、アデニン環をシトシン環やグアニン環に置換した場合、阻害活性が大幅に減弱する。つまり、適切にアデニン環として COMT に認識されないと、COMT のカテコール環認識部位は形成されないことを意味している。

Apo 体に AdoMet が結合した後に、マグネシウムイオンは Asp141, Asp169, Asn170 の側鎖による配位結合で保持されると考えられる。AdoMet とマグネシウムイオンが結合した Holo 体は Pro174, Leu198 が四成分複合体と近い位置まで動くことで、基質のヒドロキシル基のマグネシウムイオン配位子場への正しい配位を規定すると考えられる。次に O-メチル化反応

に關与する残基について述べる。種々の Aspartate aminotransferase 及び Protease において Lys 残基は一般塩基触媒として機能することが知られている (Toney, M et al., 1999), (Paetzel et al., 1997)。これを COMT に当てはめてみる。COMT において Lys144 はカテコール環のヒドロキシル基から水素原子を引き抜くとされている (Zheng et al., 1997), (Lautala et al., 2001)。Holo 体においても Lys144 は Apo 体と同様溶媒側にあり、 $\beta 5$ - $\beta 6$  ループにある Glu199 と共に、基質が結合して初めて活性部位に近接する。Glu199 の Ca 原子は Holo 体の状態から四成分複合体 (PDB accession code: 1VID) に変わるまでに、5.4Å 移動する。一方で、Lys144 の Ca 原子は Holo 体と四成分複合体で位置が保存されており、Glu199 のようなコンフォメーション変化を起こさずに、活性部位まで近接することが可能である。この事より、Lys144 が最初に活性部位に近づいて、カテコールヒドロキシル基からの脱プロトン反応を起こすと考えられる。では Holo 体が四成分複合体に変化する過程で、どのように活性部位を形成するのだろうか？ 以下に、四成分複合体と Holo 体との構造比較から考察する。Fig. 22 (a) より、Holo 体では熱振動でその位置を特定できなかった  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループが四成分複合体ではコンフォメーション的に均一状態に近づき活性部位に近接する。その際に鍵となるのは Tyr200 を介した  $\beta 6$ - $\beta 7$  ループと  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループの相互作用であることがわかる (Fig. 22 (b))。Tyr200 は Gln41 の側鎖と水素結合し、また Cys33 の側鎖が van der Waals 相互作用することで安定化すると考えられる。 $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループに含まれる Trp38 の NE1 位に置換している水素は  $\beta 6$ - $\beta 7$  ループが折れたたまたまの事により、Glu199 の主鎖カルボニル酸素と水素結合し、Met40 の側鎖の S-CH<sub>3</sub> は AdoMet の S<sub>δ</sub><sup>+</sup>-C<sub>ε</sub>H<sub>3</sub> を溶媒から遮蔽するように近接する。Glu199 は四成分複合体になって初めて活性部位に近接するが、これは  $\beta 6$ - $\beta 7$  ループと  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  ループの相互作用に連動して起き

ると考えられる。

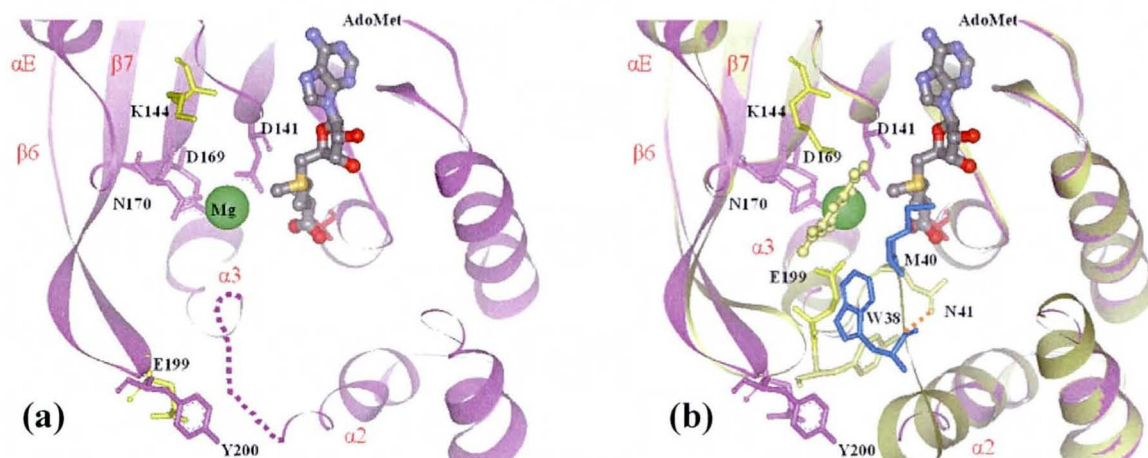


Fig. 22: (a) Close up view of the ligand-binding site of the Holo form (PDB accession code: 2ZTH). The AdoMet is depicted as a ball and stick representation. The CPK represents the Mg<sup>2+</sup> ion. Yellow represent the side chain of K144 and E199 respectively. Cyan stick represents the side chain of D141, D169 and N170 respectively. The broken line represents the missing electron density corresponding to residues 36-41. (b): Close up view of the ligand-binding site of the Holo form and quaternary complex structure (1VID). Cyan represent Holo form and Yellow represent 1VID respectively. Blue stick represents the side chain of W38 and M40 of 1VID. Pink dotted line represents hydrogen bond. .

COMT の活性部位形成に関する Tyr200 の重要性に関しては、本研究結果から初めて得られた知見である。本研究では実施していないが、Tyr200 をフェニルアラニンに変異させた蛋白質の活性が極端に弱いという知見を得ることができれば、活性部位形成のメカニズムを生化学的にも証明できることに繋がると考えられる。

本章の最後に Apo 体から Holo 体を経由して四成分複合体になる過程を Fig. 23 に示した。



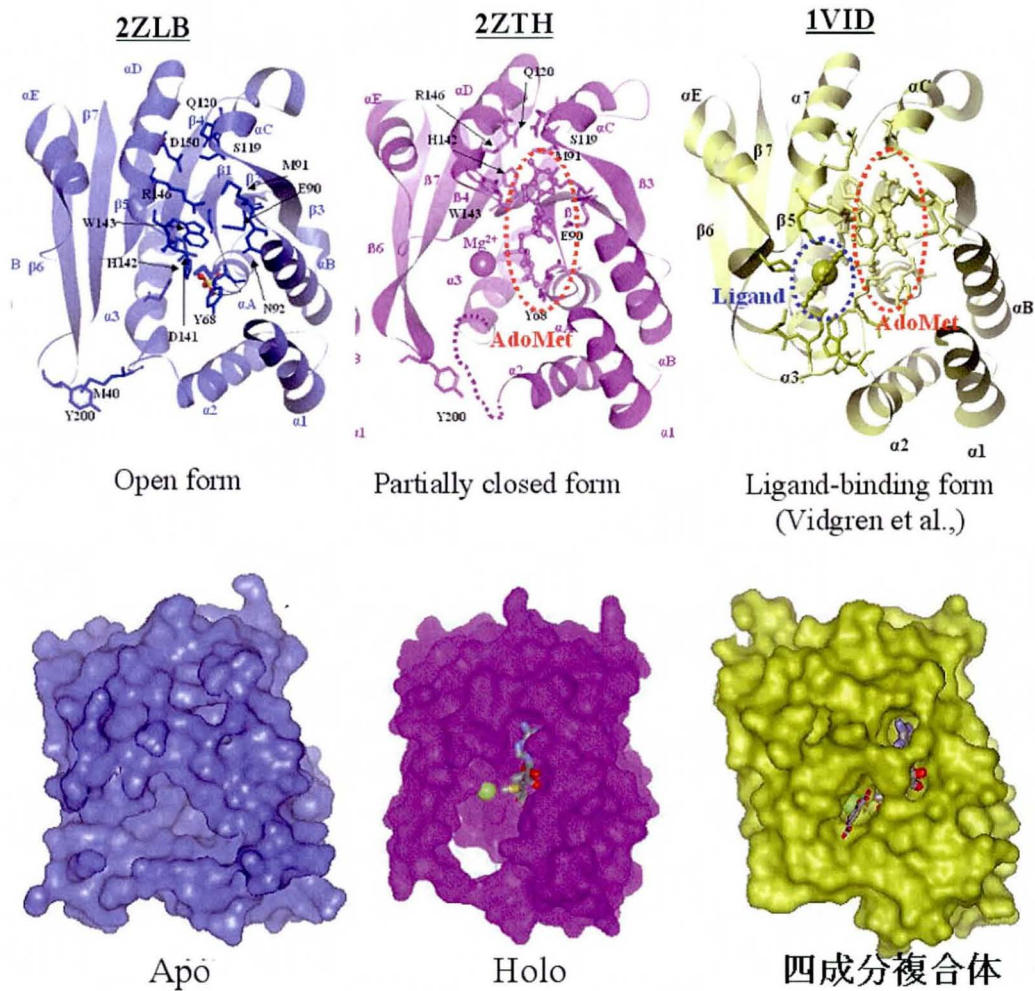


Fig. 23 (Top): Ribbon with stick model represents Apo, Holo and quaternary structure of COMT respectively. (Bottom): Solvent accessible surface area representation of Apo, Holo and quaternary structure of COMT respectively.

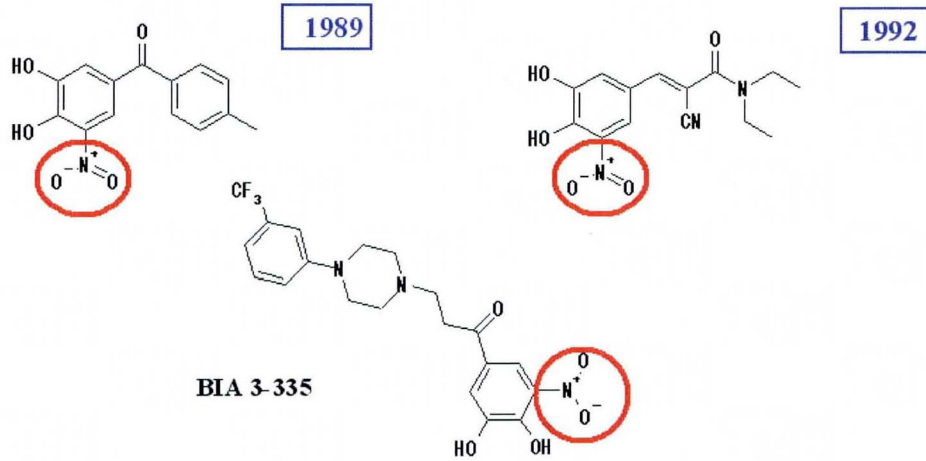
## 第四章 ラット COMT リガンド複合体の構造解析によるドラッグデザイン

### 結果及び考察の部

現在パーキンソン病の治療薬として開発されている COMT 阻害剤はニトロカテコール骨格 (Fig. 24) を有している。しかしながら、同構造を有するトルカポンはミトコンドリアのエネルギー産生に影響を及ぼす” uncoupler” 作用によると推察される、重篤な肝障害が報告されている (Nissinen, E. et al., 1997)。一方でニトロカテコール構造を有しない阻害剤 (Mannisto, P. T. et al., 1999) も多く知られているが (Fig. 25)、いずれも選択性、毒性、バイオアベイラビリティの面で有効ではなく、開発の主流はニトロカテコールタイプである。われわれはこの毒性が懸念される構造要因を取り除くべく非ニトロカテコール構造の阻害剤を COMT の活性部位に基づいた *in-silico* によるコンピュータスクリーニング手法 (蛋白質の活性部位にフィットする化合物を市販試薬のデータベースから網羅的に探索する方法) で探索した。その結果、市販の 4-phenyl-7, 8-dihydroxycoumarine (4PCM) に阻害作用 ( $IC_{50}=1.8 \mu M$ ) があることを見出した (Fig. 25)。そこで、4PCM とラット COMT 複合体を結晶化し、2.3Å 分解能で複合体の構造を解き、4PCM の相互作用パターンを解析することに成功した。更に、既知の複合体構造と比較することによって、4PCM の阻害作用を向上させるための情報を得ることができた。

Tolcapone (海外発売)  
販売中止した国あり  
(Roche)

Entacapone (海外発売)  
(Orion Pharma (Novartis))



Learmonth et al., J. Med. Chem. 47 (2004) 6207-6217

Fig. 24: Structures of nitrocatechol type COMT inhibitors.

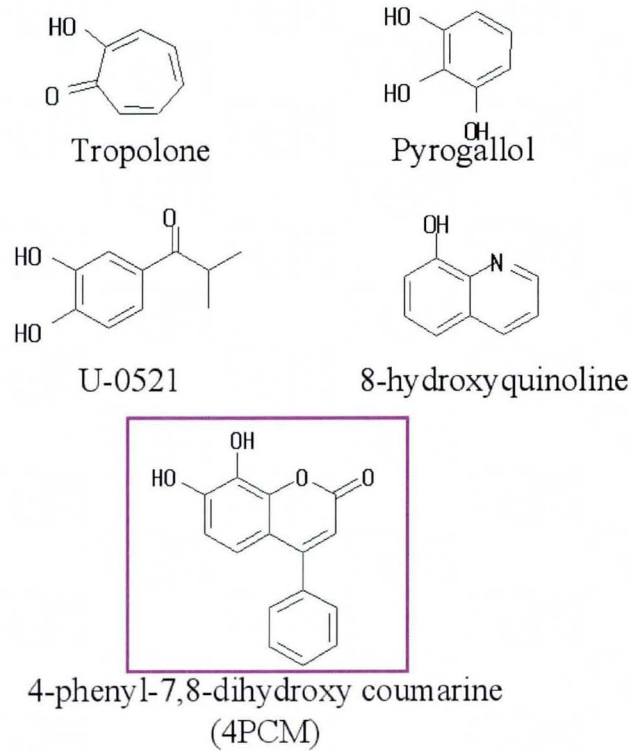
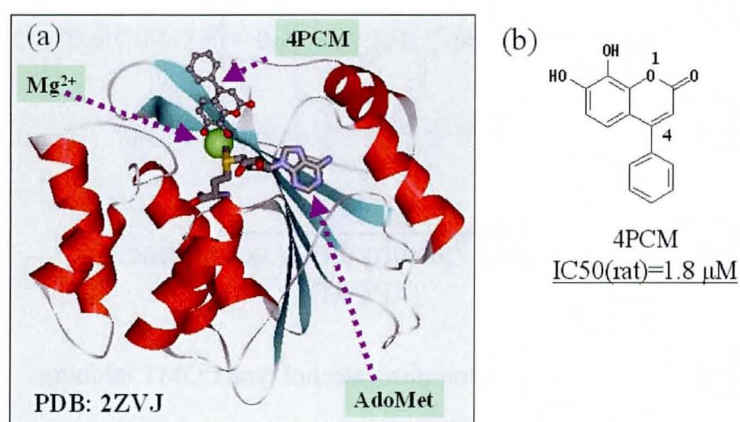


Fig. 25: Structures of non-nitrocatechol type COMT inhibitors.

#### 4-1 4PCM-COMT 複合体全体構造

COMT は生理学的条件下ではモノマーの酵素として機能する。しかし、これまでに解析されている COMT と阻害剤との複合体は、活性部位に存在する阻害剤の脂溶性官能基と隣接 COMT の脂溶性アミノ酸残基との相互作用も含むダイマー構造を取る事例があるため、必ずしも生体内の条件を反映しているとは言えない (PDB accession code: 2CL5 (Lerner, C. et al., 2005) )。そこで本研究では、結晶化条件探索時に排除体積効果が大きくなるような高分子量の PEG の使用及び蛋白質の脂溶性を上げるような単糖類の添加を避けた (Bhat et al., 1992), (Taravati et al., 2007)。

4PCM との複合体の全体構造 (Eiichi T et al., 2009<sup>2)</sup>, PDB accession code: 2ZVJ) は既に報告されている複合体結晶構造 (Vidgren, J. et al., 1994) , (Palma, P. N. et al., 2006), (Bonifacio, M. J. et al., 2002) と類似していた。PDB accession code: 1JR4, 1H1D, 2CL5 の 3 種類の座標と C $\alpha$  で重ね合わせたところ、その RMSD はそれぞれ 0.28, 0.26, 0.34Å であった。Fig. 26 (a) に 4PCM-COMT 複合体の全体構造を示す。



PDB: 2ZVJ Eiichi Tsuji, Kosuke Okazaki, and Kei Takeda  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.

Fig. 26 (a): Crystal structure of 4PCM-COMT complexes (PDB accession code: 2ZVJ). (b): Molecular structure of 4PCM.

また、4位のフェニル基は溶媒側に位置し、溶媒接触面積が約  $37\text{\AA}^2$  であった。また、隣接

COMTによるパッキングの影響の無い結晶構造を得る事ができた (Fig. 27)。

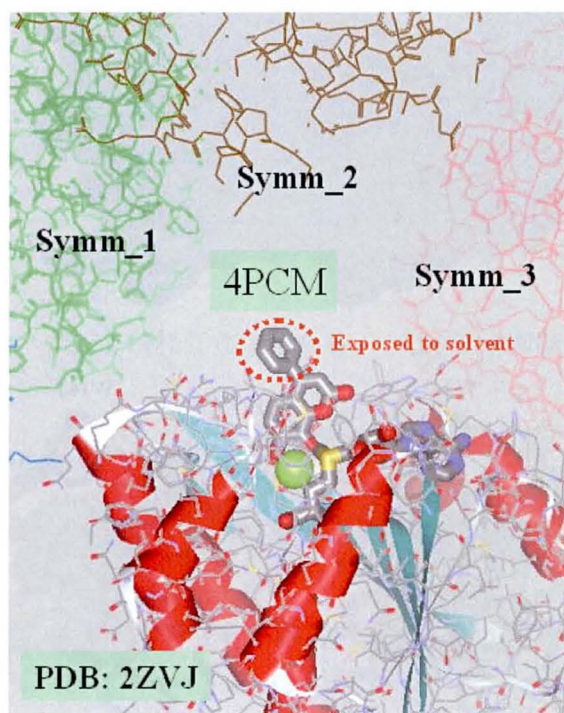


Fig. 27: The packing diagram of crystal structure of 4PCM-COMT complexes.

これにより、4PCM と COMT の相互作用を結晶学的なアーティファクト無しに解釈する事ができる。

#### 4-2 活性部位における 4PCM と COMT の相互作用

4位のフェニル基は Trp38, Met40, Pro174 の側鎖に囲まれ、そのコンフォメーションは固定化されていた (Fig. 28 (a), (b))。

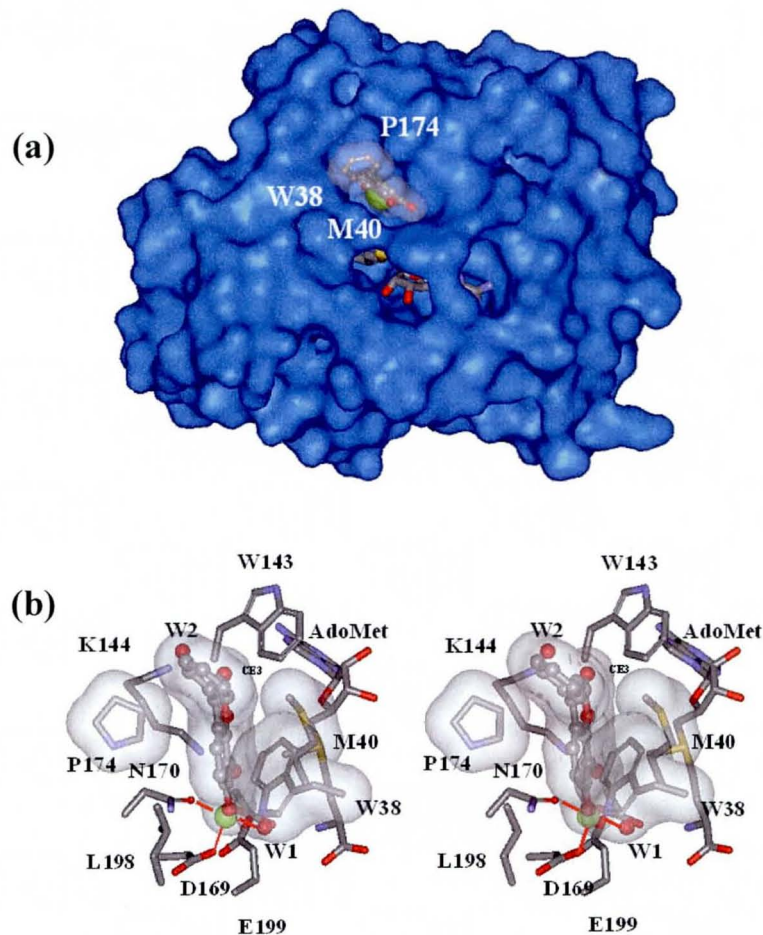


Fig. 28: Catechol-binding site. (a) AdoMet is shown in stick representation colored by atom type. 4PCM is shown with a transparent van der Waals surface and a ball-and-stick representation colored by atom type. The protein surface is shown in blue. Catechol-binding site (b): 4PCM is shown in stereo with a transparent van der Waals surface and a ball-and-stick representation colored by atom type. Mg<sup>2+</sup> and the coordinating water oxygen (W1) are shown in green and red, respectively. Water oxygen (W2) that is hydrogen bond to carbonyl oxygen of 4PCM is shown in red. The side chain of W38, M40, P174 are shown with a transparent van der Waals surface and a stick representation colored by atom type.

Met40 の側鎖は四成分複合体構造(PDB accession code: 2CL5)と比較して 96° 捩れ、7,8-dihydroxycoumarin 環を収容するように "induced-fit" していた。Met40 側鎖の硫黄原子と 7,8-dihydroxycoumarin 環の 9 位との原子間距離は 4.1Å であった。これは、S-Aromatic 相互作用(Trp28 ··Met45: (4.4Å), PDB accession code: 6LYZ (Hen egg white lysozyme), (Chakrabarti, P et al., 2007) に相当すると考えられる。次にマグネシウムイオン近傍の相互作用について示

す (Fig. 29)。4PCM のカルボニル酸素は水分子 (W2) を介して Lys144 のアミド結合と水素結合していた ( $C=O \cdots (W2)OH_2$ : 2.54 Å,  $(W2)OH_2 \cdots NH$ : 2.96 Å)。さらに Trp143 の CE3 との原子間距離は 2.81Å であり、CH-O 水素結合 (Manikandan, K. et al., 2004) していると考えられる。この原子間距離は典型的な CH-O 水素結合 (~3.8Å) の距離よりも優位に短い。このような水素結合を介した相互作用は *ortho*-nitro catechol タイプの阻害剤 (PDB accession code: 1VID, 2CL5, 1H1D) には無いユニークな相互作用である。CH-O 水素結合は蛋白質の構造安定化に寄与している相互作用の 1 種であり、*ab initio* 分子軌道計算の結果ではその値は -2.1kcal/mol を示し、 $NH \cdots O=C$  水素結合の約半分の相互作用エネルギーである (Chakrabarti, P et al., 2007)。

Lys144 はカテコール環のヒドロキシル基の脱プロトン反応を促進する catalytic base とされている (Ovaska M et al., 1998) が、7,8-dihydroxycoumarin 環の 1 位の酸素原子との静電相互作用により、複合体を安定化していると考えられる。

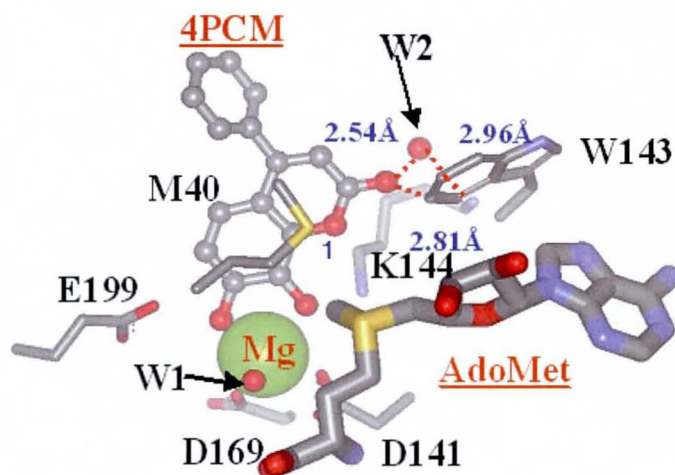


Fig. 29: Close-up view of ligand site of 4PCM-COMT complex structures (PDB accession code: 2ZVJ). Ball-and-stick model represent 4PCM. The CPK represent  $Mg^{2+}$  ion. The coordinating water (W1) and water oxygen (W2) that is hydrogen bond to carbonyl oxygen of 4PCM are shown in red sphere respectively. Red broken lines show hydrogen bond.

### 4-3 ドラッグデザインに対する指針

ここまで述べてきた 4PCM-COMT 複合体構造における各種相互作用から、阻害活性向上の方策について、既知複合体構造との比較から提案したい。 Fig. 30 (a) は BIA 3-335 - COMT 複合体の構造 (PDB accession code: 1HID) を示してある。 ピペラジン環窒素原子の隣の炭素原子と Trp38 の CH<sub>2</sub> 炭素原子の原子間距離は 3.47Å であった。 この原子間距離は論文で報告されている CH/ $\pi$  相互作用 (Umezawa, Y et al., 1998), (Nishio, M. et al., 2004), (Hatigai, M et al., 2006), (Spiwork, V. et al., 2004) の距離 (~3.5 Å) に近く、BIA 3-335 - COMT 複合体の安定化に寄与していると考えられる。 BIA 3-335 誘導体の構造活性相関については Learmonth らにより広範に研究されており (Learmonth et al., 2004)、3-trifluoromethyl-phenyl-piperazine が置換することで、阻害活性の向上が確認されている。 依って、4PCM 阻害活性向上の方策の一つとして、4位のフェニル基から、Trp38 との CH/ $\pi$  相互作用エネルギーを稼ぐ事が可能な官能基を置換する事が有望であると考えられる (Fig. 30 (b))。 また、Trp38 の側鎖は Fig. 31 に示すように、インドール環部分の電子密度が一部不鮮明であり、コンフォメーションの自由度があると考えられる。 筆者らによる Apo 体、Holo 体の構造解析の結果からも示唆されたように、 $\alpha$ 2- $\alpha$ 3 ループにある Trp38 と Met40 はリガンド結合サイトを形成する上では非常に重要であり、高活性な阻害剤を創製する上でこの  $\pi$  電子系に富む 2 つの残基のフレキシビリティを考慮に入れることは必須であると考えられる。



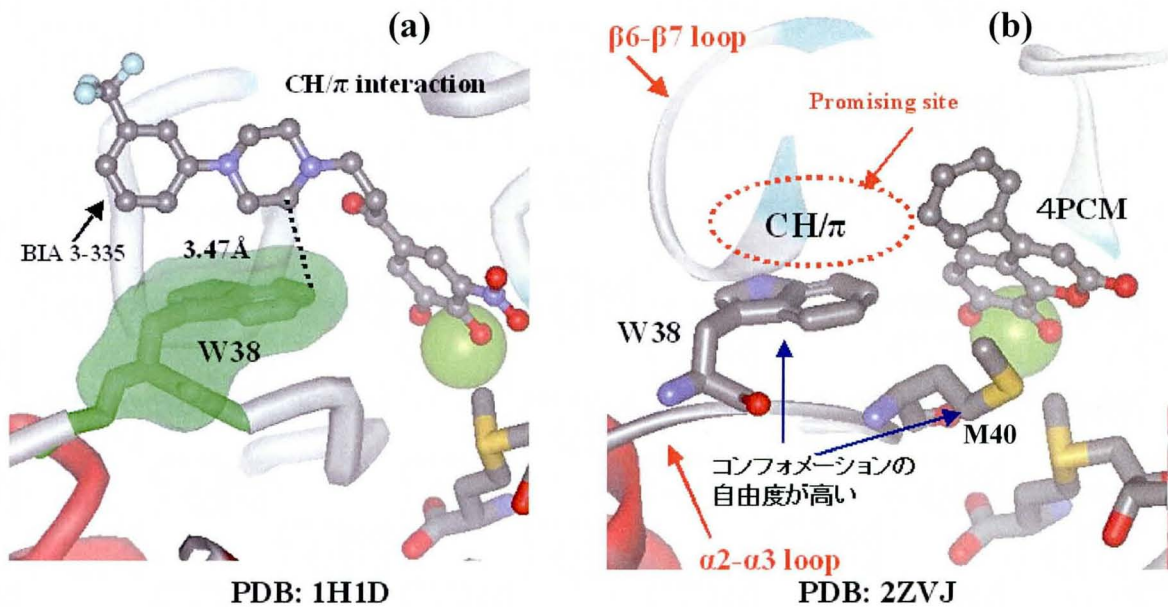


Fig. 30 (a): The crystal structure of BIA 3-335 – COMT complex (1H1D). The dotted line represents CH/ $\pi$  interaction. (b): The crystal structure of 4PCM–COMT complex (2ZVJ). The side chain of W38 and M40 are depicted as stick model.

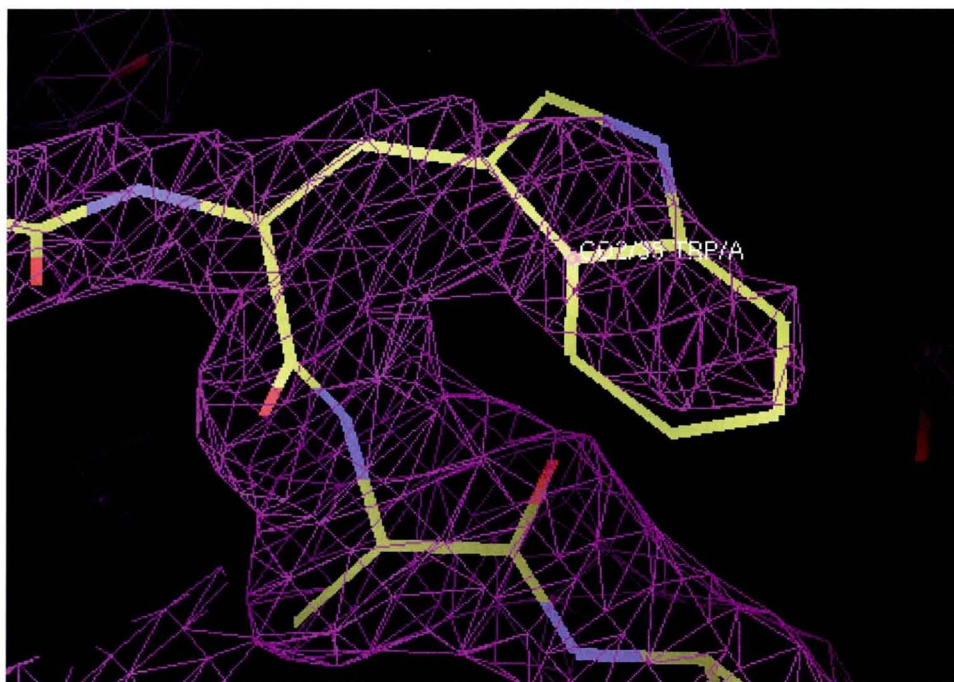


Fig. 31: The  $(2|F_o|-|F_c|)$  electron density (using 42.29-2.30 Å resolution shell data) map of W38 contoured at 1.0  $\sigma$ . (PDB accession code: 2ZVJ).

以上、4PCM–COMT 複合体構造解析を利用したドラッグデザインから、安全性の高く、且つ高い阻害活性を有するリガンドを創製する可能性を示す事ができた。

## 実験の部（第二章）

### 2-1 蛋白質発現及び精製

以下の実施例において、配列番号 1 は、組換えヒト COMT の配列である；配列番号 2 は、配列番号 1 の組換えヒト COMT を発現するように配列番号 3 および 4 のプライマーを用いて増幅された DNA 配列を示す；配列番号 3 は、配列番号 2 の DNA を増幅するために使用された 5' プライマーの配列である；配列番号 4 は、配列番号 2 の DNA を増幅するために使用された 3' プライマーの配列である；配列番号 5 は、配列番号 2 に示す DNA がプラスミドに組み替えられたかどうかをゲル電気泳動にて簡便に確認するための 5' プライマーの配列である。さらに、配列番号 5 は配列番号 2 に示す DNA がプラスミドに組み替えられたかどうかをダイターミネーター法にて確認するためにも使用できる；配列番号 6 は、配列番号 2 に示す DNA がプラスミドに組み替えられたかどうかをゲル電気泳動にて簡便に確認するための 3' プライマーの配列である。配列番号 7 は、配列番号 2 に示す DNA がプラスミドに組み替えられたかどうかをダイターミネーター法にて確認するためのヒト COMT DNA 配列内部の 5' プライマー配列である。（各配列については p75～p76 に列記した。）

#### 1) 結晶化可能な組換えヒト COMT の設計

本研究の組換えヒト COMT-AdoMet-マグネシウムイオン-3,5-dinitrocatechol の四成分複合体の結晶化に用いる組換えヒト COMT として、配列番号 1 記載の組換えヒト COMT を設計した。この配列番号 1 記載の組換えヒト COMT は、完全長のヒト COMT の N 末端に Gly-Ser 残基が付加され、C 末端から 7 個のアミノ酸が欠損したものである。

完全長のヒト COMT をコードする、NCBI (National Center for Biotechnology Information) 上に登録されている受入番号 BC011935 の DNA 配列に基づき、配列番号 1 記載の組換えヒト COMT をコードする DNA 配列を増幅するために 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。5' プライマーの配列を配列番号 3 に、3' プライマーの配列を配列番号 4 に示した。これらのプライマーは、ベクター中に PCR 産物を挿入しやすくするために制限酵素部位 (5' 側は *Bam*HI, 3' 側は *Eco*RI) を含んでいる。

これらのプライマーによって得られるインサート DNA を配列番号 2 に示した。このインサート DNA を、下記に示すように、pGEX-2T ベクターに組込み、蛋白を GST 融合蛋白として発現させ、その後、トロンビンで処理して、配列番号 1 に示す組換えヒト COMT を調製した。この組換えヒト COMT の酵素活性を、文献記載の方法 (Zurcher et al., 1982) に従って調べたところ、完全長のヒト COMT の酵素活性とほぼ同等の活性を有することを確認した。

## 2) 組換えヒト COMT を発現するためのインサート DNA のクローニングおよび発現

配列番号 3 記載の 5' プライマーおよび配列番号 4 記載の 3' プライマーの各々を、TE 緩衝液で希釈して 15 pmol/ $\mu$ L 溶液とした。PCR 用滅菌水 (34.8 $\mu$ L), 25 mM MgSO<sub>4</sub> (2.0 $\mu$ L), 2 mM dNTPs (5.0 $\mu$ L), 10 倍濃縮の DNA ポリメラーゼ KOD plus 緩衝液 (5.0 $\mu$ L, 東洋紡)を混合し、PCR 反应用混合物を調製した。次いでヒト肝臓 cDNA (Invitrogen) (5.0 $\mu$ L) を、この PCR 反应用混合物に加えた。各々のプライマー対 (1 $\mu$ L, 15 pmol) を上記混合物に加え、最後に 1.0 $\mu$ L の KOD plus を加えた。その後、PCR 反応を行った。PCR 反応は 1) 94°C: 2 分間、2) 94°C: 15 秒間、3) 59°C: 30 秒間、4) 68°C: 1 分間で 1) から 4) を 40 サイクル行った。次いで 68°C: 5

分間、4°C: 10分間で終了した。PCR産物の一部1.0 $\mu$ Lを分取し、10 X ローディング緩衝液(1.2 $\mu$ L)とPCR用滅菌水(5.8 $\mu$ L)を加えた後に電気泳動により分析した結果、PCR産物の増幅を確認した。

PCR産物をQIAquick PCR精製キット(Qiagen)にて精製した。目的配列のインサートDNAは同キットのEB緩衝液(30 $\mu$ L)により溶出した。次いで溶出したDNA(1.0 $\mu$ L)をTE緩衝液(99 $\mu$ L)により希釈し濃度を決定した。当該組換えヒトCOMTを発現するためのインサートDNAは0.112  $\mu$ g/ $\mu$ L, 260nm/280nm = 1.99であった。

### 3) 組換えヒトCOMTインサートDNAおよびpGEX-2Tベクターの二重消化

組換えヒトCOMTインサートDNA(1.5 $\mu$ g)に、10 X *Eco*RI 緩衝液(New England Biolab社)(3.0 $\mu$ L), PCR用滅菌水(11.1 $\mu$ L), *Bam*HI(1.5 $\mu$ L, 15 U, 10 u/ $\mu$ L)と*Eco*RI(1.0 $\mu$ L, 15 U, 15 U/ $\mu$ L)を加え混合した。混合溶液を37°Cで1.5時間加熱した。更にその溶液に10 X ローディング緩衝液を加えた。混合溶液を電気泳動にて分離し、消化断片を有するDNAを含むゲルの部分を切り出し、Qiagen Mini Elute ゲル抽出キット(Qiagen)を使用して精製した。消化断片DNAの濃度は33.1 ng/ $\mu$ Lであった。

pGEX-2TベクターDNA(1.5 $\mu$ g), (GE Healthcare Bioscience)に、10 X *Eco*RI 緩衝液(New England Biolab社)(3.0 $\mu$ L), PCR用滅菌水(21.5 $\mu$ L), *Bam*HI(1.5 $\mu$ L, 15 U, 10 u/ $\mu$ L)と*Eco*RI(1.0 $\mu$ L, 15 U, 15 U/ $\mu$ L)を加え混合した。混合溶液を37°Cで1.5時間加熱した。更にその溶液に10 X ローディング緩衝液を加えた。混合溶液を電気泳動にて分離し、消化断片を有するDNAを含むゲルの部分を切り出し、Qiagen Mini Elute ゲル抽出キット(Qiagen)を使用して

精製した。消化断片 DNA の濃度は 25.0 ng/ $\mu$ L であった。

#### 4) ライゲーションと大腸菌 JM109 の形質転換

二重消化した pGEX-2T ベクター (2.0 $\mu$ L, 50 ng, 25 ng/ $\mu$ L) およびインサート DNA (1.0 $\mu$ L, 33.1 ng, 33.1 ng/ $\mu$ L) を、2 X ライゲーション緩衝液 (5.0 $\mu$ L, PGEM) および PCR 用滅菌水 (1.7 $\mu$ L) に加えて混合した。次いで、リガーゼ (1.0 $\mu$ L, 3 U/ $\mu$ L, PGEM) を混合溶液に加え、その混合物を 25 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションした。次に、大腸菌 JM109 (100 $\mu$ L) を 0 $^{\circ}$ C にて溶解し、リガーゼで反応させた上記混合溶液 (5 $\mu$ L) を JM109 懸濁液に加え、穏やかに混合し、強く振動させないようにしながら (0 $^{\circ}$ C: 20 分間, 42 $^{\circ}$ C: 40 秒間, 0 $^{\circ}$ C: 30 分間) の熱ショックを加えた。次いで、450 $\mu$ L の SOC 培地を熱ショック後の溶液に加え 37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪した。振盪後、混合溶液の 50 $\mu$ L と 200 $\mu$ L を、LB-アンピシリン培地のプレート上 (アンピシリン濃度: 100 $\mu$ g/mL) にそれぞれ蒔き、37 $^{\circ}$ C で 16 時間の静置培養をおこなった。その結果、プレート上にはコロニーが出現していた。培養後のプレートは使用時まで 4 $^{\circ}$ C にて保存した。

#### 5) GST 融合組換えヒト COMT の PCR 法によるコロニーセレクション

以下に示す配列番号 5 記載の 5' プライマーと、配列番号 6 記載の 3' プライマーとを、それぞれ TE 緩衝液で希釈し、15 pmol/ $\mu$ L 溶液とした。

次いで、5' プライマーの希釈溶液 (20  $\mu$ L, 15 pmol/ $\mu$ L)、3' プライマーの希釈溶液 (20  $\mu$ L, 15 pmol/ $\mu$ L)、PCR 用滅菌水 (460  $\mu$ L)、2 倍濃縮 AmpliTaq Gold Master Mix (500  $\mu$ L, アプライドバイオシステムズ) を混合し 22 本の PCR チューブ (45  $\mu$ L X 22 tubes) に分割した。4)

で得られた LB-アンピシリン培地のプレート上より得られたコロニーから 22 個を選択し、各々を上記の 22 個の PCR 混合溶液に別々に加え PCR 反応を行った。尚、PCR 反応の条件は以下に示すとおりである。1) 95°C: 5 分間、2) 95°C: 15 秒間、3) 61°C: 15 秒間、4) 72°C: 1 分間、5) 1) から 4) を 40 回繰り返す、次いで、6) 72°C: 7 分間、7) 4°C: 10 分間で終了した。次いで PCR 生成物の 1.0 $\mu$ L を分取し 10 X ローディング緩衝液 2.0 $\mu$ L を加え電気泳動にて分析した。GST 融合組換えヒト COMT が導入されているコロニーを 10 mL LB-アンピシリン培地 (アンピシリン濃度 100 $\mu$ g/mL) に加え 37°C で 15 時間の培養を行った。

#### 6) GST 融合組換えヒト COMT プラスミドの大腸菌 JM109 からの抽出と精製

5) で得られた GST 融合組換えヒト COMT の形質転換が確認できた JM109 の培養液は一部 (100 $\mu$ L) をグリセロールストックとし、残りの培養液は 12,000rpm で 10 分間遠心を行い、大腸菌ペレットを得た。得られた大腸菌ペレットは Qiagen plasmid mini kit (Qiagen) のインストラクションマニュアルにより精製し、GST 融合組換えヒト COMT をコードするプラスミド DNA を得た。それらの濃度を OD<sub>260nm</sub> によって決定し、311 ng/ $\mu$ L、DNA と蛋白質濃度の比は OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.87 となった。各々のプラスミド溶液は TE 緩衝液で希釈し 1 ng/ $\mu$ L の溶液とした。得られたプラスミド DNA の配列は、配列番号 5 および配列番号 7 に示すプライマーを用いたダイターミネーター法にて分析する事によって、配列番号 2 の DNA 配列のうち、5 番目～655 番目の塩基を含む配列であることを確認した。

#### 7) GST 融合組換えヒト COMT プラスミド DNA の大腸菌 BL21 CODON PLUS (DE3) RP への

## 形質転換

精製した GST 融合組換えヒト COMT プラスミド DNA 1.0 $\mu$ L (1.0ng/ $\mu$ L) を 0 $^{\circ}$ C で融解した大腸菌 BL21 CODON PLUS (DE3) RP (STRATAGENE) 細胞懸濁液 50 $\mu$ L に加え、0 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。この混合物に強く振盪すること無しに 42 $^{\circ}$ C で 40 秒間の熱ショックを与え、0 $^{\circ}$ C で 10 分間冷却した。次いで、450 $\mu$ L の SOC 培地を細胞懸濁溶液に加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪した。得られた混合物を LB-アンピシリン培地のプレート (アンピシリン濃度 100 $\mu$ g/mL) に蒔き、37 $^{\circ}$ C で 15 時間静置培養した。

### 8) GST 融合組換えヒト COMT の発現

形質転換後の大腸菌 BL21 CODON PLUS (DE3) RP のプレートから GST 融合組換えヒト COMT を発現するためのプラスミドを保有している大腸菌のコロニーを拾い上げ、10mL の LB-アンピシリン培地 (アンピシリン濃度 100 $\mu$ g/ml) に投入した。上記混合物は OD600nm 値が 0.24 になるまで 37 $^{\circ}$ C にて 4 時間振盪培養を行った。培養液の一部 50 $\mu$ L はグリセロールストックとした。また 1.0mL を IPTG (イソプロピルー  $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド) 添加前サンプルとして分取した。分取後の残りの混合溶液に 0.1M IPTG を 9.0 $\mu$ L 加え 20 $^{\circ}$ C で 6 時間振盪した。次いで、混合物を 12,000rpm で 15 分間遠心し、大腸菌ペレットを回収し使用時まで -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

### 9) GST 融合組換えヒト COMT のトロンビン処理

8) から得られたセルペレットは 1セルペレット当たり 1.8mL の BugBuster 溶液 (Novagen)

により 15 分間室温にて穏やかに攪拌しながら処理した。得られたライゼートを 12,000rpm で 15 分間遠心し、上澄み液を回収した。次いで、予め D-PBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE) にて平衡化し、D-PBS で 50%に再懸濁した。400 $\mu$ L の GST 4B Sepharose (GE Healthcare Bioscience) の (レジンベッドボリューム 200 $\mu$ L) を上記上澄み溶液に加え、得られた混合物を 4 $^{\circ}$ Cにて 30 分間振盪した。振盪後の混合物をフィルターによりレジンと濾液に分別した。得られたレジンを 500 $\mu$ L の D-PBS で 5 回洗浄し、300 $\mu$ L の トロンビン処理用緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 % glycerol, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 %  $\beta$ -OG ( $\beta$ -オクチル-D-グルコピラノシド)) で 3 回洗浄した。次いで、レジンにトロンビン処理用緩衝液を加え 500 $\mu$ L とし、トロンビン (GE Healthcare Bioscience) 5 ユニットを加えた。レジン混合液は 4 $^{\circ}$ Cで 15 時間穏やかに攪拌し、その一部を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析したところ、トロンビン処理により組換えヒト COMT に該当するバンドが検出された。一部のレジン混合液をろ過して得られた蛋白質の濃度は 258 $\mu$ g/mL であった。更にエレクトロスプレー四重極型質量分析器にて当該組換えヒト COMT の分子量を測定したところ観測値=23994.97 となり、配列番号 1 記載のペプチドから算出される理論値=23997.67 と良い一致をみた。

#### 10) 組換えヒト COMT の固相抽出による精製と透析処理

トロンビン処理後のレジン懸濁液を空きカラムにロードしその濾液を回収した。次いでこの操作で得られた濾液を GSTrap FF (GE Healthcare Bioscience) にペリスタポンプでロードし、その濾液を回収した。この濾液を 2.0L の緩衝液 (10mM NaCl, 10% Glycerol, 20mM Tris pH7.0,



0.5%  $\beta$ -OG, 4.0mM DTT(ジチオスレイトール) を用いて一晩透析した。

#### 11) Super Q-5PW カラムクロマトグラフィー

透析後のサンプル溶液を約 10~12m L (蛋白質の量として約 10mg 相当) を 0.5m L/min の流速で予め緩衝液 A (10mM NaCl, 10% Glycerol, 20mM Tris pH7.0, 0.5%  $\beta$ -OG, 4.0mM DTT) にて平衡化された Super Q-5PW カラムにロードした。このカラムから目的蛋白質を 0.5m L/min で緩衝液 B (10% glycerol, 50mM Tris pH7.0, 4.0mM DTT, 0.2%  $\beta$ -OG, 700mM NaCl )によりリニアグラジエントで溶出させた ((0%の緩衝液 B で 7 分間 (Super Q-5PW カラム体積の約 4 倍量相当)、0-20%の緩衝液 B で 70 分間 (Super Q-5PW カラム体積の約 40 倍量相当)、20-100%の緩衝液 B で 2 分間 (Super Q-5PW カラム体積の約 1 倍量相当))。その結果、開始から約 50 分の溶出により得られるピークを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析し、組換えヒト COMT の分子量を与える事を確認した。

#### 12) Superdex HR75 prep grade カラムクロマトグラフィー

11) で得られたフラクションを合一し、YM-10 膜 (ミリポア社) により約 4 m L にまで濃縮した。緩衝液 (10% glycerol, 50mM MES pH6.5, 1.0mM DTT, 2.5mM  $MgCl_2$ ) で予め 2 時間平衡化した Superdex HR75 prep grade カラム (GE Healthcare Bioscience) に 1.0m L のサンプル溶液をロードし、流速 1.0ml/min にて溶出を行った。70 分後に溶出される分画を組換えヒト COMT として採取した。また、この溶出された分画は組換えヒト COMT の分子量を与えることを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。得られた組換えヒト COMT の分画を

Develosil C4 カラム (野村化学株式会社) により分析し、95%以上の純度であることを確認した。

## 2-2 ヒト COMT 複合体結晶化

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法 (McPherson, 1990) により行い、精製した COMT 蛋白溶液 (4.8 - 5.0mg/mL) に 3 倍モル量の AdoMet と塩化マグネシウム、更に 3,5-dinitrocatechol を加え、氷冷下で 30 分インキュベーションした。蛋白質-AdoMet-マグネシウムイオン-3,5-dinitrocatechol 混合溶液 2.0  $\mu$ L に、結晶化溶液を 2.0  $\mu$ L 加え、リザーバー溶液は 750  $\mu$ L とした。結晶化の初期スクリーニングは Crystal Screen I, II (Hampton Research), JCSG Suite (QIAGEN), Stura Foot Print Screen (Molecular Dimension) を使用し、20°C でインキュベーションした。結晶が得られた初期条件を最適化することにより、0.1M MES pH6.5, 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20% (w/v) PEG 6000 の条件より Fig. 32 に示すような結晶をインキュベーションより 1 週間後に得る事ができた。

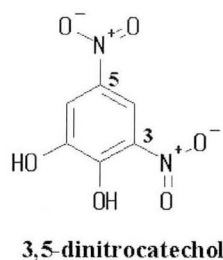
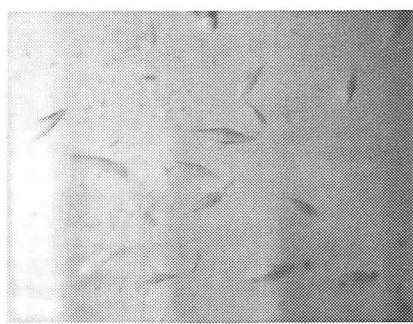


Fig. 32: Crystals of 3,5-dinitrocatechol-COMT complexes.

尚、3,5-dinitrocatechol は SIGMA より購入し、20mM のストック溶液 (DMSO) を調整した。

このストック溶液は-30°Cにて用事まで凍結保存した。

## 2-3 回折データ収集及び構造解析

回折データ収集を行うに当り、3,5-dinitrocatechol - COMT 複合体結晶を 15% (v/v) Glycerol を含む結晶化バッファーに (10~20 秒) 浸した後に液体窒素に直漬けし、R-AXIS IV (RIGAKU) により回折点のチェックを行った。 実験条件を以下に示す (Table. 1)。 回折点の最大分可能によるスクリーニングを行い、2.7 Å 程度の分解能を示す結晶を本測定用とした。 本測定に用いる結晶は測定時まで液体窒素を充填したデュワー瓶内に保存した。 本測定は SPring-8 BL32B2 (創薬産業ビームライン) にて行い、測定データは MOSFLM (Leslie, 1992) と SCALA (P.R.Evans, 1993) により反射強度の積分とスケールリングを行った。 BL32B2 における実験条件を Table. 2 に示す。 初期位相は PDB accession code: 1VID から低分子を除いた蛋白質座標をプローブとした分子置換 MOLREP (Vagin, A. et al., 2000) により決定した (Table. 3)。 分子置換の結果、第一番目のピークの相関係数 (Corr), 及び R 因子 (Rfac) は第 2 番目のピークよりも優位に大きく、得られた解が正しい事を示していた。 構造精密化は REFMAC (Murshdov, G. N. et al., 1997) により、また、モデルの修正および補酵素と 3, 5-dinitrocatechol の電子密度へのフィッティングは QUANTA (Accerlys Japan) により行った。 結晶学的データ及び構造精密化の結果を Table. 4 に、更に、Ramachandran Plot の結果を Fig. 33 に示す。 最終座標は特開 2006-23<sup>3)</sup> に公開した。 構造精密化の結果、N 末の Gly-Ser-Met-Gly は熱振動が高いため、電子密度は見えなかった為、最終座標からは除いてある。

Table. 1: Experimental conditions of diffraction study using R-AXIS IV diffractometer.

<i>Wave length (Å)</i>	<i>Camera distance (mm)</i>	<i>Exposure time (min)</i>
<b>1.54</b>	<b>180~200</b>	<b>20~30</b>
<i>Oscillation width (degree)</i>	<i>Total oscillation width (degree)</i>	<i>Cryo temperature (K)</i>
<b>1.0</b>	<b>10.0 (注)</b>	<b>100</b>

(注) : 振動範囲の開始点をゴニオメータの0度と90度の2箇所とした。

Table. 2: Experimental conditions of diffraction study at SPring-8 BL32B2.

<i>Wave length (Å)</i>	<i>Camera distance (mm)</i>	<i>Exposure time (sec)</i>
<b>1.0</b>	<b>180</b>	<b>7.0</b>
<i>Oscillation width (degree)</i>	<i>Oscillation range (degree)</i>	<i>Cryo temperature (K)</i>
<b>1.0</b>	<b>-180~180</b>	<b>100</b>

Detector: Jupiter 210 CCD (RIGAKU)

Table. 3: The results of molecular replacement using Molrep.

<b>Sol_RF_TF</b>	<b>No.</b>	<b>theta</b>	<b>phi</b>	<b>chi</b>	<b>tx</b>	<b>ty</b>	<b>tz</b>	<b>Rfac</b>	<b>Corr</b>
Sol__1__1	1	0.3	-45.3	60.26	0.492	0.891	0.391	<u>0.372</u>	<u>0.627</u>
Sol__2__4	2	8.82	61.28	124.52	0.235	0.10	0.201	0.643	0.111
Sol__8__3	3	176.57	-130.51	81.06	0.271	0.523	0.312	0.665	0.04
Sol__5__2	4	86.55	159.68	163.89	0.335	0.431	0.284	0.681	0.10

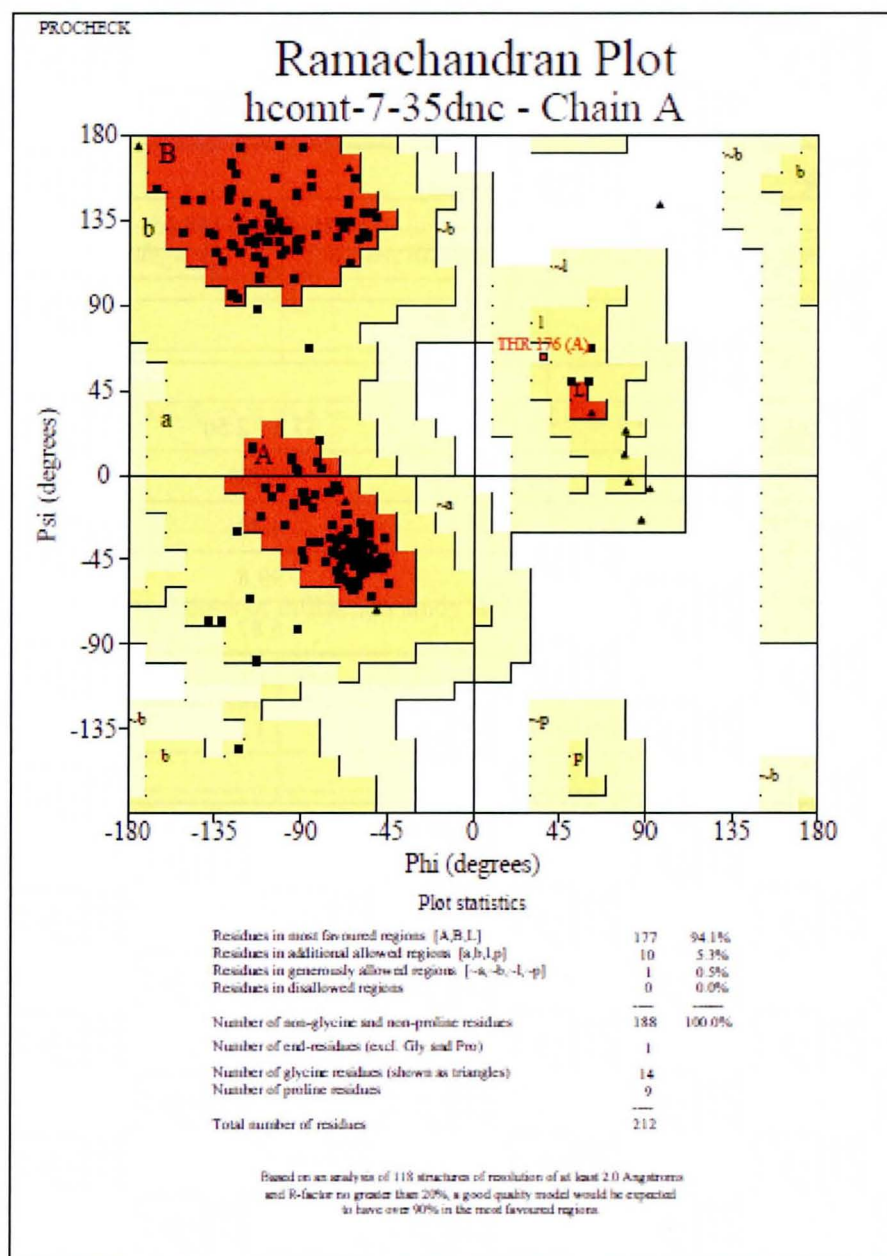
Resolution range (rotation function): 37.3-3.0Å, Resolution range (Translation function): 37.3-3.0Å

Table. 4: Crystallographic parameter and refinement statistics of 3,5-dinitrocatechol -COMT crystal structure.

A. Data collection and processing	3,5-dinitrocatechol -COMT
Wavelength (Å)	1.00
Space group	<i>P</i> 3 <sub>2</sub> 21
Unit cell parameters	
a, b, c (Å)	51.45, 51.45, 168.63
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (deg.)	90, 90, 120
B. Diffraction data	
Resolution range (Å)	37.3 - 2.50
Unique reflections	10879
R ( <i>I</i> ) sym (%) <sup>a</sup>	4.40
Completeness (%)	99.8
Redundancy	6.87
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	21.1
Number of crystal to collect whole data set	1
C. Refinement	
Resolution range (Å)	37.3 - 2.50
Reflections used in refinement	10422
Final R value (work <sup>b</sup> /free <sup>c</sup> )	0.221/0.275
Protein residues	212
Water molecules	73
Ligand	3
RMSD from ideal (COMT)	
Bond lengths (Å)	0.02
Bond angles (deg.)	1.44
Ramachandran statistics	
Most favored regions (%)	94.1
Additionally allowed regions (%)	5.3
Mean <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	
Protein	38.24
Water molecules	32.11
Ligands (Mg <sup>2+</sup> , AdoMet, 3,5-dnc)	15.91, 24.40, 22.87

<sup>a</sup>  $R_{\text{sym}} = 100 \sum_i |I(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i I(h)$ , where  $I(h)$  is the observed intensity and  $\langle I(h) \rangle$  is the corresponding mean value of  $I(h)$  for all measurements. <sup>b</sup>  $R\text{-work} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$ , where  $|F_{\text{obs}}|$  and  $|F_{\text{calc}}|$  are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. <sup>c</sup>  $R\text{-free}$  is the same as  $R\text{-factor}$ , but for a 10.0 % subset of all reflections for 3,5-dinitrocatechol -COMT. 3,5-dnc: 3,5-dinitrocatechol

Fig. 33: Ramachandran plot 3,5-dinitrocatechol - COMT complex structure)



## 実験の部 (第三章)

### 3-1 蛋白質発現及び精製

以下、DNA 及びアミノ酸配列を配列番号で表記する。配列番号 1 は、組換えラット COMT の配列である。配列番号 2 は、配列番号 1 の組換えラット COMT を発現するように配列番号 3 および 4 のプライマーを用いて増幅された DNA 配列を示す。配列番号 3 は、配列番号 2 の DNA を増幅するために使用された 5' プライマーの配列である。配列番号 4 は、配列番号 2 の DNA を増幅するために使用された 3' プライマーの配列である。配列番号 5 は、配列番号 2 に示す DNA がプラスミドに組み替えられたかどうかを確認するための 5' プライマーの配列である。配列番号 6 は、配列番号 2 に示す DNA がプラスミドに組み替えられたかどうかを確認するための 3' プライマーの配列である。(各配列については p77~p78 に列記した。) 尚、蛋白質の発現及び精製は (Tilgman, C et al., 1996), (Lundstrom, K et al., 1992) の実験条件を参考にした。

#### 1) 結晶化可能な組換えラット COMT の設計

本研究の結晶化に用いる組換えラット COMT として、配列番号 1 の組換えラット COMT を設計した。この配列番号 1 の組換えラット COMT は完全長のラット COMT の N 末端に Gly-Ser 残基が付加されたものである。完全長のラット COMT をコードする、NCBI (National Center for Biotechnology Information) 上に登録されている番号 M60754 の DNA 配列に基づき、配列番号 1 の組換えラット COMT をコードする DNA 配列を増幅するための 2 つのプライマーを設計した。5' プライマーの配列を配列番号 3 に、3' プライマーの配列を配列番号 4 に示した。こ

これらのプライマーは、制限酵素部位（5' 側は *Bam*HI, 3' 側は *Eco*RI）を含んでいる。これらのプライマーによって得られるインサート DNA を配列番号 2 に示した。このインサート DNA を、2) 以降に示すように、pGEX-2T ベクターに組み込み、蛋白を GST 融合蛋白として発現させ、その後、トロンピンで処理して、配列番号 1 に示す組換えラット COMT を調製した。この組換えラット COMT の酵素活性を、文献記載の方法（Zurcher G et al., 1982）に従って調べたところ、完全長のラット COMT の酵素活性とほぼ同等の活性を有することを確認した。

## 2) 組換えラット COMT を発現するためのインサート DNA のクローニングおよび発現

配列番号 3 記載の 5' プライマーおよび配列番号 4 記載の 3' プライマーの各々を、TE 緩衝液で希釈して 15 pmol/ $\mu$ L 溶液とした。PCR 用滅菌水 (34.8 $\mu$ L), 25 mM MgSO<sub>4</sub> (2.0 $\mu$ L), 2 mM dNTPs (5.0 $\mu$ L), 10 倍濃縮の DNA ポリメラーゼ KOD plus 緩衝液 (5.0 $\mu$ L) (東洋紡) を混合し、PCR 反应用混合物を調製した。次いでラット心臓 cDNA (CLONTECH) (5.0 $\mu$ L) を、この PCR 反应用混合物に加えた。各々のプライマー対 (1 $\mu$ L, 15 pmol) を上記混合物に加え、最後に 1.0 $\mu$ L の KOD plus を加えた。その後、PCR 反応 (Eppendorf Mastercycler) を行った。PCR 反応は 1) 94°C: 2 分間、2) 94°C: 15 秒間、3) 59°C: 30 秒間、4) 68°C: 1 分間で 1) から 4) まですべてを 40 サイクル行った。次いで 68°C: 5 分間、4°C: 10 分間で終了した。PCR 産物の一部 1.0 $\mu$ L を分取し、10 X ローディング緩衝液 (1.2 $\mu$ L) と PCR 用滅菌水 (5.8 $\mu$ L) を加えた後にアガロース電気泳動により分析した。その結果 PCR 産物の増幅を確認した。

得られた PCR 産物を QIAquick PCR 精製キット (Qiagen) にて精製した。インサート DNA



は同キットの EB 緩衝液 (30 $\mu$ L) により溶出し、DNA (1.0 $\mu$ L) に TE 緩衝液 (99 $\mu$ L) を加えて濃度を決定した。組換えラット COMT を発現するためのインサート DNA は 0.157 $\mu$ g/ $\mu$ L, 260nm/280nm = 1.92 であった。

### 3) 組換えラット COMT インサート DNA および pGEX-2T ベクターの二重消化

組換えラット COMT インサート DNA (1.5 $\mu$ g) に、10 X *EcoR* I 緩衝液 (New England Biolab 社) (3.0 $\mu$ L), PCR 用滅菌水 (14.9 $\mu$ L), *Bam*HI (1.5 $\mu$ L, 15 U, 10 u/ $\mu$ L) と *EcoR*I (1.0 $\mu$ L, 15 U, 15 U/ $\mu$ L) を加え混合した。混合溶液を 37 $^{\circ}$ C で 1.5 時間酵素処理した。更にその溶液に 10 X ローディング緩衝液を加え、混合溶液を電気泳動にて分離し、制限酵素消化断片を有する DNA を含むゲルの部分を切り出し、Qiagen Mini Elute ゲル 抽出キット (Qiagen) を使用して精製した。得られた消化断片 DNA の濃度は 33.1 ng/ $\mu$ L であった。

pGEX-2T ベクター DNA (1.5 $\mu$ , (GE Healthcare Bioscience)) に、10 X *EcoR* I 緩衝液 (New England Biolab 社) (3.0 $\mu$ L), PCR 用滅菌水 (21.5 $\mu$ L), *Bam*HI (1.5 $\mu$ L, 15 U, 10 u/ $\mu$ L) と *EcoR*I (1.0 $\mu$ L, 15 U, 15 U/ $\mu$ L) を加え混合した。混合溶液は 37 $^{\circ}$ C で 1.5 時間酵素処理した。更にその溶液に 10 X ローディング緩衝液を加えた。混合溶液を電気泳動にて分離し、消化断片を有する DNA を含むゲルの部分を切り出し、Qiagen Mini Elute ゲル 抽出キット (Qiagen) を使用して精製した。当該消化断片 DNA の濃度は 25.0 ng/ $\mu$ L であった。

### 4) ライゲーションと大腸菌 JM109 の形質転換

二重消化した pGEX-2T ベクター (1.32 $\mu$ L, 50 ng, 38 ng/ $\mu$ L) およびインサート DNA (1.0 $\mu$ L,

33.4 ng, 33.1 ng/μL) を、2 X ライゲーション緩衝液 (5.0μL, PGEM) および PCR 用滅菌水 (1.7μL) に加えて混合した。次いで、リガーゼ (1.0μL, 3 U/μL, PGEM) を混合溶液に加え、その混合物を 25°C で 1 時間インキュベーションした。次に、大腸菌 JM109 (100μL) を 0°C にて溶解し、リガーゼで反応させた上記混合溶液 (5μL) を JM109 懸濁液に加え、穏やかに混合し、強く振動させないようにしながら (0°C: 20 分間, 42°C: 40 秒間, 0°C: 30 分間) の熱ショックを加えた。次いで、450μL の SOC 培地を熱ショック後の溶液に加え 37°C で 1 時間振盪した。振盪後、混合溶液の 50μL と 200μL を、LB-アンピシリン培地のプレート上 (アンピシリン濃度: 100μg/mL) にそれぞれ蒔き、37°C で 16 時間の静置培養をおこなった。その結果、プレート上にはコロニーが出現していた。培養後のプレートは使用時まで 4°C にて保存した。

#### 5) GST 融合組換えラット COMT の PCR 法によるコロニーセレクト

以下に示す配列番号 5 記載の 5' プライマーと、配列番号 6 記載の 3' プライマーとを、それぞれ TE 緩衝液で希釈し、15pmol/μL 溶液とした。次いで、5' プライマーの希釈溶液 (20μL, 15 pmol/μL)、3' プライマーの希釈溶液 (20μL, 15 pmol/μL)、PCR 用滅菌水 (460μL)、2 倍濃縮 AmpliTaq Gold Master Mix (500μL, (アプライドバイオシステムズ)) を混合し 22 本の PCR チューブ (45μL X 22 tubes) に分割した。4) で得られた LB-アンピシリン培地のプレート上より得られたコロニーから 22 個を選択し、各々を上記の 22 個の PCR 混合溶液に別々に加え PCR 反応を行った。尚、PCR 反応の条件は以下に示すとおりである。1) 95°C: 5 分間、2) 95°C: 15 秒間、3) 61°C: 15 秒間、4) 72°C: 1 分間、5) 1) から 4) を 40 回繰り返す、6) 72°C: 7 分間、7) 4°C: 10 分間で終了した。次いで PCR 生成物の 1.0μL を分取し、10 X ローディング緩

衝液 2.0 $\mu$ L を加え電気泳動にて分析した。 GST 融合組換えラット COMT が導入されているコロニーを 10mL LB-アンピシリン培地（アンピシリン濃度 100 $\mu$ g/mL）に加え 37 $^{\circ}$ C で 15 時間の培養を行った。

#### 6) GST 融合組換えラット COMT プラスミドの大腸菌 JM109 からの抽出と精製

5) で得られた GST 融合組換えラット COMT の形質転換が確認された JM109 の培養液は一部 (100 $\mu$ L) をグリセロールストックとし、残りの培養液は 12,000rpm で 10 分間遠心を行い、大腸菌ペレットを得た。得られた大腸菌ペレットは Qiagen plasmid mini kit (Qiagen) のインストラクションマニュアルにより精製し、GST 融合組換えラット COMT をコードするプラスミド DNA を得た。それらの濃度を OD<sub>260nm</sub> によって決定し、276ng/ $\mu$ L、DNA と蛋白質濃度の比は  $OD_{260}/280 = 1.98$  となった。各々のプラスミド溶液は TE 緩衝液で希釈し 1ng/ $\mu$ L の溶液とした。 DNA 配列分析は Qiagen 社において、配列番号 5、配列番号 6 のプライマーを用い、ダイターミネーター法にて分析することによって行われた。その結果、配列番号 2 の DNA 配列のうち、1 番目~684 番目の塩基を含む配列であることを確認した。

#### 7) GST 融合組換えラット COMT プラスミド DNA の大腸菌 BL21 CODON PLUS (DE3) RP への形質転換

精製した GST 融合組換えラット COMT プラスミド DNA, 1.0 $\mu$ L (1.0ng/ $\mu$ L) を 0 $^{\circ}$ C で融解した大腸菌 BL21 CODON PLUS (DE3) RP (STRATAGENE)細胞懸濁液 50 $\mu$ L に加え、0 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。この混合物に 42 $^{\circ}$ C で 40 秒間の熱ショックを与え、0 $^{\circ}$ C で 10 分間冷却した。次い

で、450 $\mu$ L の SOC 培地を細胞懸濁溶液に加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪した。得られた混合物を LB-アンピシリン培地のプレート(アンピシリン濃度: 100 $\mu$ g/mL)に蒔き、37 $^{\circ}$ C で 15 時間静置培養した。

#### 8) GST 融合組換えラット COMT の発現

形質転換後の大腸菌 BL21 CODON PLUS (DE3) RP のプレートから GST 融合組換えラット COMT を発現するためのプラスミドを保有している大腸菌のコロニーを拾い上げ、10mL の LB-アンピシリン培地 (アンピシリン濃度: 100 $\mu$ g/mL) に投入した。上記混合物は OD600nm 値が 0.24 になるまで 37 $^{\circ}$ C にて 4 時間振盪培養を行った。培養液の一部 50 $\mu$ L はグリセロールストックとした。また 1.0mL を IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 添加前サンプルとして分取した。分取後の残りの混合溶液に 0.1M IPTG を 9.0 $\mu$ L 加え 20 $^{\circ}$ C で 6 時間振盪した。次いで、混合物を 12,000rpm で 15 分間遠心し、大腸菌ペレットを回収し使用時まで -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

#### 9) GST 融合組換えラット COMT のトロンビン処理

8) から得られたセルペレットに 1.8 mL の BugBuster 溶液 (Novagen) を加え、15 分間室温にて穏やかに攪拌しながら溶菌処理した。得られたライゼートを 12,000 rpm で 15 分間 (4 $^{\circ}$ C) 遠心し、上澄み液を回収した。次いで、予め D-PBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE) にて平衡化した D-PBS で 50% に再懸濁した。400 $\mu$ L の GST4B Sepharose (レジンベッドボリューム: 200 $\mu$ L) を上記上澄み溶液に加え、得られた混合物を 4 $^{\circ}$ C にて 30 分間振

盪した。振盪後の混合物をフィルターによりレジンをと濾液に分別した。得られたレジンを 500 $\mu$ L の D-PBS で 5 回洗浄し、300 $\mu$ L の トロンビン処理用緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 % glycerol, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 %  $\beta$ -OG ( $\beta$ -octyl-D-glucopyranoside) で 3 回洗浄した。次いで、レジンに トロンビン処理用緩衝液を加え 500 $\mu$ L とし、トロンビン (GE Healthcare Bioscience) 5 ユニットを加えた。レジン混合液は 4 $^{\circ}$ C で 15 時間穏やかに攪拌し、その一部を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析したところ、トロンビン処理により組換えラット COMT に該当するバンドが検出された。一部のレジン混合液をろ過して得られた蛋白質の濃度は 258 $\mu$ g/mL であった。更にエレクトロスプレー四重極型質量分析器にて組換えラット COMT の分子量を測定したところ観測値=24889.43 となり、配列番号 1 記載のペプチドから算出される理論値=24891.63 と良い一致をみた。

#### 10) 組換えラット COMT の固相抽出による精製と透析処理

トロンビン処理後のレジン懸濁液を空きカラムにロードしその濾液を回収した。次いでこの操作で得られた濾液を GStap FF (GE Healthcare Bioscience) にペリスタポンプでロードし、その濾液を回収した。この濾液を 2.5 L の緩衝液 (10mM NaCl, 10% Glycerol, 20mM Tris pH7.0, 0.5%  $\beta$ -OG, 4.0mM DTT, 1.0mM EDTA) を用いて一晚透析した。

#### 11) Super Q-5PW カラムクロマトグラフィー

透析後のサンプル溶液を約 10~12mL (蛋白質の量として約 10mg 相当) を 0.5mL/min の流速で予め緩衝液 A (10 mM NaCl, 10% Glycerol, 20 mM Tris pH7.0, 0.5%  $\beta$ -OG, 4.0 mM DTT,

1.0mM EDTA) にて平衡化された Super Q-5PW カラムにロードした。このカラムから目的蛋白質を 0.5mL/min で緩衝液 B (700mM NaCl, 10% glycerol, 20mM Tris pH7.0, 0.5%β-OG, 4.0mM DTT, 1.0mM EDTA) によりリニアグラジエントで溶出させた ((緩衝液 A で 7 分間 (Super Q-5PW カラム体積の約 4 倍量相当)、0-20%の緩衝液 B で 70 分間 (Super Q-5PW カラム体積の約 40 倍量相当)、20-100%の緩衝液 B で 2 分間 (Super Q-5PW カラム体積の約 1 倍量相当))。その結果、開始から約 26 分 (NaCl 濃度にて 60mM 相当) の溶出により得られるピークを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析し、組換えラット COMT の分子量を与える事を確認した。

#### 12) Superdex HR75 prep grade カラムクロマトグラフィー

11) で得られたフラクションを合一し、YM-10 膜 (ミリポア社) により約 4mL にまで濃縮した。緩衝液 (10% glycerol, 50mM MES pH6.5, 1.0mM DTT) で予め 2 時間平衡化した Superdex HR75 prep grade カラム (GE Healthcare Bioscience) に 1.0mL のサンプル溶液をロードし、流速 0.8mL/min にて溶出を行った。約 90 分後に溶出される分画を組換えラット COMT として分取した。また、この溶出された分画は組換えラット COMT の分子量を与えることを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。得られた組換えラット COMT の分画を Develosil C4 カラム (野村化学株式会社) により分析し、95%以上の純度であることを確認した。

### 3-2 ラット COMT の Apo, Holo 体複合体結晶化結晶化

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法 (McPherson, 1990) により行った。精製した組み換

えラット COMT 蛋白溶液を YM-10 により 4.8 - 5.0 mg/mL に濃縮した。 Holo 体の結晶化では、3 倍モル量の AdoMet と塩化マグネシウムを濃縮蛋白溶液に加え、氷冷下で 30 分インキュベーションした。 蛋白質溶液 (Holo 体の場合は補酵素を含む) 2.0 $\mu$ L に、結晶化溶液を 2.0 $\mu$ L に加え、リザーバー溶液は 500 $\mu$ L とした。 結晶化の初期スクリーニングは Crystal Screen I, II (Hampton Research), JCSG Suite (QIAGEN), Stura Foot Print Screen (Molecular Dimension) を使用し、20 $^{\circ}$ C と 4 $^{\circ}$ C で行った。 初期スクリーニングから得られた条件を更に最適化し、Apo 体結晶は 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30% (w/v) PEG8000, Holo 体結晶は 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 26% (w/v) PEG8000, 0.2% (v/v) sucrose から、Fig. 34 に示すような結晶をいずれも 20 $^{\circ}$ C の条件からインキュベーション約 1 週間後に得る事に成功した。 Holo 体の結晶化条件に含まれる Sucrose は Additive Screen (Hampton Research) に含まれるキット試薬を使用した。 Sucrose 以外の単糖類 (Xylitol, Glucose, Trehalose) からも結晶は得られたが、X 線を照射した回折データの質は Sucrose を添加した系から得られた結晶が最も良い結果を与えた。

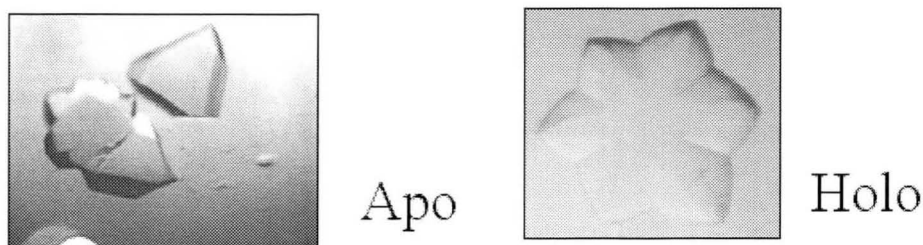


Fig. 34: Crystals of Apo COMT and Holo COMT.

尚、AdoMet は SIGMA 社製 A7007-1G を、塩化マグネシウムは Hampton Research 社製 HR2-559 を使用した。

### 3-3 : 回折データ収集及び構造解析

回折データ収集を行うに当り、Apo 体及び Holo 体結晶を 20% (v/v) Glycerol を含む結晶化バッファーに (10~20 秒) 浸した後に液体窒素に直漬けし、R-AXIS IV (RIGAKU) により回折点のチェックを行った。実験条件を以下に示す (Table. 5)。回折点の最大分可能によるスクリーニングを行い、2.7Å 程度の分解能を示す結晶を本測定用とした。本測定に用いる結晶は測定時まで液体窒素を充填したデュワー瓶内に保存した。本測定は SPring-8 BL32B2 (創薬産業ビームライン) にて行い、測定データは MOSFLM (Leslie, 1992) と SCALA (P.R.Evans, 1993) により反射強度の積分とスケーリングを行った。BL32B2 における実験条件を Table. 6 に示す。初期位相は PDB accession code: 1VID から低分子を除いた蛋白質座標をプローブとした分子置換 AMoRe (Navaza, 1994)により決定した。分子置換の結果、第一番目のピークの相関係数(Corr\_F), R 因子(R-factor) は第 2 番目のピークよりも優位に大きく、得られた解が正しい事を示していた (Table. 7)。構造精密化は CNX (Accerlys Japan)により、また、モデルの修正および補酵素の電子密度へのフィッティングは QUANTA (Accerlys Japan)により行った。結晶学的データ及び構造精密化の結果を Table. 8 に、更に、Ramachandran Plot の結果を Fig. 35 (Apo 体), Fig. 36 (Holo 体) に示す。最終座標はプロテインデータバンク (PDB) に PDB accession code: 2ZLB (Apo 体)、PDB accession code: 2ZTH (Holo 体)として登録した。構造精密化の結果、Apo 体、Holo 体の N 末の Gly-Ser-Met-Gly と C 末の Pro-Ser-Ser-Pro-Asp-Lys-Ser、Holo 体の残基番号 36-41 (Lys36-Glu37-Trp38-Ala39-Met40-Asn41) は熱振動が高いため、電子密度は見えなかった為、最終座標からは除いてある。



Table. 5: Experimental conditions of diffraction studies using R-AXIS IV diffractometer.

<i>Wave length (Å)</i>	<i>Camera distance (mm)</i>	<i>Exposure time (min)</i>
<b>1.54</b>	<b>180~200</b>	<b>20~30</b>
<i>Oscillation width (degree)</i>	<i>Total oscillation width (degree)</i>	<i>Cryo temperature (K)</i>
<b>1.0</b>	<b>10.0(注)</b>	<b>100</b>

(注) : 振動範囲の開始点をゴニオメータの0度と90度の2箇所とした。

Table. 6: Experimental conditions of diffraction studies at SPring-8 BL32B2.

<i>Wave length (Å)</i>	<i>Camera distance (mm)</i>	<i>Exposure time (sec)</i>
<b>1.0</b>	<b>180 (Apo), 200 (Holo)</b>	<b>5.0 (Apo), 7.0 (Holo)</b>
<i>Oscillation width (degree)</i>	<i>Oscillation range (degree)</i>	<i>Cryo temperature (K)</i>
<b>1.0</b>	<b>-180~180 (Apo), -270~270 (Holo)</b>	<b>100</b>

Detector: Jupiter 210 CCD (RIGAKU)

Table. 7: The results of molecular replacement using AMoRe.

**Apo**

<b>Solution</b>	<b>alpha</b>	<b>beta</b>	<b>gamma</b>	<b>Tx</b>	<b>Ty</b>	<b>Tz</b>	<b>Corr_F</b>	<b>R-factor</b>
Sol_1	46.42	76.79	21.37	0.9667	0.3331	0.3592	<b><u>65.7</u></b>	<b><u>0.377</u></b>
Sol_2	46.42	76.79	21.37	0.3025	0.0004	0.2389	41.3	0.489
Sol_3	46.42	76.79	21.37	0.2989	0.998	0.1897	39.8	0.493

**Holo**

<b>Solution</b>	<b>alpha</b>	<b>beta</b>	<b>gamma</b>	<b>Tx</b>	<b>Ty</b>	<b>Tz</b>	<b>Corr_F</b>	<b>R-factor</b>
Sol_1	0.97	87.52	323.97	0.2359	0.2236	0.1632	<b><u>56.3</u></b>	<b><u>0.46</u></b>
Sol_2	0.97	87.52	323.97	0.2357	0.2247	0.3227	39.9	0.532
Sol_3	0.97	87.52	323.97	0.2344	0.2224	0.2292	39.5	0.539

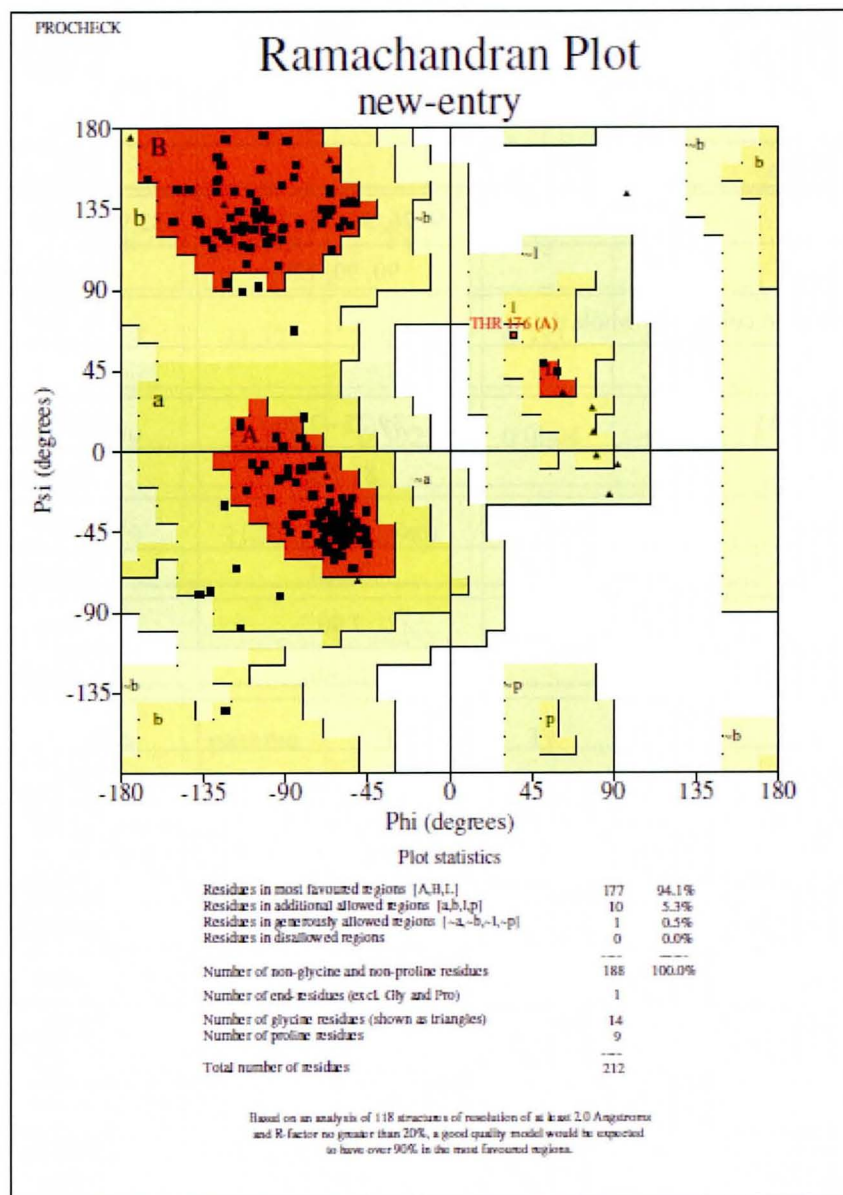
Resolution range (rotation function): 20.0 – 3.0Å, Resolution range (translation function): 20.0 – 3.0Å

Table. 8: Crystallographic parameter and refinement statistics of Apo and Holo form of COMT.

A. Data collection and processing	Apo	Holo
Wavelength (Å)	1.00	1.00
Space group	$P3_121$	$P2_12_12_1$
Unit cell parameters		
a, b, c (Å)	56.26, 56.26, 117.48	32.90, 61.09, 105.37
$\alpha, \beta, \gamma$ (deg.)	90, 90, 120	90, 90, 90
Number of crystal to collect the whole data set	1	1
B. Diffraction data		
Resolution range (Å)	39.22 - 2.20	39.0 - 2.60
Unique reflections	81 710	46 918
R ( <i>I</i> ) sym (%)	8.3	10.1
Completeness (%)	98.70	100.00
Redundancy	7.90	6.80
$I/\sigma$ ( <i>I</i> )	12.60	14.00
C. Refinement		
Resolution range (Å)	2.20	2.60
Reflections used in refinement	11 356	6 225
Final R value (work/free)	0.20/0.26	0.19/0.28
Protein residues	211	205
Water molecules	183	42
Ligand	1	2
RMSD from ideal		
Bond lengths (Å)	0.02	0.02
Bond angles (deg.)	2.14	2.00
Ramachandran statistics		
Most favored regions (%)	94.1	91.1
Additionally allowed regions (%)	5.90	8.30
Mean <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )		
Protein	15.8	32.3
Water molecules	22.1	28.0
Ligand	17.00	31.3/47.8

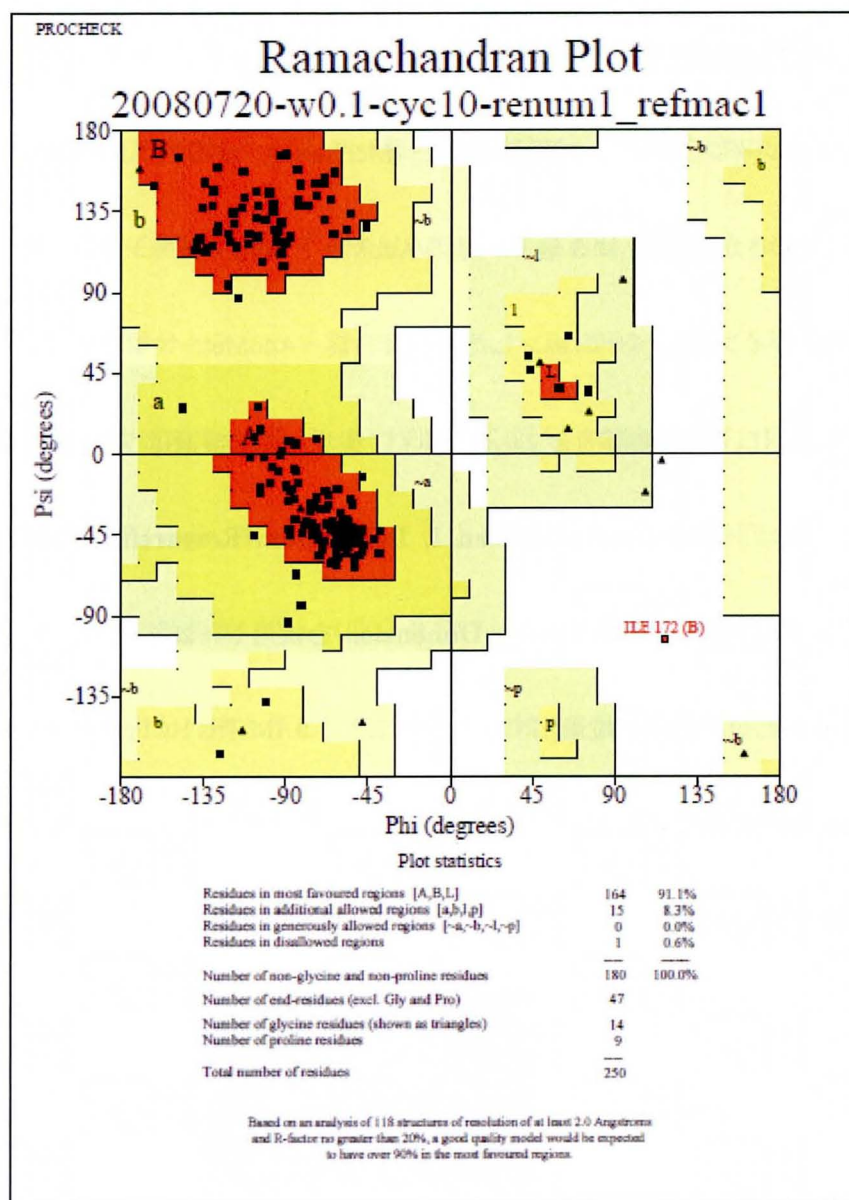
<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h,i)}$ , where  $I(h,i)$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$  and  $\langle I(h) \rangle$  is the corresponding mean value of  $I(h)$  for all  $i$  measurements. <sup>b</sup>  $R\text{-factor} = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$ , where  $|F_{\text{obs}}|$  and  $|F_{\text{calc}}|$  are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. <sup>c</sup>  $R\text{-free}$  is the same as  $R\text{-factor}$ , but for a 5.0 % subset of all reflections for Apo form and 10.0 % for Holo form respectively.

Fig. 35: Ramachandran plot (Apo 体)



new-entry\_01.ps

Fig. 36: Ramachandran plot (Holo 体)



## 実験の部 (第四章)

### 4-1 4PCM-COMT 複合体結晶化

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法 (McPherson, 1990) により行い、精製した COMT 蛋白溶液 (4.8 - 5.0mg/mL) に 3 倍モル量の AdoMet と塩化マグネシウム、更に 4PCM を加え、氷冷下で 30 分インキュベーションした。蛋白質-AdoMet-マグネシウムイオン-4PCM 混合溶液 2.0  $\mu$ L に、結晶化溶液を 2.0  $\mu$ L 加え、リザーバー溶液は 750  $\mu$ L とした。結晶化の初期スクリーニングは Crystal Screen I, II(Hampton Research), JCSG Suite(QIAGEN), Stura Foot Print Screen (Molecular Dimension) を使用し、20°C でインキュベーションした。結晶が得られた初期条件を最適化することにより、0.1M Tris HCl pH7.5, 0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20% (w/v) PEG 4000 の条件より Fig. 37 に示すような結晶をインキュベーションより 1 週間後に得る事ができた。



Fig. 37: Crystals of 4PCM-COMT complexes.

尚、4PCM は CHEMBRIDGE collection より購入し、20mM のストック溶液 (DMSO) を調整した。このストック溶液は-30°Cにて用事まで凍結保存した。

### 4-2 回折データ収集及び構造解析

回折データ収集を行うに当り、4PCM-COMT 複合体結晶を 20% (v/v) Glycerol を含む結晶化バッファーに (10~20 秒) 浸した後に液体窒素に直漬けし、R-AXIS IV (RIGAKU) により回折

点のチェックを行った。 実験条件を以下に示す (Table. 9)。 回折点の最大分可能によるスクリーニングを行い、2.5Å 程度の分解能を示す結晶を本測定用とした。 本測定に用いる結晶は測定時まで液体窒素を充填したデュワー瓶内に保存した。 本測定は SPring-8 BL32B2 (創薬産業ビームライン) にて行い、測定データは MOSFLM (Leslie, 1992) と SCALA (P.R.Evans, 1993) により反射強度の積分とスケールリングを行った。 BL32B2 における実験条件を Table. 10 に示す。 初期位相は PDB accession code: 1VID から低分子を除いた蛋白質座標をプローブとした分子置換 MOLREP (Vagin, A. et al., 2000) により決定した (Table. 11)。 分子置換の結果、第一番目のピークの相関係数 (Corr), 及び R 因子 (Rfac) は第 2 番目のピークよりも優位に大きく、得られた解が正しい事を示していた。 構造精密化は REFMAC (Murshdov, G. N. et al., 1997) により、また、モデルの修正および補酵素と 4PCM の電子密度へのフィッティングは QUANTA (Accerlys Japan) により行った。 結晶学的データ及び構造精密化の結果を Table. 12 に、更に、Ramachandran Plot の結果を Fig. 38 に示す。 最終座標はプロテインデータバンク (PDB) に PDB accession code: 2ZVJ として登録した。 構造精密化の結果、N 末の Gly-Ser-Met-Gly と C 末の Pro-Ser-Ser-Pro-Asp-Lys-Ser、は熱振動が高いため、電子密度は見えなかった為、最終座標からは除いてある。

Table. 9: Experimental conditions of diffraction study using R-AXIS IV diffractometer.

<i>Wave length (Å)</i>	<i>Camera distance (mm)</i>	<i>Exposure time (min)</i>
<b>1.54</b>	<b>180~200</b>	<b>20~30</b>
<i>Oscillaion width (degree)</i>	<i>Total oscillation width (degree)</i>	<i>Cryo temperature (K)</i>
<b>1.0</b>	<b>10.0 (注)</b>	<b>100</b>

(注) : 振動範囲の開始点をゴニオメータの0度と90度の2箇所とした。

Table. 10: Experimental conditions of diffraction study at SPring-8 BL32B2.

<i>Wave length (Å)</i>	<i>Camera distance (mm)</i>	<i>Exposure time (sec)</i>
<b>1.0</b>	<b>180</b>	<b>5.0</b>
<i>Oscillation width (degree)</i>	<i>Oscillation range (degree)</i>	<i>Cryo temperature (K)</i>
<b>1.0</b>	<b>-180~180</b>	<b>100</b>

Detector: Jupiter 210 CCD (RIGAKU)

Table. 11: The results of molecular replacement using Molrep.

Sol_RF_TF	No.	theta	phi	chi	tx	ty	tz	Rfac	Corr
Sol_1_1	1	0	-45	59.26	0.462	0.871	0.431	<b>0.394</b>	<b>0.607</b>
Sol_2_4	2	8.92	64.28	114.52	0.335	0.033	0.401	0.615	0.111
Sol_8_3	3	178.57	-132.56	85.06	0.176	0.723	0.133	0.625	0.104
Sol_5_2	4	86.85	155.68	173.89	0.435	0.472	0.234	0.623	0.1

Resolution range (rotation function): 42.3-3.0Å, Resolution range (Translation function): 42.3-3.0Å

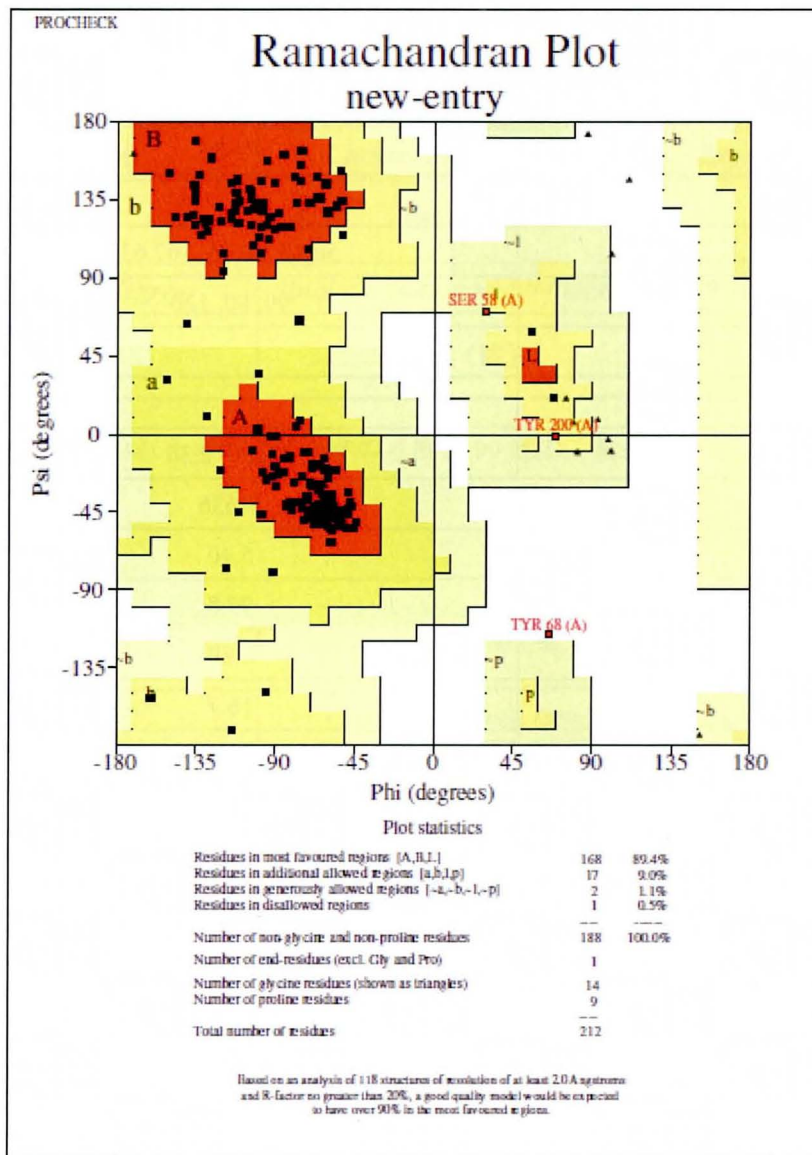


Table. 12: Crystallographic parameter and refinement statistics of 4PCM-COMT crystal structure.

<i>A. Data collection and processing</i>	4PCM-COMT
Wavelength (Å)	1.00
Space group	<i>P</i> 3 <sub>2</sub> 21
Unit cell parameters	
a, b, c (Å)	50.45, 50.45, 167.63
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (deg.)	90, 90, 120
<i>B. Diffraction data</i>	
Resolution range (Å)	42.29 - 2.30
Unique reflections	11636
R ( <i>I</i> ) sym (%) <sup>a</sup>	5.40
Completeness (%)	99.8
Redundancy	6.80
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	16.7
Number of crystal to collect whole data set	1
<i>C. Refinement</i>	
Resolution range (Å)	42.29 - 2.30
Reflections used in refinement	10454
Final R value (work <sup>b</sup> /free <sup>c</sup> )	0.211/0.286
Protein residues	212
Water molecules	73
Ligand	3
RMSD from ideal (COMT)	
Bond lengths (Å)	0.02
Bond angles (deg.)	1.67
Ramachandran statistics	
Most favored regions (%)	89.4
Additionally allowed regions (%)	9.0
Mean <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	
Protein	41.76
Water molecules	43.37
Ligands (Mg <sup>2+</sup> , AdoMet, 4PCM)	33.91, 34.40, 50.50

<sup>a</sup>  $R_{\text{sym}} = 100 \frac{\sum_j |I(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_j I(h)}$ , where  $I(h)$  is the observed intensity and  $\langle I(h) \rangle$  is the corresponding mean value of  $I(h)$  for all measurements. <sup>b</sup>  $R\text{-work} = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$ , where  $|F_{\text{obs}}|$  and  $|F_{\text{calc}}|$  are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. <sup>c</sup>  $R\text{-free}$  is the same as  $R\text{-factor}$ , but for a 10.0 % subset of all reflections for 4PCM-COMT.

Fig. 38: Ramachandran plot (4PCM-COMT complex structure)



【配列表】 第二章 ヒト COMT

配列番号 1

Gly Ser Met Gly Asp Thr Lys Glu Gln Arg Ile Leu Asn His Val Leu  
1 5 10 15

Gln His Ala Glu Pro Gly Asn Ala Gln Ser Val Leu Glu Ala Ile Asp  
20 25 30

Thr Tyr Cys Glu Gln Lys Glu Trp Ala Met Asn Val Gly Asp Lys Lys  
35 40 45

Gly Lys Ile Val Asp Ala Val Ile Gln Glu His Gln Pro Ser Val Leu  
50 55 60

Leu Glu Leu Gly Ala Tyr Cys Gly Tyr Ser Ala Val Arg Met Ala Arg  
65 70 75 80

Leu Leu Ser Pro Gly Ala Arg Leu Ile Thr Ile Glu Ile Asn Pro Asp  
85 90 95

Cys Ala Ala Ile Thr Gln Arg Met Val Asp Phe Ala Gly Val Lys Asp  
100 105 110

Lys Val Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Gln Asp Ile Ile Pro Gln Leu  
115 120 125

Lys Lys Lys Tyr Asp Val Asp Thr Leu Asp Met Val Phe Leu Asp His  
130 135 140

Trp Lys Asp Arg Tyr Leu Pro Asp Thr Leu Leu Leu Glu Glu Cys Gly  
145 150 155 160

Leu Leu Arg Lys Gly Thr Val Leu Leu Ala Asp Asn Val Ile Cys Pro  
165 170 175

Gly Ala Pro Asp Phe Leu Ala His Val Arg Gly Ser Ser Cys Phe Glu  
180 185 190

Cys Thr His Tyr Gln Ser Phe Leu Glu Tyr Arg Glu Val Val Asp Gly  
195 200 205

Leu Glu Lys Ala Ile Tyr Lys Gly  
210 215

配列番号 2

インサート DNA

tctggatcca tgggtgacac caaggagcag cgcctcctga accacgtgct gcagcatgcg	60
gagcccggga acgcacagag cgtgctggag gccattgaca cctactgcga gcagaaggag	120
tgggcatga acgtgggcca caagaaaggc aagatcgtgg acgccgtgat tcaggagcac	180
cagccctccg tgctgctgga gctgggggcc tactgtggct actcagctgt gcgcatggcc	240
cgoctgctgt caccaggggc gaggctgata accatcgaga tcaaccccca ctgtgccgcc	300
atcaccacgc ggatggtgga ttctgctggc gtgaaggaca aggtcaccct tgtggttggg	360
gcttcccagg acatcatccc ccagctgaag aagaagtatg atgtggacac actggacatg	420
gtcttctctg accactggaa ggaccggtac ctgccggaca cgcttctctt ggaggaatgt	480
ggcctgctgc ggaaggggac agtgctactg gctgacaacg tgatctgccc aggtgcgcca	540
gacttcttag cacacgtgcg cgggagcagc tgctttgagt gcacacacta ccaatcgttc	600
ctggaataca gggaggtggt ggacggcctg gagaaggoca tctacaaggg ctgagaattc	660
ctc	663

配列番号 3

5' primer

tctggatcca tgggtgacac caaggag	27
-------------------------------	----

配列番号 4

3' primer

gaggaattct cagcccttgt agatggcctt ctc	33
--------------------------------------	----

配列番号 5

5' primer

gaagctatcc cacaattga taag	24
---------------------------	----

配列番号 6

3' primer

ctgacgggct tgtctgctcc	20
-----------------------	----

配列番号 7

catcgatcaaccccgactg	21
---------------------	----

【配列表】 第三章 ラット COMT

配列番号 1

Gly Ser Met Gly Asp Thr Lys Glu Gln Arg Ile Leu Arg Tyr Val Gln  
1 5 10 15

Gln Asn Ala Lys Pro Gly Asp Pro Gln Ser Val Leu Glu Ala Ile Asp  
20 25 30

Thr Tyr Cys Thr Gln Lys Glu Trp Ala Met Asn Val Gly Asp Ala Lys  
35 40 45

Gly Gln Ile Met Asp Ala Val Ile Arg Glu Tyr Ser Pro Ser Leu Val  
50 55 60

Leu Glu Leu Gly Ala Tyr Cys Gly Tyr Ser Ala Val Arg Met Ala Arg  
65 70 75 80

Leu Leu Gln Pro Gly Ala Arg Leu Leu Thr Met Glu Met Asn Pro Asp  
85 90 95

Tyr Ala Ala Ile Thr Gln Gln Met Leu Asn Phe Ala Gly Leu Gln Asp  
100 105 110

Lys Val Thr Ile Leu Asn Gly Ala Ser Gln Asp Leu Ile Pro Gln Leu  
115 120 125

Lys Lys Lys Tyr Asp Val Asp Thr Leu Asp Met Val Phe Leu Asp His  
130 135 140

Trp Lys Asp Arg Tyr Leu Pro Asp Thr Leu Leu Leu Glu Lys Cys Gly  
145 150 155 160

Leu Leu Arg Lys Gly Thr Val Leu Leu Ala Asp Asn Val Ile Val Pro  
165 170 175

Gly Thr Pro Asp Phe Leu Ala Tyr Val Arg Gly Ser Ser Ser Phe Glu  
180 185 190

Cys Thr His Tyr Ser Ser Tyr Leu Glu Tyr Met Lys Val Val Asp Gly  
195 200 205

Leu Glu Lys Ala Ile Tyr Gln Gly Pro Ser Ser Pro Asp Lys Ser  
210 215 220

## 配列番号 2

### インサート DNA

tctggatcca tgggtgacac aaaggagcag cgcacctgc gctacgtgca gcagaatgca	60
aagcctggag accctcagag cgtcctggag gccatcgaca cctactgcac acagaaggaa	120
tgggcatga atgtgggtga cgcgaaaggc caaatcatgg atgcagtgat tcgggagtac	180
agcccctccc tgggtctgga actgggagct tactgtggct actcagcagt gcgaatggct	240
cgctgtctgc agcctggagc caggcttctc accatggaga tgaacctga ctacgtgcc	300
atcaccagc aatgctgaa ctttgcaggc ctacaggaca aagtcacat cctcaatggg	360
gcacccagg atcttatccc ccagctgaag aagaagtacg acgtggacac actagacatg	420
gtctttcttg accactggaa agaccgctac cttccagaca cacttctcct ggagaaatgt	480
ggcctgtctg gcaaggggac agtgctccta gctgacaacg tcatcgtccc gggaaccct	540
gacttcttgg cgtatgtgag agggagcagc agcttcagat gcacacacta cagctcatac	600
ctggagtaca tgaagtgtg agacggcttg gagaaggcaa tctaccaggg tccaagtagc	660
cctgacaagt cttgagaatt ctct	684

## 配列番号 3

### 5'-primer

tctggatcca tgggtgacac aaaggagcag	30
----------------------------------	----

## 配列番号 4

### 3'-primer

agagaattct caagacttgt cagggctac	29
---------------------------------	----

## 配列番号 5

### 5'-primer

gaagctatcc cacaaattga taag	24
----------------------------	----

## 配列番号 6

### 3'-primer

ctgacgggct tgtctgtccc	20
-----------------------	----

## 謝辞

本論文は2003年4月より2005年4月まで、キッセイ薬品工業株式会社 中央研究所において行った種々の実験及び構造解析とデータの比較検討に基づいて作製されたものであり、その間、多くの方々の多大なる支援によって支えられてきました。ここに感謝の意を表したいと思います。

広島大学大学院大学院医歯薬総合研究科に在学中の2年間、終始御指導御鞭撻賜り、更に本論文をまとめる機会を提供して下さいました 薬学専攻 創薬科学講座 創薬合成化学研究室 武田 敬教授に深く感謝致します。

本論文の審査を頂きました医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 生体機能分子動態学研究室 太田 茂教授 並びに医歯薬学総合研究科 薬学専攻 創薬科学講座創薬合成化学研究室 鈴木 一郎准教授に深く感謝致します。

本研究に際し、多大の御支援と研究の機会を頂きましたキッセイ薬品工業株式会社 代表取締役 神澤陸雄社長ならびに神澤邦雄会長に深甚なる感謝の意を表します。

また、多大なる御支援とご援助を頂きましたキッセイ薬品工業株式会社 取締役研究本部長 柴田信男博士、経営企画本部 製品戦略部長 伊佐治正幸博士、創薬研究部長 竹花泰雄博士、創薬研究担当部長 赤羽敏博士、品質保証部 赤羽健司博士に深く感謝致します。

筆者が2003年から2005年の間、本研究を遂行するに当り、昼夜を問わず終始有益な御指導御助言賜り、実験の方向性に関して具体的な御指導を賜りましたキッセイ薬品工業株式会社中央研究所 百瀬傳一博士に深く感謝致します。

本研究を遂行するに当り、蛋白質の発現および精製に関して終始有益な御指導御助言賜り、また、特許二報をまとめるに当り、懇切丁寧な御指導を賜りましたキッセイ薬品工業株式会社中央研究所 岡崎浩輔博士に深く感謝致します。

筆者が本研究を遂行し、まとめる過程において終始暖かい御協力御激励を頂いた、キッセイ薬品工業株式会社 中央研究所のメンバーに心より感謝致します。

最後に、筆者が本研究をまとめるに当り、終始協力、そして暖かく励ましてくれた家族と妻さゆりに心から感謝の意を表します。



## 参考文献

Bhat, R., Timasheff, S. N., (1992) *Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols*, Protein Sci. **1**, 1133-1143.

Bonifacio, M.J., Archer, M., Rodrigues, M.L., Matias, P.M., Learmonth, D. A., Carrondo, M. A., Soares-Da-Silva, P., (2002). *Kinetics and crystal structure of catechol-O-methyltransferase complex with co-substrate and a novel inhibitor with potential therapeutic application*. Mol. Pharmacol. **62**, 795-805.

Bunker, A., Mannisto, P. T., Pierre, J. -F. St., Rog, T., Pomorski, P., Stimson, L., Karttunen, M., (2008). *Molecular Dynamics simulations of the enzyme Catechol-O-Methyltransferase: methodological issues*. SAR QSAR Environ. Res. **19**, 179-189.

CCP4: Collaborative Computational Project Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D **50**, 760-763.

Harigai, M. Kataoka, Y. Imamoto, (2006). *A Single CH/π Weak Hydrogen Bond Governs Stability and the Photocycle of the Photoactive Yellow Protein*, J. Am. Chem. Soc. **128**, 10646-10647.

Kaakkola, S., Gordin, A., Jarvinen, M., Wikberg, T., Schultz, E., Nissinen, E., Pentikäinen, P. J. and Rita, H., (1990). *Effect of a novel catechol-O-methyltransferase inhibitor, nitecapone, on the metabolism of L-dopa in healthy volunteers*. Clin. Neuropharmacol. **13**, 436-447.

Kabsch W. *Acta. Cryst. Sect A* (1976) **32**, 922-923.

Karhunen, T., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Julkunen, I., Panula, P., (1994). *Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues*. J. Histochem. Cytochem. **42**, 1079-1090.

Koshland, D. E. Nemethy, J. G. Filmer, D. (1966). *Biochemistry*, **5**, 365.

Lautala, P., Ulmanen, I., Taskinen, J., (2001). *Molecular Mechanism Controlling the Rate and Specificity of Catechol O-Methyltransferase by Human Soluble Catechol O-Methyltransferase*. *Mol. Pharmacol.* **59**, 393-402.

Learmonth, D. A., Palma, P. N., Vieira-Coelho, M. A., Soares-Da-Silva, P., (2004). *Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling Studies of a Novel, Peripherally Selective Inhibitor of Catechol-O-Methyltransferase*. *J. Med. Chem.* **47**, 6207-6217.

Lerner, C., Ruf, A., Gramlich, V., Masjost, B., Zürcher, G., Joakob-Roetne, R., Borroni, E., Diederich, F., (2001). *X-ray crystal structure of a bisubstrate inhibitor bound to the enzyme Catechol-O-methyltransferase: A Dramatic effect of inhibitor preorganization on binding affinity*. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **113**, 4164-4166.

Leslie, A. G. W., (1992). *Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data*. Joint CCP4 and ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography. **26**, (Warrington, United Kingdom: Daresbury Laboratory).

Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melén, K., Julkunen, I., Taskinen, J., (1995). *Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme*. *Biochemistry*. **34**, 4202-4210.

Lundstrom, K., Tilgman, C., Peranen, J., Kalkkinen, K., Ulmanen, I. (1992). *Expression of enzymatically active rat liver and human placental catechol-O-methyltransferase in Escherichia coli; purification and partial characterization of the enzyme*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1129**, 149-154.

Männistö, P. T., Kaakkola, S., (1989). *New selective COMT inhibitors: useful adjuncts for Parkinson's disease?* Trends Pharmacol. Science. **10**, 54-56.

Männistö P. T., Kaakkola, S., (1999). *Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors.* Pharmacol. Rev. **51**, 593-628.

Masjost, B. Ballmer, P., Borroni, E., Zurcher, G., Winkler, F. K., Jakob-Roente, R., Diederich, F., (2000). *Structure-Based Design, Synthesis, and in vitro Evaluation of Bisubstrate Inhibitors for Catechol O-Methyltransferase (COMT).* Chem. Eur. J. **6**, 971-982.

McPherson. A., (1990). *Current approaches to macromolecular crystallization.* Eur. J. Biochem. **189**, 1-23.

Navaza, J., (1994). *AMoRe: an automated package for molecular replacement.*  
Acta Crystallogr. A **50**, 157-163

Nishio, M. Weak Hydrogen Bonds. In Encyclopedia of Supramolecular Chemistry; Marcel Dekker: New York, (2004) 1576-1585.

Nissinen, E., Kaheinen, P., Penttilä, K. E., Kaivola, J., Lindén, I. B., Entacapone, (1997). *A novel catechol-O-methyltransferase inhibitor for Parkinson's disease, does not impair mitochondrial energy production,* Eur. J. Pharmacol. **340**, 287-294.

Ovaska, M., Yliniemela, A., (1998). *A semiempirical study on inhibition of catechol-O-methyltransferase by substituted catechols.* J. Comput. Aided. Mol. Des. **12**, 301-307

Paetzel, M., Dalbey, R. E., (1997). *Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases.* Trends.

Palma, P. N., Rodrigues, M. A., Bonifacio, A. I., Loureiro, A. I., Learmonth, D. A., Carrondo, M. A., Soares-Da-Silva, P., (2006). *Comparative study of ortho- and meta-nitrated inhibitors of Catechol-O-methyltransferase: interactions with the active site and regioselectivity of O-methylation.* Mol. Pharmacol. 70, 143-153.

Paulini, R., Trindler, C., Lerner, C., Brandli, L., Schweizer, W. B., Jakob-Roente, R., Zurcher, G., Borroni, E., Diedrich, F. (2006). *Bisubstrate Inhibitors of Catechol O-Methyltransferase (COMT): the Crucial Role of the Ribose Structural Unit for Inhibitor Binding Affinity.* Chem Med Chem. 1, 340-357.

Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W., Cheng, X., (1995). *Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases.* J. Mol. Biol. 247, 16-20.

Spiwok, V., Lipovová, P., Skálová, T., Buchtelová, E., Hašek, J., Králová, B. (2004). *Role of CH/π interactions in substrate binding by Escherichia coli β-galactosidase,* Carbohydr. Res. 339, 2275-2280.

Taravarti, A., Shokrzadeh, M., Ebadi, A. G., Valipour, P., Tabar Molla Hassan, A., Farrokhi, F., (2007). *Varios Effects of Sugar and Polyols on the Protein Structure an Function: Role as Osmolyte on Protein Stability,* World Appl. Sci. J. 2, (4), 353-362

Tilgman, C., Ulmanen, I. (1996). *Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases.* J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 684, 147-161.

Toney, M. D., Kirsch, J. F., (1989). *Direct Broensted analysis of the restoration of activity to a mutant enzyme by exogenous amines.* Science. 243, 1485-1488.

Umezawa; Y., Nishio, M. (1998). *CH/ $\pi$  Interactions as demonstrated in the crystal structure of guanine-nucleotide binding proteins, Src homology-2 domains and human growth hormone in complex with their specific ligands*, Bioorg. Med. Chem. **6**, 493-504.

Vidgren, J., Svenson, L. A., Lijias, A., (1994). *Crystal structure of catechol-O-methyltransferase*. Nature **368**, 354-358.

Vidgren, J., Ovaska, M., (1997). Structural Aspects in the Inhibitor Design of Catechol-O-Methyltransferase, in: Pandi Veerapandian., (Ed.), STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN marcel Dekker Inc., pp. 343-363.

Vidgren, J., Ovaska, M., Tenhunen, J., Tilgman, C., Lotta, T., (1999). Structure and evolution of AdoMet-dependent methyltransferases, in: Cheng, X., Blumenthal, R. M., (Ed.), S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions. World Scientific, River Edge, NJ, pp. 1-38.

Woodard, R. W, Tsai, M. - D., Floss H. G., Crooks, P. A., Coward, J. K., (1980). *Stereochemical course of the transmethylation catalyzed by Catechol-O-methyltransferase*. J. Biol. Chem. **255**, 124-9127.

Zheng, Y. J., Bruice, T. C., (1997). A Theoretical Examination of the Factors Controlling the Catalytic Efficiency of a Transmethylation Enzyme: Catechol-O-Methyltransferase. J. Am. Chem. Soc. **43**, 8137-8145.

Zücher, G., Da, Prada, M., (1982). *Rapid and sensitive single-step radiochemical assay for catechol-O-methyltransferase*. J. Neurochem. **38**, 191-195.

本学位論文に直接関係のある学術論文及び特許

1) *Crystal Structure of Apo and Holo Form of Rat Catechol-O-Methyltransferase*

Eiichi Tsuji, Kosuke Okazaki, Masayuki Isaji, and Kei Takeda

*J. Struct. Biol.* in press.

2) *Crystal Structures of Rat Catechol-O-Methyltransferase Complexed with Coumarine-Based Inhibitor*

Eiichi Tsuji, Kosuke Okazaki, and Kei Takeda

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 2009, 494-497

3) ヒト COMT の結晶構造 特開 2006-23

辻 英一、岡崎浩輔、百瀬傳一

4) ラット COMT ホロ体の結晶構造 特願 2004-265207

辻 英一、岡崎浩輔、百瀬傳一