



Title	カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) 阻害剤の複合体X線結晶構造解析及び, FMO (Fragment molecular orbital) 法を用いた活性中心における相互作用評価
Author(s)	武部, 克希
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2025, 69(1), p. 1-7
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/103299
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) 阻害剤の複合体 X 線結晶構造解析及び, FMO (Fragment molecular orbital) 法を用いた活性中心における相互作用評価

武部 克希*

(令和6年11月5日受付)

1 COMT に関して

カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) (酵素番号 2.1.1.6) はパーキンソン病の治療のための重要な薬物標的酵素である。パーキンソン病の発症メカニズムは中脳黒質にあるドパミン神経細胞が変性・脱落し、脳内のドパミンが枯渇することによって考えられており、現在の主な治療法はドパミン補充療法である¹⁾。ドパミンは血液脳関門を通過できないため、その前駆体であり血液脳関門を通過できる L-ドーパを末梢循環から取り込み、取り込んだドーパを中枢にてドーパ脱炭酸酵素でドパミンに変換することでドパミン補充を行う。しかしながら、末梢からドーパを取り込むだけでは末梢に存在する S-COMT などに代謝されてしまうため、ほとんど中枢に取り込むことができない²⁻³⁾。そこで、取り込んだドーパの代謝を抑えるためにも、末梢でのドーパを代謝し不活化を行う COMT 阻害薬の開発が行われた⁴⁻⁶⁾。COMT の反応サイクル (図1) は、まず COMT/S-アデノシルメチオニン (SAM) 複合体が形成される。次いで、Mg イオンとカテコール基質が結合することで COMT/SAM/Mg/カテコール基質 4 者複合体が形成される。4 者複合体形成時に、SAM のメチル基がカテコール基質の 3 位の水酸基に転移 (メチル化) されることで、COMT/S-アデノシル L-ホモシステイン (SAH)/Mg/メトキシカテコール代謝物の 4 者複合体となる。その後、メトキシカテコール代謝物および Mg が解離し COMT・SAH 複合体となり最終的には SAH が解離し COMT に戻る⁷⁾。そのため、COMT 阻害剤の多くは代謝されるカテコール基のアナ

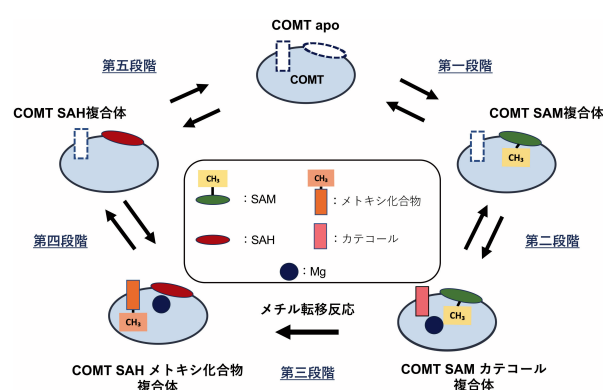


図1 COMT のサイクル図

第一段階として COMT は COMT/SAM 複合体を形成する。第二段階として COMT/SAM 複合体から、COMT/SAM/Mg²⁺/カテコール複合体が形成される。第三段階としてメチル転移反応が進み、SAM のメチル基がカテコールに移り、SAH、メトキシ化合物が生成される。第四段階として NNE と Mg²⁺ が解離し、COMT/SAH が形成される。第五段階として SAH が解離し、COMT に戻る。

ログである 3 ニトロカテコールを含み、中でもエンタカポンやトルカポンが 1990 年代後半より臨床応用されてきた⁴⁻⁶⁾。エンタカポンは末梢の COMT 阻害薬であるのに対して、トルカポンは末梢の COMT 阻害に加えて一部、血液脳関門を通過し中枢にも作用する^{5-6,8)}。しかしながら、エンタカポンもトルカポンも一日複数回投与が必要であり、トルカポンは肝障害が報告されている⁹⁾。その様な背景の中、これまでの COMT 阻害薬と同様に主鎖として 3 ニトロカテコール骨格を持っているが、一日一回の投与で十分な薬効を示し持続的に COMT を阻害するオピカポンが開発された⁵⁾。これに

* 岡山大学 学術研究院医歯薬学域 歯科薬理学分野

より、抗パーキンソン病薬の効果持続時間が短縮し、薬物濃度の変動とともに症状が変動する現象である wearing off の大幅な改善が達成され、さらには肝障害の報告もない¹⁰⁾。

そこで、本研究では、オピカポンの作用時間がなぜ長いのか解明するとともに、COMT の酵素反応における重要残基の同定および構造変化の解明を目的として、X線構造解析法を用いて、COMT/SAM/Mg²⁺/オピカポン、COMT/SAH/Mg²⁺/オピカポン複合体の構造を決定し、構造比較、さらにはリガンド-タンパク質間相互作用を Fragment molecular orbital (FMO) 計算を用い¹¹⁾、量子化学レベルで解析を行った。本稿では、上述にある著者らの知見を中心に、立体構造情報を基にした薬剤の作用機序解明について概要する。

2 COMT/SAM/Mg/ オピカポンおよび COMT/SAH/Mg/ オピカポン複合体構造決定

X線結晶構造解析にて、COMT/SAM/Mg²⁺/オピカポン複合体の構造は 2.6Å 分解能で決定し、COMT/SAH/Mg²⁺/オピカポン複合体の構造は 2.0Å 分解能で決定した。いずれの複合体においても、COMT は 9 本の α ヘリックスと 7 本の β シートからなっていた。SAM と SAH の結合部位はほとんど同じであり、いずれも β 1 α loop, β 4 α loop に挟まれるように配位していた

(図2)。オピカポンと COMT の相互作用も、触媒残基と考えられている Lys144 を除いて保存されており、オピカポンは主鎖であるニトロカテコール骨格において水酸基でマグネシウムイオンと結合し、Asp169, Asn170, Glu199 の側鎖と相互作用していた¹²⁻¹⁴⁾ (図3)。また、カテコール骨格を安定させるように α 2 α 3 loop 上の Met40 の側鎖のプロトンがカテコール骨格のベンゼン環と CH/ π 相互作用を形成していた。さらに、オピカポンの特色の一つである側鎖部位であるジアゾール環部分は α 2 α 3 loop, β 5 α 9 loop に挟まれており、 α 2 α 3 loop 上の Trp38 の側鎖と β 5 α 9 loop 上の Pro174 の側鎖の間に CH/ π 相互作用を形成し、ピリジン環部分は α 2 α 3 loop 上の Trp38 の側鎖と、 β 6 β 7 loop 上の Leu198 と CH/ π 相互作用を形成し、Met201 とピリジン環部分の Cl と相互作用可能位置にあった (図4)。構造に違いがみられた触媒残基の Lys144 に着目すると COMT/SAM/Mg²⁺/オピカポン複合体において触媒残基の Lys144 は活性中心に向かい、触媒残基の Lys144 の ϵ -アミノ基は、Tyr147 のヒドロキシ基、オピカポンのニトロ基および水酸基、His142 の主鎖骨格のカルボニル酸素原子とも相互作用していた (図3)。一方で、COMT/SAH/Mg²⁺/オピカポン複合体において、Lys144 の ϵ -アミノ基はこのネットワークから外れ、側鎖はポケットの外側に向いており、活性中心に水分子 (Wat91) が ϵ -アミノ基の代わりに配位している。Wat91

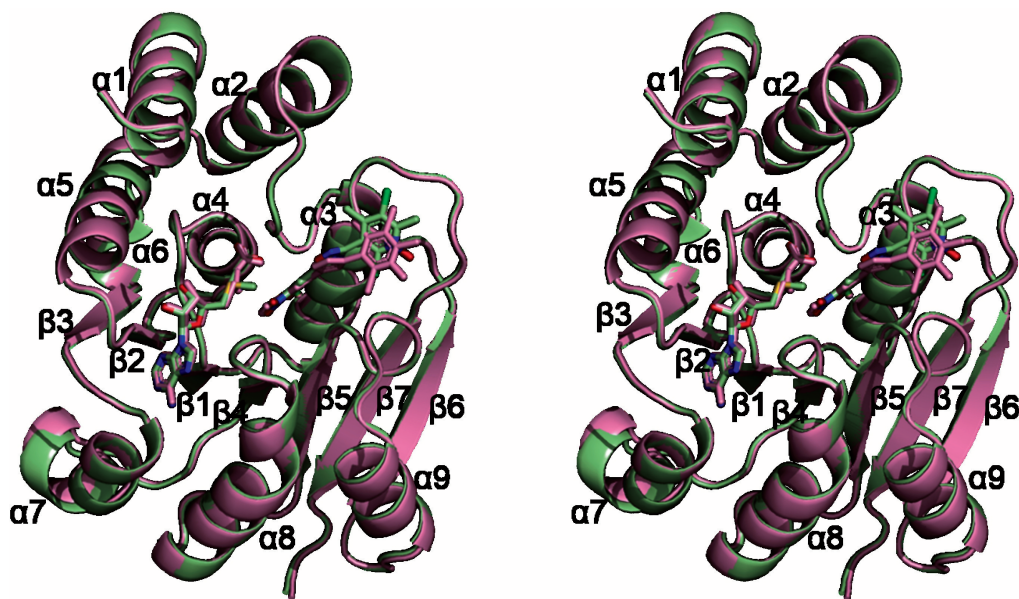


図2 COMT/SAM または SAH/Mg/1 複合体の全体構造
COMT/SAM/Mg/ オピカポン複合体 (緑) と COMT/SAH/Mg/ オピカポン複合体 (マゼンタ) の重ね合わせ図。ステレオグラム。

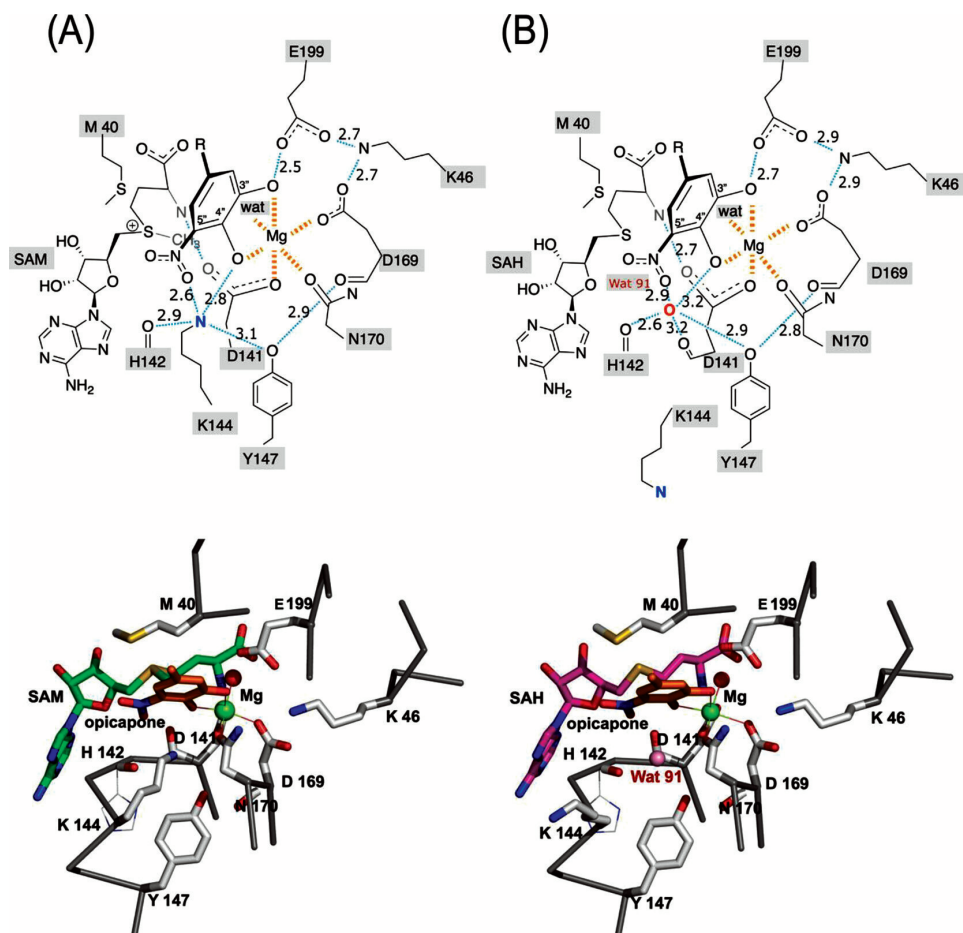


図3 COMT/SAM/Mg/1 複合体(A) および COMT/SAH/Mg/1 複合体(B)におけるカテコール結合部位近傍の模式図
上) 太い点線は座標結合を, 細い点線は水素結合の可能性を示す。下) カテコール結合部位のクローズアップ図。

は, COMT/SAM/Mg²⁺/ オピカポンにおいて, Lys144 と水素結合を形成していた側鎖の Tyr147, オピカポンのニトロ酸素原子および His142 の主鎖骨格のカルボニル酸素原子と水素結合形成可能距離に存在している (図3)。このように, オピカポンはCOMT/SAM/Mg²⁺ および COMT/SAH/Mg²⁺ の両方の結晶構造が得られた初めての化合物であり, このことはオピカポンが既報の薬剤とは異なり, COMT の酵素サイクルにおいて, メチル転移反応を阻害することのみならず, COMT/SAH 複合体にも結合し, 安定化できることを示している。すなわち, オピカポンが酵素サイクルの2つのプロセスにおいて, COMT を阻害できる可能性を強く示しており, オピカポンの複合体解離定数 (Kd = 0.19 pM) がトルカポンの複合体解離定数 (Kd = 14 pM) と比較しても緩徐であり, 長い作用時間をもたらしている要因の一つであると考えられた¹⁵⁻¹⁶⁾。両複合体を比較すると, Lys144 のコンフォメーションの違いに加え,

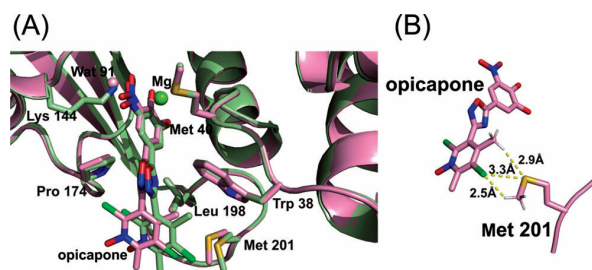


図4 COMT/SAM/Mg/ オピカポンおよび COMT/SAH/Mg/ オピカポン複合体における活性中心
(A)COMT/SAM/Mg/ オピカポン (緑) と COMT/SAH/Mg/ オピカポン (マゼンタ) 複合体の重ね合わせ。オピカポンの位置は異なっているが, β6β7 ループの骨格と側鎖のコンフォメーションは異なっていない。
(B)Met201 とオピカポンの相互作用のクローズアップ図。

オピカポンの位置が異なり, 3ニトロカテコール環の位置が COMT/SAH/Mg²⁺/ オピカポン複合体において, β4α8 loop 側に 0.4Å シフトしている。この3ニト

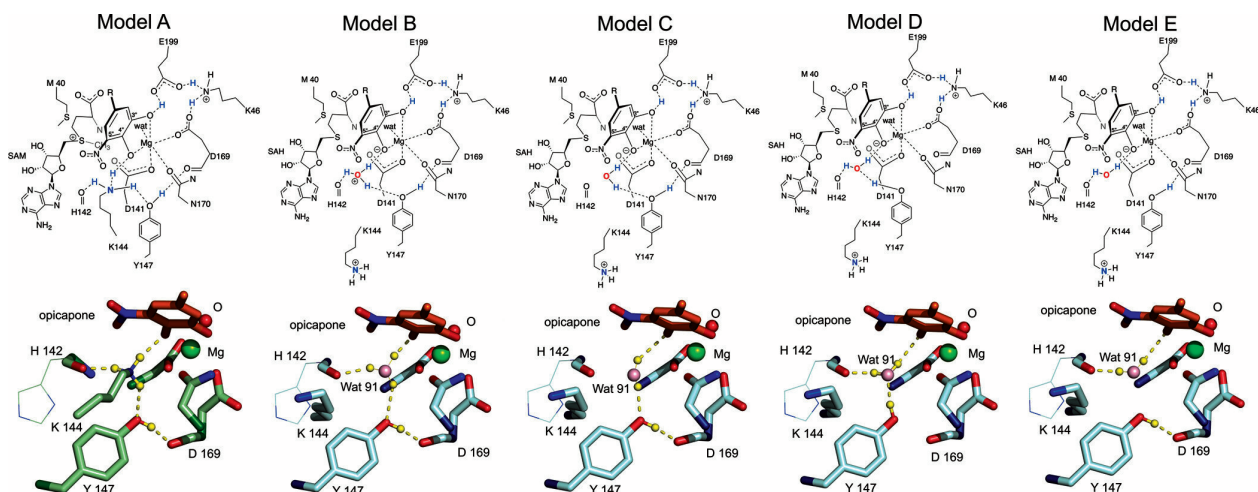


図5 COMT/SAM/Mg²⁺/ オピカポン(モデル A)と COMT/SAH/Mg²⁺/ オピカポン(モデル B, C, D, E)の分子モデルの構築
各パネルでは、相互作用ネットワークが2D(上)と3D(下)で示されている。水素原子は小さな黄色の球で示されている。
モデル A : Lys144 は、His142(C=O), Tyr 47(OH), オピカポンと3つの相互作用を形成する。モデル B : Wat91 をオキソニウムイオンとして扱い、His142(C=O), Tyr147(OH), オピカポンと3つの相互作用を形成する。モデル C, D, E : Wat91 は中性の水分子であり、それぞれ His142(C=O), Tyr147(OH), オピカポンと2つの相互作用を形成する。

ロカテコール環のシフトが、SAH 複合体のオピカポンのピリジン環が、SAM 複合体のオピカポンのピリジン環と比べると、 $\beta 4\alpha 8$ loop 側への1.3Åシフトしている。そこでFMO法を用いて、両複合体におけるオピカポンの位置のシフトに起因する相互作用の違いを明らかにするとともに、COMT/SAH/Mg²⁺/ オピカポンにおける活性中心における Wat91 の水分子を中心とした水素結合ネットワークの評価を行った。

3 モデル構築

COMT/SAM/Mg²⁺/ オピカポンおよび COMT/SAH/Mg²⁺/ オピカポン複合体に対して、活性中心で取得可能な水素結合を網羅的に考慮した5つのモデルを構築した。以下にモデルの詳細を示す(図5)。

モデル A (COMT/SAM/Mg²⁺/ オピカポン) : Lys144 のε-アミノ基はアンモニウムイオン(正電荷)であり、オピカポンの4'-ヒドロキシ基は脱プロトン(負電荷)であると仮定した¹²⁾。したがって、Lys144 は、His142 の骨格カルボニル基、Tyr147 の側鎖ヒドロキシ基、およびオピカポンの4位のヒドロキシ基と3つの相互作用をするように配置した(図5A)。

モデル B, C, D, E (COMT/SAH/Mg²⁺/ オピカポン) : COMT/SAH/Mg²⁺/ オピカポン複合体構造を基に作成した。活性中心に見られる Wat91 の酸素原子の原子座標は結晶構造の位置に固定した。モデル B では、

Wat91 をオキソニウムイオンとして扱い、SAM 複合体の Lys144 のアンモニウムイオンを模倣する形で、His142 (C=O), Tyr147 (OH), オピカポンとの3つの相互作用を仮定した。モデル C, D, E では、Wat91 は中性の水分子として扱った(図5 B, C, D, E)。これらのモデルを用いて二次Møller-Plesset摂動法(MP2)および基底関数として6-31G*を用いてFMO計算を実行したところ、モデル B の計算は収束しなかった^{11,17)}。そのため、モデル B は以降の解析から除外し、以下の考察はモデル A, C, D, E を用いて行い、Inter-Fragment Interaction Energy (IFIE)・Pair Interaction Energy Decomposition Analysis (PIEDA)・全エネルギーを用いて行った¹⁸⁾。

ESは静電相互作用項、EXは交換反発項、CT+mixは電荷移動項、DIは分散相互作用項を表し、IFIEはこれら4つのPIEDA項のエネルギーの和である。

4 COMT/SAH/Mg/1モデルの水素結合ネットワークの特性評価

水素結合ネットワークのみが異なる COMT/SAH/Mg²⁺/ オピカポン複合体のモデルであるモデル C, D, E に対して、IFIE_(Wat91), PIEDA_(Wat91) およびモデルの全エネルギーの比較を行い、水素結合ネットワークの検証を行った(図6)。IFIE_(Wat91) の値より、Asp141, His142, オピカポンは C, D, E 全てのモデルの中で常

に Wat91 の安定化に寄与していた。Tyr147 に着目すると $IFIE_{(Wat91)}$ は C と D のモデルにおいて安定性への寄与を示しており、 $PIEDA_{(Wat91)}$ に着目すると、Tyr147 の静電相互作用を表す ES 項と電荷移動相互作用エネルギーを表す CT+mix 項の合計が、モデル C では -8.3 kcal/mol、モデル D では -11.4 kcal/mol、モデル E では 1.3 kcal/mol であり、このことはモデル C と D における Tyr147 と Wat91 間の水素結合を反映している。Wat91 に対する全部フラグメントからの相互作用を示す $IFIE_{(Wat91)}$ の総和は、モデル C で -53.0 kcal/mol、モデル D で -51.1 kcal/mol、モデル E で -41.5 kcal/mol であった。さらに、それぞれのモデルの全エネルギーの合計を比較すると、モデル C はモデル D より -10.04 kcal/mol 安定で、モデル D はモデル E より -5.65 kcal/mol 安定である。即ち、モデル C > D > E の順に $IFIE_{(Wat91)}$ および、Total Energy が安定である。各モデル間に大きなエネルギーの差が見られなかったことから、全てのモデルを Wat91 は取り得ることを示し

ているがモデルの存在確率は C, D, E の順であることを示している。

5 両複合体におけるオピカポンにおける結合ポケット近傍での相互作用

SAM 複合体 (モデル A) と SAH 複合体 (モデル C, D, E) の $IFIE_{(opicapone)}$ と $PIEDA_{(opicapone)}$ の値を比較すると、SAM 複合体において、Met40 はオピカポンに対してわずかに不利な相互作用を示し、Lys144 はオピカポンに対して安定な強い相互作用を示した (図7)。この相互作用の主成分は静電相互作用である ES 項が占めており、SAM の正電荷による影響であると考えられる。COMT/SAM/Mg²⁺/オピカポンの Lys144 と COMT/SAH/Mg²⁺/オピカポンの Wat91 は電荷の違いが ES 項に反映されて大きく異なるが、電荷移動相互作用である CT + mix、分散エネルギー相互作用 DI 項はモデル間で同等である。すなわち、Wat91 は電荷移動相互作用と分散エネルギー相互作用の観点から触媒残基である Lys144 に入れ替わり、COMT の活性中心を安定化に寄与している可能性がある。さらに、オピカポンの側鎖と COMT の相互作用は、両複合体の $IFIE_{(opicapone)}$

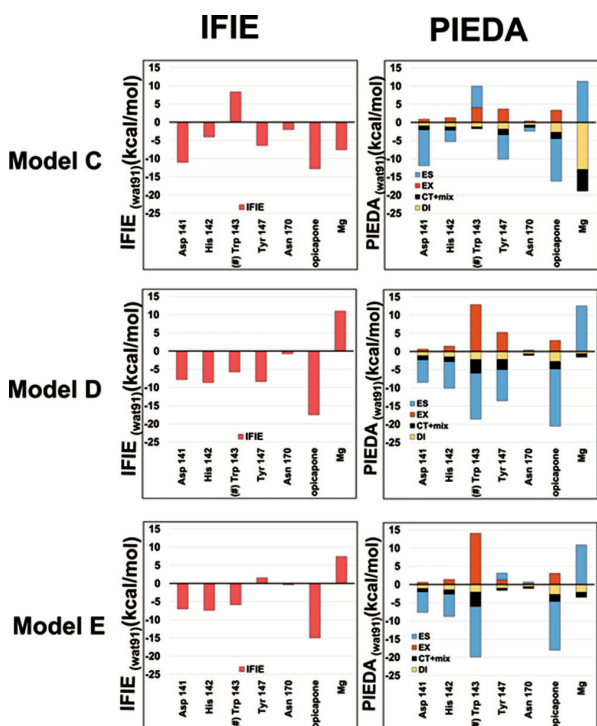


図6 COMT/SAH/Mg²⁺/オピカポン複合体(モデルC, D, E)における Wat91 の相互作用

(#)His142 の骨格カルボニル基は Trp143 フラグメントの一部として含まれ、同様に Asp141 の骨格カルボニル基は His142 フラグメントの一部として含まれる。

ES は静電項、EX は交換反発項、CT+mix は高次混合項を持つ電荷移動項、DI は分散相互作用項である。IFIE はこれら4つの PIEDA 項のエネルギーの和である。

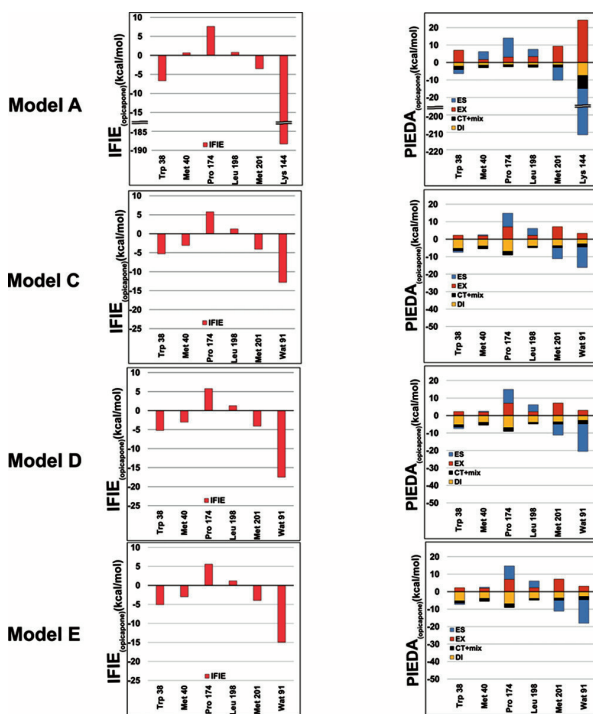


図7 COMT/SAM/Mg²⁺/オピカポン複合体 (モデルA) および COMT/SAH/Mg²⁺/オピカポン複合体(モデルC, D, E)におけるオピカポンの相互作用

および PIEDA_(opicapone) に着目すると, IFIE_(opicapone) が異なり, Trp38 と Pro174 が安定化に与える影響に差が生じており, その差は PIEDA_(opicapone) より Trp38 と Pro174 の分散エネルギー相互作用 (DI 項) の寄与が大きく, 構造で見られたオピカポンのシフトを反映している。さらに, Leu198 とオピカポンの相互作用は, PIEDA_(opicapone) の結果において, SAM および SAH 複合体のどちらでも DI 項が安定に寄与していた。Met201 は, IFIE_(opicapone) の結果から, いずれの複合体においても安定に寄与することが明らかになり, さらに PIEDA_(opicapone) の結果から, ES との DI 相互作用が安定に寄与していることが明らかになった。これは, Met201 の ϵ -メチル基と δ -硫黄原子は, オキシドピリジン環の 4-メチル基と 5-塩素原子と原子間距離が近接しているためであり, S-Halogen 相互作用を反映していると考えられる (図 3B)。Met201 はヒト COMT で Arg201 に変異しており, ヒト COMT ではラット COMT の Met201 の硫黄とオピカポンの塩素の間で形成される S-Halogen 相互作用に変わり, ヒト COMT では Arg201 の窒素とオピカポンの塩素の間で形成される N-Halogen 相互作用が生じている可能性が高い。

6 おわりに

今回得られた知見より, オピカポンは COMT/SAM/ Mg^{2+} および COMT/SAH/ Mg^{2+} と複合体を形成し, 両方の状態で安定であることから, COMT の酵素サイクルを長時間阻害でき, 作用時間が長い一因と考えられた。結晶構造解析と FMO 計算から COMT のメチル転移反応メカニズムは, 触媒残基である Lys144 が基質であるカテコールに対して, SAM のメチル基を転移させ, 転移反応後, Lys144 が活性中心から離れ, 代わりに水分子が Lys144 に置き換わるように配位することで, 活性中心を安定化させていることで進行することが示唆された。相互作用解析から, COMT の薬剤設計において, 化合物と $\alpha 2\alpha 3$ loop, $\beta 5\alpha 9$ loop, $\beta 6\beta 7$ loop 上の残基と相互作用重要であり, オピカポンは, これらの残基と相互作用を形成可能なことで結合解離定数が長くなると考えられる。このように, X 線結晶構造解析と量子化学計算を組み合わせることで, 酵素反応のメカニズムや薬剤の作用機序の詳細な解明が可能になり, これらの情報は, 立体構造情報を基にした新規薬剤設計 (SBDD: Structure-Based Drug Design) において重要な知見となりうる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり, 様々なアドバイスやご協力をいただきました。大阪大学大学院歯学研究科顎口腔腫瘍外科学講座 鶴澤成一教授, 日本大学薬学部薬学研究所 上席研究員 飯島洋先生, 大阪大学蛋白質研究所 鈴木守准教授, 日本大学松戸歯学部生物学教室 桑田(楠瀬)隆生准教授, 大阪大学大学院薬学研究科量子生命情報薬学分野 福澤薫教授, 星薬科大学 白井智子様に感謝の意を表したいと思います。

Fig2-7 は Takebe K, Suzuki M, Kuwada-Kusunose T, Shirai S, Fukuzawa K, Takamiya T, Uzawa N, Iijima H. Structural and Computational Analyses of the Unique Interactions of Opicapone in the Binding Pocket of Catechol O-Methyltransferase: A Crystallographic Study and Fragment Molecular Orbital Analyses. *J Chem Inf Model*. 2023 Jul 24; 63(14): 4468-4476. の許可を得て転載。Copyright © 2023 American Chemical Society

引 用

- 1) Korczyn, A. D., Hassin-Baer, S. (2015): Can the disease course in Parkinson's disease be slowed?. *BMC Med.* **13**, 295.
- 2) Nutt, J. G.; Fellman, J. H. (1984): Pharmacokinetics of levodopa. *Clin. Neuropharmacol.* **7**, 35-49.
- 3) Eggert K., Skogar Ö., Amar K., Luotonen L., Kuoppamäki M., Leinonen M., Nissinen H., Oertel W. (2010): Direct switch from levodopa/benserazide or levodopa/carbidopa to levodopa/carbidopa/entacapone in Parkinson's disease patients with wearing-off: efficacy, safety and feasibility—an open-label, 6-week study. *J. Neural Transm.* **117**, 333-342.
- 4) Fabbri, M., Ferreira, J. J., Lees, A., Stocchi, F., Poewe, W., Tolosa, E., Rascol, O. (2018) Opicapone for the treatment of Parkinson's disease: A review of a new licensed medicine. *Mov. Disord.* **33**, 1528-1539.
- 5) Rinne, U. K., Larsen, J. P., Siden, A., Worm-Petersen, J. (1998) Entacapone enhances the response to levodopa in parkinsonian patients with motor fluctuations. Nomecomt Study Group. *Neurology*. **51**, 1309-1314.
- 6) Zurcher, G., Keller, H. H., Kettler, R., Borgulya, J., Bonetti, E. P., Eigenmann, R., Da Prada, M. (1990) Ro 40-7592, a novel, very potent, and orally active inhibitor of catechol-O-methyltransferase: a pharmacological study in rats. *Adv. Neurol.* **53**, 497-503.
- 7) 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**, 4202-10.

- 8) Waters, C. H., Kurth, M., Bailey, P., Shulman, L. M., LeWitt, P., Dorfänger, E., Deptula, D., Pedder, S. (1997) Tolcapone in stable Parkinson's disease: efficacy and safety of long-term treatment. The Tolcapone Stable Study Group. *Neurology*. **49**, 665-671.
- 9) Borges, N. (2005) Tolcapone in Parkinson's disease: liver toxicity and clinical efficacy. *Expert Opin Drug Saf.* **4**, 69-73.
- 10) Rocha, J. F., Almeida, L., Falcão, A., Palma, P. N., Loureiro, A. I., Pinto, R., Bonifácio, M. J., Wright, L. C., Nunes, T., Soares-da-Silva, P. (2013) Opicapone: a short lived and very long acting novel catechol-O-methyltransferase inhibitor following multiple dose administration in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **76**, 763-775.
- 11) Mochizuki, Y.; Tanaka, S.; Fukuzawa, K. (2021): *Recent Advances of the Fragment Molecular Orbital Method*; Springer: Singapore.
- 12) Vidgren, J., Svensson, L. A., Liljas, A. (1994) Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* **368**, 354-358.
- 13) Palma, P. N., Rodrigues, M. L., Archer, M., Bonifácio, M. J., 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.
- 14) Czarnota, S., Johannissen, L. O., Baxter, N. J., Rummel, F., Wilson, A. L., Cliff, M. J., Levy, C. W., Scrutton, N. S., Waltho, J. P., Hay, S. (2019) Equatorial Active Site Compaction and Electrostatic Reorganization in Catechol-O-methyltransferase. *ACS Catal.* **9**, 4394-4401.
- 15) András, Salamon., Dénes, Zádori., László, Szpisjak., Péter, Klivényi., László, Vécsei. Opicapone for the treatment of Parkinson's disease: an update. (2019) *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. **20**, 2201-2207.
- 16) Palma, P. N., Bonifácio, M. J., Loureiro, A. I., Soares-da-Silva, P. (2012) Computation of the binding affinities of catechol-O-methyltransferase inhibitors: multisubstrate relative free energy calculations. *J Comput Chem.* **33**, 970-986.
- 17) Mochizuki, Y., Nakano, T., Koikegami, S., Tanimori, S., Abe, Y., Nagashima, U., Kitaura, K. A parallelized integral-direct second-order Møller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme. (2004) *Theor. Chem. Acc.* **112**, 442-452.
- 18) Fedorov, D. G., Kitaura, K. (2007) Pair interaction energy decomposition analysis. *J. Comput. Chem.* **28**, 222-237.