

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14719

研究課題名(和文) エクジステロイド生合成に関わる新規酵素に着目した昆虫発育制御剤スクリーニング戦略

研究課題名(英文) Screen of insect growth regulators that inhibit the novel ecdysteroidogenic enzyme

研究代表者

丹羽 隆介 (NIWA, Ryusuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60507945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規昆虫発育制御剤の発見を目指して、昆虫エクジステロイド生合成酵素 Noppera-boに対する阻害化合物の探索と作用機序の研究を実施した。Noppera-boの活性阻害剤を迅速にアッセイできる独自のハイスループットスクリーニング系を用いて、約1万種類の化合物ライブラリーから、 β -エストラジオールを含む複数の阻害化合物を同定した。X線結晶構造解析と生化学的解析から、 β -エストラジオールの阻害効果の発揮には、Noppera-boとの水素結合を介した相互作用が重要であることも示した。一連の成果は、将来的なエクジステロイド生合成阻害剤のデザインに重要な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify novel insect growth regulators that inhibit the enzymatic activity of Noppera-bo, a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis. We utilized our own high-throughput chemical screen system and identified several candidate compounds, including β -estradiol. X-ray crystallographic and biochemical analyses revealed that the inhibitory effect of β -estradiol requires a specific hydrogen bond interaction between β -estradiol and Noppera-bo. Our results provide a novel insight into a design principle for developing practical insect growth regulators impairing ecdysteroid biosynthesis in the future.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：農業 昆虫 酵素 エクジステロイド グルタチオンS-転移酵素

1. 研究開始当初の背景

これまでの先人たちの努力によって、環境にもヒトにも優しい農薬が数多く開発され、世界の食料増産に大きく貢献してきた。しかし、大量にかつ単一的に利用される農薬に対して害虫はしばしば強力な抵抗性を獲得する。よって、優れた新規農薬を継続的に開発して適切に利用することは、害虫管理の観点から社会的に重要な課題である。

害虫に対する高い殺傷能・成長阻害能を示しつつも、昆虫以外の生物に対して副作用がない薬剤の開発方法として、昆虫特有の生命現象を攪乱する「昆虫発育制御剤 (IGR)」の探索がある。そして、昆虫の脱皮および変態の誘導を司る昆虫ステロイドホルモン「エクジステロイド」の生合成過程を攪乱する薬剤を開発できれば、優れた IGR となる可能性が古くから指摘されている [1]。エクジステロイド生合成過程に関わる酵素の実体は、申請者を含む複数のグループによって、過去 12 年間で飛躍的に解明が進んだ [2]。これまでに同定されたエクジステロイド生合成酵素のほとんどは、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼに属する。これを受けて、「エクジステロイド生合成 P450 をターゲットにした阻害剤発掘による新しい IGR 探索」というアイデアが生まれ、ミネソタ大学の Michael B. O'Connor 博士らによる米国特許の取得、また東京大学の片岡宏誌博士らによる農研機構の昆虫発育制御剤探索研究の実施 [3] へと繋がった。

しかし、エクジステロイド生合成 P450 タンパク質の精製と可溶化は困難であり、従来のスクリーニングはコストのかかる培養細胞発現系に依存している。また、エクジステロイド生合成 P450 の活性はクロマトグラフィと質量分析によって検出する必要があり、千〜万単位の化合物を対象とした迅速なスクリーニングは実現されていない。これらの事実から、エクジステロイド生合成を攪乱する IGR 探索には、P450 を標的とする発想からの転換が必要であった。

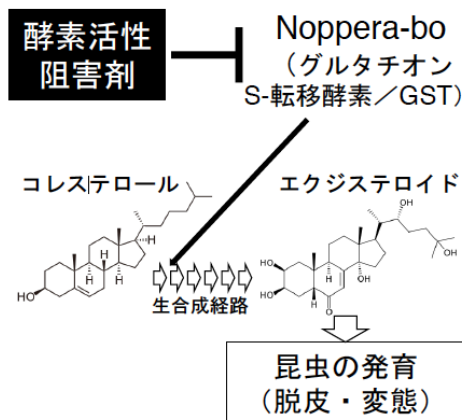


図 1：本研究で同定を目指す酵素活性阻害剤の模式図

2. 研究の目的

本研究は、P450 とは異なる新規エクジステロイド生合成関連酵素 Noppera-bo [4][5] に注目し、Noppera-bo 酵素活性を阻害する薬剤を探索し、エクジステロイド生合成を阻害する新しい IGR のシーズを発掘し、その阻害効果の機序を解明することを目的とした (図 1) (主な発表論文・雑誌論文 2)。

3. 研究の方法

(1) 阻害化合物のスクリーニング

Noppera-bo はグルタチオン S-転移酵素 (GST) ファミリーに属する。申請者らはすでに、大腸菌から調製・精製した Noppera-bo 組換えタンパク質と GST 活性検出蛍光プローブ 3,4-DNADCF を用いたハイスループットスクリーニング系の構築に成功していた [6]。この系を用いることで、従来のエクジステロイド生合成 P450 に着目した際の問題点を完全に解決し、数万種類の化合物ライブラリーを数日のうちにアッセイできる。本研究では、東京大学創薬機構の保有する 9,600 化合物コアライブラリーをスクリーニングの対象として、Nobo の GST 活性を阻害する化合物を探索した。Noppera-bo タンパク質としては、キイロショウジョウバエ由来、ハマダラカ由来、そしてコナガ由来のものをそれぞれ利用した。

(2) キイロショウジョウバエ Noppera-bo タンパク質の結晶化とソーキング実験、および X 線結晶構造解析

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所のご助力を得て、キイロショウジョウバエ Noppera-bo タンパク質の結晶化条件を定めた。

Noppera-bo 阻害化合物の作用機序を理解するために、得られたショウジョウバエ Noppera-bo 結晶を阻害化合物溶液に漬け込み、阻害化合物を Noppera-bo 結晶中に入りこませた (ソーキング法)。そして、このソーキングした結晶に対して X 線ビームを照射し、回折像から Noppera-bo と阻害化合物の複合体の結晶構造解析を行った。一連の実験と解析では、高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所のご助力を得た。

(3) 同定された化合物がショウジョウバエ発育に及ぼす影響の検討

Noppera-bo 阻害化合物を餌中に様々な濃度で添加し、この餌中で飼育したショウジョウバエ幼虫やネッタシマカ幼虫、コナガ幼虫に脱皮や変態の異常が認められるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 阻害化合物の同定

キイロショウジョウバエ、ハマダラカ、そ

してコナガにコードされた Noppera-bo の大腸菌組換えタンパク質の酵素活性を阻害する低分子化合物を探索し、この3種の Noppera-bo すべてに対して有意な阻害活性を示す化合物を計 12 種類同定した。

得られた化合物の1つは、哺乳類の女性ホルモンである 8-エストラジオール (EST) であった。

(2) Noppera-bo 阻害化合物の阻害様式の追究

Noppera-bo と阻害化合物との相互作用様式を X 線結晶構造解析によって追究した。その結果、複合体結晶が得られた 8 種類の化合物のすべてが、Noppera-bo タンパク質の予想基質結合ポケットに存在することが明らかになった。この結果から、今回同定された化合物の多くが、本来の内在性基質の入り込むポケットへと存在することで阻害することが示唆された。

本研究では、阻害化合物の代表例として EST に特に着目し、EST と相互作用する Noppera-bo アミノ酸残基を特定した。EST 周辺に存在する Noppera-bo のアミノ酸残基のうち、あるアスパラギン酸と EST が水素結合を形成していることが明らかとなった。このアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型 Noppera-bo タンパク質を大腸菌にて調製して、酵素学的な実験を行った。その結果、このアスパラギン酸残基は EST と水素結合を形成し安定性に寄与すること、アラニン変異型 Nobo タンパク質に対して EST の阻害効果は著しく下がること、そして表面プラズモン共鳴法を用いた相互作用解析によれば変異分子の EST に対する解離定数が大幅に上昇することを示した。これらの結果は、Noppera-bo のこのアスパラギン酸残基と形成する化合物の水素結合が、Nobo の酵素活性を阻害するのに重要であることを示唆する。一連の結果をまとめた論文を現在投稿準備中である。

(3) 昆虫への阻害効果の検討

同定した Noppera-bo 阻害化合物を餌中に混和し、ショウジョウバエやネッタシカマ、そしてコナガの幼虫を飼育した際の、これらの昆虫の発育阻害を検討した。このうち、1つの化合物がネッタシカマの幼虫発育を阻害することが示唆された。しかしながら、当初データベースにて開示されている構造の化合物そのものの純度を高めた溶液では、発育阻害効果が認められなくなった。逆に、観察されていた発育阻害効果は、当初用いていた溶液に含まれていた別の夾雑物によるものであることが判明した。

この夾雑物の化学構造を同定するための実験を行ったが、残念ながら完了には至らなかった。

なお、EST を混和した餌を用いた場合、0.5%~1%の濃度でショウジョウバエ蛹化の遅れを予備的に観察したが、今後さらなる追

認が必要である。

(4) 考察

本研究によって、Noppera-bo を阻害する化合物が実際に同定され、しかもその阻害様式に重要な Noppera-bo のアミノ酸残基を特定することに成功した。一連の成果は、今後のエクジステロイド生成阻害剤のデザインに重要な知見を与えるものである。一方で、本研究そのものからは、実際に昆虫発育を低濃度で阻害する化合物の特定には至らなかった。今後、今回同定された化合物を参考にした類縁化合物の探索によって、より活性の高い化合物の探索が必要である。

また残された課題として、Noppera-bo が実際の生体内で何を基質としているのかの解明がある。今回得られた化合物の構造情報は、内在性基質探索にもヒントを与えるものと期待される。

(5) 補遺

GST は基質にグルタチオンと呼ばれるトリペプチドを抱合させる酵素である。本研究の過程で、エクジステロイド生成の過程にグルタチオンが必要とされるのかが重要な疑問として浮上した。そこで、グルタチオンの生成に関わる酵素 GCLc のノックアウトショウジョウバエの作出を実施し、表現型解析を行った。その結果、GCLc 欠損ショウジョウバエは幼虫致死を示すこと、さらに期待どおり、致死性の一旦はエクジソン生成不全であることを明らかにした。本成果は原著論文として公表した (主な発表論文・雑誌論文 1)。

[1] 丹羽&梅井, *日本農薬学会誌* 37:377-380, 2012

[2] Niwa & Niwa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:1283-1292, 2014

[3]http://www.naro.affrc.go.jp/brain/inv_up/epf_report/2013/057905.html

[4] Enya et al. *Sci. Rep.* 4:6586, 2014.

[5] Enya et al. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 61:1-7, 2015.

[6] Fujikawa et al. *Chem. Comm.* 51:11459-11462, 2015.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

①Sora Enya, Chikana Yamamoto, Hajime Mizuno, Tsuyoshi Esaki, Hsin-Kuang Lin, Masatoshi Iga, Kana Morohashi, Yota Hirano, Hiroshi Kataoka, Tsutomu Masujima, Yuko Shimada-Niwa, Ryusuke Niwa, Dual Roles of Glutathione in Ecdysone Biosynthesis and Antioxidant Function During the Larval Development in *Drosophila*, *Genetics*, 査読有、207 巻、

2017, 1519-1532. DOI:10.1534/genetics.117.300391

②丹羽隆介、昆虫ステロイドホルモン生合成にかかわる酵素群と昆虫成長制御剤の開発、化学と生物、査読有、54巻、2016、508-513 DOI:10.1271/kagakutoseibutsu.54.508

〔学会発表〕(計 17 件)

①丹羽隆介、昆虫ホルモン生合成調節のケミカルバイオロジー、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

②稲葉和恵、小祝孝太郎、諸橋香奈、塩谷天、荒井怜奈、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、井上英史、藤川雄太、湯本史明、千田俊哉、丹羽隆介、昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo と阻害化合物の生化学的・構造生物学的解析：新規農薬開発に向けて、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

③稲葉和恵、荒井怜奈、小祝孝太郎、諸橋香奈、塩谷天、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、井上英史、藤川雄太、湯本史明、千田俊哉、丹羽隆介、昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo の生化学的・構造生物学的解析に基づく創農薬への展開、日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会、2017 年

④丹羽隆介、昆虫の発育を制御する環境にやさしい農薬の研究開発、公益財団法人科学技術交流財団 研究交流クラブ第 183 回定例会、2017 年

⑤Reina Arai, Kazue Inaba, Kotaro Koiwai, Kana Morohashi, Sora Enya, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, Hideshi Inoue, Yuuta Fujikawa, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Ryusuke Niwa, X-ray crystallographic analysis of the ecdysteroidogenic glutathione S-transferase Noppera-bo and the complex with its inhibitor compounds, The 3rd International Insect Hormone (21st Ecdysone) Workshop, 2017 年

⑥稲葉和恵、小祝孝太郎、諸橋香奈、塩谷天、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、井上英史、藤川雄太、湯本史明、千田俊哉、丹羽隆介、エクジステロイド生合成制御因子 Noppera-bo の生化学的・構造生物学的解析、第 61 回日本応用動物昆虫学会、2017 年

⑦稲葉和恵、小祝孝太郎、諸橋香奈、塩谷天、井上英史、藤川雄太、湯本史明、千田俊哉、丹羽隆介、昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo の X 線結晶構造解析：活性阻害剤との相互作用と創農薬への知見、日本農芸化学会 2017 年度京都大会、2017 年

⑧小祝孝太郎、山田悠介、諸橋香奈、稲葉和恵、湯本史明、丹羽隆介、千田俊哉、X 線結晶構造解析を用いた創薬スクリーニングのための自動精密化および評価プログラムの開発、2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ、2017 年

⑨稲葉和恵、小祝孝太郎、諸橋香奈、塩谷天、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、井上英史、藤川雄太、湯本史明、千田俊哉、丹羽隆介、昆虫グルタチオン S-転移酵素 Noppera-bo と阻害化合物の構造生物学的解析、2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ、2017 年

⑩稲葉和恵、諸橋香奈、小祝孝太郎、塩谷天、井上英史、藤川雄太、湯本史明、千田俊哉、丹羽隆介、昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo の構造生物学的解析、平成 28 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会、2016 年

⑪丹羽隆介、創農薬を目指した昆虫グルタチオン S-転移酵素 Noppera-bo に対する阻害剤スクリーニング、平成 28 年度内外環境応答・代謝酵素研究会、2016 年

⑫Kazue Inaba, Kana Morohashi, Kotaro Koiwai, Sora Enya, Hideshi Inoue, Yuuta Fujikawa, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Ryusuke Niwa, Discovery of chemical inhibitors for the insect steroidogenic enzyme Noppera-bo, The 12th Japanese Drosophila Research Conference (JDRC12), 2016 年

⑬丹羽隆介、Noppera-bo のケミカルバイオロジー ～大規模化合物ライブラリーを活用した 昆虫ステロイドホルモン生合成研究の試み～、第 264 回発生研セミナー、2016 年

⑭Kana Morohashi Kana, Asami Ogura, Yota Hirano, Sora Enya, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, Hideshi Inoue, Yuuta Fujikawa, Ryusuke Niwa, 昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo に対する阻害剤のハイスループットスクリーニング、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年

⑮丹羽隆介、脱皮ホルモン生合成のケミカルバイオロジー (の試み)、平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第 85 回大会)、2015 年

⑯丹羽隆介、昆虫変態の研究は創農薬の夢を見るか?、日本動物学会第 86 回新潟大会、2015 年

⑰丹羽隆介、大規模化合物スクリーニングから見える同一オーソログ分子間の多様性、国立遺伝学研究所研究集会：「ビッグデータ時代の分子進化」、2015年

〔その他〕

ホームページ

<https://sites.google.com/site/niwashimadalab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 隆介 (NIWA, Ryusuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60507945

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし