

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0172

研究課題名（和文）タンパク質構造情報を礎とした昆虫成長阻害剤の創製（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Creation of insect growth inhibitor based on protein structure(Fostering Joint International Research)

研究代表者

山本 幸治 (Yamamoto, Koji)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：00346834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,900,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：カイコのプロスタグランジンE合成酵素（bmPGES）ならびに新しくPG合成酵素の候補として同定したカイコのアルドケト還元酵素（AKR6）の基質結合部位を構造的に解析する。Sitting-drop vapor diffusion 法により結晶化を行なったところ、bmPGES 基質複合体そしてAKR6 NADPH複合体結晶を得た。日本、米国、韓国の放射光施設にて回折データを収集した。部位特異的アミノ酸置換法によりbmPGES分子中のTyr8、Ser17、Ser101、Glu123が活性に重要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、日本（九州大学）、米国カリフォルニア大学デービス校のWilson博士、韓国慶北大学のLuccio博士と進めた国際共同研究である。アルドケト還元酵素（AKR）について多くの成果が蓄積されている両研究室を訪問し、AKR6の基質について発見できた。また、日本、米国、韓国の各放射光施設を利用し連携することで、昆虫由来プロスタグランジン合成酵素群のX線結晶構造の解析を促進し精密化を進めることができた。

研究成果の概要（英文）：We studied on a prostaglandin E synthase (bmPGES) in the silkworm *Bombyx mori* that involves in the isomerization of PGH<sub>2</sub> to PGE<sub>2</sub>. Also, we identified an aldo-keto reductase 6 (AKR6), new prostaglandin synthase in *B. mori*. The present study aimed to analyze substrate-binding site in bmPGES and AKR6. Each protein was purified, concentrated to 10 mg/mL in 20mM Tris-HCl, pH8, 0.2M NaCl, and crystallized by sitting-drop vapor diffusion. Results showed we obtained some crystals for both protein, although we were unable to get enough diffraction data. Site-directed mutagenesis experiments revealed that we found amino acid residues regarding to catalysis in bmPGES as well as AKR6. Therefore, this study may provide insights into the physiological role of both proteins in silkworms.

研究分野：生物有機化学

キーワード：プロスタグランジン

様式 F - 19 - 2

#### 1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン (PG) は不飽和脂肪酸より合成され、その化学構造をもとに A から J 群に分類される。哺乳類の PG に比べて、昆虫における PG の役割はよくわかっていない。本研究では、鱗翅目昆虫のモデルであるカイコよりプロスタグランジン E 合成酵素 (*Bombyx mori* prostaglandin E synthase: bmPGES) を発見し、その機能解析を進めている。研究代表者はすでに bmPGES の基質特異性、組織局在性そして X 線結晶構造解析を明らかにしている。

#### 2. 研究の目的

本研究課題では、bmPGES と基質との複合体結晶を作製し、基質結合部位の構造学的解析を集中的に発展させる。また、新しい PG 合成酵素の候補として同定していたカイコ由来のアルドケト還元酵素 (AKR6) についても標的とし研究を進める。具体的には、

- (1) bmPGES と基質複合体の結晶化ならびに X 線結晶構造解析
- (2) AKR6 の基質特異性
- (3) AKR6 の X 線結晶構造解析

について調査することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

##### (1) bmPGES と基質複合体の結晶化ならびに X 線結晶構造解析

すでに確立している apo - bmPGES ならびにグルタチオン - bmPGES 複合体結晶化条件を参考にし、基質-bmPGES 複合体結晶化条件を探索し、結晶を調製する。bmPGES は、最終濃度 10mg/mL に精製した酵素 (20mM Tris-HCl, pH8, 0.2M NaCl) を用いて、sitting-drop vapor diffusion 法により 20 度で結晶化を行なった。回折データの収集は SPring8 そしてアメリカ合衆国スタンフォードシンクロトロン放射光施設を用いた。結晶化に関連する実験は、研究代表者の所属施設ならびにアメリカ合衆国カリフォルニア大学デービス校分子細胞生物学部の David K. Wilson 教授の研究室にて実施した。

##### (2) AKR6 の基質特異性

基質特異性をはじめとする AKR6 の酵素化学的性質の調査は、研究代表者の所属施設ならびに大韓民国慶北大学遺伝子工学部 Eric Di Luccio 准教授の研究室にて実施した。

##### (3) AKR6 の X 線結晶構造解析

アポ AKR6 ならびに AKR6 - NADPH 複合体結晶の作製を試みた。最終濃度 10mg/mL に調製した精製 AKR6 (20mM Tris-HCl, pH8, 0.2M NaCl) を用いて、sitting-drop vapor diffusion 法により 20 度において結晶化を行なった。結晶化に関連する実験は、研究代表者の所属施設ならびに Eric Di Luccio 准教授の研究室にて実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) bmPGES と基質複合体の結晶化ならびに X 線結晶構造解析

いくつかの結晶化条件を試した結果、基質 - bmPGES 複合体結晶を得ることに成功した。アメリカ合衆国スタンフォードシンクロトロン放射光施設において、回折データを収集した。引き続き、David K. Wilson 教授研究室と bmPGES 基質結合部位の構造学的解析を継続中である。

bmPGES の基質認識に関するアミノ酸残基については、部位特異的アミノ酸置換法により、基質結合 PGH ならびに補酵素グルタチオン結合に関与するアミノ酸残基を同定している。候補のアミノ酸残基を Ala に置換した。その結果、Tyr8、Ser17、Ser101、Glu123 を Ala に置換した変異体では GST 標準基質 1,2-ジクロロニトロベンゼンに対する活性の大幅な低下が見られた。また、基質プロスタグランジン H (PGH) からプロスタグランジン E (PGE) への変換は観察されなかった。以上の結果より、これらのアミノ酸残基は基質結合に必要な不可欠であることがわかった。

##### (2) AKR6 の基質特異性

Eric Di Luccio 准教授は、これまでに多数の哺乳由来 AKR の活性測定を行ってきている。そのため当該研究室には充実した AKR 活性測定系が準備されている。研究代表者は日本国内においてカイコ AKR6 のクローニング、配列決定、大腸菌を用いた発現系の構築そして精製系の確立をすでに終了している。精製した AKR6 ならびに発現用 plasmid DNA を Eric Di Luccio 准教授の研究室に郵送し、基質特異性について調査した。その結果、AKR6 は補酵素 NADPH 存在下において、DL - グリセルアルデヒド、グルコースそして 2-ノネナルに対する還元反応を触媒した。補酵素 NADH 存在下ではいずれの基質に対しても活性を示さなかった。

##### (3) AKR6 の X 線結晶構造解析

3.5 M Sodium formate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6 ならびに 2.0 M

Sodium formate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6 の条件下で複数の AKR6 - NADPH 複合体結晶を得た。これらの結晶を用いて日本国内の SPring8 ならびに韓国国内の浦項シンクロトン放射光施設においてデータ収集を行った。引き続き、AKR6 - 補酵素 NADPH の複合体結晶を解析し、NADPH 結合部位を解析する。あわせて、AKR6 - 基質 PGH の複合体結晶を作製し、AKR6 分子内の基質 PGH 結合部位について解析を続けていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto K, Haque M. R. , Saruta F.	4. 巻 88
2. 論文標題 Identification and expression analysis of the replication factor C protein in the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haque RM, Higashiura A, Nakagawa A, Hirowatari A, Furuya S, Yamamoto K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular structure of a 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from the silkworm <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 618-628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto K, Higashiura A, Hirowatari A, Yamada N, Tsubota T, Sezutsu H, Nakagawa A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterisation of a diazinon-metabolising glutathione S-transferase in the silkworm <i>Bombyx mori</i> by X-ray crystallography and genome editing analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 16835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cheng T., Wu J., Wu Y., Chilukuri R., Huang L., Yamamoto K., et al, Arunkumar A., Kishino H., Goldsmith M., Feng Q., Xia Q., and Mita K.	4. 巻 1
2. 論文標題 Wide distribution of a major East Asian noctuid pest explained by genomic adaptation to polyphagy and insecticides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 1747-1756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto K., Higashiura A., Suzuki M., Aritake K., Urade Y., Nakagawa A.	4. 巻 492
2. 論文標題 Molecular structure of a prostaglandin D synthase requiring glutathione from the brown plant hopper, <i>Nilaparavata lumen</i> s	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communication	6. 最初と最後の頁 166-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto K., Ozakiya Y., Uno T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Localization of an Aldo-Keto Reductase (AKR2E4) in the Silkworm Bomber mori (Lepidoptera: Bombycidae)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of insect science	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Haque MR, Nai N, Hirowatari A, Furuya S, and Yamamoto K.
2. 発表標題 Identification and characterization of the serine hydroxymethyl transferase from silkworm, <i>Bombyx mori</i>
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto K, Wilson DK.
2. 発表標題 Identification and characterization of a novel AKR from the silkworm, <i>Bombyx mori</i>
3. 学会等名 Carbonyl conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 広渡愛子・坪田拓也・宇野知秀・瀬筒秀樹・山本幸治
2. 発表標題 プロスタグランジンEのカイコ・コリオン遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 平成31年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡純治、山本幸治
2. 発表標題 カイコガオス生殖腺分泌物に含まれるSuperoxide dismutase (SOD) の存在
3. 学会等名 平成31年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ウイルソン デビット  (Wilson David)	カリフォルニア大学デービス校・分子細胞学部・教授	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ルチオ エリック ジ  (Luccio Eric di)	慶北大学・遺伝工学部・准教授	