

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 9月26日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603011

研究課題名（和文） 新規殺虫剤創製に向けた昆虫脱皮ホルモン受容体の
リガンド認識機構の解明研究課題名（英文） Ligand recognition mechanism of the ecdysone hormone receptor
for the molecular design of a new pesticide

研究代表者

多田 俊治（TADA TOSHIJI）

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：70275288

研究成果の概要（和文）：

昆虫は脱皮を繰り返すことにより成長する。本研究は、脱皮を制御する脱皮ホルモン受容体の作用機構を、その立体構造を通して解明しようというものである。まず、EcR/USP の2種の蛋白質から成る受容体の大腸菌を用いた共発現系を構築した。引き続き、X線回折法による立体構造の解明を行うため、受容体とホルモンとの複合体の結晶化を試み、微結晶を得るに至った。期間内に構造決定には至らなかったが、しかし、ホルモン非存在下で受容体の結晶化が可能であることを見出し、作用機構解明に途を拓くことができた。

研究成果の概要（英文）：

Insects grow by repeatedly molting. The aim of this work is to elucidate the molecular mechanism of the molting hormone receptor by analyzing its crystal structure. The receptor composed of two proteins, EcR and USP, was coexpressed in *E. coli*. Crystallization trials were performed using the purified receptor proteins in order to determine the three dimensional structure by X-ray crystallography. Small crystals were obtained, but the structure determination could not be achieved in a period due to difficulty of its crystal growth. However, it has been found that the receptor can be crystallized without the molting hormone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛋白質結晶学、構造生物化学、分子認識、昆虫、構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

(1) 標的蛋白質の構造に基づいた医薬分子設計（Structure-Based Drug Design: SBDD）が盛んに試みられるようになってきている。しかし、農薬への展開は全くなされていないのが現状である。一方、SBDDにおいて、阻害剤の研究は多くなされているが、活性作用剤で

あるアゴニストの研究事例はほとんどない。また、アゴニストの活性発現機構は生命機能の理解を進める上で極めて重要な研究対象であるが、構造生物化学的研究も進んでいない。

(2) 本課題申請者は、双翅目・キイロシヨウジョウバエの脱皮ホルモン受容体(Ecdysone

Receptor: EcR)リガンド結合ドメイン (EcR^L) および協同的に働く ultraspiracle リガンド結合ドメイン(USP^L)のヘテロダイマーのX線結晶構造解析による構造解明を目指して、発現系の構築および結晶化に取り組んでいた。その結果、結晶化に至る実験系が組めたものと判断し、本課題申請を行った。

(3) 農薬の分子設計では、Hansch-Fujita 法とも呼ばれる定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR) により展開されて来っており、成功事例も多い。脱皮ホルモン受容体に関しても、結合活性と様々な構造を持つアゴニスト分子間の構造活性相関研究が進んでいるが、さらなる展開のためには SBDD の適用が必要な状況になっていたことから、脱皮ホルモン受容体を対象としたアゴニスト活性に関する本研究を開始した。解析対象としては QSAR が広く展開されている双翅目・キイロショウジョウバエを選択した。また、これまでに鱗翅目および半翅目の構造報告がなされており、それらの構造との比較により詳細で興味深い議論の展開が可能であると判断した。

2. 研究の目的

(1) 脱皮ホルモン受容体を標的とした農薬分子設計を目指して構造活性相関研究が盛んに進められていた。しかし、その合理的解釈に至るには標的蛋白質にリガンド分子が結合した姿を実際に確認する必要があるとの見解が示されていた。そこで、未知であった双翅目・キイロショウジョウバエの EcR^L/USP^Lヘテロダイマーの構造を様々なアゴニストとの複合体としてX線結晶構造解析により構造決定することとした。

(2) これまで、他の目種の昆虫の脱皮ホルモン受容体とアゴニスト分子が結合した複合体の構造解析の報告はあるが、アゴニストフリーの構造報告は無い。そこで、本研究課題では、アゴニスト活性発現機構の構造生物化学的検討に欠かせない情報であるとの観点から、アゴニストフリーの構造決定をも目指した。

(3) X線結晶構造解析の結果に基づいて議論を展開する際に必要なことは構造の信頼性である。水素結合一つを取っても、0.1 Å の相違が反応速度やリガンド結合エネルギーなどに大きく影響する。したがって、構造解析データの収集は大型放射光を用いて行い、高分解能・高精度でのX線結晶構造解析を行うこととした。特に、ステロイド型および非ステロイド型の様々なアゴニストとの構造では高い精度での構造を決定し、その構

造情報にも基づいたドッキングシミュレーションを実施し、結合様式の相違の合理的解釈の可能性を探り、リガンド認識機構を解明すること、および新規な骨格をもった高選択的殺虫剤分子を設計に供することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 発現系の検討

双翅目・キイロショウジョウバエ脱皮ホルモン受容体リガンド結合ドメインのヘテロダイマーである EcR^L/USP^L の、大腸菌を用いた発現系を構築するため、付加するタグの種類、宿主である大腸菌の種類と発現条件、およびタグ切断プロテアーゼなどについて広く検討を行った。特にタグの選択については、可溶性を高めることのみならず立体構造を正確に組上げていることに留意した。

(2) 欠損部位の検討

キイロショウジョウバエ EcR ではリガンド結合ドメインのN末端側のDNA結合ドメインとの間に85残基のアミノ酸からなる比較的長いリンカードメインが存在する。この部分は構造を持ち難く結晶化に不利である可能性がある。また、例え結晶が得られたとしても結晶性に劣る可能性もある。そこで、リンカードメインをほぼ10残基ずつ欠損させたEcR^Lドメインの発現検討も行った。USP^Lについては、USP^L単独の構造解析がなされており、それに準じて219~508アミノ酸残基部分のみの発現を試みた。

(3) 精製法の検討

結晶化試料は、化学的純度および物理的純度の双方が高い必要がある。精製はほぼ常道に従ってFPLCシステムを用いて行ったが、迅速性を重視して行った。また、圧力が時として蛋白質の立体構造を壊す要因となる。そこで、オープンカラム系での精製検討も行った。

(4) 結晶化条件の探索および回折X線測定
得られた精製標品(EcR^L/USP^Lヘテロダイマー)を用いて、以下の各種複合体の結晶調製検討を共結晶化法により行った。また、いずれの結晶も、より小さな結晶で高い精度と分解能での回折X線測定が可能な大型放射光においてデータ収集を行い精度の高い構造決定を試みることにした。

結晶調製は以下の複合体について試みることにした。ステロイド型アゴニストである ponasterone A, 20E-ヒドロキシエクダイソンおよびエクダイソンとの複合体の結晶。非ステロイド型アゴニストとしてジベンゾイルヒドラジン類を含むジアシルヒドラジン (DAH) 類縁体およびテトラヒドロキノリン (THQ) 系化合物との複合体の結晶。

4. 研究成果

(1) 発現系の構築

EcR^LではN末端に様々なタグをつけたものにつき発現検討を行った。その結果、GST-His タグおよび Trx-His タグを付加したものを、大腸菌株 Rosetta2(DE3)pLysS 株もしくは BL21(DE3)を用いて発現した場合において、高収量ではないが可溶性画分への発現が見出された。USP^LはC末端に His タグを付加したものについて共発現させた。

① GST タグを用いた系

プロテアーゼ処理により EcR^Lが切断されることが示唆され、最終精製試料の収量は大きく減少した。下記に記述しているように正しい構造形成にも疑問がもたれたことから本タグを用いた系での発現は断念した。しかし、興味深い結果も得られた。EcR^Lは単独では発現しないということが通説であったが、GST タグの付加によって、その発現を獲得することができた。ただし、この試料も、各種クロマトグラフィーによる精製を試みた結果、結晶化に十分な純度と収量を得ることができなかった。週から月単位の時間を要する結晶化では、複合体の安定化に寄与する USP の存在が重要であるものと推定された。

② Thr-His タグを付加したものではプロテアーゼ処理での EcR^L本体の切断は見られず、最終精製試料を得ることができた。したがって、後者の発現系を主に選択して以後の検討を行うこととした。また、Thr-His-EcR^L/USP^Lでは、良質な結晶調製を目的として、N末端側のリンカードメインの欠損部位の検討を行った。ほぼ10残基ずつ切り離れた4種の EcR^L (345-665, 356-665, 368-665, 374-665)につき発現と精製を試みた。全て良好な発現に成功した訳ではないが、興味深いことにリンカー領域を短くすることによりヘテロダイマー形成能が低下する傾向が見出された。

(2) 試料の精製

結晶化蛋白質には化学的純度と共に物理的純度が求められる。化学的純度を保証するためアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーの組み合わせを用いて精製した。全て、試料は4℃で扱い、時間を開けぬよう速やかに全ステップを実施する方法を採用した。圧力が試料の物理的純度を悪くする場合も、蛋白質精製ではあり得る。オープンカラムを用いた検討も行ったが、化学的純度が上がらないこと、物理的純度に差がなかったことから全て FPLC システムを用いて加圧下、精製を行った。

(3) アゴニスト結合活性測定

精製試料のアゴニスト結合活性を重水素ラベル化した ponasterone A を用いて求めた。その結果、GST タグを用いて発現・精製したものは、十分な結合活性を示さなかった。物理的純度が十分ではないものと判断した。一方、Thr タグを用いたものは、高い結合活性を示し、物理的純度が高いことが明らかとなった。

(4) 結晶化と回折X線測定

結晶化条件の探索は、種々の市販のスクリーニングキットを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により、4℃および20℃の2種の温度条件下で行った。

① GST タグでの発現・精製試料には様々な問題があったが、ponasterone A 存在下で結晶化を一応試みた。その結果、PEG 1500 を沈殿剤として用いた系で微小結晶を得ることに成功した。しかし、精製試料調製における問題のみならず結晶も不安定であり、結晶化条件の最適化も困難であったことから、本結晶化の試行は断念した。

② Thr タグでの発現・精製した試料2種、リンカードメインを全て含む試料(EcR^L335/USP^L)および最も短いリンカードメイン部分を有する試料(EcR^L374/USP^L)、について ponasterone A 存在下で結晶化条件の探索を行った。その結果、EcR^L335/USP^Lにおいて針状の結晶を得ることができた。結晶化条件の最適化を試みたが、しかし、回折X線測定に適切な結晶に成長させることは困難であった。一方、EcR^L374/USP^Lにおいては立方体に近い外観の良好な微結晶を得ることに成功した。大型放射光施設である SPring-8 においてビームタイムをいただき、回折X線測定を試みたところ、4 Å程度の分解能は示したもののデータ収集には至らなかった。今後、条件を見直し、結晶の成長を図る必要がある。一方、アゴニストの非存在下での試料調製は困難であり、構造解析に不向きであると考えられていたが、本検討において、アゴニスト非存在下でも安定的に EcR^L335/USP^Lヘテロダイマーの調製が可能であることが示唆された。結晶化という難題が待ち受けているが、それをクリアし、構造解明を行うことによって、アゴニストの活性発現機構に関する極めて興味深い構造生物化学的知見が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

1. 蒲池沙織, 中江撰, 原田俊幸, 小倉岳彦, 中川好秋, 多田俊治, 「キイロシヨウジヨウバエ **EcR/USP** の結晶化」, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会, 2009年10月31日, 沖縄。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 俊治 (TADA TOSHIJI)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：70275288

(2) 連携研究者

中川 好秋 (NAKAGAWA YOSHIAKI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：80155689