

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26310317

研究課題名(和文)食糧循環と地球温暖化対策の両立を目指す新規な分子標的硝化抑制剤の開発

研究課題名(英文) Structure-based design of nitrification inhibitor targeting hydroxylamine oxidoreductases of ammonia-oxidizing bacteria

研究代表者

山崎 俊正 (Toshimasa, Yamazaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター・生体高分子解析チーム・チーム長

研究者番号：40360458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：窒素肥料は農作物の安定的な生産及び品質の維持向上に必要不可欠である。しかしながら、農耕地に投入された窒素肥料の約50%は、水系に流出する硝酸性窒素(NO_3^-)や CO_2 の約300倍の温室効果を持つ N_2O ガスとして環境へ放出されてしまい、農業経営を圧迫している。本研究では、施肥窒素による硝酸性窒素汚染や N_2O 発生の防止に向け、その原因となるアンモニア酸化細菌の硝化反応の鍵酵素であるヒドロキシルアミン酸化還元酵素の新規な特異的阻害剤のシード化合物を構造ベース創薬法を駆使して創出した。

研究成果の概要(英文)：About 50% of the nitrogen (N)-fertilizer applied into cropping systems is not absorbed by plants, but lost to the environment as ammonia (NH_3), nitrate (NO_3^-), and nitrous oxide (N_2O), a greenhouse gas with a global warming potential of 300 times greater than that of CO_2 , raising agricultural production costs and contributing to pollution and climate changes. These N losses are caused by nitrification, the oxidation of NH_3 to NO_3^- , catalyzed by the ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria (AOB and NOB). To reduce nitrification and N_2O emissions, we have developed seed compounds of novel nitrification inhibitors targeting hydroxylamine oxidoreductase, one of the two key enzymes of AOB, by utilizing the structure-based drug design method.

研究分野：構造生命科学

キーワード：環境調和型農林水産 地球温暖化ガス排出削減 分子標的型硝化抑制剤 構造ベース創薬

1. 研究開始当初の背景

窒素肥料は農作物の安定的な生産及び品質の維持向上に必要不可欠である。人口の増加や食生活の向上に伴い大量の窒素肥料が生産・施用され続けた結果、自然循環量に匹敵する窒素が工業的に生産され、農業をはじめとする人間活動によって排出される硝酸性窒素による水系の汚染やCO₂の約300倍の温室効果を持つN₂Oの発生が国内外で大きな問題となっている。このような窒素汚染は窒素肥料の損失であり、農業経営を圧迫している。したがって、土壌中の窒素動態を制御し窒素肥料の損失を防止する技術の開発は農業の生産性向上と環境保全の両見地から喫緊の課題といえる。

窒素肥料として農耕地に投入されたアンモニア態窒素は、土壌中のアンモニア酸化細菌によって亜硝酸に酸化され、さらに、亜硝酸酸化細菌によって硝酸に酸化される。また、N₂Oはアンモニア酸化過程で発生する。したがって、初発反応を司るアンモニア酸化細菌を制御することにより、硝酸性窒素の溶脱やN₂Oの発生を防止することができる。

アンモニア酸化細菌を特異的に阻害する硝化抑制剤を利用することにより、窒素肥料の施肥量を2割程度、N₂Oガス排出量を5割程度削減できるとの報告がある。しかしながら、既存の硝化抑制剤には毒性や効果の面で欠点が多い。また、いずれの既存薬も作用機構が不明で戦略的な改良は難しい。このため、作用機構が明確で、安全かつ効果的な新規硝化抑制剤の開発が切望されている。

2. 研究の目的

農耕地で問題となっている施肥窒素による硝酸性窒素汚染や温室効果ガスN₂O発生の防止に向け、その原因となるアンモニア酸化細菌を特異的に阻害する新規硝化抑制剤を開発する。具体的には、構造ベース創薬手法を駆使して、アンモニア酸化細菌の硝化反応の鍵酵素であるヒドロキシルアミン酸化還元酵素の新規な特異的阻害剤を開発する。

3. 研究の方法

アンモニア酸化細菌(AOB)は2綱3属にわたる多様性を有することから、広いスペクトラムを持つ阻害剤を開発する必要がある。このため、βプロテオバクテリア綱に属する5種類のβAOB [*Nitrosomonas europaea* strain NBRC14298 (= ATCC19718), *Nitrosomonas sp.* JPCCT2 NBRC108559 (=JPCCT2), *Nitrospira multififormis* ATCC25196, *Nitrosomonas cryotolerans* ATCC49181, *Nitrospira lacus* APG3 ATCC BAA2542]、および、γプロテオバクテリア綱に属する1種類のγAOB (*Nitrosococcus oceani* ATCC19707)を実験に用いた。ヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)の構造機能解析にはβAOB *N. europaea* とγAOB *N. oceani* から精製した NeHAO と NoHAO を用いた。X線回折データは高エネ

ルギー研究所放射光施設で測定した。HAO活性の測定には、シトクロム-cを電子受容体として用いる従来の吸光測定法と、蛍光電子受容体を利用して本研究で独自に開発した高感度蛍光測定法を併用した。

4. 研究成果

(1) HAOの簡便な高純度大量精製法の確立

土壌には難培養菌を含め多様なアンモニア酸化細菌(AOB)が生息している。これら多様なAOBに対して効果的な、広いスペクトラムを持つ阻害剤を開発する必要がある。これまでの硝化抑制剤の開発においては、ほとんどの場合にモデル種の *N. europaea* が使用されてきたが、この菌は土壌中の生息数が少ない。そこで、入手可能な複数種のAOB菌株の大量培養系の確立と、そこからHAOを簡便に生成する方法の確立を行った。その結果、HAOの精製方法が報告されている2株を含め6菌株の大量培養に成功し、うち5株からHAOの精製に成功した(表1)。

表1. AOB菌株の大量培養とHAO精製

Scientific Name	Strain	Source	HAO精製
<i>Nitrosomonas europaea</i>	NBRC14298	Europe, soil	○
<i>Nitrosomonas sp.</i> JPCCT2	NBRC108559	Thermal power plant, Fukushima, Japan, Slurry	○
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	ATCC49181	Alaska Kasitsna bay, sea surface	○
<i>Nitrosococcus oceani</i>	ATCC19707	North Pacific sea	○
<i>Nitrospira lacus</i> APG3	ATCC BAA2542	North America, lake, sediment soil	×(No HAO?)
<i>Nitrospira multififormis</i>	ATCC 25196	Surinam (South America), soil	○

従来のHAO精製法は、硫酸沈殿、バッファー交換、希釈・濃縮などの精製ステップが必要のため、高純度のHAOを大量に調製するのに長時間を要する。一方、我々が確立した新しい精製方法では一連のカラム精製のみで大量の高純度HAOを短時間で調製することができ、自動化も可能である。βAOB *N. europaea* 由来HAO (NeHAO)とγAOB *N. oceani* 由来HAO (NoHAO)の精製例を図1に示す。同様の方法で、これまでに精製の報告例の無い *N. sp.* JPCCT2、*N. cryotolerans*、*N. multififormis* のHAOの精製に成功した。*Nitrospira lacus* APG2株については、HAO特有の吸光スペクトルが観測されなかったことから、この菌株はHAOを持たない可能性が示唆された。

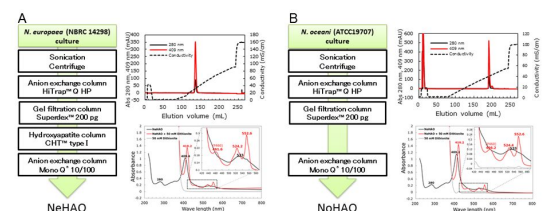


図1. 新しいHAO精製方法とそれを用いて精製した(A) NeHAOと(B) NoHAOの最終カラムクロマトグラフィーと吸光スペクトル。

(2) βAOB由来NeHAOとγAOB由来NoHAOの薬剤感受性と立体構造の比較

図2Aに示すように、AOBはβAOBとγAOBに大別されることから、系統的に大きく離れ

た β AOB *N. europaea* 由来 HAO (NeHAO)と γ AOB *N. oceani* 由来 HAO (NoHAO)について薬剤感受性を比較した。薬剤としては NeHAO の阻害剤として知られているフェニルヒドラジンを用いた。フェニルヒドラジンは 10 μ M で NeHAO の活性を 43%まで阻害するのに対して、10 μ M では NoHAO はほとんど阻害されなかった(図 2B)。また、AOB 生菌に対するフェニルヒドラジンの阻害活性を測定したところ、3 種類の β AOB *N. europaea*, *N. sp. JPCCT2*, *N. multififormis* に対してはいずれも同程度の阻害活性を示したが、 γ AOB *N. oceani* に対する阻害活性は 3 倍程度低かった。これらの結果は、 β AOB 由来 HAO と γ AOB 由来 HAO の薬剤感受性が大きく異なることを示唆している。

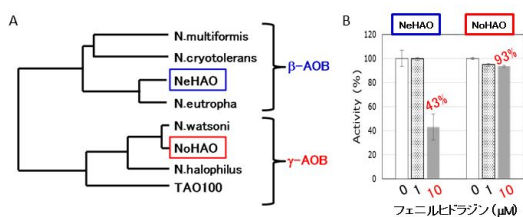


図 2. β AOB 由来 NeHAO と γ AOB 由来 NoHAO の薬剤感受性の比較。(A) HAO 系統樹、(B)フェニルヒドラジン感受性の比較。

β AOB 由来 HAO と γ AOB 由来 HAO の薬剤感受性差を構造生物学的見地から明らかにするため、 β AOB *N. multififormis* 由来 HAO (NmHAO)と γ AOB *N. oceani* 由来 NoHAO のホモロジーモデル構造を β AOB *N. europaea* 由来 NeHAO の結晶構造(PDB: 4n4n)をテンプレートとして作成して比較した。 β AOB 由来 NmHAO のモデル構造は、全体構造も薬剤結合ポケットの構造も NeHAO の結晶構造と良好に一致しており、両者の薬剤感受性が同等であることが構造生物学的見地からも裏付けられた。一方、 γ AOB 由来 NoHAO のモデル構造では、全体構造は NeHAO の結晶構造と酷似しているが、薬剤結合ポケットの構造に顕著な違いが観測された(図 3)。薬剤結合ポケットを構成するアミノ酸配列は β AOB と γ AOB の各綱に属する HAO において保存性が高いことから、 β AOB 由来 HAO と γ AOB 由来 HAO の薬剤感受性差は薬剤結合ポケットの構造の違いに起因すると推察される。

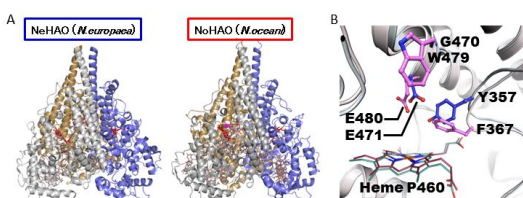


図 3. β AOB 由来 NeHAO の結晶構造(PDB: 4n4n)と γ AOB 由来 NoHAO のモデル構造の比較。(A) 全体構造、(B)薬剤結合ポケットの比較: NeHAO(青)と NoHAO(ピンク)。

(3) アセトアルドキシム及びフェニルヒドラジンの HAO 結合様式の解析と阻害剤のフラグメントベース設計

10 種類の阻害剤候補化合物を HAO 結晶に対してソーキングして X 線結晶構造解析を行い、2 種類の化合物(アセトアルドキシムとフェニルヒドラジン)の HAO 複合体構造を取得した。基質構造をミミックするアセトアルドキシムは HAO の活性中心である P460 ヘム上に結合しており、阻害剤として機能することが示唆された。実際に阻害活性を測定したところ、HAO 及び生菌に対して、非常に弱いながらも HAO 阻害活性を示した。一方、フェニルヒドラジンは、アセトアルドキシムの結合部位に隣接した部位に結合していた。

アセトアルドキシムとフェニルヒドラジンの構造的特徴を同時に持つ化合物を探索して、化合物 A を見出した。化合物 A は、アセトアルドキシムに比べて 3 倍ほど強い HAO 阻害能を有することが判明した。HAO-化合物 A 複合体の X 線結晶構造解析の結果、化合物 A はドッキングモデルとほぼ同じ位置に同様の様式で結合していることが明らかになった。

(4) ファーマコファサーチによる基質ミミック型 HAO 阻害剤の *in silico* 探索

アセトアルドキシムとフェニルヒドラジンの HAO 複合体の X 線結晶構造解析の結果に基づき、両化合物の特徴的な官能基をファーマコファに設定して *in silico* スクリーニングを行った。市販化合物データベース約 532 万化合物から数段階の絞り込みを経て、77 種類の HAO 阻害剤候補化合物を選抜した。購入することができた 40 化合物について HAO 阻害活性を測定し、23 種類のリード化合物 ($IC_{50} < 500 \mu$ M)を取得した。このうち、新規阻害剤 B は、既知のフェニルヒドラジンよりも 7 倍程度強い HAO 阻害活性を持つ。化合物 B の周辺化合物を用いて精製 HAO と菌体に対して構造活性相関解析を行ったところ、精製 HAO と菌体に対する阻害効果に正の相関が観測されたことから、化合物 B は HAO 特異的に作用していることが確認され、有力な HAO 標的型硝化抑制剤のリード化合物候補として期待される。この化合物 B と HAO 複合体の結晶構造を解析したところ、ファーマコファサーチで予測されたように、化合物 B は HAO の活性中心付近に結合していた。

(5) 新規阻害剤 B と既知硝化抑制剤の AOB 生菌阻害活性の比較

新規阻害剤 B と既知の硝化抑制剤の活性を比較するため、既知の硝化抑制剤 38 種(うち市薬 14 種)の硝化活性阻害効果(IC_{50})を測定して、上記で得られた新規阻害剤 B と比較した。この結果、化合物 B は現在主に使用されている市薬 3 種(ニトラピリン、ジシアングアミド、DMPP)よりも 2~200 倍強力な阻害効果を持つことが判明した。

(6) 現在の状況

構造ベース創薬に利用する標的タンパク質の立体構造には高い精密性が求められる。X線結晶構造の場合、分解能が2.5 Å以下の高分解能構造が必要とされている。我々は、本研究で確立した高純度 HAO 大量精製法を用いて調製した NeHAO について、既報の構造(PDB: 4n4n, 4n4o, 4fas, 1fgj)の分解能2.1~2.8 Åをはるかに上回る1.7 Åの高分解能構造の取得に成功した。また、NoHAO についても2.1 Åの高分解能構造の取得に成功するとともに、*N. sp. JPCCT2* と *N. multiformis* 由来 HAO の結晶化にも成功している。

HAO 標的型硝化抑制剤シード化合物の探索においては、本研究で開発した高感度蛍光 HAO 活性測定法を用いて20万化合物ライブラリのハイスループットスクリーニングを完了し、HAO 活性を90%以上阻害する約1000種類の化合物の取得に成功した。これにより、分子骨格構造の異なる新規硝化抑制剤のシード化合物群が整備された。

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)

[雑誌論文](計 1件)

Yuki Nishigaya, Zui Fujimoto, Toshimasa Yamazaki (2016) Optimized inhibition assays reveal different inhibitory responses of hydroxylamine oxidoreductases from beta- and gamma-proteobacterial ammonium oxidizing bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476: 127-133. (査読有)
DOI: 10.1016/ibbr.2016.05.041 (査読有)

[学会発表](計 5件)

西ヶ谷有輝、土屋渉、藤本瑞、山崎俊正、ヒドロキシルアミン酸化還元酵素を標的とした硝化抑制剤の開発、日本農薬学会42回大会、2017年3月6~8日、愛媛大学(愛媛県・松山市)

西ヶ谷有輝、藤本瑞、土屋渉、山崎俊正、持続的農業に資する硝化抑制剤の創薬、第7回スクリーニング学研究会、2016年11月25日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Yuki Nishigaya, Toshimasa Yamazaki, Structure analysis of target proteins applied to BNI action mechanism research, BNI International Symposium 2016年9月14日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)(招待講演)

Yuki Nishigaya, Toshimasa Yamazaki, Revealing inhibition mechanism against hydroxylamine oxidoreductase (HAO), 2015年3月2~3日、JIRCAS(茨城県・つくば市)(招待講演)

西ヶ谷有輝、熊谷美穂、土屋渉、藤本瑞、藤原健智、山崎俊正、構造解析と新規阻害剤を利用したアンモニア酸化細菌由来ヒドロキシルアミン酸化還元酵素に対す

る硝化抑制剤ターゲットとしてのバリデーション、生化学会第87回大会、2014年10月15~18日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

[産業財産権]

出願状況(計 2件)

名称: 酸化還元酵素の活性測定方法

発明者: 山崎俊正、西ヶ谷有輝

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/001522

出願年月日: 2017年1月18日

国内外の別: 国外

名称: テトラゾリウム塩の存在下でヒドロキシルアミン酸化還元酵素と接触させることを含む、ヒドロキシルアミン感化還元酵素の活性測定方法

発明者: 山崎俊正、西ヶ谷有輝

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-010983

出願年月日: 2016年1月22日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎俊正 (YAMAZAKI TOSHIMASA)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター 生体高分子解析チーム・チーム長

研究者番号: 40360458

(2) 研究分担者

藤原健智 (FUJIWARA TAKETOMO)

静岡大学・理学部・生物科学科・教授

研究者番号: 80209121

(3) 連携研究者

藤本瑞 (FUJIMOTO ZUI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター 生体高分子解析チーム・上級研究員

研究者番号: 20370679