

令和元年8月30日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07625

研究課題名(和文) 脱皮ホルモン受容体制御をめざした分子設計基盤の整備

研究課題名(英文) Development of molecular design basis for molting hormone receptor regulation

研究代表者

中川 好秋 (Nakagawa, Yoshiaki)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80155689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：分子動力学およびMM/PBSA法を使って計算した脱皮ホルモン様活性化化合物の受容体結合エネルギーと脱皮ホルモン様活性との間に相関関係を見いだした。この結果を使って380万の構造データベースからインシリコスクリーニングを行って5つの活性化化合物を見いだした。その中の一つはプロリンの誘導体で、2つの不斉炭素が存在し、4つの立体異性体が存在することから、それらをすべて合成し活性の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

20-hydroxyecdysone (20E)はほとんどの昆虫が用いている脱皮ホルモンで、この20Eの作用をかく乱することによって昆虫は死にいたる。実際に20Eと同じホルモン作用を示すdiacylhydrazine (DAH)類に強い殺虫活性が見つかり、農薬として実用されている。しかし、DAH類はチョウ目選択的で、他の昆虫目に対してはほとんど活性を示さない。その原因が、DAHと20Eの結合部位の違いによるものであることが明らかにされている。20E結合部位の変異は起こりにくいと考えられるが、DAHの結合部位に変異が起こり抵抗性を獲得する可能性があり、新規のアゴニストを見言い出すことは重要である。

研究成果の概要(英文)：A correlation was found between receptor binding energy and molting hormone-like activity of molting hormone-like active compounds calculated using molecular dynamics and MM / PBSA method. Using this result, in silico screening was conducted from 3.8 million structure databases to find five active compounds. One of them is a derivative of proline, which has two asymmetric carbons and four stereoisomers, so we synthesized them all and evaluated their activity.

研究分野：生物調節化学

キーワード：ecdysone molting hormone MM/PBSA 分子動力学 結合自由エネルギー インシリコスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫は脱皮変態を繰り返して成長し、ほとんどの昆虫の脱皮は 20-hydroxyecdysone (20E) によって制御されている。すなわち、20E が脱皮ホルモン受容体 (Ecdysone Receptor; EcR) に結合し脱皮関連遺伝子を活性化して脱皮が始まる。従って、EcR に作用する化合物は昆虫の成育を制御し、実際に脱皮ホルモンアゴニストである diacylhydrazine (DAH) 類は殺虫活性を示し、農業用殺虫剤として利用されている。しかし、DAH 類はチョウ目に対して高い活性を示すものの、他の昆虫目に対しては、ほとんど活性を示さない。

これまでに、EcR のリガンド結合部位の立体構造が、結晶構造解析の手法を用いて数種の昆虫において明らかにされている。特に、興味深いことに 2003 年に Billas らは、天然のステロイド型脱皮ホルモンである 20E と DAH 類は、同じ結合部位に結合しているのではなく、受容体結合領域の一部を共有していることを明らかにしている (図 1)。すなわち、DAH 類の一方のベンゾイル部 (A 環部) が 20E のヒドロキシ側鎖部に対応しているが、ステロイド骨格と DAH 類のもう一方のベンゾイル部 (B 環部) は互いに異なるポケットに結合していることが分かっている。チョウ目昆虫の EcR においては、リガンド結合領域として、20E 結合領域と DAH 結合領域の 2 つの領域が存在する。本研究では、まず、EcR に対する様々なリガンド分子の結合自由エネルギーを求めそれらの結合親和性との関係を調べた。続いて、DAH 類の結合領域に対して結合可能な化合物を探索することを目的としてインシリコスクリーニングを行った。

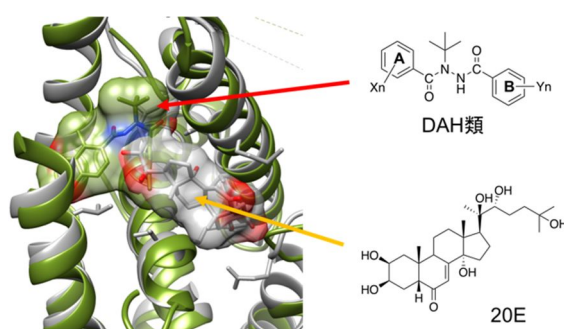


図 1. DAH 類と 20E の結合部位の比較

2. 研究の目的

DAH の構造以外で、脱皮ホルモン受容体に結合可能な化合物を、バーチャルスクリーニングの手法を利用して、数百万個の化学構造から探し出すことを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. ドッキングシミュレーションと結合自由エネルギー計算

タバコガの一種である *Heliothis virescens* の EcR (HvEcR) のリガンド結合部位の X 線結晶構造 (PDB: 3IXP) をもとにして、シロイチモジヨトウ *Spodoptera furugiperda* の EcR (SfEcR) のリガンド結合部位の一次配列から、MODELLER 9.19 ホモロジーモデリングの手法を用いて SfEcR のリガンド結合部位の立体構造を構築し Make Receptor を用いてリガンド結合部位を作成した。リガンド分子に関しては、あらかじめ OMEGA を用いて 1 化合物あたり最大 200 の立体構造を作成しておいた。HYBRID を用いて分子ドッキングを行ったのち、分子動力学 (Molecular dynamics: MD) を行った。原子電荷は AM1-BCC を用いて計算し、タンパクの力場には Amber force field 4SB (ff14SB)、リガンド分子には general AMBER force field 2 (GAFF2) を用い、MD のタイムステップは 1 fs とした。電荷を中性にするために Na⁺、Cl⁻ を使った。水分子は溶質表面から少なくとも 10 を越えるように Cube を作成した。MD の前に、系のエネルギーを最小化し、続いて、一定の体積において 20 ps で 100 K から 300 K まで熱し、180 ps 平衡化した。MD は 150 ps を行い、1ps ごとにトラジェクトリーを得て、MM/PBSA 法によってエネルギー計算を行った。各トラジェクトリーあたり 3 連計算して、1 化合物あたり 450 のスナップショットを得てエネルギーを計算した。MM/PBSA 法によって得られる結合自由エネルギーは $\Delta G_{bind} = G(\text{protein-ligand}) - G(\text{protein}) - G(\text{ligand})$ で、 $G = E_{MM} + G_{PB} + G_{SA} - TS$ として表される。ここで、 E_{MM} は気相中での MM 計算値で、クーロン相互作用、van der Waals 相互作用および結合エネルギーから計算される。 G_{PB} は Poisson-Boltzmann 式によって計算される水和の自由エネルギー、 G_{SA} は水和自由エネルギーの非極性項で、溶媒接触可能面積から計算される。TS は絶対温度とリガンドのエントロピーの積である。内部の誘電率を 1.0 (設定範囲 1.0~4.0)、外部の誘電率を 80 として計算した。リガンドのコンフォメーション自由エネルギー ΔG_{conf_ligand} の計算には OpenEye 社の SZYBKI の Freeform モジュールを用いた。

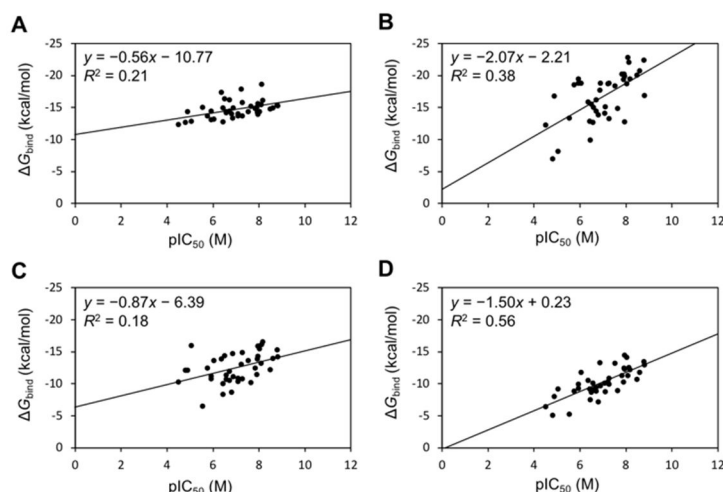


図 2. 結合自由エネルギー (ΔG_{bind}) と結合親和性 (pIC_{50}) の関係

ドッキングシミュレーションの手法を用いて、DAH 類やその類縁化合物の脱皮ホルモン受容体に結合させ、MD および MM/PBSA 法を用いてによって受容体-リガンド結合自由エネルギーを算出した。これまで、計算コストを下げるために受容体を剛体として扱い、リガンドとのドッキングを行ってドッキングスコアを算出することが多かった。本研究でも、Chemgauss4 を用いてドッキングスコアを算出し、活性との相関関係を調べたが良好な相関関係は見出されなかった (図 2A)。

MM/PBSA 法によって計算した結合自由エネルギーと脱皮ホルモン受容体への結合活性の間に相関関係が認められたが、相関関係はそれほど高いものではなかった。しかし、 ΔG_{bind} にリガンド分子のコンフォメーションエネルギー (ΔG_{conf_ligand}) を考慮することによって、相関関係が上昇し、相関式が原点を通るものとなった。自由エネルギー計算結果から結合親和性を精度よく予想できることがわかった。

この結果を使って、380 万化合物の構造データベースから DAH 結合領域に結合可能な化合物を探索した。まず、FRED を使ったドッキングスクリーニングを行って 5000 化合物まで絞り込んだ後、MM/PBSA 法を用いた 1 点計算で 389 個に、さらに MD とそれに続く MM/PBSA 計算を行って最終的に 12 個の化合物を選抜した (図 3)。選抜した 12 個の化合物を購入し、受容体への結合親活性の評価を行ったところ、5 つの化合物 (1, 2, 6, 8, 10) に活性を見出すことができた。これは、42% の確率でヒットしたことを示し、本スクリーニング法は精度の高いことを示している。

3-2 脱皮ホルモン受容体への結合活性の評価

チョウ目昆虫のヨトウガの細胞株 Sf9 あるいはハエ目昆虫ヒトスジシマカ細胞株 AeA12 に [3H]Ponasterone A ([3H]PonA) および供試化合物を加えて 30 分間インキュベートした。コントロールとして、溶媒 (DMSO) 処理区、ポジティブ応答として、非標識の高濃度 PonA 処理を行った。供試化合物の濃度を変え DMSO 処理区を 100%、PonA 処理区を 0% として濃度応答曲線を描いた。濃度応答曲線から、コントロールの 50% を阻害する濃度 (IC_{50}) を供試化合物ごとに求めてその逆対数値 pIC_{50} を活性の指標とした。

4. 研究成果

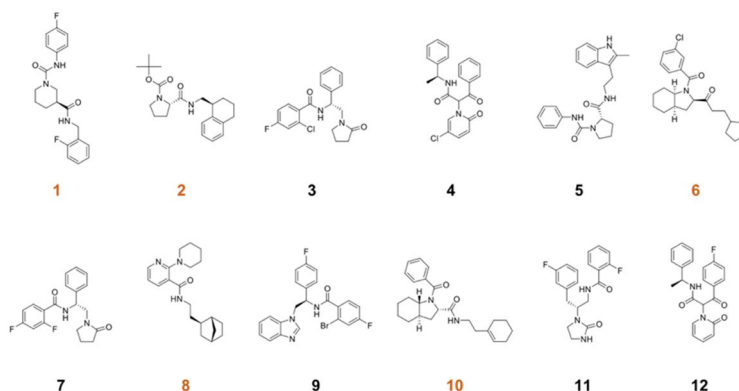


図 3. インシリコスクリーニングで得られた 12 の化合物と活性の得られた化合物の構造式

表 1 . 化合物の結合中エネルギーと受容体に対する結合活性

No.	ΔG_{bind} (kcal/mol)	pIC ₅₀ (M)	No.	ΔG_{bind} (kcal/mol)	pIC ₅₀ (M)
1	-9.13	4.28	7	-12.99	<3.60
2	-9.49	5.04	8	-9.61	4.11
3	-14.01	<3.60	9	-10.70	<3.60
4	-9.57	<4.00	10	-11.01	4.12
5	-9.44	<4.00	11	-10.16	<3.60
6	-10.73	4.13	12	-10.51	<3.60

スクリーニング後の展開

活性の得られた 5 つの化合物に関して、pIC₅₀ 値を求めたところ、最も活性の高かった化合物 2 の pIC₅₀ 値は 5.04 であった。この化合物は t-butoxycarbonyl (Boc) 基で保護されたプロリンとテトラヒドロナフチルメチルがアミド結合で結びついた簡単な構造であった。しかしこの化合物には 2 つの不斉炭素が存在し、合計 4 つの立体異性体が存在する。そこで、4 つの立体異性体を選択的に合成し、4 つの化合物の活性の評価を行った。SS 体と RS-体の活性が高く 5.3 程度で、SR 体と SS 体の活性はそれらの 1/10 以下であった。プロリン側の不斉は活性には影響しなかった。以上の結果をもとにして、受容体結合モデルを構築し、リガンド-受容体相互作用様式を推察した(図 4)。

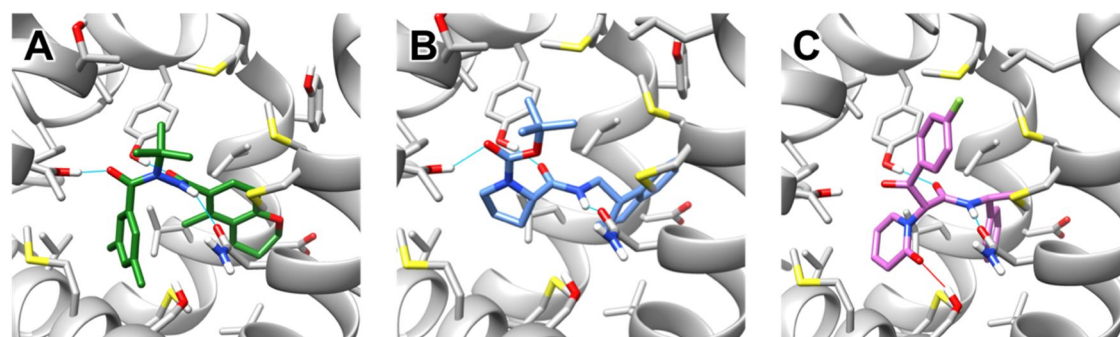


図 4 . DAH 類の chromafenozide (A), 化合物 1 (B) および 12 (C) のドッキングモデル

活性の存在した化合物 (1, 2, 6, 8, 10) では、Ser91 のヒドロキシ基との間に水素結合は認められなかったが、活性のない化合物では、化合物 5 を除いて、Ser91 のヒドロキシ基との間に水素結合の存在することが確認された

β

計算化学の他の研究への応用

1. 植物ステロイドホルモンであるブラシノライド様活性を持つ非ステロイド化合物の探索研究において、MD-MM/PBSA 法を利用した。ブラシノステロイドの受容体 リガンド結合自由エネルギーを計算し、ホルモン活性との間に直線関係を見出した。その関係を利用して、ブラシノライド活性を示す新規な非ステロイド化合物 NSBR1 を発見することができた。
2. 天然の脱皮ホルモンである 20E の EcR への結合はチョウ目だけでなく、半翅目、甲虫目において X 線結晶構造解析によって結合様式が解明されている。その様式は 3 種の昆虫目においてほとんど変わらないものであった。このことで、20E は異なる昆虫に対しても同じように高い活性をもつ。そこで、20E の結合部位に結合可能な化合物の探索に着手した。

インシリコスクリーニングの技術を用いて 380 万の構造データベースから、Spodopetra frugiperda の EcR の DAH 結合部位に結合可能な 12 個の化合物を選抜した、これらの化合物を購入し受容体結合親和性を評価したところ、5 つの化合物に脱皮ホルモン受容体結合親和性が見出された。最も高い活性の得られた化合物には 2 つの不斉炭素があることから、合計 4 つの立体異性体が存在する。そこで、4 つの異性体を作り分けて活性の評価を行ったところ、SS 体と RS

体の活性が RR 体と SR 体の約 10 倍で，プロリン側の立体化学はそれほど重要でないことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Miwa Uchibori-Asano, Akiya Jouraku, Toru Uchiyama, Kakeru Yokoi, Gaku Akiduki, Yoshitaka Suetsugu, Tetsuya Kobayashi, Akihito Ozawa, Sako Minami, Chiharu Ishizuka, Yoshiaki Nakagawa, Takaaki Daimon, Tetsuro Shinoda. Genome-wide identification of tebufenozide resistant genes in the smaller tea tortrix *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Sci. Rep.*, **9**, 2019 Mar 12;9(1):4203. doi: 10.1038/s41598-019-40863-5.

Shinri Horoiwa, Taiyo Yokoi, Satoru Masumoto, Saki Minami, Chiharu Ishizuka, Hidetoshi Kishikawa, Shunsuke Ozaki, Shigeki Kitsuda, Yoshiaki Nakagawa and Hisashi Miyagawa. Structure-based virtual screening for insect ecdysone receptor ligands using MM/PBSA. *Bioorg. Med. Chem.*, **27**, 1065-1075 (2019).

Taiyo Yokoi, Yoshiaki Nakagawa, and Hisashi Miyagawa. Asymmetric synthesis of tetrahydroquinoline-type ecdysone agonists and a QSAR of their binding affinity against *Aedes albopictus* ecdysone receptors. *Pest Manag. Sci.*, **75**, 115-124 (2019).

Airi Sugiura, Shinri Horoiwa, Takanori Aoki, Seisuke Takimoto, Ayumi Yamagami, Takeshi Nakano, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa. Discovery of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1. *J. Pesic. Sci.*, **42**, 105-111 (2017).

Bunta Watanabe, Shuji Yamamoto, Yokoi Taiyo, Airi Sugiura, Shinri Horoiwa, Takanori Aoki, Hisashi Miyagawa, Yoshiaki Nakagawa. Brassinolide-like activity of castasterone analogs with varied side chains against rice lamina inclination. *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 4566-4578 (2017).

Sayoko Ito-Harashima, Mai Matsuura, Masanobu Kawanishi, Yoshiaki Nakagawa and Takashi Yagi. New reporter gene assays for detecting natural and synthetic molting hormone agonists using yeasts expressing ecdysone receptors of various insects. *FEBS Open Bio*, **7**, 995-1008 (2017).

中川好秋：脱皮ホルモン様活性化化合物のQSAR, 日本農薬学会誌, 第42巻, 38-43 (2017)

Seisuke Takimoto, Airi Sugiura, Saki Minami, Tomohiko Tasaka, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa. In silico exploration for agonists/antagonists of brassinolide. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 1709-1714 (2016)

〔学会発表〕(計 18 件)

第44回構造活性相関シンポジウム Analysis of the ligand-receptor binding for various molting hormone agonists using molecular dynamics. Shinri Horoiwa, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa and Hisashi Miyagawa, 2016

第31回農薬デザイン研究会 Total synthesis of juvenile hormones and validation of activities of them, using gene reporter assay in yeast. Taku Nabe, Taiyo Yokoi, Sayoko Harashima, Koji Yagi, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa

日本農芸化学会関西支部講演会 然型幼若ホルモン類の合成と受容体発現酵母を用いた活性評価 名部 拓, 横井 大洋, 原島 小夜子², 松浦 麻衣, 高田 英治, 八木 孝司, 中川 好秋, 宮川 恒 2016

第45回構造活性相関シンポジウム Structure-based virtual screening of EcR ligands. Shinri HOROIWA, Yoshiaki NAKAGAWA, Hisashi MIYAGAWA, 2017

第61回応用動物昆虫学会 チャノコカクモンハマキにおけるジアシルヒドラジン系 IGR 抵抗性機構の解明. 浅野美和, 内山徹, 石塚千遥, 上樂明也, 小澤朗人, 秋月岳, 中川 好秋, 篠田 徹郎. 2017

日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会. Rational design of novel non-steroidal compounds targeting 20-hydroxyecdysone (steroid) binding site of ecdysone receptor (EcR). Yu-Hui Wang, Taiyo Yokoi, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa

第32回農薬デザイン研究会. テトラヒドロキノリン型脱皮ホルモンアゴニストの定量的構造活性相関. 横井大洋, 中川好秋, 宮川恒. 2017

日本農芸化学会関西支部例会(第498回講演会)動物細胞 HEK293T を使った脱皮ホルモンアゴニストの活性評価系. 石塚千遥, 林 謙一郎, 原島小夜子, 八木孝司, 中川好秋, 宮川

恒 . 2017

Molecular design for Brassinolide-like compounds .Airi Sugiura, Shinri Horoiwa, Takanori Aoki, Ayumi Yamagami, Takeshi Nakano, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa. 2017

日本農芸化学会 2018 .Modification of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1 .Midori MATSUO, Takanori AOKI, Airi SUGIURA, Ayumi YAMAGAMI, Takeshi NAKANO, Yoshiaki NAKAGAWA, Hisashi MIYAGAWA

日本農芸化学会 2018 .HEK293T を用いた昆虫ホルモン活性化化合物のレポーターアッセイ . 名部拓, 林謙一郎, 石塚千遥, 原島小夜子, 八木孝司, 中川好秋, 宮川 恒

THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON GREEN PLANT PROTECTION INNOVATION (ICGPPI2018) . In silico screening: conversion of steroid hormones to non-steroid mimics in insects and plants .Yoshiaki Nakagawa . 2018

日本農薬学会第 43 回大会 (秋田) 脱皮ホルモンアゴニストの In silico スクリーニング . 幌岩真理, 中川好秋, 宮川恒 (京大院・農) 2018

日本農薬学会第 43 回大会 (秋田) 動物細胞 HEK293T を用いた幼若ホルモン様活性化化合物の定量的活性評価系の確立および, in silico スクリーニングによる新規化合物の探索 . 名部拓, 幌岩真理, 林謙一郎, 原島小夜子, 八木孝司, 中川好秋, 宮川恒 . 2018

第 33 回農薬デザイン研究会 . ステロイド構造の非ステロイド化 : 昆虫および植物ステロイドホルモン . 中川好秋 (招待講演) . 2018

第 33 回農薬デザイン研究会 . 非ステロイド型 BL アゴニスト NSBR1 の構造活性相関研究 . 日向菜, 松尾美登里, 瀧本征佑, 杉浦愛理, 山上あゆみ, 中野雄司, 中川好秋, 宮川恒 . 2018

日本農薬学会第 44 回大会 (名城大学) . テトラヒドロキノリン型脱皮ホルモンアゴニストの構造展開 . 上野美乃季, 横井大洋, 中川好秋, 宮川恒 . 2019

日本農芸化学会 2019 . ブラシノステロイド類と受容体との結合自由エネルギー計算およびそれをもとにした分子設計 . 松尾美登理, 青木孝憲, 幌岩真理, 瀧本征佑, 山上あゆみ, 中野雄司, 中川好秋, 宮川恒 . 2019

〔図書〕(計 2 件)

中川好秋, 赤松美紀 農薬の構造活性相関研究 新規農薬の創製を目指して ” 農薬の創製研究の動向 安全で環境に優しい農薬開発の展開 ” pp. 318-332, 2018

中川好秋 他 . 新版農薬の科学 (宮川恒, 田村廣人, 浅見忠男編)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 「植物ステロイドホルモン (ブラシノライド) 様活性をもつ非ステロイド化合物の創製」

発明者 : 中川好秋, 杉浦愛理, 瀧本征佑, 幌岩真理, 宮川恒, 松尾美登理

権利者 : 発明者 : , 出願人 : 国立大学法人京都大学

番号 : (PCT/JP2018/008083)

出願年 : 2018 年

国内外の別 : 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.seicho.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。