

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2020

課題番号：15K07331

研究課題名(和文) タンパク質の立体構造に基づく新規農薬候補化合物の合理的探索

研究課題名(英文) Rational search for new pesticide candidate compounds based on the three-dimensional structure of proteins.

研究代表者

鈴木 倫太郎 (Suzuki, Rintaro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生体高分子解析ユニット・上級研究員

研究者番号：00399429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナミキ商事の化合物ライブラリ(約779万)から取り出した代表約60万個を異性体を考慮して3次元化した分子約106万個についてautodock-vina及びmyPrestoを用いてアセト乳酸合成酵素に対するドッキング計算を行い、合議制による解析と目視による最終確認で174の化合物を選抜、購入した。これらの化合物について酵素活性の阻害能を測定し、市販農薬ベンスルフロンメチルと比較した。その結果90%以上の阻害を示す化合物が13個含まれており、最も高い阻害を示す化合物は131%だった。今後IC50を求めるなどさらに詳しく検討する必要はあるが、本手法で効率よく阻害剤を探索できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農薬開発においては新規薬剤が減り、開発経費が膨大になり、さらに抵抗性病害虫雑草の蔓延が問題になっている。医薬では計算機を活用した構造ベース創薬(SBDD)が標準的な手法として効率化に寄与しているが、農薬では論文や総説が発表されているもののSBDDを応用して製品化に至ったと公表されている例はない。計算機で酵素活性を阻害できる剤を見つけても、生物試験、圃場試験では有効ではないことが多いと考えられる。本研究では以上を踏まえ、近年の計算速度の向上した計算機により阻害剤候補の数を増やすこと、および標的タンパク質の変異により耐性を獲得した病害虫雑草の変異標的タンパク質に対するSBDDの適用を行った。

研究成果の概要(英文)：We performed docking-based virtual screening for acetohydroxy acid (AHAS) synthase with about 1.06 million three-dimensional molecules containing isomers made from about 600,000 chemicals representatively selected from Namki Shoji's compound library (about 7.79 million). AutoDock-Vina and myPresto were used for calculation. 174 compounds were selected by consensus analysis and final visual confirmation. The ability of these compounds to inhibit AHAS activity was assayed and compared with the commercially available herbicide bensulfuron-methyl. We found 13 compounds showing inhibition greater than 90% against bensulfuron-methyl. The compound with the best result showed 131% inhibition. Although it is necessary to investigate in more detail such as obtaining IC50 in the future, it was shown that this method can efficiently search for inhibitors.

研究分野：構造生物学

キーワード：農薬 構造ベース創薬 アセト乳酸合成酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

実用化される新規薬剤は研究開始時点までの10年で半減し、農薬の開発経費も一剤当たり数十億円と膨大になっており、さらに既存剤に対する抵抗性病害虫雑草の蔓延が問題になっている。新剤開発において医薬では計算機を活用した構造ベース創薬(SBDD)が標準的な手法として確立しているが、農薬ではSBDDを応用して製品化に至ったと公表されている例はない。農薬に関しても、*in silico* スクリーニングや立体構造解析、ドラッグデザインについては論文や総説が発表されており、少なくとも海外大手農薬メーカーでは開発の手法として検討はしてきたものと思われるが、実際には普及していないと言わざるを得ない。これは計算機で酵素活性を効率よく阻害できる剤を見つけても、生物試験、圃場試験では有効ではないことが多く、製品化につながらなかったことが理由ではないかと推測される。本研究では以上を踏まえ、近年の計算速度の向上した計算機により阻害剤候補の数を増やすこと、および標的タンパク質の変異により耐性を獲得した病害虫雑草の変異標的タンパク質に対するSBDDの適用を意図した。

### 2. 研究の目的

本研究では除草剤の代表的な作用点であるアセト乳酸合成酵素(ALS)等を対象に、農薬の標的タンパク質の立体構造情報に基づき薬剤の合理的設計を行う構造ベース創薬を適用する。特に、除草剤抵抗性の原因となる変異を持つALSも対象とすることで、抵抗性雑草に有効なリード化合物を合理的に選抜することを重要な目的とする。

SBDDにおいては、1)低分子化合物ライブラリと作用点タンパク質の立体構造を使ったドッキング計算による*in silico* スクリーニング、2)それにより見つかった化合物の*in vitro* 阻害活性測定、3)阻害活性の見出された化合物と作用点タンパク質の複合体の立体構造解析、4)立体構造に基づくドラッグデザインや修飾基の網羅的スクリーニング、をもって開発のサイクルとする。本研究では創薬においてSBDDと同様に上記1)から4)までをサイクルとして数回実行することを基本技術として完成させ、効率的な農薬開発の技術基盤となることを示す。

具体的にはALSを阻害する既存の薬剤とは異なる新規骨格を持つ化合物を探索し、リード化合物を得る。またALSの抵抗性変異体を阻害する新規化合物を探索するとともに、抵抗性変異体を阻害するためのタンパク質と阻害剤の相互作用の要件(どの部位とどの残基に疎水性相互作用、スタッキング、水素結合、塩橋などの相互作用があることが必要か)を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 低分子化合物ライブラリの構築

効率的にスクリーニングを行うため、合成にかかるコスト、標的まで到達するのに適した物性、人間および環境に対する安全性などに大きな問題のある、実用可能性のない化合物を除外した。購入可能な化合物ライブラリとしてナミキ商事のSupplier在庫(HTS化合物)約780万品目を利用した。これらから農薬として適した物性値を持つ化合物を選抜して独自のライブラリを作成した。絞り込みにはケムインフォマティクスソフトウェアRDKitを用いた。次に互いに類似した化合物を集めるクラスタリングを行い、各クラスタを代表する化合物を選抜した。クラスタリングにはbayonを、代表の選抜にはpython-igraphを用いた。このようにして選んだ代表化合物を3次元の分子に変換するためにRDKitを用いた。

#### (2) *in silico* スクリーニング

ライブラリから候補化合物を選抜するため計算機上でALSの結合ポケットへのドッキングシミュレーションを行い、予測される結合の強さ、結合様式による判定で数百程度にまで候補化合物を絞り込んだ。ALSの立体構造はモノスルフロンのエステルと結合したPDB ID 3EA4からモノスルフロンのエステルを除いたものを用いた。変異体の構造は3EA4を基にDiscovery Studioを用いて計算機内で構築した。ドッキングシミュレーションのソフトウェアとしては、世界的に広く使われているAutoDock Vina (Trott, 2010)と国内で開発されたmyPresto 5.0 (Fukunishi, 2003, Fukunishi, 2009, Nguyen, 2015, Fukunishi, 2005)を利用した。計算機は農林水産研究情報総合センターの分散並列計算用クラスタシステム(Xeon E5-2680v4, 14 cores, 2.4 GHz × 2CPU × 216 ノード)を利用した。結果の目視にはPyMOLを用いた。

#### (3) *in vitro* 活性測定

計算機で選抜した化合物が実際に結合するか確認するため、選抜した候補化合物を購入してALSの活性阻害試験を行った。活性測定にはMyBioSource社のGeneral Acetolactate Synthase Assay Kitを利用した。リファレンスとして市販農薬の一つであるベンスルフロンのメチルを用いた。ALSは大腸菌でシロイヌナズナALSを大量発現、精製して用いた。活性測定は阻害剤濃度60 μMで行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 低分子化合物ライブラリの構築

医薬においてはLipinskiのRule of 5などの経験則が薬らしさ(drug likeness)の指標として絞り込みに用いられることが一般的になっている。農薬においてはこのような一般的に共有される経験則は見当たらないが、論文で提案されている指標がいくつかある(Avram *et al.* 2014)。これらを参考にパラメータを調節して絞り込むことで5~20%を除外できることがわかった(表1)。

指標	提案されている指標を適用		余裕を持たせて適用	
	閾値	該当化合物数	閾値	該当化合物数
分子量	> 500	358,594	> 700	13,444
極性表面面積	> 130	142,140	> 140	80,203
芳香環の数	> 3	991,324	> 4	147,169
水素結合アクセプターの数	> 10	77,399	> 12	18,956
水素結合ドナーの数	> 3	130,899	> 4	35,265
回転可能な結合数	> 12	28,531	> 14	13,949
オクタノール/水分配係数	> 6	232,887	> 7	63,739
Error in RDKit†		491		134
合計(重複を除く)		1,487,170		368,016

表1 絞り込みにより除外される化合物数  
ナミキ商事の2019年のSupplier在庫の約779万品目のうち指標に該当し除外される品目数。(†RDKitが処理できない構造を持つ化合物の数)

次に類似した化合物をクラスタリングすることでどのくらいの数のクラスタにまとめることができるか検討した。ナミキ商事のライブラリの場合約20%を除外した化合物群について、50万から150万品目程度のクラスタに分割するのが適当であると判断した(図1)。

分割した各クラスタから代表構造を取り出すのにあたり、当初は固有ベクトル中心性を用いることを想定していたが、実際に計算してみると必ずしも適当とは思われない分子が選ばれることも多いことが判明した。そこで固有ベクトル中心性を参考にしつつ、代表性が高いと考えられる分子を選択するアルゴリズムを作成した。クラスタリングの結果と代表構造の選抜結果を各クラスタごとにhtml形式でわかりやすく表示するとともに、gml形式でも出力して必要に応じて適宜参照・検討できるようにした(図2)。

次いで代表構造を3次元の分子にするため異性体の扱いについて検討した。光学異性体についてキラル中心の数をNとすると $N^2$ 個の可能性があり、そのすべてが存在できるとは限らない上にあらかじめどの組み合わせが可能かわからないので、すべての組み合わせについて3次元分子の作成をRDKitで試み、所定の回数以内で目的の組み合わせが実現できるかどうか、できた分子が歪んでいないかを判定するアルゴリズムを作成した。同様に幾何異性体にも対応した。また、光学異性あるいは幾何異性に依存した光学異性体及び幾何異性体への対応や、メソ異性体による重複の除去への対応も行った。光学異性、幾何異性のある化合物は一般論として製造にコストがかかるため農薬には向かないとされるが、実際の農薬の中には異性体的一方だけが有効成分である例もあり、また、スクリーニングで選抜されるのはリード化合物であってこれを基に構造展開を行うため、極端に多いものを除き、必ずしも異性体の除去にはこだわる必要はないと考え、計算時間の点から単純な組み合わせの数が5000以上になる分子は3次元化の計算を行わず、さらに3次元

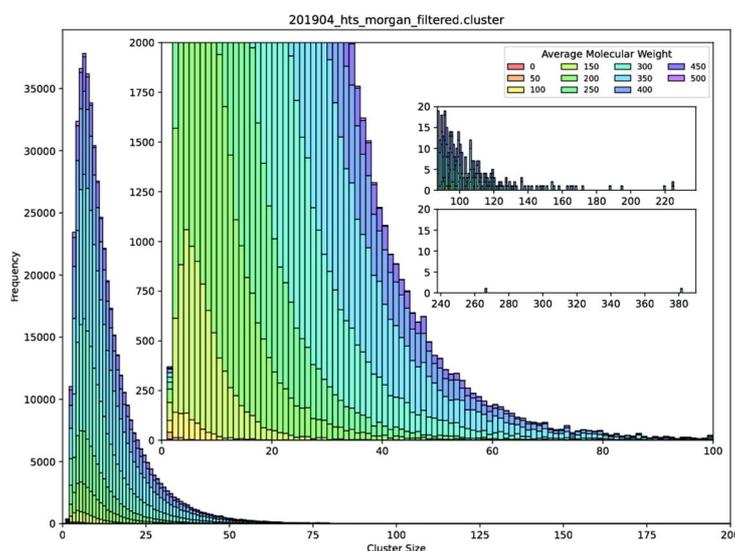


図1 クラスタサイズヒストグラム  
50万にクラスタリングした各クラスタの大きさを示すヒストグラム。各クラスタの平均分子量ごとに分けて着色した

化の計算後に可能な組み合わせの数が 20 個以上になる分子についてはスクリーニングから除外することとした。不斉軸、不斉面、アトロプ異性体、ヘリシティ、位相異性体については現段階では考慮しないこととした。RDKit が扱えない化合物もあり、結果として 5997769 化合物について 1,063,929 個の 3 次元構造を作成した。

(2) *in silico* スクリーニング

最終的に得られた約 106 万の 3 次元分子について、農林水産研究情報総合センターの分散並列計算用クラスタシステム (6048 コア、同時実行数は 72) を用いて AutoDock Vina および myPresto によるドッキング計算を ALS に対して行った。さらに両者の計算スコアおよび結合ポーズを解析して合議制による選抜システムを構築した。

ALS は補酵素としてチアミンニリン酸 (ThDP) を持っているが、計算に利用したモノスルフロンエステルに結合した ALS の立体構造では ThDP の C2 位がヒドロキシエチル化している (Wang *et al.* 2009)。他の ALS の既知構造ではこの修飾がないものや、ThDP が分解されて一部しか見えないものなど、ALS に結合した ThDP の状態には多様性がある。ターゲットとしてヒドロキシエチル化 ThDP (HeThDP)-ALS と ThDP-ALS のどちらが適当かわからないため、本研究では HeThDP-ALS とそこからヒドロキシエチル基を除いた ThDP-ALS をそれぞれ標的として計算を行った。上記の選抜システムにより、HeThDP-ALS に対して 3035 個、ThDP-ALS に対して 2545 個の化合物を得た。こ

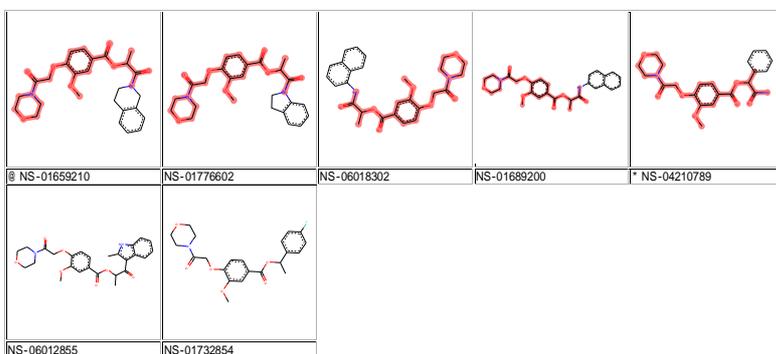


図 2 代表構造の選抜 固有ベクトル中心性が最大の化合物 (@ を付す) と基本骨格 (赤色の部分) が同じ化合物を選び、その中で分子サイズが最小の化合物 (\* を付す) を選抜

	化合物数	異性体数
絞り込まれた化合物数	6,303,294	
クラスターの代表化合物	600,000	
組み合わせが 5000 以上	3	
可能な異性体が 20 以上	1,646	
力場が対応しない化合物	468	
計算できなかった化合物	114	583
3 次元化できた化合物	597,769	1,063,929

表 2 3 次元化計算した化合物の数

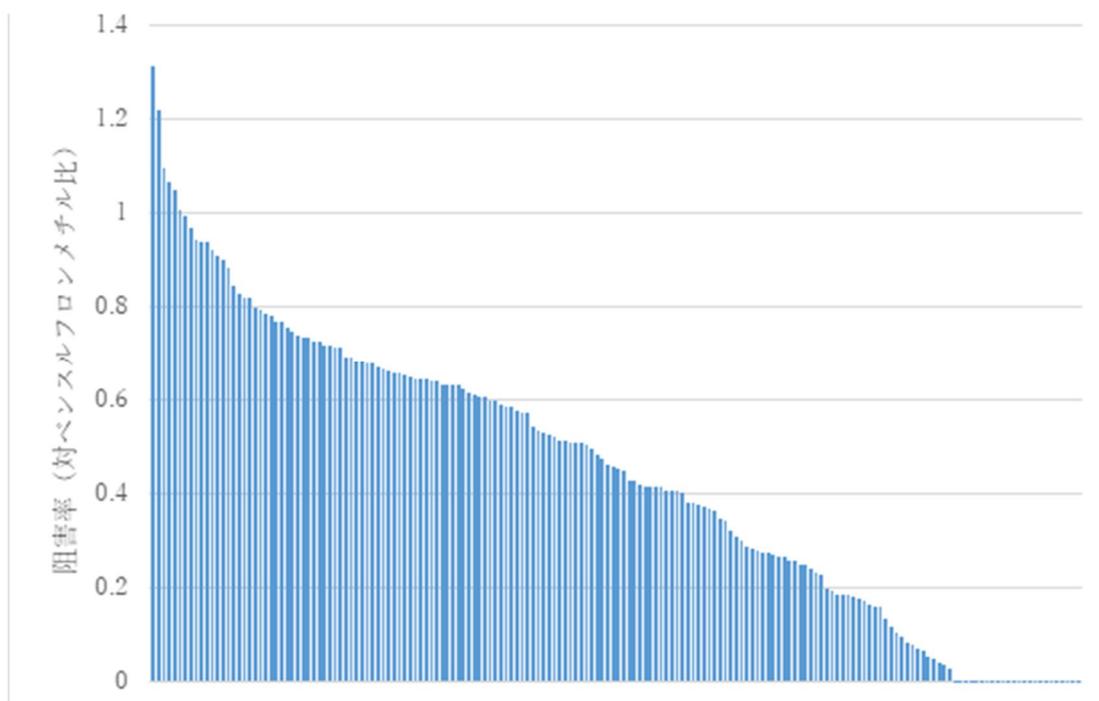


図 3 選抜化合物の阻害率

こから目視により 176 化合物を選抜し、うち実際に購入可能だった 174 の化合物を購入した。うち HeThDP-ALS の計算で得られた化合物は 106 個、ThDP-ALS の計算で得られた化合物は 91 個、重複は 23 個だった。

### (3) *in vitro* 活性測定

購入した化合物について ALS 活性の阻害能を測定し、市販農薬の一つ、ベンスルフロンメチルと比較した(濃度 60  $\mu$ M)。その結果、対ベンスルフロンメチル比で 90%以上の阻害を示す化合物が 13 個含まれており、最も高い阻害を示す化合物は対ベンスルフロンメチル比が 131%だった(図 3)。今後 IC50 を求めるなどさらに詳しく検討する必要があるが、本手法で効率よく阻害剤を探索できることが示された。

また、同様の計算を抵抗性雑草の主要な原因となるアセト乳酸合成酵素の変異体(P197A、P197S、W574L)に対しても立体構造モデルを構築して標的とし、計算を実施して解析した。今後変異体に対する阻害能を確認する。また、阻害能の強かった化合物と ALS の複合体の結晶化を現在進めている。

### < 引用文献 >

- Avram S, Funar-Timofei S, Borota A, Chennamaneni SR, Manchala AK and Muresan S (2014) Quantitative estimation of pesticide-likeness for agrochemical discovery. J. Cheminform. 6:42.
- Fukunishi Y, Mikami Y and Nakamura H (2003) The filling potential method: A method for estimating the free energy surface for protein-ligand docking. J. Phys. Chem. B 107:13201-13210.
- Fukunishi Y, Mikami Y and Nakamura H (2005) Similarities among receptor pockets and among compounds: analysis and application to *in silico* ligand screening. J. Mol. Graph. Model. 24:34-45.
- Fukunishi Y, Mitomo D and Nakamura H (2009) Protein-ligand binding free energy calculation by the Smooth Reaction Path Generation (SRPG) Method. J. Chem. Inf. Model. 49:1944-1951.
- Nguyen H, Tran T, Fukunishi Y, Higo J, Nakamura H and Le L (2015) Computational Study of Drug Binding Affinity to Influenza A Neuraminidase Using Smooth Reaction Path Generation (SRPG) Method. J. Chem. Inf. Model. 55:1936-1943.
- Trott O and Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J. Comput. Chem. 31:455-461.
- Wang JG, Lee PKM, Dong YH, Pang SS, Duggleby RG, Li ZM and Guddat LW (2009) Crystal structures of two novel sulfonylurea herbicides in complex with Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase. FEBS J. 276:1282-1290.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
連携研究者	山崎 俊正  (Yamazaki Toshimasa)  (40360458)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・センター長   (82111)	
連携研究者	藤本 瑞  (Fujimoto Zui)  (20370679)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生体高分子解析ユニット・ユニット長   (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関