

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19272

研究課題名(和文) X線結晶構造解析による新規農薬デザイン

研究課題名(英文) Design of novel insecticide by X-ray structure

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：Glutathione S-Transferase Unclassified 2 (GSTU2) は農薬・ダイアジンを殺虫活性のないグルタチオン抱合体へ代謝する。本研究では、GSTU2の構造と機能を解析する。Apo GSTU2結晶を得ることに成功し、この結晶を用いて回折データを収集した。その結果、分解能1.68 オングストロームの条件にて精密化を進めた。また、Pro13、Tyr107、Ile118、Tyr119、Phe211は基質結合に重要であった。TALENによりGSTU2ノックアウトカイコの作製に成功した。ノックアウトカイコにおいて、ダイアジノンに対するLD50値の低下が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術によりGSTU2ノックアウトカイコの作製に成功した。野生型カイコと比較した際、得られたノックアウトカイコにおいて、有機リン剤(ダイアジノン)に対するLD50値の低下が観察された。これは、当該ノックアウトカイコ体内において、GSTU2によりダイアジノンが代謝されないためにLD50値低下がおこったものと推察された。また、当該ノックアウトカイコ体内においてアセチルコリン量が増加していることが明らかとなった。ノックアウトカイコ中、GSTU2はアセチルコリンエステラーゼへ不可逆的に結合し、アセチルコリンエステラーゼはアセチルコリンを代謝できない機能不全に陥っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified an unclassified glutathione S-transferase 2 (GSTU2) in the silkworm *Bombyx mori*, a model for lepidopteran insect. In this study, we provide a structural and genome-editing characterisation of the GSTU2. The X-ray structure of GSTU2 was determined at 1.68 Å by X-ray crystallography. Mutation of putative amino acid residues in the substrate-binding site revealed that Pro13, Tyr107, Ile118, Phe119, and Phe211 are important for enzymatic function. Knock-out of GSTU2 gene influenced on median lethal dose values to an organophosphate insecticide and a decrease in acetylcholine levels in silkworms. The results suggest that GSTU2 may play an essential role in metabolism for an organophosphate insecticide.

研究分野：生物有機化学

キーワード：グルタチオン転移酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルタチオン転移酵素 (Glutathione S-transferase: GST) は代表的な第二相解毒酵素群のメンバーである。GST は、生体外異物に還元グルタチオンを抱合し、異物の可溶性を促進することで異物の体外への排出を促進する。多くの生物でゲノム配列が解明されつつある。それらのゲノム構造をもとに解析した際、GST は遺伝子ファミリーを形成すること、基質特異性の異なる複数のアイソザイムが存在すること等が明らかになってきた。

研究代表者は、昆虫のモデル生物であるカイコより delta、epsilon、omega、sigma、theta、zeta-class に属する GST ならびにいずれの class にも属さない 2 種の unclassified GST を同定してきた。それら GST の基質特異性について調査したところ、Glutathione S-Transferase Unclassified 2 (GSTU2) が農薬・有機リン剤 (ダイアジノン) を殺虫活性のないグルタチオン抱合体へ代謝することを見出した。

2. 研究の目的

本研究課題では、本酵素 (GSTU2) の立体構造ならびに生理機能などを明らかにする。以下にあげる項目を本研究課題の主たる目的とする。

- (1) GSTU2 の結晶化ならびに X 線立体構造解析
- (2) GSTU2 活性発現に重要なアミノ酸残基の同定
- (3) ゲノム編集により GSTU2 の生理機能について調査

3. 研究の方法

(1) GSTU2 の結晶化ならびに X 線立体構造解析
GSTU2 の組換えタンパク質を大腸菌内にて作製し電気泳動的に均一に精製した。この精製酵素を用いて apo - GSTU2 ならびにグルタチオン - GSTU2 の結晶作製を試みた。

(2) GSTU2 活性発現に重要なアミノ酸残基の同定
得られた apo - GSTU2 の結晶をもとに、Hg 原子を浸透させた重原子同形置換法により結晶構造解析を行なった。SPring8 にて回折データを取得した。

(3) ゲノム編集により GSTU2 の生理機能について調査
ゲノム編集として TALEN を使用した。すなわち、SV40 核移行シグナル、hsp90 プロモーターそして GFP 遺伝子を有するドナーベクターを GSTU2 遺伝子中に挿入することで GSTU2 遺伝子を破壊した。

4. 研究成果

(1) GSTU2 の結晶化ならびに X 線立体構造解析
apo - GSTU2 結晶を得ることに成功した。グルタチオン - GSTU2 の複合体結晶は未だ得られていない。そこで、共結晶そしてソーキング法を用いて複合体結晶作成を試み、複合体結晶は R1 年度中までに得ることはできなかった。

(2) GSTU2 活性発現に重要なアミノ酸残基の同定
apo - GSTU2 結晶を用いて回折データを収集した結果、分解能 1.68 オングストローム、R-work = 18.65% そして R-free = 22.10% の条件まで精密化を進めることができた。他 GST 構造との重ね合わせにより、5 個の残基 (Pro13、Tyr107、Ile118、Tyr119、Phe211) を基質結合に関与するアミノ酸として見出した。アミノ酸残基を部位特異的アミノ酸置換法によりこれらアミノ酸残基を Ala へ変異した。各組換え酵素を大腸菌にて発現し、精製した。すでに完成しているアッセイ法により、それぞれの変異が活性に及ぼす影響について調査した。酵素反応速度論的解析の結果、いずれの変異酵素においても大幅な活性低下が観察された。以上、これらのアミノ酸残基は GSTU2 活性に重要であることが示された。

次に、すでに得られている X 線結晶構造をもとに GSTU2 分子中のアミノ酸残基 Ser16、Asn102、Pro162、and Ser166 が electron-sharing network を構成していることを予測した。そこで、部位特異的アミノ酸置換法により当該アミノ酸残基を Ala に置換した変異体を作製し、酵素反応速度論的解析を実施した。野生型 GSTU2 と比較した際、いずれの変異体においても GST 標準基質である 1,2 - ジロロニトロベンゼンに対する触媒活性 (kcat/Km) の低下が観察された。また、ダイアジノン分解活性を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。その結果、いずれの GSTU2 変異体もダイアジノン分解活性を示さなかった。これらの結果より、GSTU2 分子中の Ser16、Asn102、Pro162、and Ser166 は GSTU2 活性発現において重要であることがわかった。これらの各残基は electron-sharing network を構成メンバーであり、共同して電子の受け渡しに寄与していることが示唆された。

(3) ゲノム編集により GSTU2 の生理機能について調査
ゲノム編集技術 (TALEN) により GSTU2 ノックアウトカイコの作製に成功した。

野生型カイコと比較した際、得られた GSTU2 遺伝子ノックアウトカイコにおいて、有機リン剤（ダイアジノン）に対する LD50 値の低下が観察された。これは、当該ノックアウトカイコ体内において、GSTU2 によりダイアジノンが代謝されないために LD50 値低下がおこったものと推察された。また、当該ノックアウトカイコ体内においてアセチルコリン量が増加していることが明らかとなった。当該ノックアウトカイコ中、GSTU2 はアセチルコリンエステラーゼへ不可逆的に結合し、アセチルコリンエステラーゼはアセチルコリンを代謝できない機能不全に陥っていることが示唆された。

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, 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 Mohammad R. Haque, Akifumi Higashiura, Atsushi Nakagawa, Aiko Hirowatari, Shigeki Furuya, and Kohji Yamamoto	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, 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 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 planthopper, Nilaparvata lugens	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Md. Rezwatul Haque, Nonoko Nai, Aiko Hirowatari, Shigeki Furuya, and Kohji Yamamoto
2. 発表標題 Identification and characterization of the serine hydroxymethyl transferase from silkworm, Bombyx mori
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 Kohji Yamamoto, David K. Wilson
2. 発表標題 Identification and characterization of a novel AKR from the silkworm, Bombyx mori
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

1. 発表者名 Md. Rezwanul Haque, Aiko Hirowatari, Shigeki Furuya, Kohji Yamamoto
2. 発表標題 Identification and characterization of the 5, 10- Methylene- tetrahydrofolate dehydrogenase from silkworm (Bombyx mori)
3. 学会等名 2017 AFELISA (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究 分担者	山田 直隆 (Yamada Naotaka) (20304769)	九州大学・農学研究院・助教 (17102)	