

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06051

研究課題名(和文) エクジステロイド結合部位に結合可能な非ステロイド型化合物の創製

研究課題名(英文) Molecular design of non-steroidal ecdysone-like compounds

研究代表者

中川 好秋 (Nakagawa, Yoshiaki)

京都大学・農学研究科・研究員

研究者番号：80155689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脱皮ホルモン受容体には、天然のステロイドホルモンの結合する部位と非ステロイド型化合物であるジベンゾイルヒドラジンやイミダゾール誘導体が結合する部位は異なることが分かっている。今回は、ステロイド化合物の結合部位に結合可能な化合物を探索することで、すべての昆虫に活性を示す非ステロイド化合物を見出すことを目的とした。実際にソフトウエアを使って、新規化合物を見出した。また、ステロイド結合部位の情報を得るために、それぞれの化合物の結合自由エネルギーを計算して受容体結合親和性との活性を調べて、相関関係を見出した。この結果は今後のインシリコスクリーニングに役立つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイド型の脱皮ホルモン誘導体の活性を定量的に調べ、さらにリガンド-受容体結合エネルギーとの間に正の相関関係を見出した。このことは、インシリコスクリーニングの精度の上昇に繋がるとともに、他の受容体結合親和性リガンドの探索にとっても有用な結果をもたらす。500万化合物の構造データベースを用いて、インシリコスクリーニングを行い、そこから、脱皮ホルモン受容体に結合可能な候補化合物を見出した。その化合物の結合親和性は天然の脱皮ホルモンの親和性に比べて、活性の低いものであったが、構造展開を行って活性を上昇させることができた。さらに結合親和性を上げることにより、殺虫性化合物を見出すことができる。

研究成果の概要(英文)：It is known that the binding sites of natural steroid hormones to the molting hormone receptor differ from those of dibenzoylhydrazine and imidazole derivatives, which are non-steroidal compounds. In this study, we aimed to find non-steroidal compounds that are active against all insects by searching for compounds that can bind to the binding sites of natural steroidal hormones such as 20-hydroxyecdysone and ponasterone A. In this study the software for in silico screening was used to find new compounds. To obtain the information for the ligand binding to the receptor, the molecular dynamics and the binding energy calculation were performed. Here, the binding free energy of compounds were positively correlated with their receptor binding. This result will be useful for the future in silico screening.

研究分野：生物調節化学

キーワード：ecdysone ecdysone receptor dibenzoylhydrazine in silico screening receptor binding molting hormone

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫の脱皮ホルモンは 20-ヒドロキシエクダイソン(20E)と呼ばれるステロイドホルモンである。20E の化学構造が決定されたのは 1960 年代前半で、1965 年には X 線結晶構造解析によってその立体構造も明らかにされた(。その後脱皮ホルモン様活性を示すステロイド化合物が、次々に動植物から単離同定された。その中で、植物のマキから単離されたポナステロン A (Ponasterone A: PonA)は、20E よりも強いホルモン活性を示したが(Nakanishi et al., 1966)、殺虫活性は低く、実用には至らなかった。しかし、1988 年に、非ステロイド化合物であるジベンゾイルヒドラジン(ジアシルヒドラジン)系化合物に脱皮ホルモン様活性が見出され(Wing et al., 1988)、tebufenozide が農業用殺虫剤として実用化された。その後さらに構造展開が行われて、methoxyfenozide, chlomafenozide, fufenozide, halofenozide が実用化された(図 1)。Halofenozide は鱗翅目や甲虫目に対する殺虫剤として利用されているが、他の 4 つの化合物は鱗翅目昆虫に対する殺虫剤として利用されている。

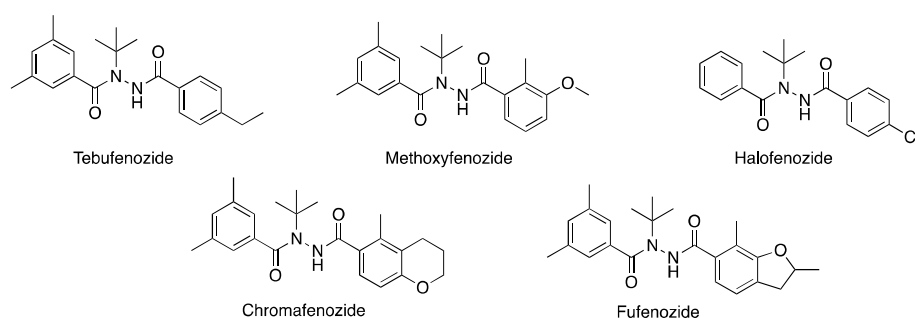


図 1 . 農業用殺虫剤として実用されている化合物の構造

一方で、脱皮ホルモンの受容体に関する研究も行われて、1991 年にショウジョウバエの遺伝子解析によって脱皮ホルモン受容体(Ecdysone receptor: EcR)の一次配列が明らかになった。さらに、EcR はレチノイド X 受容体(RXR)のホモログであるウルTRASピラクル(USP)というタンパク質とヘテロダイマーを形成して、脱皮関連遺伝子を活性化することも明らかにされた。その後、その後、様々な昆虫から EcR と USP の一次配列が明らかにされた。EcR に関しては、DNA 結合領域は昆虫間で高度に保存されているが、脱皮ホルモンの結合領域、すなわちリガンド結合領域(LBD)が昆虫目間で異なることが示された。この LBD の配列に違いがあることで、非ステロイド型脱皮ホルモン様活性化化合物が昆虫目間で選択毒性を発揮すると考えられた。実際に受容体に対する脱皮ホルモンアゴニストの親和性を測定すると、殺虫剤として登録されている tebufenozide, methoxyfenozide, chlomafenozide, fufenozide の鱗翅目昆虫の脱皮ホルモン受容体に対する親和性は非常に高いことが明らかになった。そして、2003 年に EcR の LBD の立体構造が X 線結晶構造解析で明らかにされて(Billas et al., 2003)、PonA の結合様式が明らかとなった。同時にジアシルヒドラジン系化合物の結合様式も解明された。その結果、20E や PonA などのステロイド化合物が結合しているポケットとジアシルヒドラジン系化合物が結合しているポケットは、完全に一致するわけではなく、20E のヒドロキシアルキル側鎖とジベンゾイルヒドラジン類のベンゾイル部の結合する領域が共通であることが示された。さらに、ジアシルヒドラジン類とは基本構造の異なるイミダゾール系化合物にも脱皮ホルモン活性のあることが報告された。イミダゾール系化合物に関しても受容体との共結晶構造が明らかにされて、ジアシルヒドラジン系化合物と同じポケットに結合していることが示された。

本研究者のグループは、20E や PonA のようなステロイド化合物の構造を模倣する化合物を、コンピューターを用いて約 200 万化合物の化学構造データベースから探索し (Ligand-based virtual screening: LBVS), 24 個の化合物に絞り込んだ。さらに、その中の 15 化合物を入手し、実際に受容体結合親和性を評価したところ、3 つの化合物に活性が見出された (Harada et al., 2011)。また、ホモロジーモデリングの手法を用いて *Spodoptera furugiperda* の EcR の LBD の立体構造を構築し、LBD に結合可能な新規な化学構造を探索した (Structure-based virtual screening: SBVS)。化合物を入手し、その活性を評価して 5 つの化合物に活性を見出すことができた (Horoiwa et al., 2019)。しかしながら、新規化合物の活性は、PonA や殺虫剤として実用されているジベンゾイルヒドラジン類の活性に比べると 1/1000 程度であった。また、本研究者のグループは、SBVS の手法を用いて、植物ステロイドホルモンであるブラシノライド様活性化合物のバーチャルスクリーニングを実施して、非ステロイド型ブラシノライド様活性化合物 NSBR1 を発見した (Sugiura et al., 2017)。

## 2. 研究の目的

脱皮ホルモン様活性を示すジベンゾイルヒドラジン類は鱗翅目 (チョウ目) 昆虫に対しては高い殺虫活性を示すが、それ以外の昆虫目に対しては殺虫活性を示さない。その原因は、ジアシルヒドラジン類の EcR への結合部位が、本来の昆虫脱皮ホルモンの結合部位とは若干異なり、結合親和性が、昆虫目間で大きく異なることである。そこで、本研究では、殺虫スペクトルの広い脱皮ホルモン様活性化合物を見出すことを目的とする。その遂行の為に、コンピューターを使った LBVS や SBVS の手法を利用する。さらに、バーチャルスクリーニングで得られた候補化合物を購入あるいは合成し、それらの活性を実測する。

## 3. 研究の方法

1) インシリコスクリーニング: EcR の LBD をホモロジーモデリングの手法を用いて構築する。活性評価は主として Sf-9 という昆虫細胞を用いて行うことから、*Spodoptera furugiperda* の EcR の LBD を構築する。また、約 500 万化合物の化学構造をもとに化合物あたり約 200 個の立体構造を発生させ、約 10 億個の立体構造を得る。これら約 10 化合物を順次ドッキングさせて LBD に結合可能な構造を選抜する。その際、ドッキングスコアの利用、分子動力学 (Molecular dynamics: MD) の利用、MM/PBSA を用いた結合自由エネルギーの計算などを行って、候補化合物の選抜を行う。また、Langer によって開発された LigandScout を使い、PonA が結合した EcR/LBD の PDB データを使って、スクリーニングを行う。立体構造が明らかにされている EcR はタバコ蛾のものであるが、ステロイド結合様式は昆虫間でそれほど変わらないことから、ステロイド結合ポケットに結合できる化合物の探索には差し支えない。

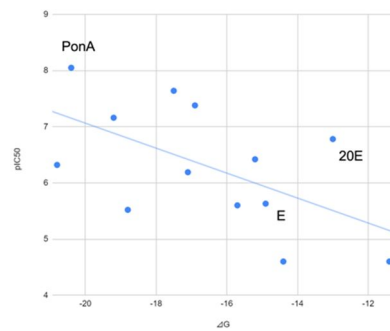
### 2) 生物活性評価

脱皮ホルモン様活性は放射性リガンド結合実験によって行う。<sup>3</sup>H]PonA と昆虫細胞を 30 分間インキュベートし、ガラスフィルターを使ってろ過し、ガラスフィルターを液体シンチレーションカウンターで計測する。定量的活性評価は、濃度応答曲線から <sup>3</sup>H]PonA の結合を 50% 阻害する濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めて、その逆対数 pIC<sub>50</sub> を活性の指標

とした。

#### 4. 研究成果

ハンガリーの Attila らと共同研究を行い Attila らが植物から単離構造決定した脱皮ホルモンのアゴニスト（ステロイド化合物）の活性評価を行った。20E（図2）は、ステロール骨格(A/B/C/D)のD環の17位にヒドロキシアルキル側鎖をもった化合物である。ヒドロキシアルキル側鎖の20位にOHを持たない ecdysone (E)（図2）の活性は20Eの



1/50 - 1/100 程度である。また、20Eのヒドロキシアルキル側鎖末端の25位にOH基がない ponasterone A (PonA)（図2）は20Eよりも20-30倍高い活性を持つ。PonAのC環の9位と11位のC-C結合が2重結合となった化合物は、PonAに比べて活性は1/3に低下するが、20Eよりは10倍程度高い活性を示した。C環D環の縮合部位である14位に水酸基を持たない化合物も比較的高い活性を示した。これらステロイド化合物をEcRにドッキングさせてMDのあとMM/PBSAによって結合自由エネルギーを計算したところ、Sf9細胞を用いて求めた結合親和性と結合自由エネルギー- $\Delta G$ との間に正の相関関係が得られた。

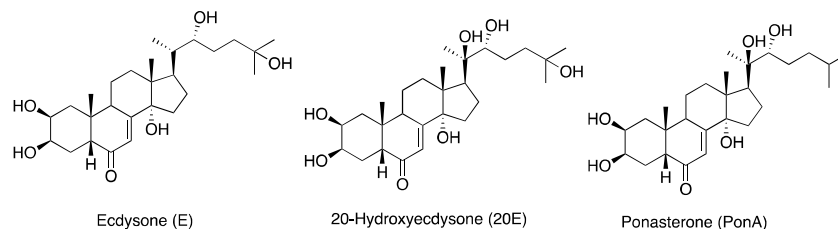


図2. 天然の脱皮ホルモン類の構造

LigandScout を用いて、500 万化合物の化学構造データベースからスクリーニングを行ったところ、40 個の候補化合物が得られた。この40 個の化合物は基本構造に-CH<sub>2</sub>=N-NH-C(=O)-を持つ化合物であった。その中の一つは、図3に示した化合物2であった。上述したように、本研究者らのグループは先に、LBVSの手法を用いて、EcRのステロイド化合物結合部位に結合可能な3つの化合物を見出し、その中の一つの化合物の基本構造は図の化合物1であった (Harada et al., 2011)。そこで、今回得られた基本構造とこれ化合物1との共通性を考慮し、さらには受容体に対するドッキングスコアを参考にして構造展開を行った、その際、植物ステロイドホルモンであるブラシノステロイド様活性を示す非ステロイド化合物 NSBR1 (Sugiura et al., 2017) のインシリコスクリーニングの情報をもとにして、IC<sub>50</sub> が 10  $\mu$ M の新規な化合物3を見出した。

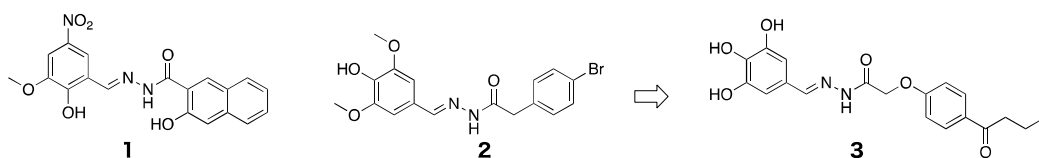


図3. Sf9の脱皮ホルモン受容体に結合する化合物

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Christopher Browning, Alastair G. McEwen, Kotaro Mori, Taiyo Yokoi, Dino Moras, Yoshiaki Nakagawa, Isabelle M. L. Billas	4. 巻 46
2. 論文標題 Nonsteroidal ecdysone receptor agonists use a water channel for binding to the ecdysone receptor complex EcR/USP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 88-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.D20-095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Minori Ueno, Taiyo Yokoi, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa	4. 巻 46
2. 論文標題 Receptor-binding affinity and larvicidal activity of tetrahydroquinoline-type ecdysone agonists against <i>Aedes albopictus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 101-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.D20-089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 杉浦愛理, 幌岩真理, 青木孝憲, 瀧本征佑, 山上あゆみ, 中野雄司, 中川好秋, 宮川恒	4. 巻 44
2. 論文標題 平成31年度論文賞対象論文の概要とその研究背景	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 164 - 165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.W19-52	査読の有無 無
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 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	4. 巻 9
2. 論文標題 Genome-wide identification of tebufenozide resistant genes in the smaller tea tortrix <i>Adoxophyes honmai</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40863-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinri Horoiwa, Taiyo Yokoi, Satoru Masumoto, Saki Minami, Chiharu Ishizuka, Hidetoshi Kishikawa, Shunsuke Ozaki, Shigeki Kitsuda, Yoshiaki Nakagawa and Hisashi Miyagawa	4. 巻 27
2. 論文標題 Structure-based virtual screening for insect ecdysone receptor ligands using MM/PBSA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 1065-1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.02.011	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 Yokoi Taiyo, Nakagawa Yoshiaki, Miyagawa Hisashi	4. 巻 75
2. 論文標題 Asymmetric synthesis of tetrahydroquinoline type ecdysone agonists and QSAR for their binding affinity against <i>Aedes albopictus</i> ecdysone receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pest Management Science	6. 最初と最後の頁 115 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ps.5160	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 Ito Harashima Sayoko, Matsuura Mai, Takada Eiji, Kawanishi Masanobu, Nakagawa Yoshiaki, Yagi Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Detection of juvenile hormone agonists by a new reporter gene assay using yeast expressing <i>Drosophila</i> methoprene tolerant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2774 ~ 2783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13277	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 T?th G?bor, Herke Ibolya, G?ti Tam?s, V?gv?lgyi M?t?, Berkecz R?bert, Parfenova Lyudmila V., Ueno Minoru, Yokoi Taiyo, Nakagawa Yoshiaki, Hunyadi Attila	4. 巻 84
2. 論文標題 A Commercial Extract of <i>Cyanotis arachnoidea</i> Roots as a Source of Unusual Ecdysteroid Derivatives with Insect Hormone Receptor Binding Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1870 ~ 1881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c01274	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

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 上野美乃李、横井大洋、中川好秋、宮川恒
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第44回日本農業学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野美乃李、横井大洋、中川好秋、宮川恒
2. 発表標題 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
3. 学会等名 農芸化学会 関西支部・中部支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Yokoi, M. Ueno, Y. Nakagawa, H. Miyagawa
2. 発表標題 ASYMMETRIC SYNTHESIS AND QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF TETRAHYDROQUINOLINES AS POTENT ECDYSONE RECEPTOR LIGANDS
3. 学会等名 IUPAC2019 Ghent Crop Protection Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Nakagawa <sup>1</sup> , S. Takimoto <sup>1</sup> , M. Matsuo <sup>1</sup> , S. Hinata <sup>1</sup> , A. Sugiura <sup>1</sup> , A. Yamagami <sup>2</sup> , T. Nakano <sup>2</sup> , H. Miyagawa
2. 発表標題 DESIGN OF NOVEL NON-STEROIDAL BRASSINOLIDE-ACTIVE COMPOUND BY PHARMACOPHORE-BASED VIRTUAL SCREENING
3. 学会等名 IUPAC2019 Ghent Crop Protection Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野美乃李、横井大洋、中川好秋、宮川恒
2. 発表標題 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活性相関
3. 学会等名 日本農薬学会 第34回農薬デザイン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川好秋
2. 発表標題 リガンド-受容体複合体をもとにした農薬の分子設計とHansch-Fujita法による最適化
3. 学会等名 第47回構造活性相関シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野美乃李、横井大洋、中川好秋、宮川恒
2. 発表標題 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活性相関研究
3. 学会等名 第47回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiaki Nakagawa
2. 発表標題 Insect growth regulators (IGRs) as plant protection agents
3. 学会等名 PacifiChem2021(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Yoshiaki Nakagawa
2. 発表標題 Modification of a non-steroidal brassinolide-like compound, NSBR1
3. 学会等名 PacifiChem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Yokoi, T. Nabe, S. Horoiwa, K. Hayashi, S. Ito-Harashima, T. Yagi, H. Miyagawa, Y. Nakagawa,
2. 発表標題 Virtual screening to identify insect juvenile hormone agonists
3. 学会等名 PacifiChem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Unsworth J, Nakagawa Y, Harris C, Kleter G.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Switzerland AG 2019	5. 総ページ数 72
3. 書名 Sustainable Agrochemistry	

〔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

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