

昆虫ステロイドホルモン生合成調節因子 Noppera-bo の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of the insect steroidogenic regulator Noppera-bo

丹羽隆介^{1*}, 諸橋香奈¹, 小祝孝太郎², 湯本史明², 千田俊哉²

¹筑波大学・生命環境系, 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

²高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学研究センター, 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Ryusuke Niwa^{1*}, Kana Morohashi¹, Kotaro Koiwai², Fumiaki Yumoto² and Toshiya Senda²

¹Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, 305-8572, Japan

²Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science, KEK/High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

1 はじめに

環境にもヒトにも優しい殺虫剤は、世界の食料増産や衛生環境の維持に重要な役割を果たしている。しかし、大量にかつ単一的に利用される殺虫剤に対して害虫はしばしば強力な抵抗性を獲得する。よって、優れた新規殺虫剤を継続的に開発して適切に利用することは、害虫管理の観点から社会的に重要な課題である。害虫に対する高い殺傷能・成長阻害能を示しつつも、昆虫以外の生物に対して副作用がない薬剤の開発方法として、昆虫特有の生命現象を攪乱する「昆虫成長制御剤 (IGR)」の探索がある。そして、昆虫の脱皮および変態の誘導を司る昆虫ステロイドホルモン「エクジステロイド」の生合成過程を攪乱する薬剤を開発できれば、優れた IGR となる可能性が古くから指摘されている[1]。

申請者らは最近、新規エクジステロイド生合成関連酵素 Noppera-bo が、エクジステロイド生合成に特化した役割を持つグルタチオン S-転移酵素 (GST) であることを報告した[2-4]。さらに申請者らは、Noppera-bo 精製組換えタンパク質を活用し、創薬等支援技術基盤プラットフォームの東京大学創薬機構のご協力をいただき、センターの所有する 1 万種類の化合物コアラライブラリーの中から Noppera-bo の酵素活性を阻害する化合物を迅速に探索するスクリーニング系を開発し[5]、複数の阻害剤の発掘に成功した (未発表)。阻害活性を持つこれらの化合物は、IGR 開発の重要なシーズとなることが期待できる。

一方で、さらに高阻害活性を持つ化合物を探索する、あるいは合成展開によって開発する上では、これらの化合物と Noppera-bo との分子レベルでの相互作用を把握することが必須である。しかし、これらの化合物が Noppera-bo とどのように物理的に相互作用するのか解明されていない。この理解のためには、Noppera-bo タンパク質の立体構造を把握することが必須である。

そこで本研究では、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、ハマダラカ *Anopheles gambiae*、そしてコナガ *Plutella xylostella* に由来する

Noppera-bo 組換えタンパク質の取得と結晶化を行い、Noppera-bo タンパク質の立体構造を解くことを目的とした。また、我々が同定した Noppera-bo 酵素活性阻害化合物との共結晶を得て、これらの立体構造の解析を試みた。

2 実験

上述の 3 種の昆虫由来の *noppera-bo* 遺伝子コーディング配列を、pCOLD III ベクター (タカラバイオ) に挿入したプラスミドを構築した。これらのプラスミドを用いて形質転換した大腸菌株 BL21 を得た。これらの BL21 株を標準プロトコルに従って 15°C でタンパク質誘導を行い、その後 Glutathione Sepharose 4B ビーズ (GE ヘルスケア) およびゲルろ過カラムを用いて精製をした。

得られたタンパク質のアポ体の結晶の取得はナノリッター分注システム (mosquito[®]) を利用して条件検討した。これにより、キイロショウジョウバエ Noppera-bo のアポ体結晶は、30% PEG3350 (pH 5.3) および、42.5% PPG P400 (pH 6.5) の溶液条件で再現性よく得られることを見出した。

アポ体結晶を利用した複合体結晶の取得に際しては、すでに我々が同定している候補化合物群から β エストラジオール [5] およびグルタチオンの溶液にアポ体結晶をソーキングした。これらのアポ体の結晶あるいは化合物に浸した結晶に対して、ビームライン BL-1A、BL-5A および BL-17A にて X 線照射を実施し、回折データを収集の後、分子置換法で構造決定を試みた。

3 結果および考察

我々は、3 種類の Noppera-bo のうち、キイロショウジョウバエ由来の Noppera-bo の高純度精製とアポ体の結晶化に成功した。一方で、ハマダラカ由来の Noppera-bo については高純度の精製タンパク質を得ることはできたものの、適切な結晶化条件を見出すことはできなかった。また、コナガ由来の Noppera-bo についてはタンパク質を適切に精製することがで

きなかった。よって、2015 年度中の解析はキイロシヨウジョウバエ由来の Noppera-bo に集中した。

我々は、アポ体結晶の Noppera-bo 組換えタンパク質だけでなく、候補阻害化合物とグルタチオンが結合した複合体結晶の取得にも成功した。これらの結晶の構造解析を目指し、回折データを収集した。現在、分子置換法による構造決定と精密化を進めている。

4 まとめ

今後、Noppera-bo タンパク質と阻害化合物の分子レベルでの相互作用様式を解明していきたい。また、得られた情報を元に Noppera-bo タンパク質と化合物との相互作用を変えるような様々な変異を導入した際に、候補化合物に対する感受性および結合状態が変わるかどうかを検討することで、より活性の高い化合物の創出のための知見を得たい。

一方、2015 年度中には、農業害虫および衛生害虫として社会的に重要なコナガとハマダラカの Noppera-bo タンパク質の立体構造を解くことはできなかった。今後、精製条件や結晶化条件のさらなる検討を進めていきたい。

謝辞

本研究は、創薬等支援技術基盤プラットフォームおよび高エネルギー加速器研究機構の多くの方々のご支援を受けて本研究を実施することができました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 丹羽隆介, *化学と生物*, **54**: 508-513.
- [2] S. Enya *et al.*, *Sci. Rep.* **4**: 6586 (2014).
- [3] H. Chanut-Delalande *et al.* (2014) *Nat. Cell Biol.*, **16**: 1035-1044 (2014).
- [4] S. Enya *et al.*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **61**: 1-7 (2015).
- [5] Y. Fujikawa *et al.*, *Chem. Commun.* **51**: 11459-11462 (2015).

* ryusuke-niwa@umin.ac.jp