

昆虫グルタチオン S-転移酵素 Noppera-bo の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of the insect glutathione S-transferase Noppera-bo

小祝孝太郎¹, 稲葉和恵², 湯本史明¹, 千田俊哉¹, 丹羽隆介^{2,*}

¹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

²筑波大学・生命環境系, 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

Kotaro Koiwai¹, Kazue Inaba², Fumiaki Yumoto¹, Toshiya Senda¹ and Ryusuke Niwa^{2,*}

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

²Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, 305-8572, 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、新規グルタチオン S-転移酵素 (GST) Noppera-bo が、エクジステロイド生合成に特化していることを報告した[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、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。

我々は、X 線結晶構造解析を用いて、Noppera-bo タンパク質の生体内における標的化合物を同定し、その化合物情報をもとに、高阻害活性を持つ化合物

を合成展開する計画である。本研究では、キイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* およびネッタイシマカ *Aedes aegypti* に由来する Noppera-bo タンパク質を精製、結晶化し、阻害剤を含む溶液にその結晶をソーキングすることによって、Nobo と阻害剤との相互作用様式の解明を目指した。

2 実験

我々は、2016 年度および 2017 年度にキイロシヨウジョウバエ由来およびネッタイシマカ由来の Noppera-bo タンパク質を高い収量で得、高分解能の結晶を再現性良く得ることができる条件を見出した。

本年度は、昨年度までに引き続き、その条件下で作成したアポ体の結晶を、阻害剤各種およびグルタチオンとともにソーキングし、単離した結晶を、ビームライン BL-1A、BL-5A、BL-17A および AR-NE-3A にて X 線回折データを収集の後、分子置換法によって位相を決定し、自動構造精密化を行った後、キイロシヨウジョウバエおよびネッタイシマカの Noppera-bo の基質結合ポケットの電子密度を観察した。

3 結果および考察

キイロシヨウジョウバエ Noppera-bo の結晶をキイロシヨウジョウバエ成虫の各種抽出物にソーキングした結晶を用いて、X 線回折実験を行った結果、キイロシヨウジョウバエ成虫の純水抽出物にソーキングした結晶から得られたデータにおいて、基質結合ポケット内に特徴的な電子密度を見出した。

以前の研究から我々は、阻害剤の 1 つである β -estradiol と Noppera-bo との認識には、 β -estradiol と Noppera-bo の 113 番目のアスパラギン酸との間の水素結合が重要であることが示唆されていた。今回の結果からは、 β -estradiol 以外でもこの残基との水素結合が認められた。このことから、113 番目の残基を介した水素結合は Noppera-bo の阻害メカニズムの共通性の一端と考えられた。

4 まとめ

今後、まだ試験できていない阻害剤を用いたソーキング実験を継続したい。ネッタイシマカ *Noppera-bo* の結晶は、シヨウジョウバエのその結晶に比べて、ソーキングに対して脆弱である傾向が認められた。それゆえに、ネッタイシマカ *Noppera-bo* を用いたソーキングにまだ成功していない化合物が多数ある。今後、ソーキングの条件出しをさらに詳細に行うことで、ハエだけでなくネッタイシマカのデータを充実させていきたい。

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