

フィチン酸生合成酵素の阻害剤開発に向けた X 線結晶構造解析 X-ray crystallography for drug discovery targeting a phytic acid biosynthetic enzyme

赤羽根健生^{1,2}, 青木耀大³, 廣津直樹^{1,3}, 加藤悦子^{4*}

¹ 東洋大学大学院生命科学研究科, 〒351-8510 埼玉県朝霞市岡 48-1

² 理化学研究所 計算科学研究センター, 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

³ 東洋大学生命科学部, 〒351-8510 埼玉県朝霞市岡 48-1

⁴ 東洋大学食環境科学部, 〒351-8510 埼玉県朝霞市岡 48-1

Tatsuki AKABANE^{1,2}, Yota AOKI³, Naoki HIROTSU^{1,3} and Etsuko KATOH^{4*}

¹ Graduate School of Life Sciences, Toyo University, 48-1 Oka, Asaka, Saitama, 351-8510, Japan

² RIKEN Center for Computational Science,

1-7-22 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa, 230-0045, Japan

³ Faculty of Life Sciences, Toyo University, 48-1 Oka, Asaka, Saitama, 351-8510, Japan

⁴ Faculty of Food and Nutritional Sciences, Toyo University,
48-1 Oka, Asaka, Saitama, 351-8510, Japan

1 はじめに

国際的な食糧問題の解決に向けて、アジアを中心に世界人口の半数以上が主食とするイネの品質改善が急務となっている。イネの玄米に蓄積されるフィチン酸は亜鉛や鉄とキレート結合し、それらのヒト体内吸収効率を低下させる。これまでに、玄米中フィチン酸含量の低減を目指して、フィチン酸生合成メカニズムが調査され、その生合成経路や複数の生合成遺伝子が明らかとなっている。

Myo-inositol 3-phosphate synthase 1 (INO1) は、フィチン酸生合成経路の初発反応を担い、玄米中のフィチン酸含量を制御する鍵遺伝子であることが報告されている。そのため、*INO1* 遺伝子は玄米中のフィチン酸を低減させ、イネの栄養価を改善する上で有効な標的として注目されている。実際に、*INO1* 遺伝子を欠損させた変異体イネが開発され、玄米中フィチン酸含量の顕著な減少によって、玄米品質が改善されることが知られている。

一方で、種子中のフィチン酸は発芽や個体のストレス応答にも寄与するため、*INO1* 遺伝子の遺伝的改良では、発芽率や生育が著しく低下することが示されている。つまり、*INO1* 遺伝子を含むフィチン酸生合成遺伝子の多面発現効果によって、遺伝的手法による低フィチン酸イネの作出は困難であると考えられる。薬剤散布などによって *INO1* を時期および器官特異的に阻害することができれば、作物生産への副作用を回避しながら玄米中のフィチン酸含量を減少させることが可能になると期待できる。そこで本研究プロジェクトでは、*INO1* の特異的阻害剤を開発し、玄米のフィチン酸含量を化学的に低減させることを最終目標とした。本申請課題では、創薬の分子基盤情報となる *INO1* の立体構造を明らかにするため、X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

大腸菌のコドン頻度に合わせて最適化された *INO1* 遺伝子を化学的に合成した。合成した *INO1* 遺伝子を pET-32a に挿入し、リコンビナント *INO1* の大腸菌発現用コンストラクトを作製した。大腸菌 BL21(DE3) に作製したコンストラクトを形質転換した。LB 培地で組換え大腸菌を培養し、IPTG の添加によってリコンビナント *INO1* の発現を誘導した。ÅKTA Explorer (Cytiva) および精製カラム各種を用いた液体クロマトグラフィーによって、抽出したリコンビナント *INO1* の精製を行った。

Sitting-drop vapor diffusion 法によって精製したリコンビナント *INO1* の結晶を作製した。BL-1A において、X 線回折実験を実施した。

3 結果および考察

X 線回折実験の結果、分解能 1.79 Å の回折データが取得された。既に結晶構造が解析済みであり、イネ由来の *INO1* と 50% 以上のアミノ酸配列同一性を示す酵母由来 *INO1* の立体構造をもとに分子置換を行い、得られた回折データからモデル構造を構築した (図 1)。*INO1* は nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) を補酵素に用いて、基質の glucose 6-phosphate (G6P) から inositol 1-phosphate の異性化を触媒する酵素である。先行研究においても、*INO1* とその補酵素および基質の反応中間体 (NADH および 5-keto-G6P) との複合体結晶構造が明らかになっている。本研究で解析した *INO1* の結晶構造において、基質認識部位に電子密度が確認されたため、それらの分子モデルを当該電子密度に当てはめたところ、良好に適合することが確認された。したがって、作製した *INO1* の結晶には、発現・精製過程から持ち

込まれた補酵素や基質由来分子が結合していることが示唆された (図 2)。

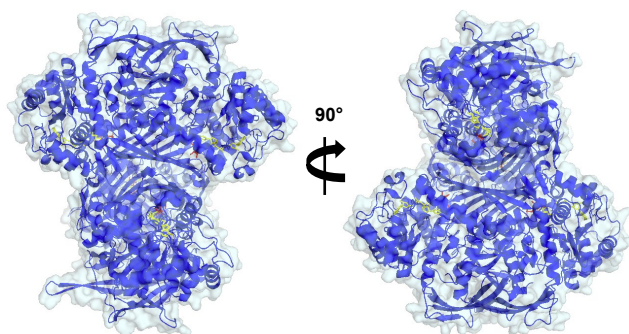


図 1 : リコンビナント INO1 の立体構造

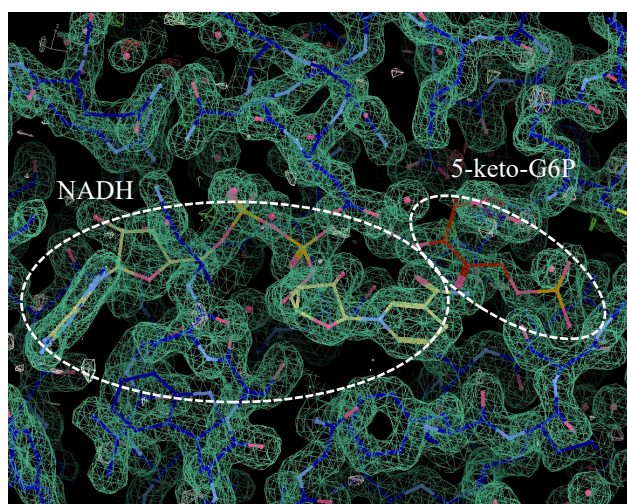


図 2 : リコンビナント INO1 の基質認識部位の電子密度マップ

4 まとめ

本研究によって阻害剤開発の分子基盤となる INO1 の立体構造が明らかとなった。一方で、その基質認識部位には補酵素や基質が持ち込みで相互作用していることが示された。したがって、INO1 と候補化合物などとの複合体構造を解析するためには、リコンビナント INO1 の発現・精製段階を含め、実験条件の最適化が必須となる。計算化学によるドッキングシミュレーションなどを補助的に使用しながら、より詳細な創薬の構造基盤情報の取得を目指していく。

謝辞

X 線回折実験を行うにあたりご協力いただいた Photon Factory のビームラインスタッフの皆様にご心よ

り感謝申し上げます。本研究は、科研費 23K05066 の支援を受けたものです。

成果

- (1) Akabane *et al.* “Chemical inhibition of INO1 reduces phytic acid in rice and wheat grains for enhanced micronutrient bioavailability” *Nature Food* 7 (2026) 163–173
- (2) 赤羽根ら “穀物のフィチン酸含量を低減させる薬剤の探索” 日本作物学会第259回講演会、78、神奈川県藤沢市、2025年3月 (口頭発表) ※優秀発表賞受賞
- (3) Akabane *et al.* “Development of low phytic acid cereals based on chemical intervention” the 11th International Conference on Agriculture 2024, A 453, Bangkok, Thailand, September, 2024 (口頭発表)
- (4) 赤羽根ら “イネのフィチン酸含量を低減させる INO1 アンタゴニストの開発を目指した薬剤探索” 第65回日本植物生理学会年会、2aB06、兵庫県神戸市、2024年3月 (口頭発表)

参考文献

- (1) Perera *et al.* Manipulating the Phytic Acid Content of Rice Grain Toward Improving Micronutrient Bioavailability. *Rice* 11 (2018) 4.
- (2) Perera *et al.* Expression regulation of myo-inositol 3-phosphate synthase 1 (INO1) in determination of phytic acid accumulation in rice grain. *Scientific Reports* 9 (2019) 14866.
- (3) Kuwano *et al.* Generation of stable 'low phytic acid' transgenic rice through antisense repression of the 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase gene (RINO1) using the 18-kDa oleosin promoter. *Plant Biotechnology Journal* 7 (2009) 96-105.
- (4) Zhou *et al.* Rice ins(3)P synthase1 (RINO1) participates in embryonic development by regulating inositol-associated changes in auxin synthesis and its distribution. *Physiologia Plantarum* 176 (2024) e14256.
- (5) Neelon *et al.* Crystal structure of a trapped catalytic intermediate suggests that forced atomic proximity drives the catalysis of mIPS. *Biophysical Journal* 101 (2011) 2816-2824.

* katoh@toyo.jp