

イネ粒重抑制酵素の阻害剤開発に向けた X 線結晶構造解析 X-ray crystallography for the drug discovery toward a grain weight limiting enzyme

赤羽根健生¹, 鈴木喜大², 加藤悦子³, 土屋渉², 廣津直樹^{1*}

¹ 東洋大学大学院生命科学研究科 〒374-0113 群馬県邑楽郡板倉町泉野 1-1-1

² 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 高度分析研究センター
〒305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-2

³ 東洋大学食環境科学部, 〒374-0113 群馬県邑楽郡板倉町泉野 1-1-1

Tatsuki AKABANE¹, Nobuhiro SUZUKI², Etsuko KATOH³, Wataru TSUCHIYA² and Naoki HIROTSU^{1*}

¹ Graduate School of Life Sciences, Toyo University,
1-1-1 Izumino, Itakura, Oura, Gunma, 374-0193, Japan

² Research Center for Advanced Analysis, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8518, Japan

³ Department of Food and Nutritional Sciences, Toyo University,
1-1-1 Izumino, Itakura, Oura, Gunma, 374-0193, 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収量改善が急務となっている。イネの THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6 (TGW6) は、収量構成要素の一つである粒重の抑制酵素であり、その酵素機能の喪失によって玄米収量を増加させる。

TGW6はインドール酢酸 (IAA) の配糖体 (IAA-グルコース) を加水分解して IAA を生成することで、胚乳細胞数を抑制し、粒長の伸長ならびに粒重を制限する (Ishimaru and Hirotsu ら *Nat. Genet.* 2013)。一方、塩基配列の1塩基欠失により機能喪失型となった *tgw6* は、IAA の供給量を低下させ粒重を増加させる。コシヒカリなどほとんどの現代品種は機能喪失型 *tgw6* 遺伝子を持っていないことに加え、TGW6 の機能喪失による農業形質へのネガティブな影響は報告されていない。そのため、TGW6 遺伝子は現代品種の収量改善に向けた標的として注目されており、ゲノム編集技術等で TGW6 遺伝子を改変したイネの作出が進められている。しかしながら、育種やゲノム編集技術等の遺伝学的な応用法は、新品種を改良ターゲットごとに逐一作製する必要があり、喫緊の課題には対応できない。そこで、より簡便で汎用的な応用法として、TGW6 の特異的阻害剤を開発し、酵素の化学的制御によって収量を増加させることが有効だと期待される。本研究では、阻害剤開発に向けた TGW6 の構造基盤を取得するため、X線結晶構造解析を用いて、TGW6 の分子機構の解析や阻害剤候補との複合体構造解析を試みた。

2 実験

1. TGW6 の結晶構造解析

精製過程において TGW6 はカルシウムイオンによって安定化されることが報告されている (Akabane ら *Protein Expr. Purif.* 2021)。予測されるカルシウム結合サイトにおけるカルシウム原子の同定を試みた。大腸菌発現系およびカラムクロマトグラフィーを用いてリコンビナント TGW6 を調製し、sitting-drop vapor diffusion 法によって TGW6 の結晶を作製した。得られた結晶を用いて、BL1A においてカルシウムの異常散乱 (~4000eV) の測定を行った。

2. TGW6-基質等複合体の結晶構造解析

TGW6 の反応機構を明らかにするため、基質 (IAA-glucose) やその反応産物 (IAA および Glucose) と TGW6 の複合体構造の解析を試みた。TGW6 の単結晶へのソーキング法や、リガンド化合物と TGW6 の混合条件での結晶化により、共結晶を作製した。得られた結晶は BL17A での X 線回折実験に供した。

3. TGW6-ヒット化合物複合体の結晶構造解析

これまでに、¹⁹F NMR フラグメントスクリーニングを用いた阻害剤候補の選抜が行われ、数種のヒットフラグメント化合物が取得されている。項目 2-2 の TGW6-基質等複合体の結晶構造解析で行った手順と同様に、TGW6 とヒットフラグメントの共結晶を作製し、BL17A および BL1A において X 線回折実験を実施した。

3 結果および考察

1. TGW6 の結晶構造解析

BL1A を利用し、波長 3.06801 Å でのカルシウム異常散乱を測定した。その結果、分解能 3.29 Å の回折データが取得された。既に解析済みの TGW6 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)。本測定波長では硫黄原子からも異常散乱が見られるため、メチオニン残基の側鎖に存在する硫黄原子近傍で異常散乱は確認された (図 1 左端 水色のマップ)。一方で、予測されたカルシウム結合サイト近傍では異常散乱は確認されなかった。したがって、カルシウムイオンが予測サイトに結合していない、または結合力が微弱であるため、異常散乱を検出することができなかったと考えられる。

2. TGW6-基質等複合体の結晶構造解析

TGW6 と基質等の共結晶化を試みた結果、酵素反応物の IAA と TGW6 の混合溶液から共結晶が得られた。BL17A を利用し、波長 0.98000 Å で X 線回折実験を行なった。その結果、取得済みの TGW6 単体の回折データとは異なる空間群を示した回折データが分解能 2.3 Å で得られた。項目 3-1 と同様にモデル構造を構築したところ、TGW6 の活性部位に IAA と思われる電子密度が確認されたが、マップが不明瞭であり IAA 分子を当てはめることができなかった (図 2)。今後、より高濃度の IAA を用いた共結晶化を図り、酵素-基質等複合体の詳細な立体構造解析を目指す。

3. TGW6-阻害剤複合体の結晶構造解析

薬剤探索実験で得られたヒットフラグメント 5 種と TGW6 の共結晶をソーキング法または共結晶化法によって作製した。項目 2-2 TGW6-基質等複合体の結晶構造解析と同様に、BL17A において X 線回折実験を実施し、得られた回折データからモデル構造を構築した。いずれの共結晶でも TGW6 の活性部位近傍に化合物由来の電子密度は確認されなかった。フラグメント化合物は分子量が極めて小さく、結合活性が弱いことが知られている。今後、詳細な立体構造解析を行うためには、項目 3-2 と同様に、より高濃度のフラグメント化合物を用いて共結晶化を行うことが必須である。

4 まとめ

本研究によって TGW6 へのカルシウム原子の結合の有無を直接的に解析することができた。その一方で、阻害剤開発に向けた酵素反応機構の解析や TGW6 に対する阻害剤候補の結合様式の解析などは完遂することができなかった。今後、実験条件の最適化を行い、詳細な複合体構造の解析を目指す。また、計算化学によるドッキングシミュレーション等を補助的に使

用し、阻害剤開発に向けた TGW6 の構造基盤情報を取得する。

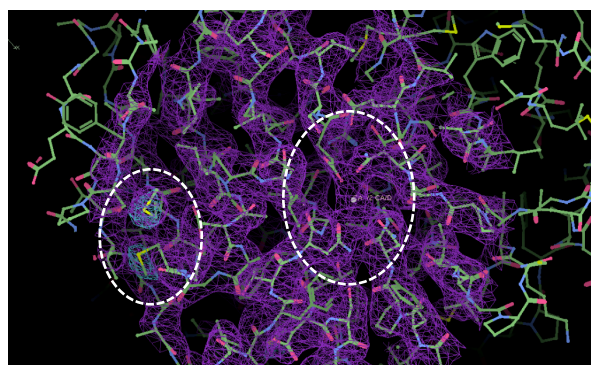


図 1 : TGW6 の活性部位近傍の異常散乱マップ
中央の円: 予測カルシウム結合サイト
左端の縁: 硫黄原子の異常散乱マップ

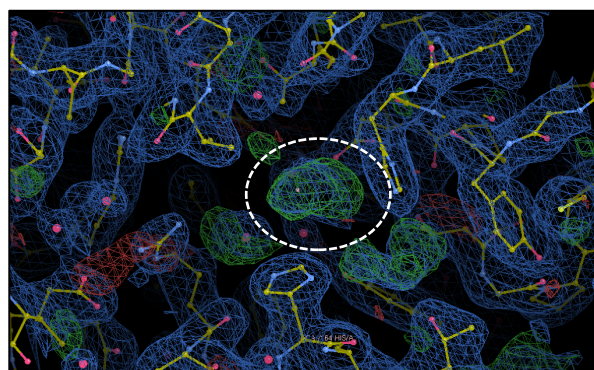


図 2 : TGW6 の活性部位近傍の電子密度マップ
中央の円: IAA と思われる電子密度マップ

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 2021G638 (イネ TGW6 の阻害剤開発に向けた X 線結晶構造解析) の皆様に心より感謝申し上げます。本研究は、科研費 JP20K05869 および東洋大学井上円了記念研究助成の支援を受けたものです。

参考文献

- Ishimaru and Hirotsu *et al. Nature Genet.* 2013,**45**, 707-711.
Akabane *et al. Protein Expr. Purif.* 2021, **188**, 105975.

* hirotsu@toyo.jp