

氏名（本籍）	稲葉 和恵		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 9834 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Structure-Activity Relationship Analysis of Inhibitors Targeting an Insect Steroid Hormone Biosynthesis Regulator Noppera-bo (昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子Noppera-boを標的とした阻害剤の構造生物学的解析)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	丹羽 隆介
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中野 賢太郎
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男

## 論 文 の 要 旨

本論文において著者は、昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo (Nobo) の酵素活性を抑制する薬剤の作用機序を、創薬科学および構造生物学の手法を主に用いて追究している。

様々な作用機序に基づく殺虫剤の継続的開発は、薬剤抵抗性を抑え、農業害虫や衛生害虫を駆除する上で常に重要な課題である。本研究で注目する Nobo は、昆虫の脱皮ホルモンとして知られているエクジステロイドの生合成に特異的に関与するグルタチオン *S*-転移酵素である。ショウジョウバエとカイコガを用いた先行研究において、*nobo* 機能欠損個体は致死であることが示されている。このことから著者は、Nobo のグルタチオン抱合活性を阻害する薬剤は将来的な殺虫剤として期待できると予想する一方で、現時点ではまず阻害化合物の詳細な作用機序の構造レベルでの理解が必要であると考えている。そこで本論文において著者は、モデル生物であるキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* に由来する Nobo (以下ハエ Nobo) と、デング熱の媒介虫ネッタイシマカ *Aedes aegypti* に由来する Nobo (以下蚊 Nobo) に焦点を当てて、これらに対する酵素活性阻害化合物の相互作用様式と構造的特徴の解明に従事している。

本論文の第 1 章において著者は、ハエ Nobo 阻害化合物の 1 つである 17 $\beta$ -エストラジオールとハエ Nobo タンパク質との相互作用解析の成果を記載している。著者は、ハエ Nobo タンパク質の結晶を 17 $\beta$ -エストラジオール溶液にソーキングし、その後の X 線結晶構造解析によって高解像度の複合体構造を解明している。そして著者は、17 $\beta$ -エストラジオールが、Nobo タンパク質中で内在性基質が入り込むと想定される疎水性部位 (Hydrophobic site; H-site) に存在していることを見出している。さらに著者は、17 $\beta$ -エストラジオールが H-site のアミノ酸残基の多くと疎水性相互作用を形成すると共に、113 番目のアスパラギン酸残基 (D113) と特徴的な水素結合を形成することを発見している。この水素結合の重要性は、著者の分子動力学シミュレーションによっても確認されている。すなわち著者は、計算機上で分子の溶液中での動きを予測し、化合物のどの部位がハエ Nobo との相互作用に寄与しているかを検討したところ、D113 との水素結合が結合の際にエネルギー的な寄与が最も大きいことを明らかにしている。分子動力学シミュレーションの結果を受けて著者は、D113 をアラニン残基に置換した変異タンパク質 (D113A) に対

するエストラジオールの阻害活性を *in vitro* の系にて評価している。そして著者は、17 $\beta$ -エストラジオールは、野生型に対しては高い阻害能 ( $IC_{50}=2.3\ \mu M$ ) を示すのに対し、D113A に対しては一切の阻害能を示さないことを明らかにしている。この結果から著者は、ハエ Nobo の D113 と阻害化合物の水素結合が、Nobo の酵素活性阻害に重要であると論じている。

本論文の第 2 章において著者は、蚊 Nobo の阻害剤の探索および構造活性相関解析を報告している。まず著者は、9,600 種類の化合物ライブラリーを用いたハイスループット酵素活性スクリーニングを実施し、蚊 Nobo を阻害するがハエ Nobo を阻害しない化合物を複数得ることに成功している。著者は、その中の 1 つとしてフラボノイド骨格を持つ阻害化合物に注目し、本論文でさらなる解析を進めている。著者は、フラボノイド化合物の蚊 Nobo に対する阻害活性の構造活性相関を評価するために、フラボノイド骨格をもつ化合物 20 種類を用いた生化学的アッセイを実施している。その結果として著者は、 $IC_{50}$  が  $10\ \mu M$  以下の 13 化合物を得ている。著者は、得られた阻害化合物は C 環に二重結合を持つ傾向にあることを見出したことから、この二重結合の重要性を検討するために、阻害活性を持つフラボノイド Genistein (GEN) および Daidzein (DZN) から C 環の二重結合をなくした化合物 (Dihydrogenistein (DGN) および Dihydrodaidzein (DDN)) の阻害活性評価を行っている。そして著者は、DGN および DDN は蚊 Nobo をまったく阻害しないことを発見している。これらの構造と活性の相関をさらに理解するために著者は、蚊 Nobo と阻害化合物の複合体の X 線立体構造解析を行い、最終的に  $1.75\ \text{\AA}$  の最大分解能で 4 つの阻害化合物との複合体構造を得ている。そして著者は、どの複合体構造においても 113 番目のグルタミン酸 (E113) と阻害化合物との水素結合を確認している。この水素結合の重要性を検討するために著者は、E113 をアラニンに置換した変異体タンパク質 (E113A) に対する阻害活性を評価したところ、どの化合物においても E113A に対して阻害活性を持たないことを見出している。最後に著者は、GEN や DZN 以外の 8 種類の類縁構造のフラボノイド化合物の阻害活性を評価し、 $IC_{50} = 0.295\ \mu M$  という高い阻害活性を持つ阻害化合物 4',6,7-trihydroxyisoflavone (THI) を発見している。さらに著者は、THI の複合体構造を明らかにし、他の複合体構造と比較したところ、THI の 2 箇所の OH 基が E113 と強く水素結合していること、および B 環と蚊 Nobo の 39 番目のフェニルアラニン残基との有意な相互作用を見出している。著者は、これらの 2 つの特徴が、蚊 Nobo に対する高い阻害活性に寄与すると考察している。

総合討論において著者は、ハエ Nobo と蚊 Nobo のいずれにおいても、113 番目を構成する酸性アミノ酸と阻害化合物の水素結合の重要性を強調している。そして著者は、今回見出した相互作用様式の知見が、Nobo を標的とした将来的な殺虫剤開発のドラッグデザインの手掛かりとなる、重要な知見になり得ると論じている。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、昆虫のステロイドホルモン生合成調節因子に着目し、その阻害剤の原子・分子レベルの作用機序を創薬科学および構造生物学的観点から解明したものである。昆虫ステロイドホルモンの受容体の機能を阻害する薬剤の研究は従来も盛んに行われてきているが、生合成酵素を阻害する薬剤に注目した研究は現時点で皆無であり、本研究の独創性は高い。また、今回著者が見出した蚊 Nobo 阻害化合物は、蚊に対する新規の殺虫剤開発のドラッグデザインの手掛かりとなる重要な知見であり、基礎生物学のみならず、農薬科学に対する意義も大きいと評価できる。

令和 3 年 1 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。