

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19163

研究課題名(和文)構造生物学的着想に基づく昆虫グルタチオンS-転移酵素Noboの内在性基質の同定

研究課題名(英文)A structure biological approach toward the identification of an endogenous substrate of the insect glutathione S-transferase Nobo

研究代表者

丹羽 隆介(Niwa, Ryusuke)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授

研究者番号：60507945

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):グルタチオンS-転移酵素Noppera-bo(Nobo)は、昆虫ステロイドホルモンの生合成に特化した役割を持つ。本研究では、構造生物学的な解析手法を導入することで、Noboのリガンド結合部位に挿入される化合物の同定を進め、未同定のNobo内在性基質の解明を目指した。本研究期間中に真の内在性基質を確定するには至らなかったが、Nobo阻害剤化合物の探索と合わせた成果から、哺乳類ステロイドホルモンである17beta-エストラジオールがNoboのリガンド結合部位と強い相互作用を示すことを明らかにした。その他のデータも併せて考察すると、Noboの内在性基質はステロイドである可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫ステロイドホルモンは、昆虫の脱皮や変態という多くの人々にとって身近な生命現象に深く関与する。しかし、昆虫ステロイドホルモン生合成に特異的に関わる酵素は、タンパク質としてどのような特徴を有しているのかを追究した研究は多くない。本研究は、昆虫ステロイドホルモン生合成高酵素の1つNoppera-boのタンパク質構造の解明に成功した世界ではじめての事例である。また、本研究で明らかにされた酵素活性阻害剤との複合体構造は、今後の内在性基質の同定にむけたさらなる流研究だけでなく、昆虫ステロイドホルモン生合成酵素を阻害するような農薬開発にも重要な足がかりを与える。

研究成果の概要(英文):The glutathione S-transferase Noppera-bo(Nobo) has a specialized role in the biosynthesis of insect steroid hormones. In this study, using a structural biological analysis method, we proceeded with the identification of compounds that are inserted into the Nobo ligand-binding pocket, and aimed to clarify the unidentified Nobo endogenous substrate. Although the study had not completed determining the true endogenous substrate during the study period, the results combined with the search for Nobo inhibitor compounds showed that the mammalian steroid hormone 17beta-estradiol strongly interacted with the Nobo ligand-binding site. Considering the other data together, it was strongly suggested that the endogenous substrate of Nobo may be a steroid.

研究分野:構造生物学、昆虫生理学

キーワード:ステロイドホルモン 昆虫 酵素 基質 ハイスループットスクリーニング X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

昆虫のステロイドホルモンであるエクジステロイドは、昆虫の広範な発生現象と生理現象、特に脱皮と変態に必須の役割を持つ。エクジステロイドは哺乳類のステロイドホルモンと化学構造的に異なり、脊椎動物はエクジステロイドの生合成や作用に関わる分子群の多くを持たない。よって、エクジステロイドの生合成や作用の研究は、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のない「昆虫発育制御剤 (IGR)」の開発においても重要な位置を占める。

エクジステロイドは食餌から得られるコレステロールを出発点として複数の酵素により生合成される。2014年に研究代表者の所属研究室は、エクジステロイド生合成器官(前胸腺)でのコレステロールの動態を調節する制御因子として、グルタチオン S-転移酵素(GST)である *Noppera-bo* (*Nobo*)を報告した。*Nobo* はエクジステロイド生合成に特化した機能を持つ昆虫特異的な酵素であり、*nobo* の機能欠損個体はエクジステロイド生合成不全のために発生中に致死となる。GST はグルタチオン(GSH)と呼ばれるトリペプチドを基質に抱合させる酵素である。よって、何らかの内在性基質をグルタチオン化することによって、エクジステロイド生合成を調節することが予測された。しかし、*Nobo* の内在性基質は不明であり、その同定は基礎科学的にも農業科学的にも重要であった。

研究開始時に研究代表者は、*DmNobo* 結晶の構造生物学的解析に成功していた。そして、研究代表者は、ショウジョウバエ抽出物を *DmNobo* 結晶にソーキングさせると、*DmNobo* のリガンド結合ポケットに低分子とみられる電子密度が得られた。この結果は、対象とする酵素の基質同定において、X線結晶構造解析が大きな力を発揮することを示唆する。そこでこのデータを足がかりに *DmNobo* の内在性基質を同定できるのではと着想した。

2. 研究の目的

研究開始時点では、結晶中に占有する内在性基質の比率が十分でないため、X線結晶構造解析から得られるデータだけからの基質同定は困難であった。そこで研究代表者は本研究で、結晶構造解析データを出発点として、質量分析、生化学的手法、および薬理学的手法を分野横断的に組み合わせることで、*Nobo* の内在性基質の同定を目指した。そして本研究が成功すれば、「構造生物学的手法から得られた情報に基づく酵素基質同定」という新規方法論を提示できると考えた。

3. 研究の方法

(1) *Nobo* 結晶中化合物の高精度質量分析

Nobo のタンパク質結晶にショウジョウバエ抽出物あるいはカイコガ抽出物をソーキングし、その後結晶を取り出して破碎して、*Nobo* 結晶中に挿入された化合物を抽出した。そして、四重極イオントラップ型質量分析装置を用いて、*Nobo* 結晶に存在する低分子化合物の分子量を分析した。質量分析は、連携研究者である加香孝一郎(筑波大学)との共同で実施した。

(2) 内在性基質候補のケミカルバイオロジー的探索

ショウジョウバエやカイコガの抽出物を用いた実験は挑戦的であり、困難が予想された。そこで並行して、どのような化合物であれば基質結合ポケットに入り込めるのかを追究した。具体的には、*Nobo* 酵素活性阻害化合物をまずハイスループットスクリーニングにより同定し、その後、化合物の構造特性を計算科学的に詳細に検討した。

(3) 内在性基質候補としてのステロイドと *DmNobo* 結晶の複合体構造解析

ハイスループットスクリーニングによって同定された化合物をショウジョウバエ *Nobo* 結晶にソーキングさせ、X線回折測定により複合体構造を明らかにした。X線結晶構造解析は、連携研究者の小祝孝太郎博士(高エネルギー加速器研究機構)との共同で実施した。

4. 研究成果

(1) *Nobo* 結晶中化合物の高精度質量分析

本研究の実施当初は、*Nobo* 結晶にショウジョウバエ組織抽出物を漬け込み、その際に *Nobo* の基質結合ポケットに入り込む化合物を直接同定することを試みた。リガンド結合ポケットに存在する基質由来と考えられる電子密度は再現性よく観察されたが、電子密度の分解能を上げることはできなかった。一方、結晶中に入り込んだ物質を破碎させて抽出したのち、質量分析装置を用いて物質同定を試みた。しかし、実験毎に得られるピークは大きく変動し、再現性のある結果を得ることは本研究期間には実現できなかった。また、得られたピークに対応する化合物がグルタチオン抱合体であるかどうかについても再現性のある結果を得ることはできなかった。

並行して、ショウジョウバエよりもはるかに大きなステロイドホルモン産生器官を持つカイコガを利用することを思い立ち、カイコガ前胸腺抽出物を用いたソーキング実験も行ったが、今

度はリガンド結合ポケットに優位な電子密度像を得ることはできなかった。

一連の実験により、残念ながら、抽出物を用いた方法論の実現は困難であると判断した。

(2) 内在性基質候補のケミカルバイオロジー的探索

(1)の遂行が困難になったため、別戦略として、どのような化合物であれば基質結合ポケットに入り込めるのかをケミカルバイオロジーの手法で追究した。具体的には、人工蛍光基質 3,4-DNACF を用いた DmNobo の酵素活性測定系を利用し、DmNobo 酵素活性を阻害する化合物に注目した。阻害化合物はリガンド結合部位に入り込む可能性があるため、阻害化合物は内在性基質の構造に近しいと期待した。東京大学創薬機構から分与いただいた 9,600 種類の化合物ライブラリーを利用したアッセイ、および研究代表者らが独自に調達した化合物群を用いたアッセイにより、DmNobo の酵素活性を阻害する (50%酵素阻害濃度 $5\mu\text{M}$ 以下) を 80 種得た。この 80 種の中には、複数のステロイド化合物が含まれていた。Nobo が昆虫ステロイドホルモン生成に関与することを考えると、ステロイドは内在性基質の性状を何らか反映するものと予想された。

得られたステロイド化合物のうち、研究代表者は、市販化合物として入手が容易であった哺乳動物の女性ホルモン 17 β -エストラジオール (以下、エストラジオール) に注目した。分子動力的シミュレーションによる分子間相互作用の検討の結果、エストラジオールが DmNobo のリガンド結合ポケットと安定的に相互作用することを確認した。

(3) ステロイドと DmNobo 結晶の複合体構造解析

次に、エストラジオールと DmNobo との相互作用をさらに検討するために、X 線結晶構造解析に着手した。DmNobo アポ体結晶にエストラジオールをソーキングさせることで、DmNobo-GSH-エストラジオール複合体の結晶構造を得ることに成功した (図 1)。

さらに詳細な解析の結果、DmNobo の 113 番目のアスパラギン酸残基 (Asp113) が、エストラジオールの A 環の水酸基と水素結合を有することを見出した (図 2)。この水素結合の重要性を検討するため、Asp113 をアラニンへと置換した変異型 DmNobo を用いた生化学試験を行った結果、エストラジオールの阻害活性は変異型タンパク質では消失した。

次に、Asp113 がショウジョウバエの内在性機能にも重要かを検討するため、ショウジョウバエで整備されている CRISPR-Cas9 法を用いた点変異導入技術を利用し、*nobo* 遺伝子の 113 番目残基をコードする塩基に変異を入れ、アスパラギン酸ではなくアラニンを持つ変異型 *nobo* アリルを得た。このアリルのホモ接合体は胚性致死であった。また、変異ホモ接合体の胚では表皮クチクラの分化が進まず、頭部陥入不全の形態形成異常が観察された (図 3)。これらの表現型は、*nobo* 完全機能欠損アリルの表現型に酷似していた。

この(2)および(3)の一連の結果は、Asp113 が生体内の DmNobo の機能にも必須であることを強く示唆し、また内在性基質もこの Asp113 と相互作用することを暗示する。また、ステロイド骨格が DmNobo のリガンド結合ポケットにうまく適合することから、Nobo の内在性基質はやはりステロイドであることを強く期待させる。実際、昆虫に存在する内在性ステロイドであるコレステロールは、DmNobo と分子動力的には安定的に相互作用することを見出した。これらの成果は、原著論文として *Journal of Biological Chemistry* 誌に報告した (Koiwai et al. 2020)。

将来的には、Asp113 との水素結合を介した相互作用の有無が、今後の Nobo 内在性基質の同定に際して重要な評価指標になると考えられる。研究代表者は今後この指標を活用して、内在性基質同定を追究していく予定である。

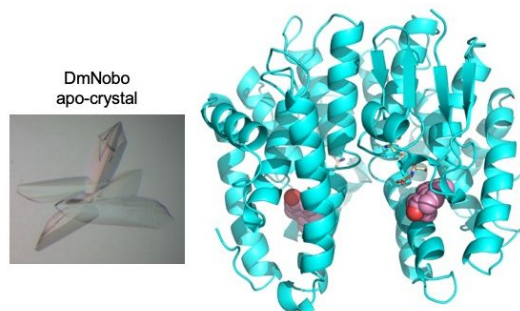


図 1 : (左) DmNobo アポ体結晶。(右) DmNobo とエストラジオール (暖色) との複合体構造。

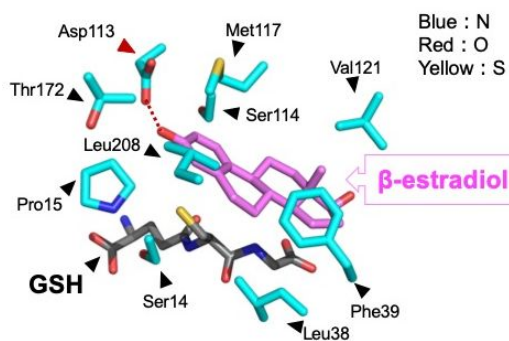


図 2 : DmNobo、エストラジオールおよび GSH の配置。エストラジオール 3 位の水酸基と Asp113 との水素結合は赤点線で示す。

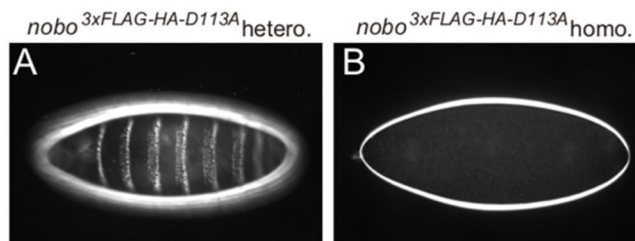


図 3 : ショウジョウバエ胚のクチクラ構造。(A) 対照群、(B) *nobo* Asp113Ala 点変異。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotaro Koiwai, Kazue Inaba, Kana Morohashi, Sora Enya, Reina Arai, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Yuuta Fujikawa, Hideshi Inoue, Ryunosuke Yoshino, Takatsugu Hirokawa, Koichiro Kato, Kaori Fukuzawa, Yuko Shimada-Niwa, Akira Nakamura, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Ryusuke Niwa	4. 巻 295
2. 論文標題 An integrated approach to unravel a crucial structural property required for the function of the insect steroidogenic Halloween protein Noppera-bo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7154-7167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 稲葉和恵、丹羽隆介
2. 発表標題 エクジソン生合成制御因子 Noppera-bo の構造生物学
3. 学会等名 昆虫ポストゲノム研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazue Inaba, Kotaro Koiwai, Kana Morohashi, Sora Enya, Reina Arai, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, Hideshi Inoue, Yuuta Fujikawa, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Toshiya, Ryusuke Niwa
2. 発表標題 X-ray crystallographic analysis of the ecdysteroidogenic glutathione S-transferase Noppera-bo
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉和恵、小祝孝太郎、諸橋佳奈、塩谷天、荒井怜奈、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、井上英史、藤川雄太、湯本史明、千田俊哉、丹羽隆介
2. 発表標題 昆虫グルタチオン S- 転移酵素 Noppera-bo の構造生物学的・生化学的解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryusuke Niwa
2. 発表標題 Do ecdysteroidogenic enzymes dream of insect growth regulators?
3. 学会等名 2018 Ecdysone Workshop at 59th Annual Drosophila Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉 和恵、小祝 孝太郎、今村 理世、塩谷 天、荒井 怜奈、小島 宏建、岡部 隆義、長野 哲雄、井上 英史、藤川 雄太、湯本 史明、千田 俊哉、丹羽 隆介
2. 発表標題 新規農薬開発に向けた昆虫グルタチオン S- 転移酵素 Noppera-bo の阻害剤探索
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小祝 孝太郎、稲葉 和恵、諸橋 香奈、塩谷 天、荒井 怜奈、藤川 雄太、井上 英史、小島 宏建、岡部 隆義、長野 哲雄、湯本 史明、千田 俊哉、丹羽 隆介
2. 発表標題 昆虫特異的グルタチオン S 転移酵素による発生・分化制御機構の解明
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Koiwai, Kazue Inaba, Kana Morohashi, Sora Enya, Riyo Imamura, Takayoshi Okabe, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Kaoru Fukazawa, Ryunosuke Yoshino, Takatsugu Hirokawa, Hideshi Inoue, Youth Fujikawa, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Ryusuke Niwa
2. 発表標題 Combined experimental and computational approaches reveal a unique structural property of the Halloween glutathione Stransferase Noppera-bo
3. 学会等名 4th International Insect Hormone Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小祝 孝太郎、稲葉 和恵、湯本 史明、丹羽 隆介、山田 悠介、千田 俊哉
2. 発表標題 Automated X-ray crystallographical inhibitors screening against an insect embryogenesis regulator, Noppera-bo
3. 学会等名 CBI学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 肇、豊福 美和子、藤永 大輝、稲葉 和恵、船橋 智輝、藤川 雄太、井上英史、片岡 宏誌、丹羽 隆介
2. 発表標題 ステロール代謝およびエクダイソン生合成を介した植物トリテルペノイドcucurbitacin 類がショウジョウバエの発育に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農薬学会第45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野 肇、豊福 美和子、藤永 大輝、稲葉 和恵、船橋 智輝、藤川 雄太、井上 英史、片岡 宏誌、丹羽 隆介
2. 発表標題 植物トリテルペノイド cucurbitacin B によるエクダイソン生合成の阻害
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

丹羽研究室ウェブページ
<https://sites.google.com/view/niwa-lab-tsukuba/home>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	加香 孝一郎 (Kako Koichiro) (60311594)	筑波大学・生命環境系・講師 (12102)	
連携研究者	小祝 孝太郎 (Koiwai Kotaro) (60620721)	大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究員 (82118)	