

抵抗性変異に有効な新規 ALS 阻害型除草剤の創出

株式会社アグロデザイン・スタジオ
田中 良樹

はじめに

近年、農業は安全性基準の厳格化に起因する開発期間の長期化（11年以上）や開発費の増大（平均300億円以上）が課題であり、より効率的な創農業技術が必要となっている（参考資料：JCPA 農業工業会 ウェブサイト）。農業の安全性については、ヒトの健康に対してだけでなく、農地周辺の環境に対しても十分な検討が求められている。このような背景のもと、安全性の課題を解決する手法として、分子標的農業が有望視されている。分子標的農業とは、防除対象生物（雑草・害虫・植物病原菌など）が持つ酵素など特定のタンパク質分子を標的として特定の部位に結合するように開発される農業である。化合物の結合により対象の酵素の働きを特異的に阻害し、その結果として除草・殺虫・殺菌をするものである。標的分子として、対象生物のみが持つ酵素を選定することができれば、ヒトや動物に対する毒性リスクの低い農業の開発が可能となる。一方、生物種間で共通した酵素を標的とした場合であっても、それぞれの分子構造を正確に理解していれば、種間で生じる差を利用して薬剤に選択性を与えることも理論上可能である。さらに、薬剤抵抗性の原因が酵素に生じるアミノ酸点変異にある場合、標的分子構造の理解は薬剤の改良の重要な道標となる。薬剤と標的タンパク質の結合様式が正確に理解できていれば、変異の生じやすい

部位を避けて結合するような化合物の設計や効率的な改良が可能となるからである。そこで当社ではタンパク質立体構造解析を重視した構造ベース創農業法による分子標的農業開発を行っている。

研究の目的と概要

本共同研究では、除草剤の標的分子として植物のアセト乳酸合成酵素に着目して開発を進めている。アセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase; ALS) は、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸の生合成経路においてアセト乳酸を合成する重要な酵素である。この酵素を標的にすることで、これまでに低薬量で高い除草作用を示す農業が多数開発されてきた。また、この酵素自体が動物には存在しないため、この酵素を標的とした農業は安全性の高い農業である。実際、1970年代からスルホニルウレア系除草剤をはじめ多数の剤が開発されており、除草剤の中では大きな分野を占めている。一方、長年にわたり広範囲で使用されてきたために、これら既存薬に対する抵抗性雑草の出現が深刻な問題となっている。抵抗性発生の大きな要因は ALS の薬剤の結合部位周辺を構成するアミノ酸残基に変異が起ることである。タンパク質と薬剤の間の相互作用に関与していたアミノ酸側鎖が変化し、相互作用が失われ、薬剤の結合力が弱まり、機能を阻害できなくなるためである。そのため抵抗性雑草対策剤として、変異型 ALS にも結合能が

低下せず、阻害効果を維持できる新規化合物が望まれている。また、多数の既存薬が存在することやシロイヌナズナ由来 ALS の結晶構造が Protein Data Bank (PDB) に登録されていることは構造ベースでの創農業の対象に適している。そこで、2021年より Preferred Networks (PFN) 社とアグロデザイン・スタジオは ALS を標的とした新規除草剤の創農業に関する共同研究を開始した。この共同研究において、アグロデザインによる結晶構造解析と酵素および植物に対する試験技術、PFN の AI 創薬プラットフォームによる in silico スクリーニングなどを組み合わせて、迅速な新規な農業リード化合物の創出を指向するものである。

共同研究を開始して最初に標的タンパク質である ALS の構造の精査を行った（図-1）。PDB に既に登録されている構造だけでなく、自分たちでも構造決定して阻害化合物の結合様式の詳細な理解を目的として行った。分子標的農業開発においては、精製タンパク質を用いた化合物スクリーニングが重要であるため、大量の単離精製したタンパク質を用意することになる。アッセイに必要な精製タンパク質は結晶化に使用することも可能である。今回は40種類以上存在する既存の阻害化合物のうち複合体構造が報告されていないものに関して結晶構造解析を実施した。13種類の ALS- 既存薬複合体構造が登録済みであるものの、残る20種類以上の化合物との複合体結晶構造解析を行うのは手作業では困難である

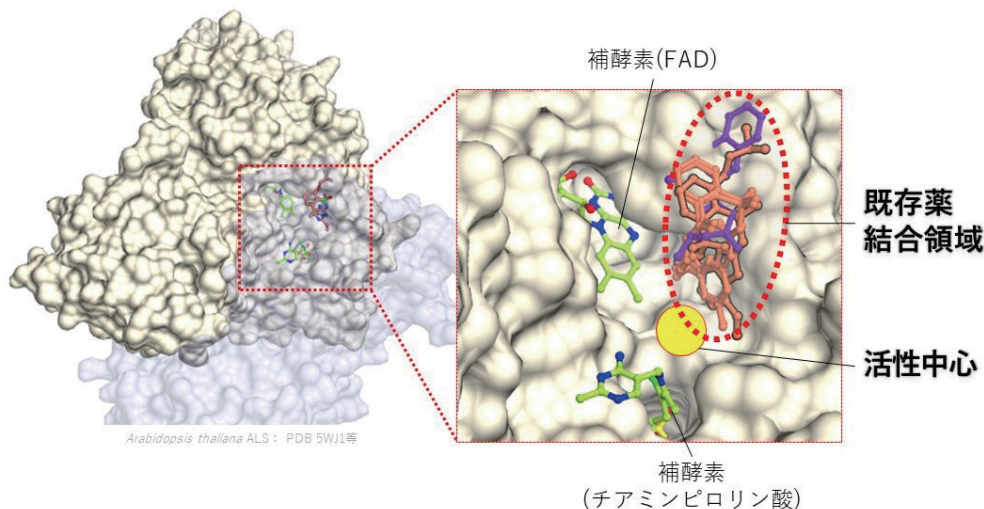


図-1 シロイヌナズナ由来 ALS の全体構造および活性中心付近拡大図

ALS は二量体で機能しており、二分子の間に活性中心を含むポケットが存在している。右図に活性部位周辺の拡大図を示した。阻害剤、補酵素をスティック表示している。既存薬複合体構造は複数 PDB に登録されており、それらを重ね合わせて表示している。既存薬はタンパク質表面から活性中心へつながる経路中の同じ部位に結合して、活性中心への基質の出入りを妨げて反応を阻害する。

ため、理化学研究所 SPring-8 および高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory それぞれが所有する自動化された結晶構造解析システムを利用してハイスループット複合体構造解析を実施した。これにより、一度に 15 種類の複合体結晶構造解析に成功している。複合体構造の阻害剤結合部位を確認するとどの化合物（スルホニルウレア系を含め複数のケモタイプ）も同じ位置に結合しており、結合部位を形成する化合物周辺アミノ酸の位置関係も同じであった。このため、既存薬はいずれも高い除草効果を発揮する一方で、同じ耐性変異により活性が弱まると考えられる。耐性変異による結合力低下を回避するためには、より変異が起こりにくい部位と結合する化合物が必要である。また、既存薬の化合物骨格が限られていることも結合様式が似通る原因であるため、全く新しい化合物骨格の阻害剤を見つけることも重要である。そこで、新規ケモタイプ化合物による ALS 阻害除草剤開発を目指して研究を開始した。

in silico大規模ドッキングシミュレーションの実行

初期ヒット化合物を得るために、ここまでで取得した構造を使用してドッキングシミュレーションを用いた in silico 化合物スクリーニングを行うことにした。実際には、大規模のドッキングシミュレーションを始める前に既知の複合体構造をシミュレーション上で再現する条件検討を繰り返し行った。ドッキングシミュレーションにおいては、結合部位となるタンパク質のポケット範囲や電荷、溶媒分子の扱い、化合物の初期位置など多数の要素が結果に関係してくる。そのため、実験構造により近い、精度の良い計算結果を得るためには事前検討の重要性が高い。今回の研究においては、既知の結合化合物が多数あり、複合体結晶構造も得られていることから、それら複合体構造を再現できるようなシミュレーション条件を探索することにした。各種パラメータを変化させて計算を繰り返し、結晶構造とシミュレーション結果が一致する条件を見出すことができた。次にこの条件を利用

して大規模ドッキングシミュレーションを実行する。現在一般に公開されている低分子化合物データベースには約 10 億種類の化合物が含まれるが、本研究で計算に使用する化合物リストとしては、入手性が比較的高い市販化合物約 1,000 万種のライブラリを対象にした。この化合物ライブラリに対してシミュレーションに適さないものや塩などを取り除く前処理を行い、残った約 700 万化合物を使って大規模ドッキングシミュレーション (AutoDock Vina をベースに PFN 独自の改良を行ったソフトウェア。参考: PFN Blog 『GPU を用いたタンパク質・化合物ドッキングシミュレーションの高速化』 https://tech.preferred.jp/ja/blog/gpu_docking_simulation/) を実行した(図-2)。シミュレーションは PFN 社所有のスーパーコンピュータを用いて行われ、複数回の条件検討のためのシミュレーションを含めて、開始してからおよそ 1 か月(実際の 700 万化合物の計算時間は 1 週間程度)で大規模ドッキングシミュレーションを完了した。なお、PFN のスーパーコンピュータは独自設計であるが、最近当社内に構築した計算機クラスター

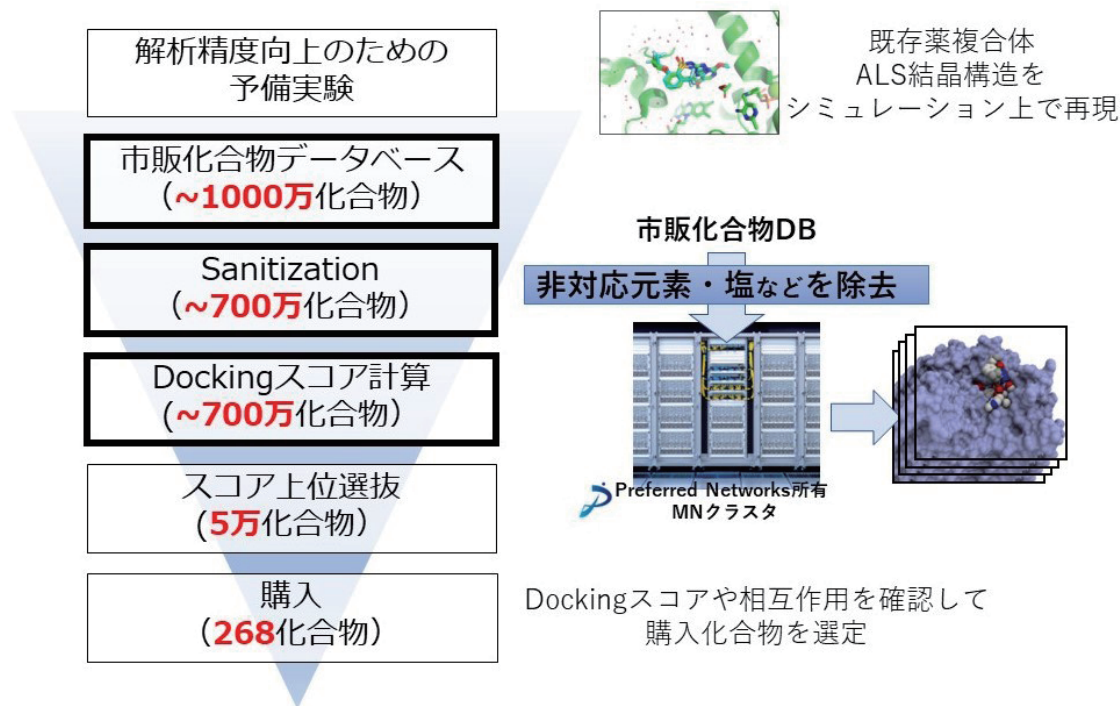


図-2 in silico スクリーニングの流れ

既知の複合体構造を利用してドッキングシミュレーションの条件検討を実施。化合物データベースに計算に適さないものを除く処理を行ったのち、予備実験にて決めた計算条件を用いて大規模ドッキングシミュレーションを実行。得られたドッキング構造から結合エネルギーなどの各 property をリスト化し、それらを指標に購入化合物の選抜を行った。

(CPU: AMD Ryzen Threadripper PRO 5995WS×12基, 合計768CPUコア)でAutoDock Vinaを使い同等な計算をしたところ、700万化合物の計算を約8日で完了した。

シミュレーションで得られたドッキングスコア(タンパク質-化合物相互作用エネルギーの計算値)に基づき、化合物選抜を行って実際に入手して実験でその活性を確認し、ヒット化合物を見つけ出す。まずドッキングシミュレーションを行った全化合物からドッキングスコアのみを指標として、上位50,000化合物を抽出した。そこからさらにドッキングスコアだけでなく、他のいくつかの指標を使って化合物の絞りこみを行う。市販化合物ライブラリを使用しているが、現実的には予算や実験にかかる時間と手間の制限があるためである。具体的にはドッキングスコアの最上位、保存性の高いアミノ酸残基との水素結合を形成しているもの、親水性の高いもの、化合物ケモ

タイプが既知化合物に近いもの、全く異なるもの等、化合物の性質や構造も利用して選抜を行った。特に、本研究においては耐性変異ALSに対しても阻害効果を示す化合物を見出す必要がある。そのため、より保存性の高い(変異が入りにくい)アミノ酸側鎖との相互作用があり、かつ既知化合物と異なるケモタイプ化合物であることを重視して選抜していった。最終的に268化合物を購入して実際のアッセイに用いた。

アッセイによる化合物評価

化合物の活性を判断するためのアッセイは、精製したALSを使う酵素阻害アッセイとシロイヌナズナ種子を使う生育阻害アッセイの二つの方法で行った。酵素アッセイにおいてはシロイヌナズナ由来野生型ALSだけでなく、既知の抵抗性変異に対応する変異型ALSも同時に発現・精製してアッセイ系を構築し

た。生育阻害アッセイではシロイヌナズナ種子を24ウェルプレート寒天培地に撒いて一定期間後の葉面積で判定することで、実験室内で一度に多数の化合物評価を行える系を確立した(図-3)。

購入した化合物を確立した酵素アッセイと生育阻害アッセイで評価を行った。その結果、268化合物のうち、35化合物で酵素アッセイのIC50が計測可能なレベルの阻害を示すことが分かった。阻害を示した化合物骨格を確認したところ、既知化合物とは全く異なるものが二種類見つかった。その二つは生育阻害アッセイにおいても活性を示したため、リード化合物の候補となり得るものである。

さらに、抵抗性変異ALSに対する阻害活性についても確認を行った。その結果、新規ケモタイプ(化合物骨格タイプ)である複数のリード化合物が、アセト乳酸合成酵素の抵抗性変異体(アミノ酸の点変異体)に対して有効であつ

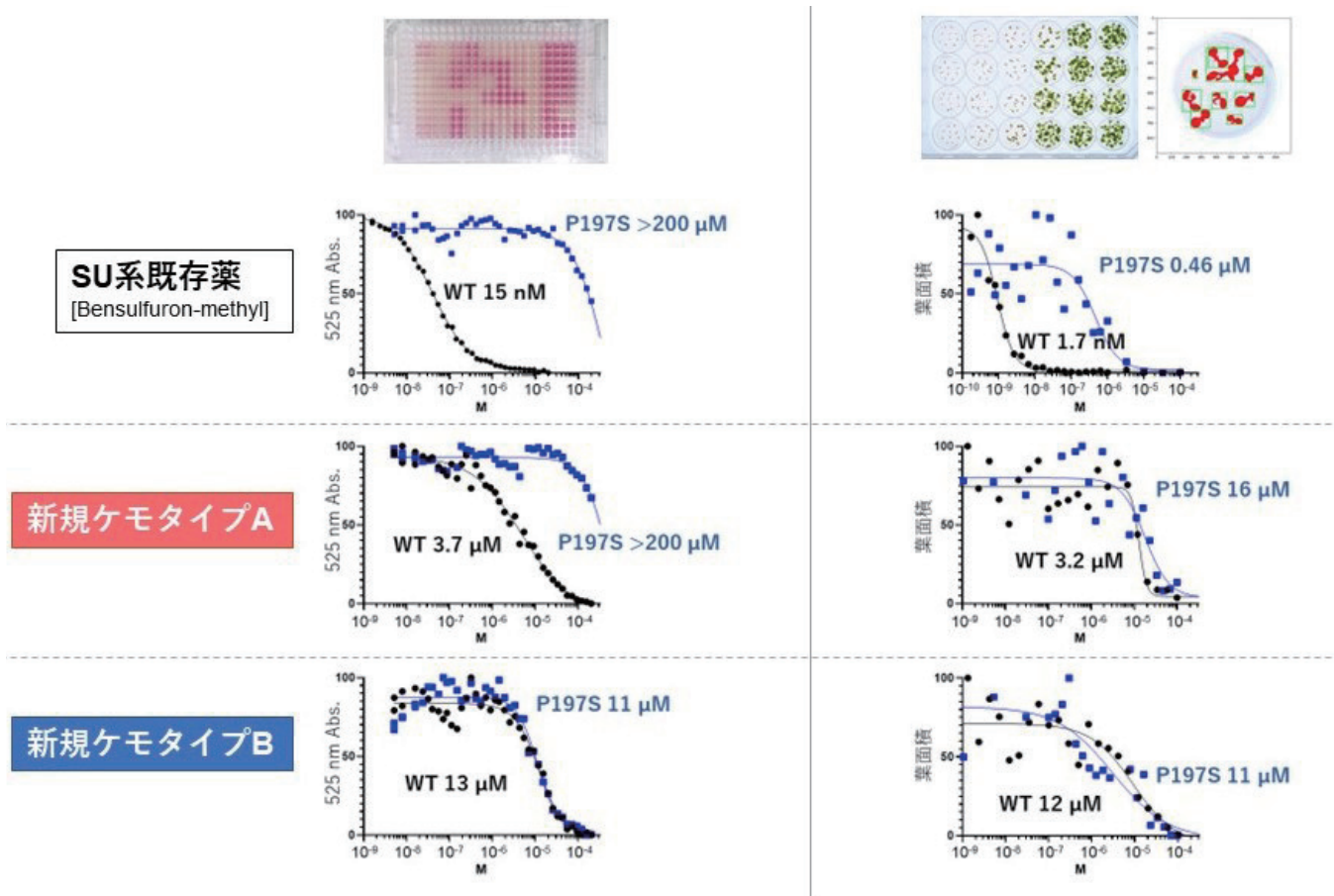


図-3 酵素阻害アッセイおよびシロイヌナズナ生育阻害試験

(左) 野生型 ALS と抵抗性変異 ALS を精製し、アセト乳酸比色試験法による酵素阻害アッセイを行った。図中では野生型 (WT) と P197S 抵抗性 ALS 変異体を比較している。SU 系化合物と新規ケモタイプ A では変異により阻害活性の低下が確認できる。ケモタイプ B では阻害活性に変化がなく、P197S 抵抗性変異の影響を受けていない。

(右) 寒天培地上に播種し 1 週間後の葉面積をプロットして阻害活性測定を行うことで、実験室系で植物を用いたアッセイが可能な系を構築した。野生型シロイヌナズナ種子と P197S ALS 変異シロイヌナズナ種子 (Arabidopsis Biological Resource Center から購入) を用いてそれぞれ生育阻害試験を実施した。酵素アッセイでの結果と同様の ALS 阻害剤抵抗性が確認できる。

た。多くの既存の阻害化合物に対して抵抗性を示す W574L 変異型アセト乳酸合成酵素に対して、野生型 (変異がないタイプ) の酵素と同等に効果を確認できた。しかし、もう一つの主要な変異である P197S 変異に対しては、新規ケモタイプ化合物のうち一つは阻害活性が低下し、一つは活性を維持する結果になった (図-3)。このことは、本共同研究で行った一連の創農業アプローチによる新規ケモタイプ取得の抵抗性対策への有効性を示唆している。

新規ケモタイプ化合物と ALS 複合体の結晶構造解析

新規ケモタイプ化合物と ALS 複合体の結晶構造解析を行い、結合様式の確認を行った。新たに得られた化合物の結合を確認することは、標的の活性部位に特異的に結合して機能を阻害していることを明らかにするものである。さらに、次の化合物改良のための大きな手掛かりとなるため、化合物の合成と活性確認、構造解析のサイクルを迅速に行うことが構造ベースの創農業の重要なポイントである。実際に今回得ら

れた新規ケモタイプ化合物との複合体構造を決定したところ、既存化合物同様に活性部位までの経路中に化合物電子密度を確認できた。一方で、結合ポケットを構成するアミノ酸側鎖の配向が変わり、ポケット形状が変化していた (図-4)。化合物の結合による構造変化、誘導適合 (induced-fit) が生じており、このことは新規ケモタイプ化合物が既知の抵抗性変異を回避できた要因と考えられる。残念ながらドッキングシミュレーションでは結合ポケットの構造変化は予測できておらず、ドッキング構造と結晶構造は部分的にしか一致しない。今後は構造変化後の構造を対象に



図-4 阻害剤結合ポケット形状の比較

阻害化合物の結合部位周辺のタンパク質表面をメッシュ表示している。紫が親水性、緑が親油（疎水）性の領域を示す。それぞれの複合体構造はアミノ酸主鎖レベルでは一致しており、さらに既存薬複合体構造では側鎖の配向まで同じためポケット形状に変化は見られない。一方、本研究で得られた新規ケモタイプ化合物においては既存薬複合体構造と側鎖の向きが異なり、ポケット形状も変化している。

してより大規模のドッキングシミュレーションを行い、抵抗性変異に対応した最適ナリード化合物を探索する予定である。

まとめ

本研究では構造が既に解かれており、複数の阻害剤が存在する酵素に対して、新規ケモタイプの阻害剤を *in silico* スクリーニングにより見出した。立体構造および阻害化合物の結合部

位が明らかであったことから、スクリーニング開始から実験による阻害活性の確認まで半年以内で行うことができた。長年研究が行われ、多数の薬剤が開発されてきた ALS に対しても、立体構造とコンピュータを利用するスクリーニングを行うことで、新規ケモタイプ阻害化合物が得られることを示したものである。構造解析の結果からケモタイプの異なる化合物は異なる結合モードであることが明らかになり、既知のアミノ酸変異による結合能低下の影響も受けにく

くなっている。今回の研究で示されたように長年にわたり研究が行われてきた標的に対しても、新たなアプローチで探索を行うことで新規薬剤開発の可能性があると見える。構造ベースでの創農業を実現していくには、正確な立体構造解析と *in silico* スクリーニング、*in vivo* 及び *in vitro* アッセイのサイクルを迅速に回していくことが最も重要であると考えており、当社では計算機高度化や実験の自動化技術導入を推進している。