



アセト乳酸合成酵素-農薬複合体の X 線結晶構造解析

佐藤匡史¹, 小野田浩宜², 梅名泰史², Swagatha Ghosh², 田中良樹¹,

Joshua K. Stanfield¹, Simon Miller¹, Leonard M.G.H. Chavas², 西ヶ谷有輝¹

¹ 株式会社アグロデザイン・スタジオ, ² 名古屋大学シンクロトロン光研究センター,

キーワード： X 線結晶構造解析, 構造ベース創農薬, 除草剤

1. 測定実施日

2022 年 8 月 10 日 BL2S1 (2 シフト)

2022 年 8 月 26 日 BL2S1 (2 シフト)

2022 年 9 月 9 日 BL2S1 (2 シフト)

2022 年 9 月 22 日 BL2S1 (2 シフト)

2. 概要

本研究では、あいちシンクロトロン・名古屋大学 BL2S1 ビームラインにおいて、カプトンフィルムを用いた新規デバイスを活用することにより、煩雑な職人芸とも言える結晶のサンプリングと凍結作業をスキップして、除草剤標的の植物由来アミノ酸合成酵素の 2.30 Å 分解能の「室温」結晶構造をシームレスに決定することが出来た。

3. 背景と研究目的

近代農業において、農薬は安定した作物収量の確保に大きく貢献してきた。一方、長年に渡る同類の農薬使用の結果として生じた薬剤抵抗性を示す雑草、害虫等の出現と、またこれら農薬の安全性に対する問題が深刻化している。農薬の安全性を向上させるための最も有効な戦略は、作用機構が明確な分子標的農薬を実用化させることであるが、医薬品開発に比べ農薬開発では構造ベースの分子設計技術の利用と発展が大きく立ち遅れている。医薬と異なり農薬は、環境中の他種多様な防除対象生物種に効果を発揮する必要があり、それが大きな障壁となっている。すなわち、構造ベースで薬剤をデザインしようとすると、理想的には『ホモログタンパク質×化合物』という大量の複合体結晶構造解析が必要となる。これに加えて、『薬剤抵抗変異』も考慮する必要があるため、その理想的な構造解析数は数千オーダーの莫大な数となる。こうした農薬独特の分子標的農薬の難しさが、本研究分野の妨げとなっていたが、近年の放射光 X 線結晶構造解析の自動化と構造バイオインフォマティクスの技術革新により、構造ベース創農薬による産業応用が現実的になってきた。

これまで (株) アグロデザイン・スタジオでは、放射光施設のそれぞれの特徴を活かした最新の X 線結晶構造解析の自動化技術を用い、構造ベース創農薬の技術基盤の構築を行ってきた。しかしながら、結晶構造解析の一連のプロセスにおいて結晶のサンプリングおよび凍結作業は唯一自動化が困難であり、ハイスループット構造解析のボトルネックとなっている。そこで現在我々は、結晶化溶液スクリーニングから立体構造決定までをシームレスに行うことが可能となる、『室温測定法』に着目している。室温測定法では、①シッティングドロップ蒸気拡散法により調製した結晶化プレートに直接 X 線を照射する方法[1]、②サンドイッチドロップ蒸気拡散法により調製したカプトン等のフィルムに直接 X 線を照射する方法、③マイクロ流路 Chip を用いる方法[2]、④空中浮揚させた液滴中の結晶に X 線を照射する方法[3]、などがある。これまでに、当社では Photon Factory との共同研究を通じて、①の *in situ* プレート回折技術の検証実験を進めているが、測定準備および測定にかかる時間が課題であった。

本研究では、除草剤標的となるアセト乳酸合成酵素 (Acetolactate synthase : ALS) およびアミノ酸合成酵素を対象として、「室温」結晶構造解析を行うことを目的とする。本事業を通じて、シームレス X

線結晶構造解析の実現可能性を探り、放射光 X 線結晶構造解析を用いた構造ベース創農薬による産業応用を推進することを目指す。

4. 実験内容

本実験では、まずマイクロ流路 Chip を用いた室温測定 of フィジビリティスタディとして、ALS およびアミノ酸合成酵素・農薬複合体を対象として、これまでに確立した蒸気拡散法を用いた結晶化条件を元にバッチ法を用いた結晶化スクリーニングを行った。しかしながら、蒸気拡散法とバッチ法では ALS およびアミノ酸合成酵素の結晶化条件が大きく異なり、バッチ法では良質の結晶を得ることが出来なかった。そこで、Chavas 研究室で開発中のカプトンフィルムを用いたデバイスを用いてサンドイッチドロップ蒸気拡散法により、アミノ酸合成酵素の結晶化を行った。その結果、0.1-0.2 mm 程度の大きさの良質の結晶を得ることができた。アミノ酸合成酵素の結晶が生成したカプトンフィルムデバイスをそのままゴニオメーターにセットし、室温条件下で X 線回折強度データの収集を行った。室温測定では、クライオ条件測定よりも放射線損傷が問題となるため、波長は低フラックスで低吸収線量が期待できる 0.72 Å を用いた。

5. 結果および考察

カプトンフィルムデバイスを用いたアミノ酸合成酵素結晶の室温条件下での X 線回折実験の結果、2.30 Å の回折強度データ (Completeness=99.9%, $R_{\text{merge}}=20.8\%$) を収集することができた。結晶は空間群 $P3_221$ に属し、格子定数は $a=149.2$, $b=149.2$, $c=99.5$ Å, $\alpha=90.0^\circ$, $\beta=90.0^\circ$, $\gamma=120.0^\circ$ であった。得られた回折強度データを用いて、分子置換法により初期位相を決定することができ、構造精密化を行った結果、 $R_{\text{work}}=15\%$, $R_{\text{free}}=19\%$ の高精度で、立体構造を決定することが出来た。構造解析の結果、室温結晶構造はクライオ結晶構造とほぼ同一の構造をとっており、標的農薬化合物の明確な電子密度を確認することができた。

本研究では、あいちシンクロトロン・名古屋大学 BL2S1 ビームラインにおいてカプトンフィルムを用いたデバイスを用いることにより、植物由来アミノ酸合成酵素の室温条件下で 2.30 Å のデータ収集を行うことが出来た。これまでに Photon Factory で実施した同サンプルの結晶化プレートを用いた室温測定では、19 個の結晶を用いたデータセットをマージすることによりデータ収集を行ったが、本研究では 1 個のみ結晶で完全なデータ収集を行うことができ、データ測定の大幅な時間短縮に成功した。

6. 今後の課題

今回対象としたサンプルをはじめタンパク質の結晶化条件は蒸気拡散法とバッチ法で大きく異なることが改めて分かった。マイクロ流路 Chip を用いた室温 X 線回折実験では、事前のバッチ法での結晶化条件のスクリーニングに時間を要することが課題である。一方、カプトンフィルムを用いたサンドイッチドロップ蒸気拡散法では、結晶化条件の検討がほとんど必要ないのが利点である。しかしながら、結晶のセンタリングが煩雑で時間がかかるため、AI 等を用いた結晶画像認識による「結晶自動センタリング」システムの開発が今後の課題である。

7. 参考文献

- [1] Okumura, H. et al: *In situ* crystal data-collection and ligand-screening system at SPring-8. *Acta Cryst.*, F74, 241-251 (2022)
- [2] Chaussavoine et al.: Implementation of wedged-serial protein crystallography at PROXIMA-1. *J. Synchrotron Rad.*, 29, 439-446 (2022)
- [3] Tsujino, S. and Tomizaki, T: Ultrasonic acoustic levitation Ultrasonic acoustic levitation for fast frame rate X-ray protein crystallography at room temperature. *Sci. Rep.*, 6, 25558 (2016)