

論文の内容の要旨

論文題目 Structure-based agrochemical design of nitrification inhibitor targeting for hydroxylamine oxidoreductase in ammonia-oxidizing bacteria
(ヒドロキシルアミン酸化還元酵素を標的とした硝化抑制剤の構造ベース創農薬)

氏名 西ヶ谷 有輝

【序論】

窒素化合物は農業において特に重要な肥料成分であり、大量の化石燃料を消費して工業的に固定されたアンモニア態窒素 (NH_4^+) が農地に大量投入されている。投入された NH_4^+ は、アンモニア酸化細菌の過剰な増殖と硝化を促し、急速に亜硝酸態窒素 (NO_2^-) に代謝され、最終的に硝酸態窒素 (NO_3^-) に変化する。負電荷を帯びた NO_3^- は土壌中には留まりづらく、投与した窒素の半分以上が河川などへ流出する。また、この過程で生成される亜酸化窒素ガス (N_2O) には、強力な温室効果やオゾン層破壊効果がある。

過剰な硝化に伴う負荷の軽減には、アンモニア酸化細菌の代謝・増殖を抑える薬剤 (**硝化抑制剤**) が有効である。既存の硝化抑制剤を使えば、窒素肥料投入量を2割ほど、 N_2O ガス発生量を5割ほど削減できる。一方で、既存薬はどれも効果が不十分であり、毒性もあるため、改良が望まれている。

そこで、近年の医薬品開発において最も有効な手段として使われる**構造ベース創薬**による硝化抑制剤開発を行った。この手法では、薬剤標的となる酵素を選定し、その立体構造をもとに薬剤デザインを行う。薬剤標的として、硝化のカギ酵素であるヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (HAO) を選定した。HAO は、もう一つの硝化のカギ酵素であるアンモニア酸化酵素 (AMO) と異なり、活性や結晶構造の解析例があり、明確なリガンド結合ポケットを持つなど、標的として最適であると考えられた。一方で、現在までに硝化抑制剤どころか農薬においても構造ベース創薬により実用化された薬剤は知られておらず、その基盤技術も構築されていないため、薬剤探索・評価手法などの創薬基盤の確立も同時に行なった。

【結果】

1. 創薬の基盤技術の構築：HAOの結晶構造解析・ハイスループットアッセイ法の開発

硝化抑制剤開発の基盤技術の構築として、1) 薬剤ターゲットである HAO の結晶構造解析法の確立、2) AOB 生菌に対するハイスループット阻害アッセイ法の確立、3) HAO に対するハイスループット阻害アッセイ法の開発、を行った。

1) アンモニア酸化細菌(AOB)は、 β -または γ -プロテオバクテリア綱の2グループ (β AOB・ γ AOB)に大きく分けられる。 β AOB に分類される *N. europaea* (Ne 菌)由来の NeHAO 構造は既知であるため、 γ AOB の *Nitrosococcus oceani* (No 菌)由来 NoHAO の結晶構造解析を試み、2.6 Å の分解能で立体構造を得る事に成功した。さらに、NeHAO の結晶構造解析の再現性を取ることに成功したため、HAO-阻害剤複合体構造を解析するための基盤技術が整った。

2) 阻害効果の指標となる 50%阻害濃度 (IC₅₀) を求めるためには、各阻害剤で 16 濃度条件 (500 μ M-15 nM)、n=3 以上の多数の測定点 (約 2000) を必要とした。そこで、菌培養条件と亜硝酸比色試薬 (Greiss 試薬) 組成を 384 穴プレートに最適化し、*Nitrosomonas europaea* (Ne 菌) などに対するハイスループットな阻害アッセイ法を確立した。アッセイの精度指標値は十分な値を示した (Coefficient (CV) 値 = 3.8%, Signal background 比 (S/B)=2.0, Z'-factor=0.73)。

3) HAO の従来の HAO 活性測定法は、キュベットを利用した吸光法であったため、低感度・低スループットであった。そこで、新たに蛍光試薬と 384 穴プレートを用いて、高感度でハイスループットな HAO 阻害アッセイ系 (HAO 蛍光アッセイ法) を構築した。HAO のヒドロキシルアミン酸化に伴って電子が生成されるため、電子受容により蛍光物質に変化するレサズリンを用いた。この方法により、感度は従来法の 10 倍に向上し、マニュアル操作においても 1 日数千アッセイが可能となった。アッセイの精度指標値は十分な値を示した (CV 値 = 2.2%, S/B = 23, Z'-factor = 0.95)。

2. 既存の硝化抑制剤のリプロファイリング 新規薬剤開発では、まずは実験室レベルの試験で既存薬を上回る成績を出す必要がある。硝化抑制効果を持つ化合物として、60 種 (うち上市薬 20 種) が報告されているが、測定法が統一されておらず、指標とするのが困難であった。そこで、既存薬のうち 38 種 (うち上市薬 14 種) を入手し、アンモニア酸化細菌の亜硝酸生成活性に対する阻害効果を検討した。その結果、現在主に使われている上市薬 3 種中で最も強い化合物はニトラピリン (IC₅₀=1.8 μ M) であると判明し {他 2 種: ジンアンジアミド (~400 μ M), DMPP (4.1 μ M)}、全体で最も強い化合物は非上市薬のアリルチオ尿素 (0.44 μ M) であった。そこで新規硝化抑制剤リード化合物の生菌阻害活性として、ニトラピリンと同等な IC₅₀=1.8 μ M を第一目標とする事にした。また、チオウレアの周辺化合物を探索することで、より強い阻害剤が得られる可能性も示唆された。

3. HAO の構造および薬剤感受性に対する種間差の検討 土壌には 2 綱 3 属におよぶ多種のアンモニア酸化細菌種が生息しており、それらにも広く効く硝化抑制剤を開発する必要がある。一方で、これまでに詳細な解析例のある HAO は、ほぼ Ne 菌由来のもの (NeHAO) のみであり、構造や薬剤感受性に種間差があるか不明であった。そこで、系統的に離れた種の HAO 構造や薬剤感受性の比較解析を行った。

まず、既知の HAO 阻害剤であるフェニルヒドラジンに対する感受性を β AOB と

γ AOB をそれぞれ代表する Ne 菌と No 菌の 2 種由来の HAO 間で比較したところ、明確な差が認められた。さらに Ne 菌と Nm 菌を含む β AOB 3 種と、 γ AOB である No 菌に対するフェニルヒドラジンの 50%阻害濃度 (IC₅₀) を比較したところ、 β AOB と γ AOB 間では 3 倍程度の明確な差が見られた。さらに、NoHAO と NeHAO の構造を詳細に比較したところ、活性中心に位置する残基のうち、1 残基が異なることが判明した。さらに、これら残基を β AOB に属する *Nitrospira multiformis* (Nm 菌) 由来 HAO (NmHAO) の配列と比較したところ、 β AOB 内では完全に保存されていることが判明した。これらより、 β AOB と γ AOB の間には薬剤感受性に差があることが予想された。よって、広い抗菌スペクトラムを持つ薬剤を開発するために、 β AOB と γ AOB のそれぞれからモデル菌を選ぶ必要があることが判明した。今回利用した Ne 菌と No 菌は公共の生物バンクから入手可能なこともあり、HAO 阻害剤開発のモデルとして最適な 2 種であるといえる。

4. HAO 阻害剤シーズ化合物の取得と薬剤デザイン HAO の結晶構造が得られても、ゼロから薬剤をデザインすることは困難である。そこで、シーズとなる HAO 阻害剤を探索し、その化合物を基に薬剤改良を行った。まず、既知の硝化抑制剤および HAO 阻害剤の中から基質ミミックとして HAO の活性中心に結合する可能性のある 7 種を選び出し、NoHAO 結晶に添加して構造解析を行った。その結果、既知の HAO 阻害剤であるフェニルヒドラジンおよび弱い硝化抑制剤であるアセトアルドキシム(CH₃-CH₂-O-NH)の結合 HAO 構造をそれぞれ 2.4 Å と 2.1 Å の分解能で得ることに成功した。

これら化合物は、活性中心である Heme P460 上の隣り合う位置に結合していたため、この特徴を生かし、フラグメントベースの薬剤デザインを兼ねた市販化合物探索を行った。まず、計算機上で重ね合わせた 2 つの結合構造上の各化合物の特徴的な官能基をファーマコフォアに設定し、2 つの化合物の特徴を併せ持つ化合物の探索を可能にした。このモデルを基に、市販化合物ライブラリ約 500 万種 (ナミキ商事) に対してファーマコフォアサーチを行った (CCG 社の創薬支援ソフトウェア MOE を利用)。この時、NeHAO と NoHAO の基質ポケット形状でフィルタリングすることにより、ポケットに入らない形状を持つ化合物は排除した。その結果、989 化合物のヒットが得られ、そこからさらにクラスタリングと目視により 98 化合物に絞り込んだ。そのうち入手が容易であった 77 化合物を阻害アッセイ用に購入した。

5. 新規硝化抑制剤リード化合物の創出 購入した 77 化合物の阻害効果を検証するため、HAO 蛍光アッセイ法を用いて NeHAO および NoHAO 双方に対する阻害アッセイを行った。その結果、500 μ M の阻害剤濃度で 50%以上の阻害活性をもつ化合物が、NeHAO において 9 種、NoHAO において 22 種ヒットした。これらのうち、最も強い阻害剤は分子質量 122 Da の化合物であり、NeHAO と NoHAO に対する IC₅₀ がそれぞれ 43 nM と 250 nM という非常に良好な値を示した (以下 122-Da 化合物)。122-Da 化合物が結合した NeHAO 構造を解析したところ、ファーマコフォアサーチの予測と同様に、活性中心の Heme P460

上に結合することが判明した。

次に、アンモニア酸化細菌の生菌を用いて、122-Da 化合物の硝化活性阻害効果を検証した。その結果、 IC_{50} は $1.85 \mu M$ (Ne 菌) と $19.3 \mu M$ (No 菌) であった。この値は、市販の阻害剤に比べても遜色がない値であり、リード化合物として十分な薬効を持つ阻害剤の開発に成功したといえる。一方で、精製酵素に対する IC_{50} に比べて 20~40 分の 1 程度に低下しており、122-Da 化合物の誘導体 7 種でも同様な傾向が見られた。逆に 122-Da 化合物と構造が似ている 124-Da 化合物においては、生菌での阻害活性が 20 倍ほど上昇していた (NeHAO, 約 1 mM; Ne 菌, $47.6 \mu M$)。これらより、122-Da 化合物は現時点では膜透過性が低い、124-Da 化合物の持つ官能基の導入などにより、さらなる活性向上が期待できる有力なリード化合物であると判明した。

【結論】 本研究では、系統的に離れた *N. europaea* と *N. oceanus* の双方を対象にした硝化抑制剤開発戦略の重要性を示し、HAO の結晶構造解析、フラグメントベースの薬剤デザイン、酵素および菌体レベルでの阻害剤アッセイ法を用いて硝化抑制剤候補化合物の創出を行った。その結果、市販硝化抑制剤に匹敵する阻害活性を持つ 122-Da 化合物を見出すことに成功した。122-Da 化合物は、結合効率指数 { $BEI = \text{阻害活性 (p}IC_{50}) / \text{分子質量 (kDa)}$ } が 61 と良好であったため、官能基付加などによる修飾の余地を多く残している。さらに、作用機序も明確であるため、今後のさらなる薬剤改良により、既存薬を凌駕する活性を持つ薬剤に構造展開できる事が期待される。よって、本研究において見いだされた 122-Da 化合物とその周辺化合物は、硝化抑制剤のリード化合物候補として十分な性質を持つ化合物だといえる。