

# 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、田中良樹、Simon Miller、西ヶ谷有輝

株式会社アグロデザイン・スタジオ





# アセト乳酸合成酵素 ALS を標的とした除草剤

## 分岐鎖アミノ酸の合成

アミノ酸

セリン・システイン・アラニン



ピルビン酸

Aceto Lactate Synthase  
アセト乳酸合成酵素



アセト乳酸



分岐鎖アミノ酸  
バリン・ロイシン

## 植物に特有な酵素

- 阻害剤の動物毒性リスクが少ない -

バリン・ロイシンを

合成可能



植物

合成できない  
(必須アミノ酸)



動物

## 標的として実績あり

- 40種以上の既存薬 -



1970年代から市販

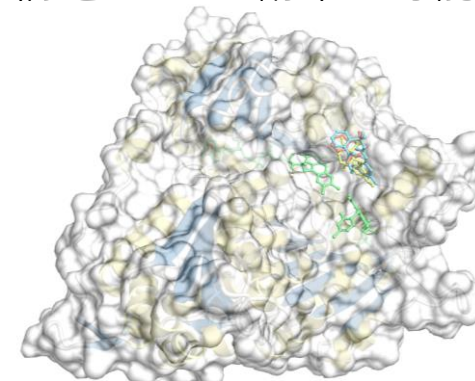
## 薬剤抵抗性雑草が問題

- 新規骨格の薬剤ニーズ -



## 結晶構造が既知

- 構造ベース創薬が可能 -



PDB : シロイヌナズナ-ALS複合体構造 (13剤)



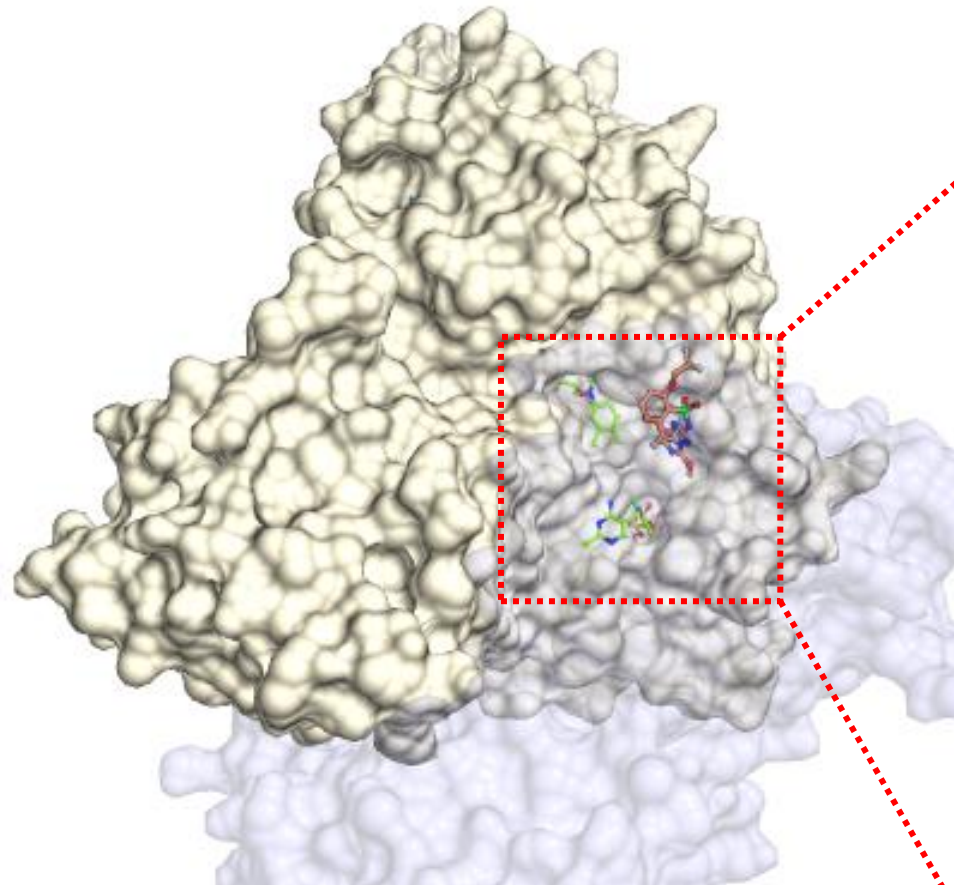
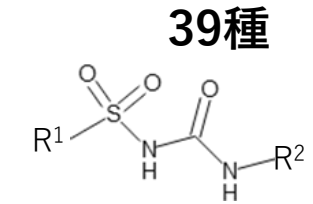
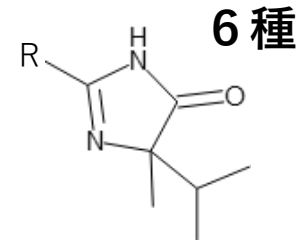
# ALSと既存薬の特徴

## ALS構造の特徴

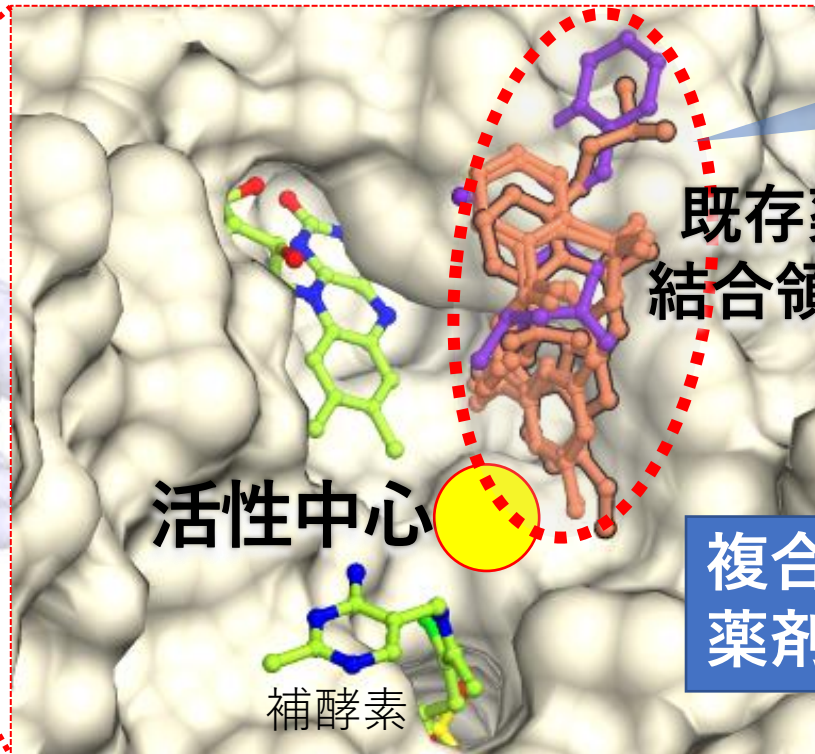
- 二量体界面に活性中心
- 幅広いポケット
- 補酵素が結合

## 既存薬の特徴

- 阻害剤基本骨格は二種類



*Arabidopsis thaliana* ALS : PDB 5WJ1等



PDB構造13種  
全て同じ結合領域

複合体構造が多ければ  
薬剤設計がより正確に

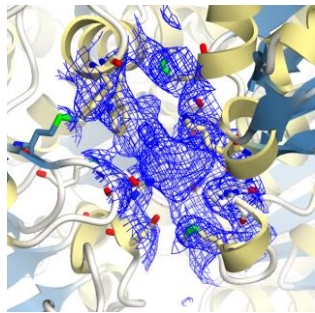




# リード化合物創出

## 結晶構造解析

ハイスループット  
複合体構造解析

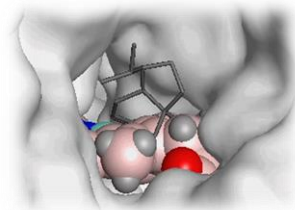
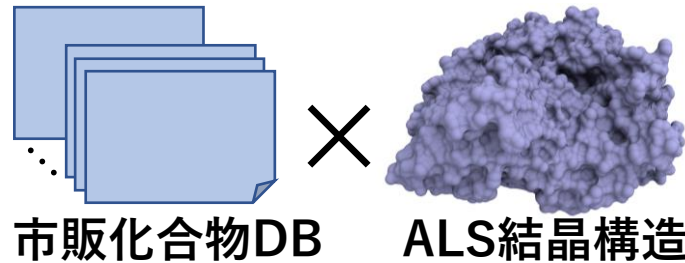


既知複合体：13種  
未知複合体：約40種



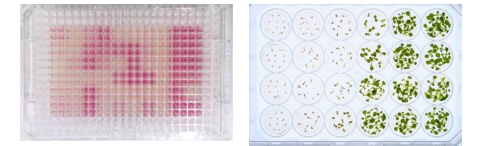
## 大規模 *in silico* スクリーニング

スーパーコンピューター解析



## リード最適化

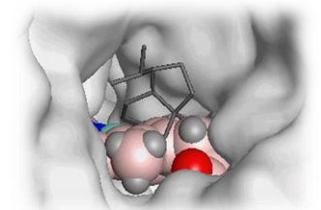
*in vitro* 試験  
*in vivo* 試験



化学合成



シミュレーション





# *In silico* スクリーニング

解析精度向上のための  
予備実験

市販化合物データベース  
(**~1000万**化合物)

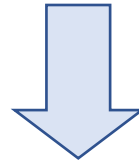
Sanitization  
(**~700万**化合物)

Dockingスコア計算  
(**~700万**化合物)

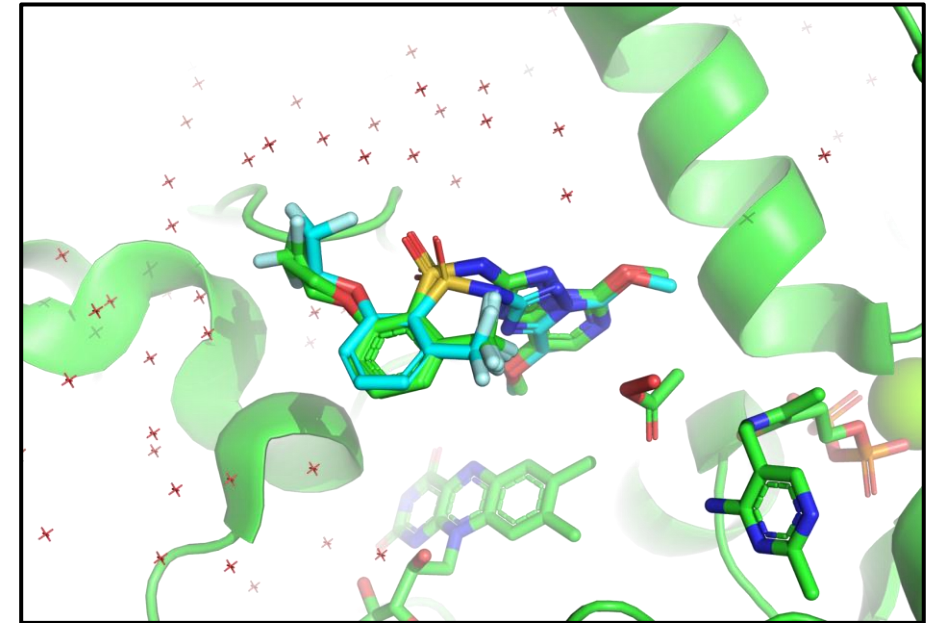
スコア上位選抜  
(**5万**化合物)

購入  
(**268**化合物)

PDB & 当社決定の  
複合体結晶構造を  
利用したパラメータ調整



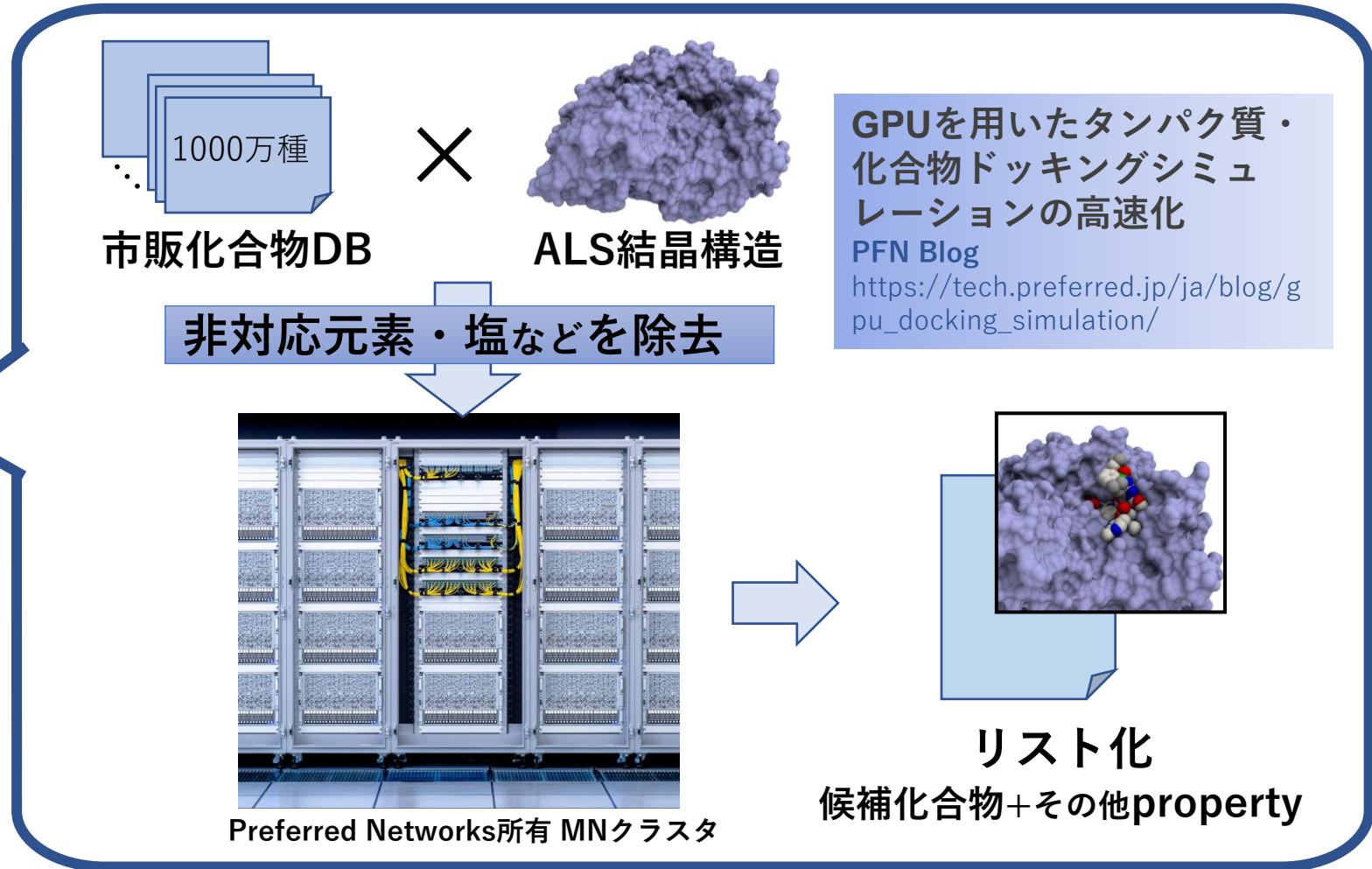
結晶構造をよく再現する  
パラメータの設定



例 Penoxsulam + ALS複合体 (PDB ID: 5WJ1)  
緑: 複合体結晶構造 (PDB登録構造)  
水色: ドッキングによる予測

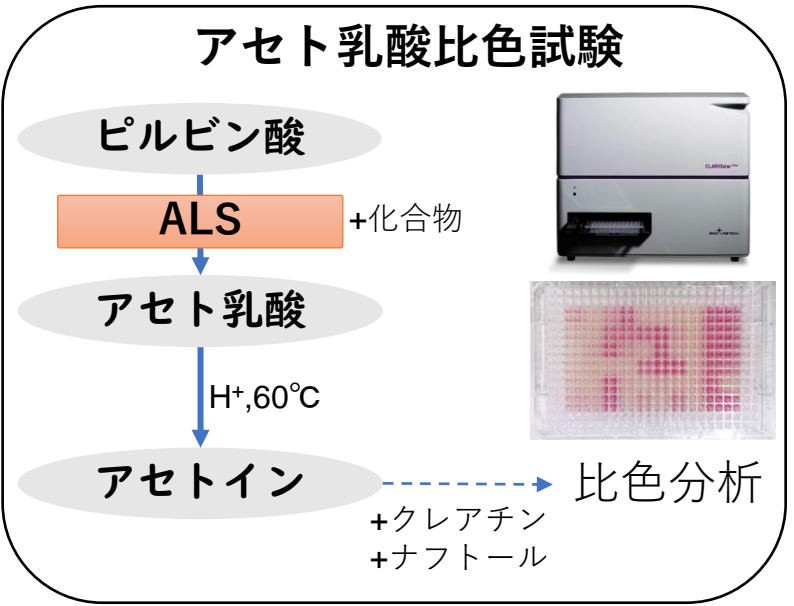


# In silico スクリーニング

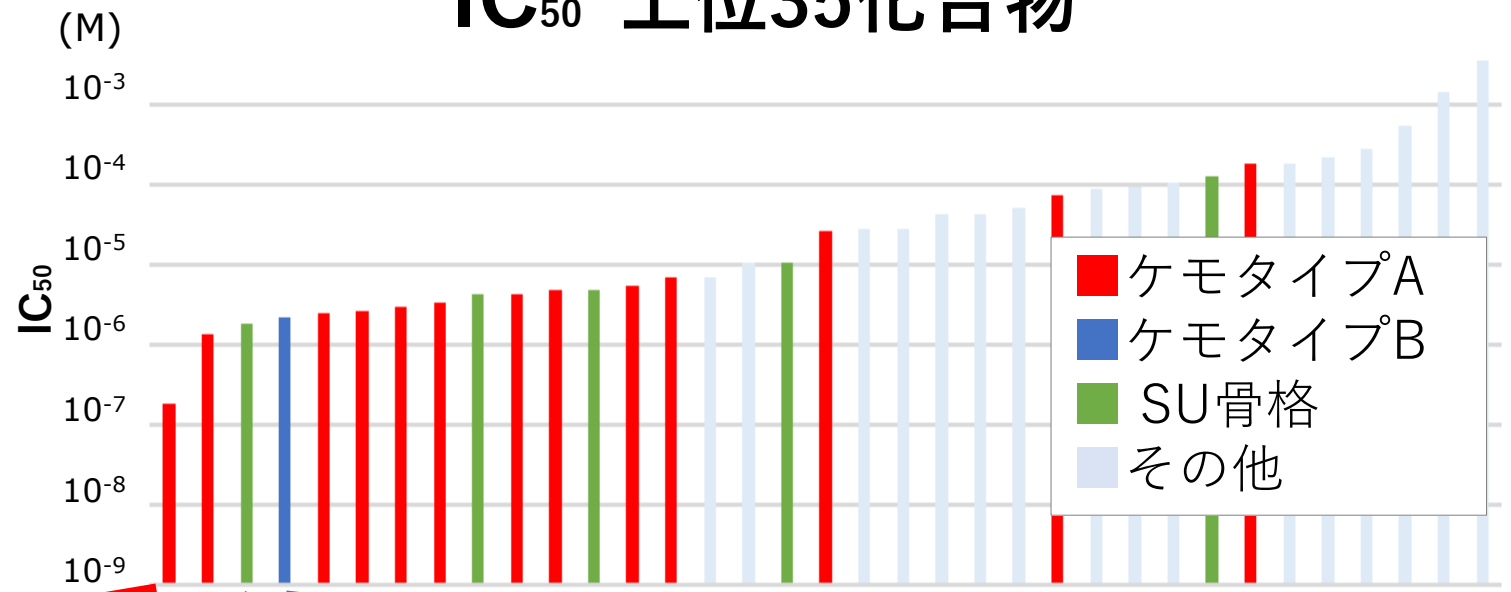


ドッキングスコアリストを基に選定  
合計268化合物を購入

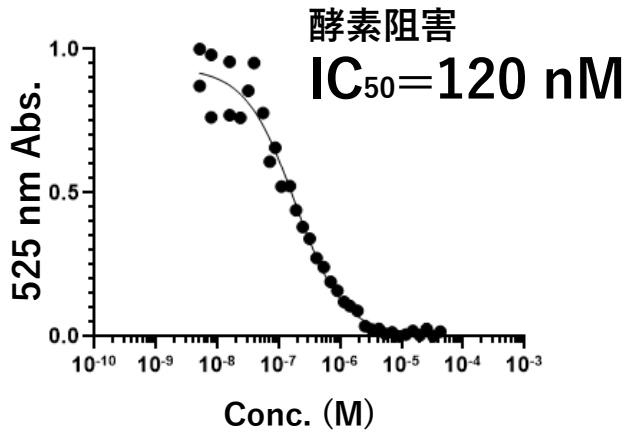
# ドッキングヒット化合物 *in vitro* アッセイ



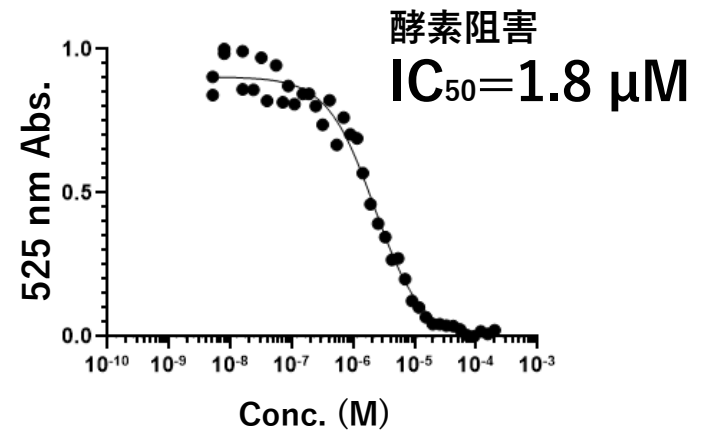
## IC<sub>50</sub> 上位35化合物



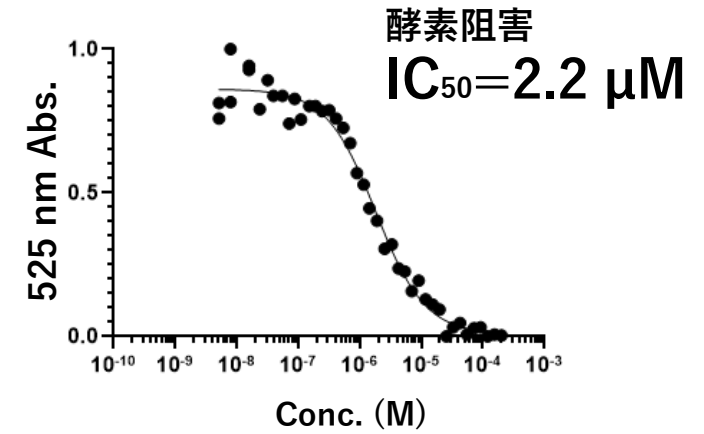
### 新規ケモタイプA



### 新規SU骨格化合物



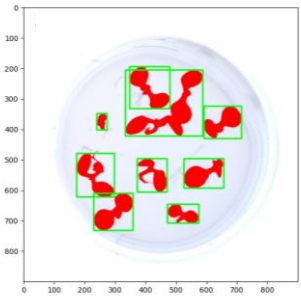
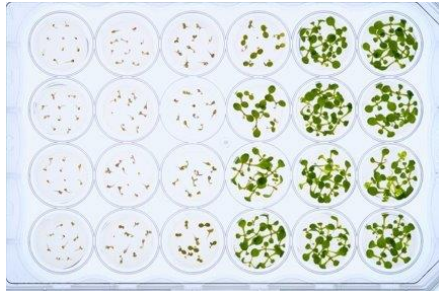
### 新規ケモタイプB





# シロイヌナズナ生育阻害試験

## シロイヌナズナ 生育阻害試験

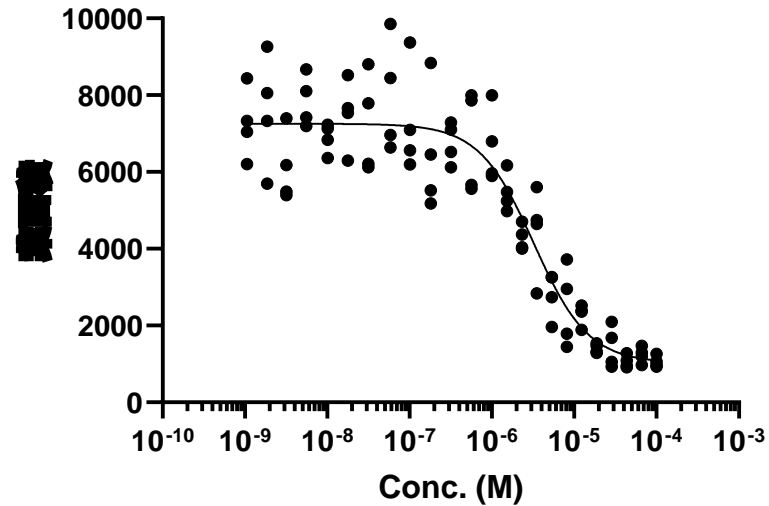


葉面積を計測

### 新規ケモタイプA

生育阻害

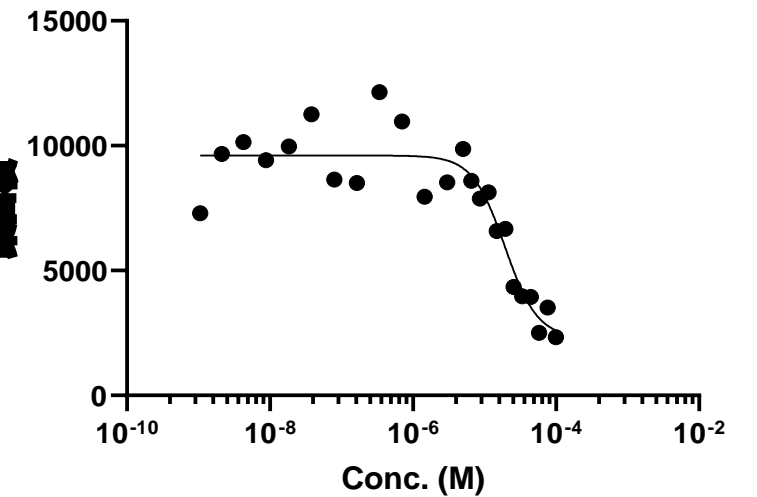
$EC_{50}=3.2 \mu\text{M}$



### 新規ケモタイプB

生育阻害

$EC_{50}=19 \mu\text{M}$



新規ケモタイプAと新規ケモタイプBの  
シロイヌナズナ生育阻害活性を確認





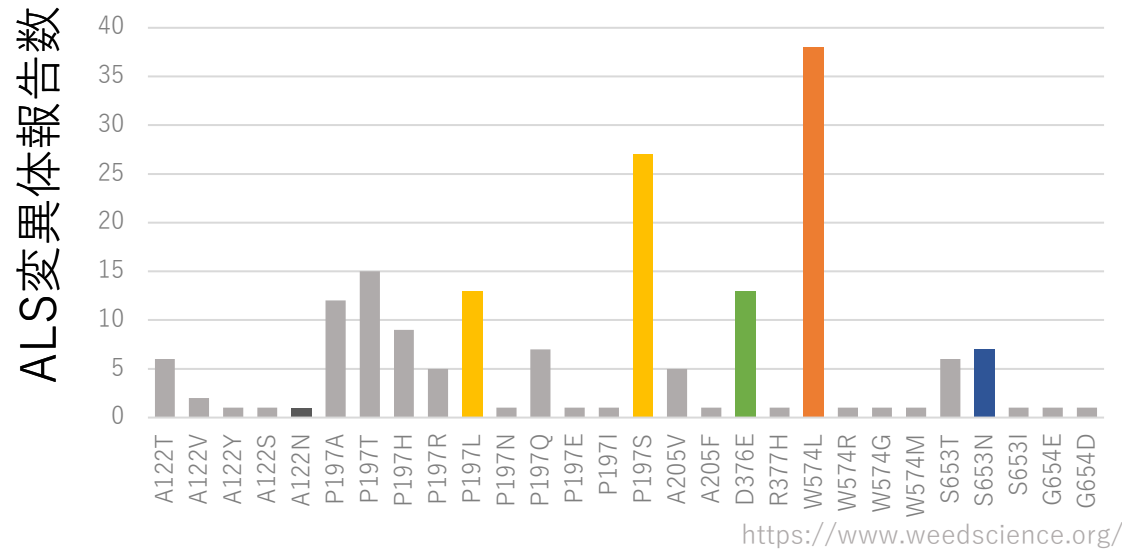
# 薬剤抵抗性ALSに対する 新規化合物の有効性





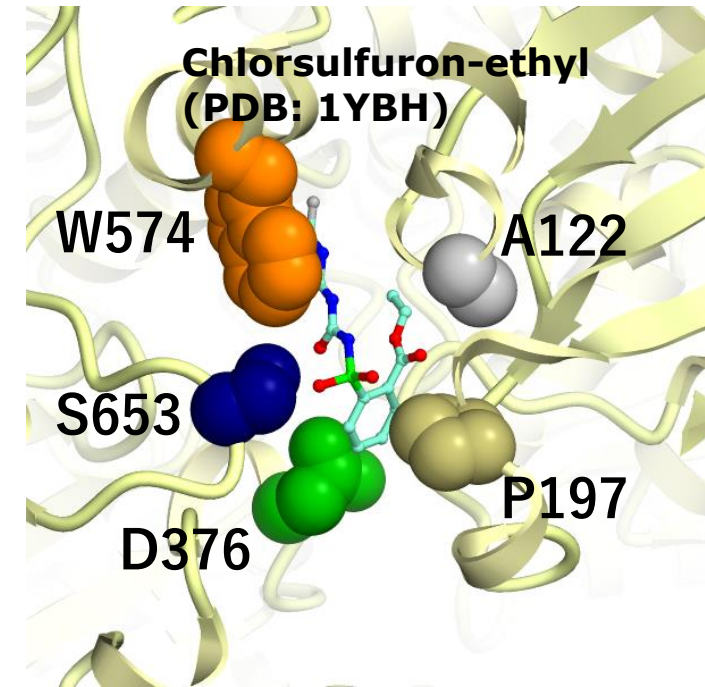
# 既存ALS阻害剤 抵抗性変異

## ALS変異体報告数



28の変異の中で W574L変異は最も数が多く  
イミダゾリノン・スルホニルウレア両系統に抵抗性

## 既存薬複合体結合部位



既存薬の結合部位周辺に変異

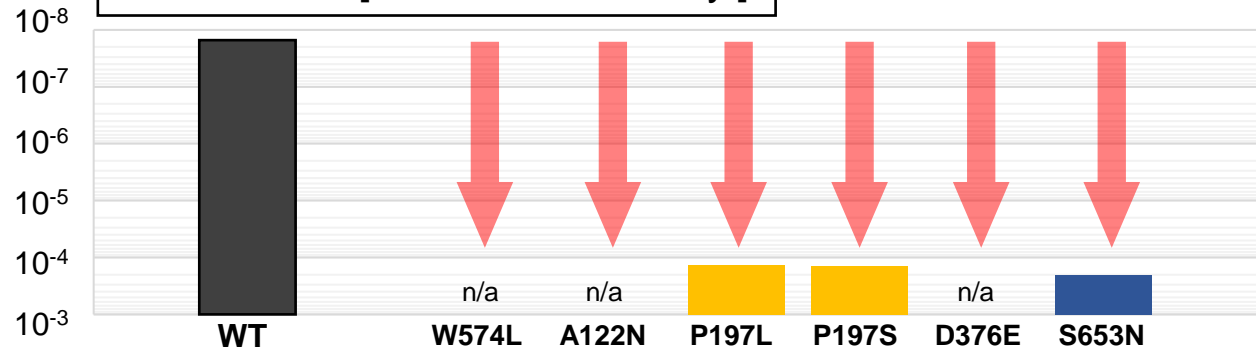
既知抵抗性変異に対して有効な化合物を探索



# 抵抗性変異ALSに対する候補化合物の有効性

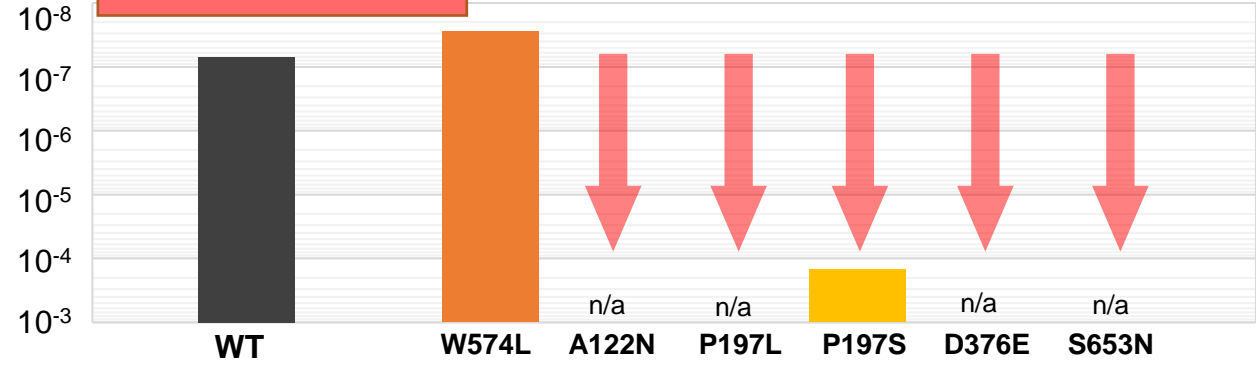
ALS阻害活性  
IC<sub>50</sub> (M)

SU系既存薬 [Bensulfuron-methyl]



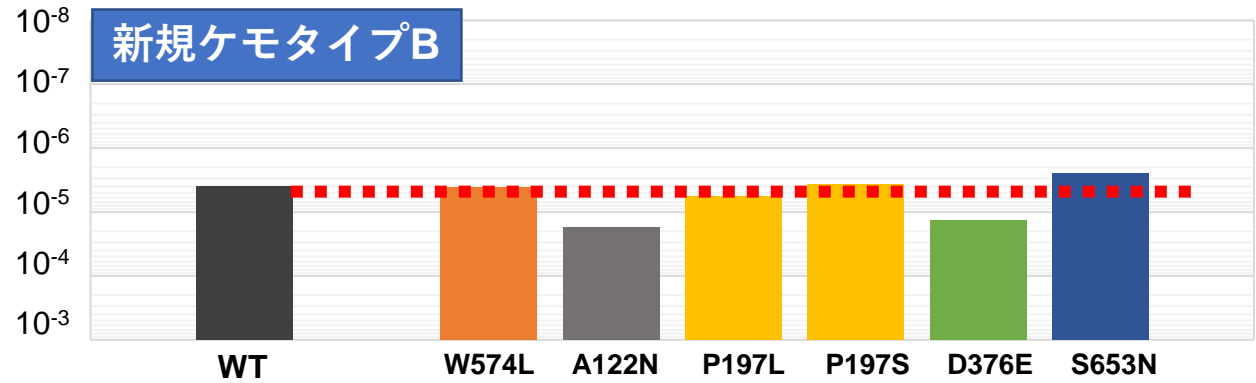
効果があった変異体  
なし

新規ケモタイプA



効果があった変異体  
『W574L』のみ

新規ケモタイプB



効果があった変異体  
5種全て

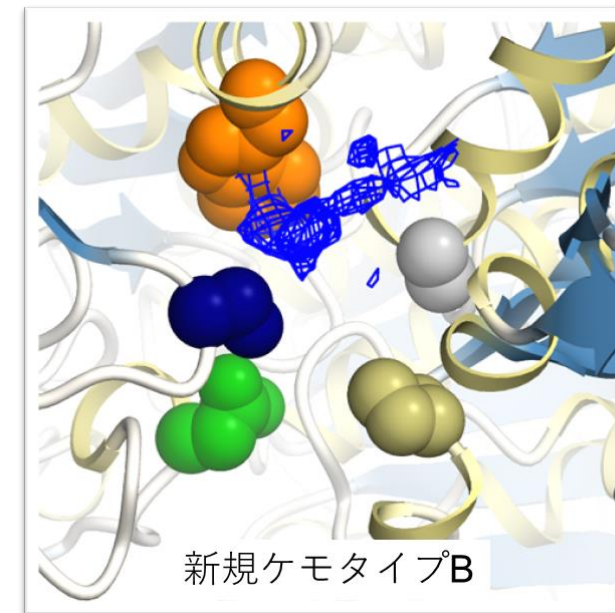
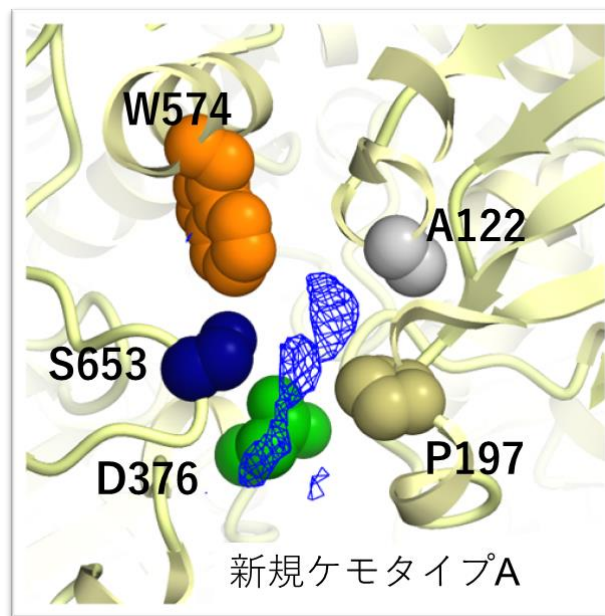
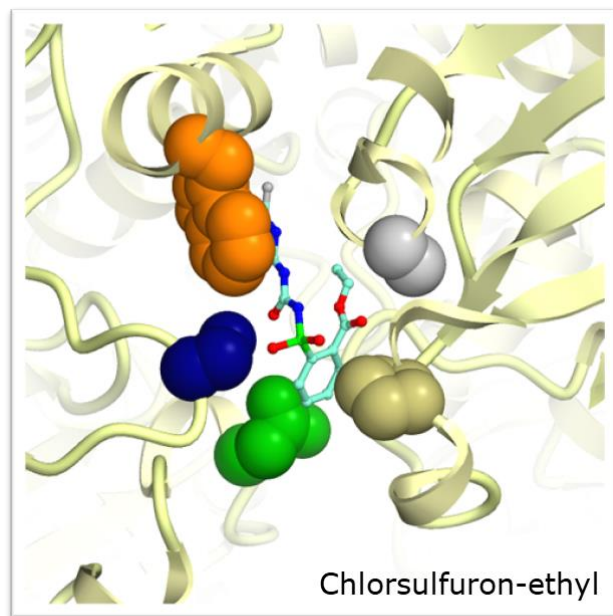
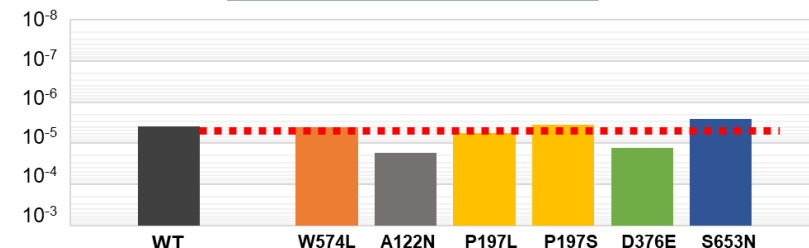
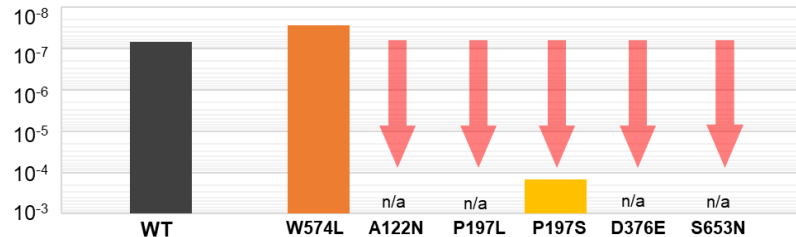
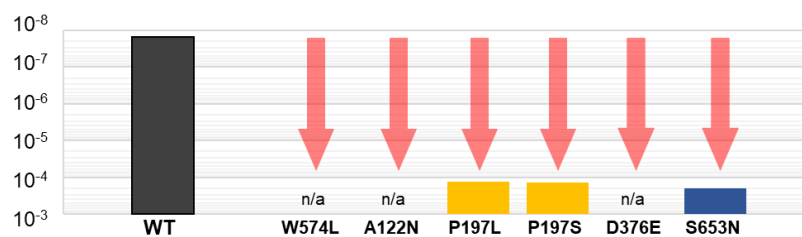
# 新規ケモタイプ 複合体構造解析

## SU系既存薬 [Bensulfuron-methyl]

## 新規ケモタイプA

## 新規ケモタイプB

ALS阻害性 (M)



既存薬

既存薬に近い位置に結合

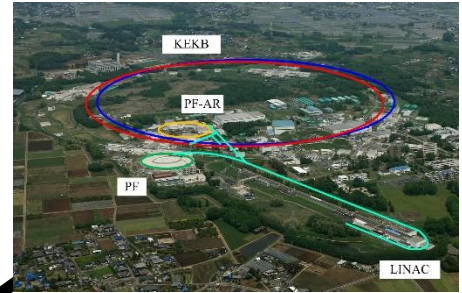
既存薬と異なる位置に結合

ケモタイプBは抵抗性変異に有効なリード

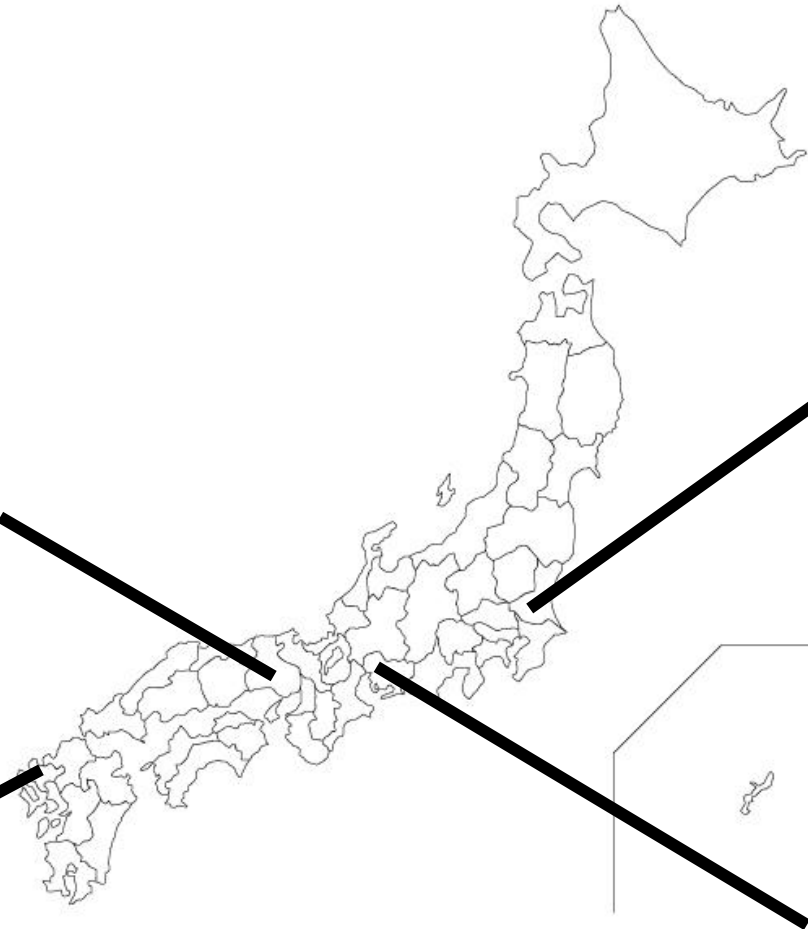


タンパク構造解析可能な  
**国内放射光施設**

理化学研究所  
**SPring-8**  
(兵庫)



高エネルギー加速器研究機構  
**Photon Factory**  
(つくば)



佐賀県立九州シンクロトロン光研究センター  
**SAGA-LS**  
(佐賀)

**あいちSR**  
(愛知)



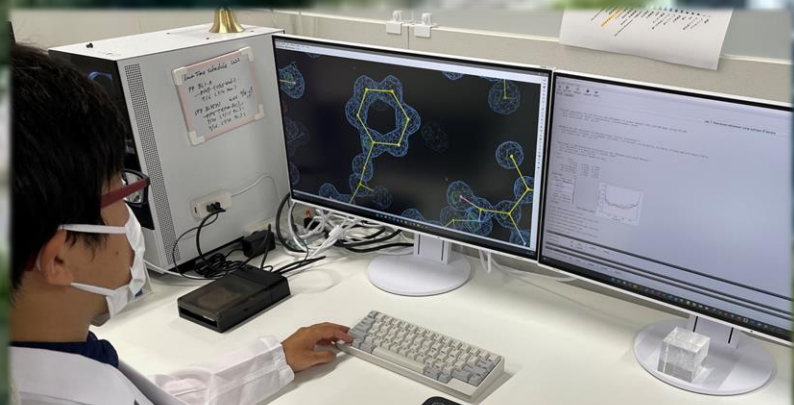


# 国内トップクラスの タンパク質の3次元構造解析能力

タンパク質（酵素）結晶

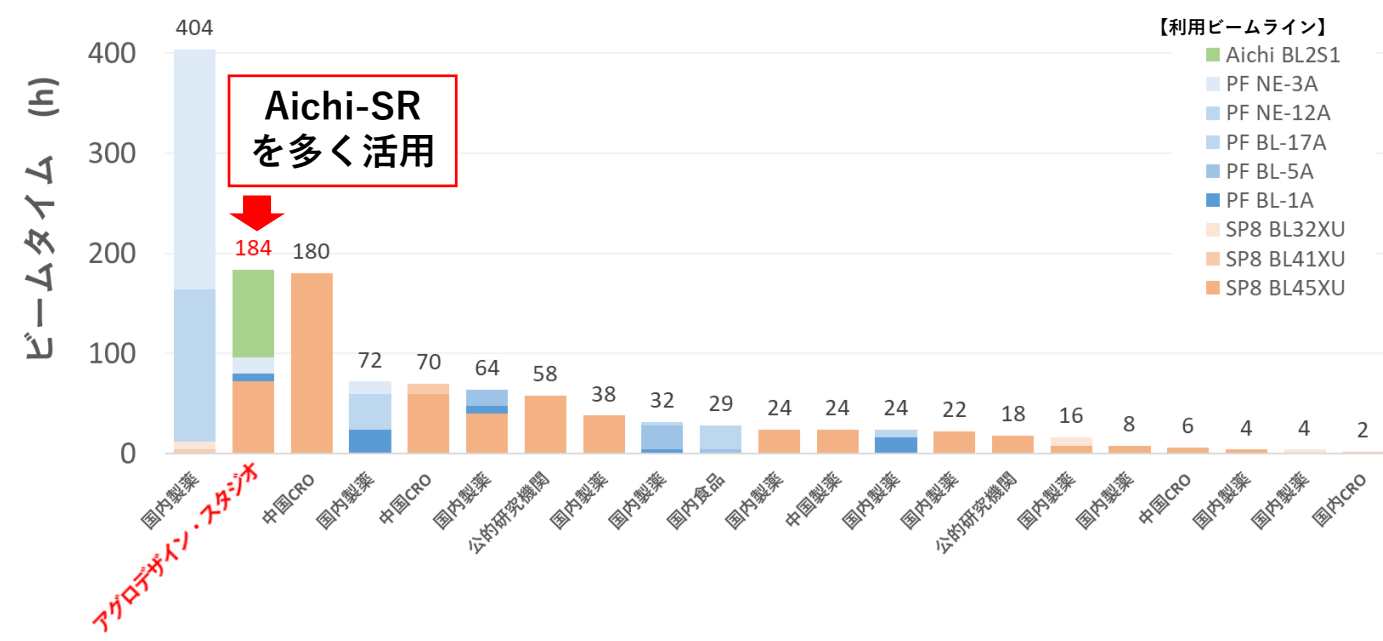


大型放射光施設を利用した結晶測定



解析担当：田中良樹博士 他3名  
(東大濡木研で博士号取得、元奈良先端大助教)

国内放射光ビームライン成果占有利用(商用利用)測定時間数 (2022年8月~12月) ※当社調べ

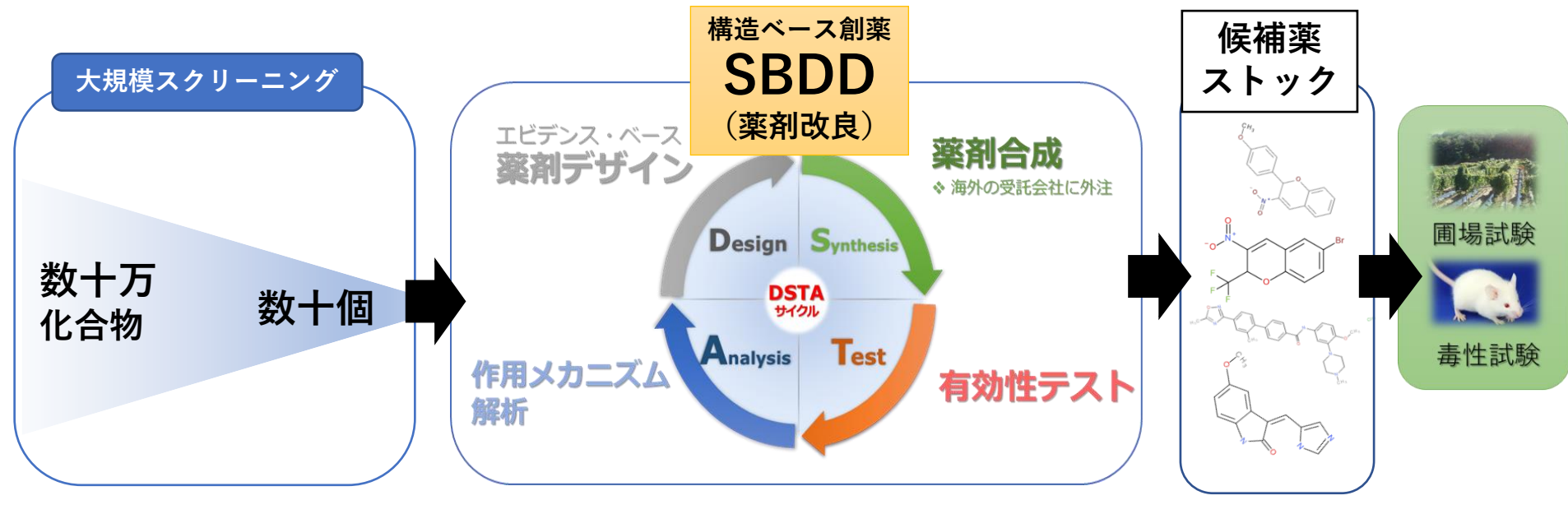


国内有数の豊富な  
ビームタイムを確保  
毎週1回程度のビームタイムを確保



# 次世代型の農薬『分子標的農薬』

## 分子標的農薬



## 従来のぶっかけ試験

個体に直接添加



数千化合物

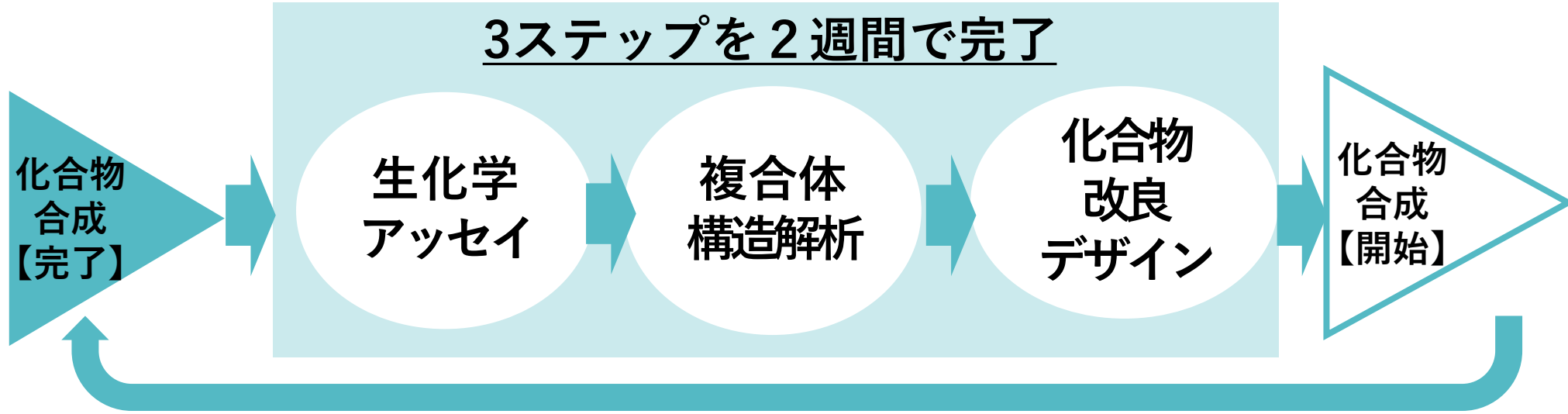
数十個

数個

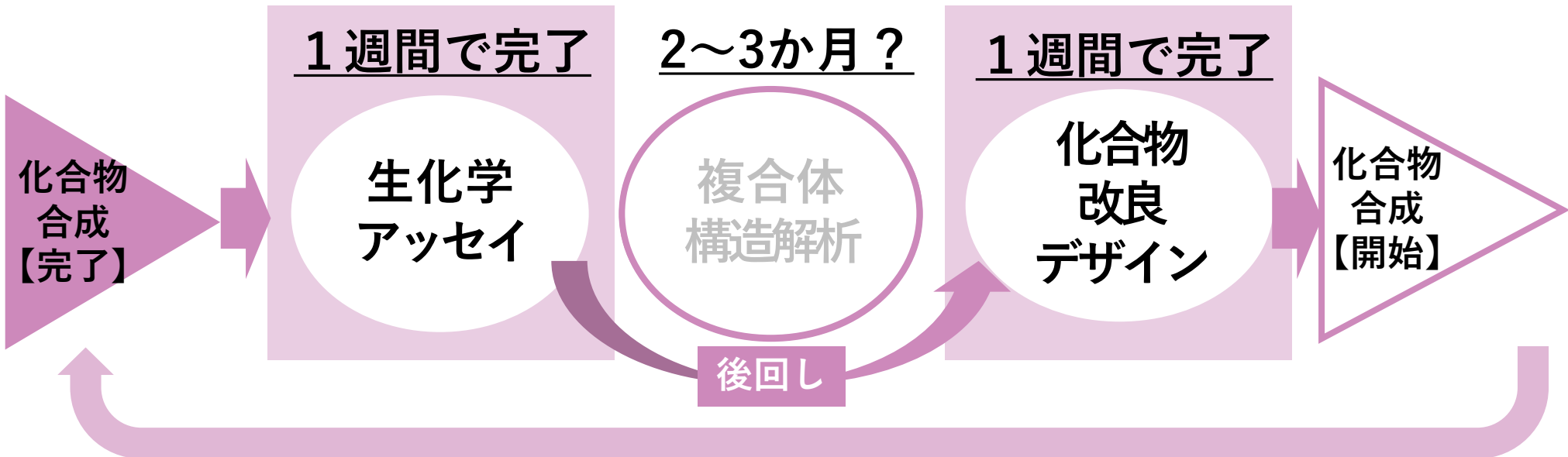
実用化

# SBDDサイクルを高速で回す

## 理想



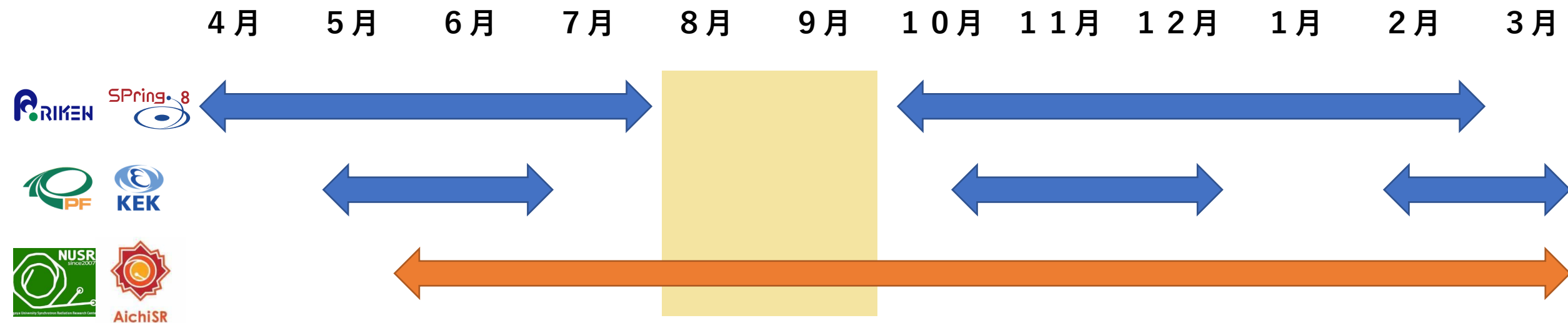
## 現実



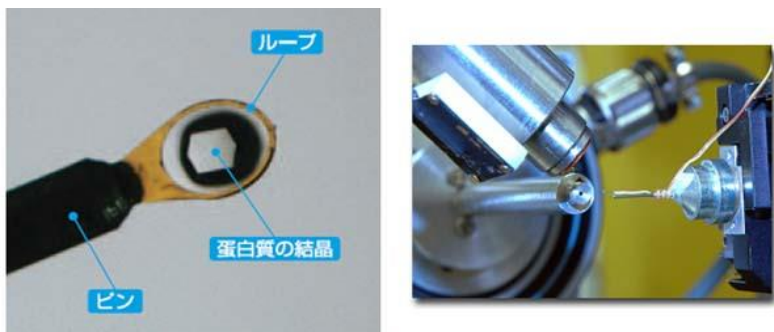




# 国内放射光施設の運転状況

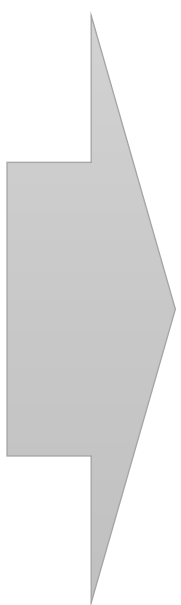


## 従来法 (ループ法)



### 問題点

- ・ 結晶拾いに熟練の技術が必要  
(自動化が困難)

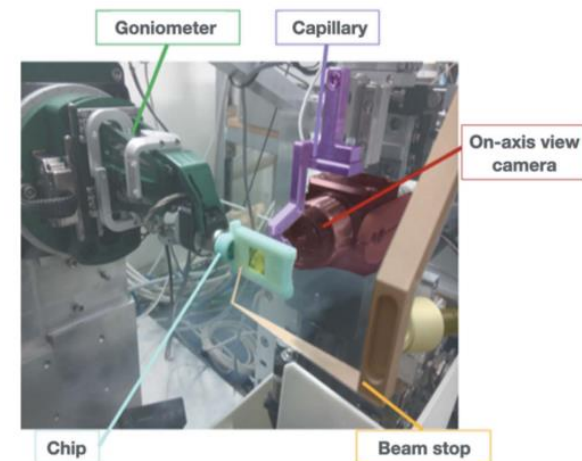


## 室温測定法

### フィルム上で



### チップ上で

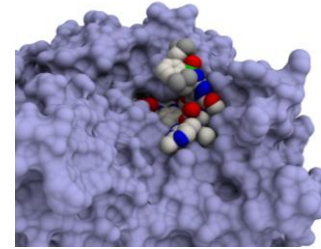


Chaussavoine I. et al. (2022) J. Synchrotron Rad. **29**, 439–446



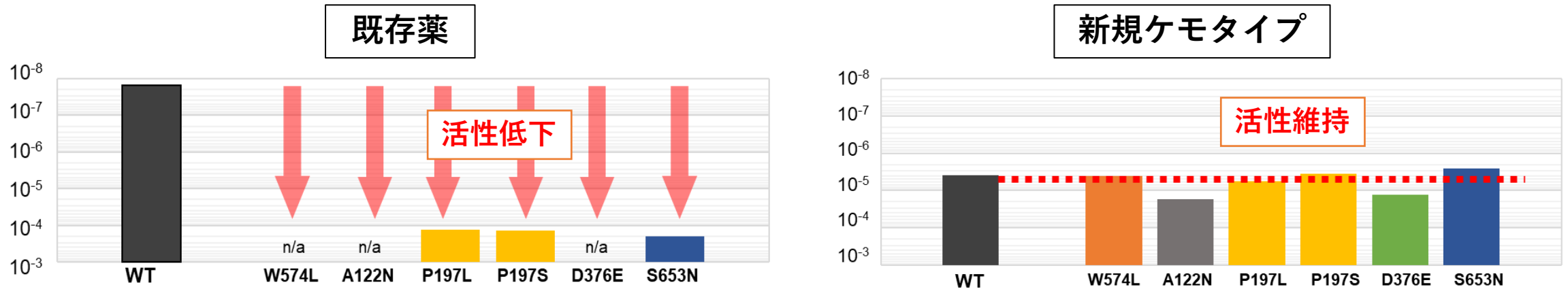
# まとめ

大規模 *in silico* スクリーニングにより、  
市販化合物から新規ケモタイプ化合物の選抜に成功



タンパク質立体構造と計算機を利用した薬剤探索&デザイン

変異ALSに対して、新規ケモタイプの酵素阻害活性維持を確認



農薬SBDDに重要な室温測定法を検討

# 謝辭



Chavas MGH Leonard

梅名 泰史

小野田 浩宜

石谷 隆一郎

武本 瑞貴

山本 雅貴

坂井 直樹

平田 邦生

千田 俊哉

加藤 龍一

山田 悠介

引田理英