

論文審査結果の要旨

ウラシル DNA グリコシラーゼ(*ung*)は、DNA のシトシンの脱アミノ化によってウラシルに変換された結果生じる G : U ミスマッチを取り除く塩基除去修復因子として機能しており、大腸菌からヒトに至る多くの生物に保存されている。シトシンが脱アミノ化を受けウラシルになることは細胞内 DNA で頻繁に見られ、ウラシルが生じると対側にアデニンを挿入し、グアニンからアデニンへの塩基置換が生じる。ウラシル DNA グリコシラーゼをコードする *ung* の欠損株では、G:C→A:T トランジションが誘発されることが知られている。このように *ung* の転写制御機構の解明は生物の突然変異生成と深く関与するものである。

一方、大腸菌において、*ung* の遺伝子発現は定常期で著しく低下する一方、二成分制御系 CpxR/CpxA の発現が上昇することが知られていたが、その詳細な分子機構は不明であった。本研究において、大腸菌 CpxR/CpxA 系による *ung* の詳細な転写機構が解明された(主論文 1)。

さらに大腸菌二成分制御系欠損株を用いた DNA マイクロアレイのデータを解析した結果、細胞内の酸化還元状態を感知する二成分制御系 ArcA/ArcB によって、DNA 修復に関わる遺伝子、*uvrA* の発現が制御されていることが見出された。詳細な転写解析より、*uvrA* は、ArcA/ArcB により負に制御されることを明らかにした(主論文 2)。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値のあるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成 17 年 2 月 22 日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	伊原 誠 <small>い ほん まこと</small>
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農 第 8 4 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Electrophysiological actions of neurotoxic insecticides on native and recombinant ligand gated ion channels (生得および組換えリガンド依存性イオンチャンネルに対する神経作用性殺虫剤の電気生理学的活性)
論文審査委員 (主査)	教授 駒 井 功 一 郎
(副主査)	教授 村 上 哲 男
(副主査)	教授 河 村 幸 雄

論文内容の要旨

指数関数的に増加し続けている地球上の人口を養うための食糧の増産は人類にとって非常に重要な課題である。近年、遺伝子組み換え植物の開発も行われているが、安全性や倫理的問題が相まって、広く受け入れられない状態が続いている。その中で、殺虫剤を初めとする農薬の使用は、効率のいい食糧生産のために必要不可欠である。神経作用性殺虫剤は、哺乳類－昆虫間の選択毒性に優れ、かつ即効性であることから、農業用殺虫剤のみならず家庭用殺虫剤としても広く用いられている。中でも、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)や γ -アミノ酪酸(GABA)受容体を初めとする Ligand Gated Ion Channel (LGIC)を標的とする殺虫剤は、選択毒性および効果が高く、現在世界中で売り上げを伸ばしている。ネオニコチノイド系化合物やフェニルピラゾール系化合物がその例である。しかし、これまでに LGIC を標的とする化合物の昆虫の神経系に対する詳細な生理作用は、代表的な化合物を除いて詳細に評価されていない。そこで本研究では、電気生理学的手法を用いて、昆虫の中樞神経から調製した神経細胞、およびアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた組み換え受容体に対する殺虫剤および類縁化合物の作用機構について解析した。

(1) ホールセルパッチクランプ法による昆虫神経細胞応答の安定記録

昆虫の神経細胞は殺虫剤作用機構を調べるために有用な研究材料である。しかし、しばしば受容体の「Run-down」現象がおこるため、その電気生理学的応答をホールセルパッチクランプ法によって安定に記録することはこれまで至難であった。そこで、実験に用いる溶液を改良した結果、細胞外溶液に 5-10 mM のグルコースを、細胞内液に 20 mM 程度のピルビン酸ナトリウムを添加することにより、ワモンゴキブリおよびショウジョウバエの神経細胞における GABA 受容体、抑制性グルタミン酸受容体、およびアセチルコリン受容体の電気生理学的応答を1時間以上にわたって安定に記録することが可能となった。

(2) 抑制性 LGIC に対する非競合的アンタゴニストの選択性

上述のように改良されたパッチクランプ法を駆使して、ワモンゴキブリの dorsal unpaired motor neuron の GABA および抑制性グルタミン酸受容体に対する γ -Hexachlorocyclohexane (γ -HCH)および 4'-Ethynyl-4-n-propylbicycloorthobenzoate (EBOB)の活性を測定した。その結果、これら化合物はいずれも GABA 受容体のみならず抑制性グルタミン酸受容体に対しても低濃度で阻害作用を示すことがわかった。

(3) ネオニコチノイドのニコチン性アセチルコリン受容体に対する電気生理活性と構造活性相関

イミダクロプリドを初めとするネオニコチノイド系殺虫剤の nAChR に対する作用を評価するために、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたヒヨコ($\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$)およびショウジョウバエとヒヨコのハイブリッド(ALS $\beta 2$, SAD $\beta 2$) nAChR および、ワモンゴキブリの腹部神経節から調製した神経細胞に対する、イミダクロプリドとその関連化合物のアゴニスト作用を電気生理学的に測定した。まず、2電極膜電位固定法を用いてアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた各種 nAChR に対する化合物の作用を調べたところ、イミダクロプリドを初めとするネオニコチノイドは脊椎動物型の受容体よりもショウジョウバエとヒヨコのハイブリッド型の受容体に対してより高い効果を示すことを見出した。このことから、ショウジョウバエ nAChR の α サブユニットにはネオニコチノイドとの相互作用に有利にはたらく構造因子が存在することが示唆された。続いて、4種の受容体の中でネオニコチノイドに対して最も反応性の高かった SAD $\beta 2$ nAChR を用いて、イミダクロプリドとクロチアニジンを基準化合物として、それらの芳香環部分、ニトロイミノ基、およびイミダゾリジン部分を変化させた計8種のネオニコチノイド誘導体のアゴニスト活性を測定した。その結果、ニトロメチレン基を有する化合物がニトロイミノ基を有する化合物よりもより高い親和性を示すことが明らかとなった。そこで、イミダクロプリドとそのニトロメチレン類縁体のニトロ基と受容体のモデル分子との水素結合エネルギーを計算した。その結果、ニトロイミノ型化合物よりもニトロメチレン型化合物の方がより安定にモデル分子と水素結合を形成することが示唆され、このことが受容体との強い相互作用をもたす原因のひとつとしてはたらいっているものと推定された。

さらに、イミダゾリジン環を持つイミダクロプリド型の化合物よりもそのような環構造を持たないクロチアニジン型の化合物の方がよりハイブリッド受容体に対して高いチャネル開口作用を示すことを見出した。

電気生理学的手法を用いた以上の研究により、化合物の構造変化が及ぼす微少な立体構造の変化が大きな生理活性の変化をもたらすことが明らかとなった。また、GABA 受容体をターゲットとする化合物であっても抑制性グルタミン酸受容体にも作用するものがあることが明らかとなったが、電気生理学的手法を用いることでしか知ることの出来ない事例であり非常に興味深い。とくに、本研究で見いだされたパッチクランプのための溶液組成は通常は短時間しか適用できないホールセルパッチクランプ法の弱点を改善するものであり、今後昆虫の神経生理学分野での利用が大いに期待される。

論文審査結果の要旨

本論文はネオニコチノイド系化合物の作用点を明らかにし、本系列化合物が持つ哺乳動物と昆虫間に見られる高い選択性の機構を究明するために実施されたものである。これら化合物はニコチン性アセチルコリン受容体やγ-アミノ酪酸受容体 (GABA) を標的とするもので、昆虫の神経系に作用することで知られている薬剤として既に実用化されているが、神経系に対する詳細な作用機構については不明な点が多い。ここでは電気生理学的手法を用いて、昆虫の中樞神経から調整した神経細胞、およびアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた組み換え受容体に対するネオニコチノイドおよびその類縁化合物の作用機構について解析した。得られた結果の概要は次のようである。

- 1) ホールセルパッチクランプ法による昆虫神経細胞応答の測定確立
電気生理学的応答をホールセルパッチクランプ法によって安定的に評価することが困難であったが、改良を加えて長時間の測定評価を可能にした。
- 2) 抑制性 Ligand Gate Ion Channel(LGIC)に対する非競合的アゴニストの選択
1) の方法を駆使して、ワモンゴキブリの dorsal unpaired motor neuron の GABA および抑制性グルタミン酸受容体に対する γ-hexachlorocyclohexane(γ-HCH) および 4'-Ethynyl-4-n-propylbicycloorthobenzoate(EBOB)の活性を評価した。その結果、これら化合物はいずれも GABA 受容体のみならず抑制性グルタミン酸受容体に対しても低濃度で阻害作用を示すことを明らかにした。
- 3) ネオニコチノイドのニコチン性アセチルコリン受容体に対する電気生理活性と構造活性相関
代表的なネオニコチノイドであるイミダクロプリドは脊椎動物型の受容体よりもショウジョウバエとヒヨコのハイブリッド型の受容体に高い効果を示すことを明らかにした。そこでネオニコチノイドに対して最も反応性の高かったヒヨコハイブリッド受容体を用いてイミダクロプリドとクロチアニジンを基準化合物としてそれらの芳香環部分、ニトロイミノ基およびイミダゾリン部分を変化させた径種の誘導体についてそのアゴニスト活性について評価した。その結果、ニトロイミノ型化合物よりもニトロメチレン型化合物の方がより安定にモデル分子と水素結合を形成することが示唆され、このことが受容体との強い相互作用をもたらす要因であることを明らかにした。

得られた知見は既に専門学会誌に掲載されており、高い評価を得ている。これらの知見は今後の低毒性、高選択性の新規殺虫剤開発のために重要な材料を提供するものであり、本論文は博士論文として十分に価値のあるものであると判断し、ここに合格と判定した。

氏名	佐々木 千 絵			
学位の種類	博 士 (農学)			
学位記番号	農 第 8 5 号			
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
学位論文題目	Hydrolytic and substrate recognition mechanisms of rice chitinases イネ由来キチナーゼの加水分解および基質認識機構に関する研究			
論文審査委員 (主 査)	教授	深	溝	慶
(副主査)	教授	岡	本	忠
(副主査)	教授	重	岡	成