

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

## 論文内容の要旨

### 1. 緒論

キチナーゼはキチンやキトサンの $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニド結合を加水分解する酵素であり、生物界に広く存在している。魚類、動物、植物は侵入してくる病原菌に対する防御反応としてキチナーゼを分泌し、微生物、カビ、昆虫はそれらの細胞壁や外骨格にキチン質が含まれているために、成長、脱皮といった成長段階においてキチナーゼがキチン質を分解し、成長を促進していると考えられている。これらの酵素は、アミノ酸配列の相同性に基づいて、ファミリー18とファミリー19に分類されており、ファミリー18キチナーゼは微生物、ウイルス、カビ、昆虫、植物、魚類、動物など多くの生物に存在するが、ファミリー19キチナーゼは植物やいくつかの微生物にしか発見されていない。またいくつかのキチナーゼの立体構造や加水分解メカニズムも知られており、ファミリー18キチナーゼは8本の $\alpha$ ヘリックスと8本の $\beta$ ストランドからなるバレル構造を有しており、基質のアノマー型が保持される Retaining mechanism によって加水分解が起こる。一方、ファミリー19キチナーゼは $\alpha$ ヘリックスに富んだ立体構造を有しており、アノマー型が反転される Inverting mechanism で加水分解が起こることが知られている。特に植物においては、これら2つの異なるファミリーに属するキチナーゼが両方ともに存在しており、それらのキチナーゼが病原菌の侵入や様々な環境ストレスによって誘導され、植物の自己防御において協同的に働いていると考えられている。しかし、現段階では、植物になぜこれら二つの異なるキチナーゼが存在しているのかは明らかにされておらず、それぞれのキチナーゼが生体防御システムのなかでどのように関わりあっているのかは生理学的にも分子生物学的にも非常に興味深い問題となっている。

そこで、本研究では、ファミリー18キチナーゼとファミリー19キチナーゼの植物体内での役割を明らかにするために、イネ由来のファミリー18、19キチナーゼを用い、それらキチナーゼの基質結合クレフトにおけるキチンオリゴ糖の結合様式を明らかにし、さらにサブサイトの構造比較を行った。また、本来生体内で標的となりうる病原菌細胞壁成分である高分子キトサンとの相互作用とその加水分解生成物の分析を行い、高分子基質に対する作用様式の解析を行った。

### 2. イネ由来キチナーゼのオリゴ糖に対する加水分解様式

イネ由来ファミリー18キチナーゼ(OsChib3a, OsChib3b)およびファミリー19キチナーゼ(OsChialc $\Delta$ CBD, OsChia2b)を *Pichia pastoris* による発現系を用いて分泌生産し、精製を行った。得られた酵素を用い、*N*-アセチルグルコサミン6量体[(GlcNAc)<sub>6</sub>]に対する加水分解様式について比較検討を行った。OsChib3a, OsChib3b は(GlcNAc)<sub>6</sub>を主に(GlcNAc)<sub>4</sub>+(GlcNAc)<sub>2</sub>に分解することがわかり、反応初期に(GlcNAc)<sub>4</sub>の $\beta$ アノマー型が多量に生成することから、これらのサブサイト構造について、加水分解が起こる部位(触媒部位)から非還元末端側に4つ、還元末端側に2つサブサイトが存在する(-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)型の結合クレフトをもつと推定した。一方、OsChialc $\Delta$ CBD, OsChia2b は(GlcNAc)<sub>6</sub>を主に2分子の(GlcNAc)<sub>3</sub>に分解し、同様のアノマー型の分析から、(GlcNAc)<sub>3</sub>の $\alpha$ アノマー型が多量に生成しており、結合クレフトの構造を(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)型と推定した。また、それぞれのキチナーゼの(GlcNAc)<sub>6</sub>を基質としたときの加水分解反応の経時変化を得、その実験的な経時変化に基づいてデータフィッティング法による各サブサイト固有の親和力の推定を行った。その結果、ファミリー18キチナーゼは各サブサイトの親和力が結合クレフト全体に分散しているのに対し、ファミリー19キチナーゼは触媒部位に近接したサブサイトの親和力が高く、両端のサブサイトでは低いことが明らかになった。

さらに、イネ由来ファミリー19キチナーゼ(OsChialc $\Delta$ CBD)をすでに立体構造が明らかにされているオオムギキチナーゼを鋳型としてホモロジーモデリングを行った。推定された立体構造中の(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)型結合クレフトに(GlcNAc)<sub>6</sub>を結合させたところ、(-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)型結合クレフトに結合させたときよりも、その酵素基質複合体形成に関わる自由エネルギーはより低く見積もられ、(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)型結合クレフトの妥当性が証明された。また、分子動力学シミュレーションを行った際、(GlcNAc)<sub>6</sub>はサブサイトの中央部分に安定してほぼ一定の位置に結合していたのに対して、両端のサブサイトでは比較的ゆるく結合しており柔軟であることがわかった。以上より、酵素反応解析より得られたサブサイト親和力の値は、構造的にも妥当であることがわかった。

### 3. イネ由来キチナーゼとモノアセチル化キトサンとの相互作用解析

キチン質加水分解酵素に対して結合する加水分解されない高度脱アセチル化キトサン(Monoacetylated chitosan: MAC)は、酵素と高分子基質との相互作用を調べる上で有用である。本章では MAC とイネ由来キチナーゼの相互作用を解析するために、円二色性分散計を用いて本酵素と MAC との複合体の熱変性実験を行った。OsChib3a と OsChialc $\Delta$ CBD のそれぞれに MAC を添加して、222nm の CD を追跡することによって熱変性曲線を得た。その結果、OsChib3a 自体の熱変性中点温度( $T_m$ )は 57.1°C であり、OsChib3a に MAC を加えた場合  $T_m$  値が 59.5°C で 2.1°C 上昇していることがわかった。一方 OsChialc $\Delta$ CBD を用いた場合、その酵素自体の  $T_m$  が 52.1°C であり、MAC を加えた場合は 55.3°C まで上昇していた。以上の結果から OsChib3a も OsChialc $\Delta$ CBD も MAC のアセチル基を認識して何らかの相互作用を行っていると考えられた。

一方、MAC の標品中にはアセチル基を全く含まない完全に脱アセチル化されたキトサン分子が多く含まれており、より定量的な相互作用実験を行うには、これらの完全脱アセチル化キトサン分子を取り除くことが必要である。そこで *N*-アセチル基を認識するリゾチームを結合させた Sepharose 4B を用いて完全脱アセチル化キトサンの分離を試みた。その結果、完全脱アセチル化キトサン分子はこのリゾチームカラムによってうまく除去することができ、より純粋な MAC(FMAC)を得ることができた。

得られた FMAC を用いて、イネ由来キチナーゼとの相互作用を <sup>1</sup>H-NMR を用いて解析した。FMAC を D<sub>2</sub>O に溶かし、そこへ OsChib3a を添加し、FMAC の *N*-アセチル基のメチルプロトンシグナルの挙動を調べた。その結果、FMAC の *N*-アセチル基のシグナル付近に新しいシグナルが現れ OsChib3a が FMAC を加水分解していることが明らかになった。一方、FMAC に OsChialc $\Delta$ CBD を添加したところ、*N*-アセチル基のシグナルの形状には全く変化が見られなかったが、FMAC の H1 と H2 に由来するシグナルの縦緩和時間が OsChialc $\Delta$ CBD を加えることにより減少した。この結果は、OsChialc $\Delta$ CBD との相互作用によって FMAC の H1 と H2 の運動が制限されていることを示しており、FMAC はキチナーゼと静電的な非特異的相互作用を行っていると考えられた。

以上の結果より、ファミリー18キチナーゼは、高度に脱アセチル化されたキトサン分子中の単一のアセチル化された糖残基に特異的に結合することが明らかとなり、ファミリー19キチナーゼは連続して存在するアセチル化糖残基が存在しない限り特異的には結合しないものと考えられた。

### 4. 部分脱アセチル化キトサンの加水分解生成物の分析

微生物由来のキチナーゼを用いた実験より、ファミリー18キチナーゼは連続した *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)間のグリコシド結合、もしくは GlcNAc とグルコサミン(GlcN)間の結合を加水分解し、ファミリー19キチナーゼは GlcNAc-GlcNAc もしくは GlcN-GlcNAc のグリコシド結合を加水分解することが明らかにされている。しかし植物キチナーゼの分解

論文審査結果の要旨

特異性についての実験はまだなされていない。そこで、イネ由来のキチナーゼを用いてさまざまなアセチル化度のキトサンの加水分解を行い、その反応を  $^{13}\text{C-NMR}$  によって追跡し、生成物の還元末端および非還元末端の糖残基構造の解析を行った。

その結果、OsChib3a は GlcNAc-GlcNAc もしくは GlcNAc-GlcN のグリコシド結合を同頻度で加水分解しており、OsChialcCBD は GlcNAc-GlcNAc もしくは GlcN-GlcNAc の結合を加水分解するが、GlcN-GlcNAc の分解速度は極めて低く、GlcNAc-GlcNAc 結合の分解に対する選択性が高いことがわかった。これらの結果より、OsChib3a はさまざまなアセチル化度のキトサンに働くのに対して、OsChialcCBD はアセチル化度が高いキトサンに特に有効に働くことが分かった。これらの特異性は、イネ由来キチナーゼの植物体内での役割に深く関係していると考えられた。

5. 総合考察

本研究において、イネ由来キチナーゼのキチンオリゴ糖、部分アセチル化キトサンに対する加水分解様式および結合様式を、ファミリーの違いによって分類することができた。ファミリー1-8キチナーゼとファミリー1-9キチナーゼでは全く異なったサブサイトを有しており、各サブサイト固有の親和力の分布も異なっていた。特にファミリー1-9キチナーゼは連続した GlcNAc を特異的に認識し加水分解することが明らかになった。一方、ファミリー1-8キチナーゼは GlcNAc-GlcNAc 間だけでなく GlcNAc-GlcN 間も加水分解することから、さまざまなアセチル化度のキトサンを加水分解することが明らかになった。これらの結果は、FMAC を用いた結合実験の結果とも一致していた。

これまで一つの植物種内での異なるファミリーに属するキチナーゼの作用様式の比較は行われておらず、本論文はイネのファミリー1-8キチナーゼとファミリー1-9キチナーゼのオリゴ糖やキトサンに対する相互作用について詳細な比較を行った最初の例である。イネには今回用いたキチナーゼを含めてファミリー1-9キチナーゼが6種類、ファミリー1-8キチナーゼが2種類存在し、そのうち塩基性キチナーゼが液胞分泌型キチナーゼで、酸性キチナーゼはアポプラスト型キチナーゼと考えられている。これらのキチナーゼ中には、病原菌侵入を知らせるシグナルとして病原菌細胞壁からオリゴ糖を生成したり、菌細胞壁を加水分解して生育を抑えるものなど様々な機能をもつものが存在していると考えられている。今回用いたファミリー1-9酵素はアポプラストに分泌することが明らかにされており、アポプラスト中の防御システムにおいて、植物病原菌表層のキチン質に対して特異的に作用していると考えられる。またファミリー1-8酵素は病原菌の感染によって誘導されることが知られており、ファミリー1-9酵素では加水分解できない糖タンパク質や糖脂質中の *N*-アセチルグルコサミンを含む糖鎖に対して幅広い特異性をもって作用しているのかもしれない。いずれにしろ、本論文の結果はイネの防御システムの中での異なるファミリーに属するキチナーゼの存在意義や役割を明らかにする上で有用な情報であり、今後これらのキチナーゼの分子論的な性質と生理学的性質との関連が明らかになることによって、複雑な植物生体防御システムが解明されていくことであろう。

キチナーゼはキチンの  $\beta$ -1,4 結合を分解する酵素であり、生物界に幅広く存在している。最近、バイオマス資源として地球上に豊富に存在するキチン、キトサンを有効に利用していくために、これらの酵素を用いて効果的に分解することが考えられており、その有効利用が期待されている。すでに多数のキチナーゼにおいてアミノ酸配列が決定されており、それらの相同性にもとづいてファミリー1-8 とファミリー1-9 に分類されている。ファミリー1-9 キチナーゼは主に植物にみられるキチナーゼであり、その立体構造は  $\alpha$ ヘリックスが豊富な2つのドメインからなることがすでに知られている。一方、ファミリー1-8キチナーゼは生物界に幅広く存在しており、その構造は8本の  $\alpha$ ヘリックスと8本の  $\beta$ ストランドからなる TIM バレル構造を共通にもっている。このような構造的な理解に比べると、機能的な理解はそれほど進んでおらず、特に植物キチナーゼにおいては、キチナーゼが植物の生体防御に深く関与していることから生理学的機能に注目されている。しかしその生理学的機能を裏付ける酵素学的な性質の解明は進んでおらず、これらの情報は酵素群の機能的な理解を乏しいものにしていていると思われる。

本研究では、イネ由来の2種類のファミリー1-8キチナーゼおよび2種類のファミリー1-9キチナーゼを用いて、*N*-アセチルグルコサミン[(GlcNAc)<sub>6</sub>]に対する加水分解反応を経時的に追跡し、微生物由来キチナーゼとの比較を通して、構造と機能の関係を明らかにすることを試みた。さらに、植物が本来ターゲットにしていると思われる部分アセチル化キトサンとの相互作用を円2色性分散計、核磁気共鳴を用いて分析した。また、部分アセチル化キトサンを基質としファミリー1-8キチナーゼもしくはファミリー1-9キチナーゼと反応させ、加水分解生成物を  $^1\text{H-NMR}$  や  $^{13}\text{C-NMR}$  を用いて分析しそれぞれのキチナーゼの基質認識特異性を明らかにした。

Chapter II ではイネ由来ファミリー1-8キチナーゼとイネ由来ファミリー1-9キチナーゼの酵素化学的性質の比較するために、イネ由来ファミリー1-8キチナーゼ (OsChib3a, OsChib3b) とイネ由来ファミリー1-8キチナーゼ (OsChialcCBD, OsChia2b) の (GlcNAc)<sub>6</sub> に対する加水分解生成物のアノマー型を HPLC で調べた。さらに加水分解生成物をゲルろ過カラムをもちいた HPLC によって分析し、得られたタイムコースを分析することによって、サブサイトの結合自由エネルギーを得て、それぞれの酵素と基質の相互作用を推測した。これらの結果から、イネ由来ファミリー1-8キチナーゼではサブサイト構造は (-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)型サブサイトをもち、イネ由来ファミリー1-9キチナーゼのサブサイト構造は (-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)型であることがわかり、サブサイトが大きく異なることを明らかにした。

Chapter III では、イネ由来ファミリー1-9キチナーゼ (OsChialcCBD) とイネ由来ファミリー1-8キチナーゼ (OsChib3a) と部分アセチル化キトサンの相互作用を明らかにするために

その結果、OsChialcΔCBD、OsChib3a に高度脱アセチル化されたキトサン(MAC)を加えると熱変性中点温度( $T_m$ )はそれぞれの酵素のみの時よりも上昇した。以上の結果は両酵素とMAC の間に何らかの相互作用があることを示唆していた。そこで、より定量的に各酵素とMAC の相互作用を測定するために、MAC からリゾチームを結合させたカラムによって完全脱アセチル化キトサンを分離し、得られた FMAC(Fractionated monoacetylated chitosan) のGlcNAc のメチル基のプロトンシグナルが酵素が加えられることによりどのように変化するかを観察した所、OsChib3a を加えると FMAC の加水分解が起こることがわかり、OsChialcΔCBD を加えると全く変化が見られなかった。そこで、さらに詳細なキトサンとOsChialcΔCBD の相互作用を分析するために、FMAC の縦緩和時間( $T_1$ )を  $^1\text{H-NMR}$  によって測定した。その結果 FMAC 中の GlcN の H1 と H2 の  $T_1$  が増加しており、GlcN の分子運動抑制されていることが分かった。これらの結果から、OsChialcΔCBD は FMAC と非特異的な結合をしていると推測された。

Chapter IV では、OsChialcΔCBD、OsChib3a をアセチル化度の異なる部分アセチル化キトサンと反応させその反応生成物を  $^1\text{H-NMR}$  および  $^{13}\text{C-NMR}$  によって分析した。その結果、OsChib3a は GlcNAc-GlcNAc もしくは GlcNAc-GlcN のグリコシド結合を同頻度で加水分解しており、OsChialcΔCBD は GlcNAc-GlcNAc もしくは GlcN-GlcNAc の結合を加水分解するが、GlcN-GlcNAc の分解速度は極めて低く、GlcNAc-GlcNAc 結合の分解に対する選択性が高いことがわかった。これらの結果より、OsChib3a はさまざまなアセチル化度のキトサンに働くのに対して、OsChialcΔCBD はアセチル化度が高いキトサンに特に有効に働くことが分かった。これらの特異性は、イネ由来キチナーゼの植物体内での役割に深く関係していると考えられた。

以上のように、本研究においておこなわれた、イネ由来キチナーゼのキチンオリゴ糖に対する加水分解様式および各サブサイト固有の親和力の分布の比較はアミノ酸配列に基づくファミリー分けをより細かく分類することを可能にするであろう。またファミリー18および19キチナーゼの異なるアセチル化度の高分子キトサンに対する基質特異性の解明はイネキチナーゼが本来生体内で何を標的として、どのように作用しているかといった生理的機能や、これらのキチナーゼのイネの中での存在意義を裏付けるために、重要な情報と成りうるであろう。よって、本論文は博士論文として十分に価値のあるものであることを認める。

氏 名	よし だ しん じ 吉 田 慎 治
学位の種類	博 士 (農学)
学位記番号	農 第 8 6 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	環境保全型防蟻剤の開発

論文審査委員 (主 査)	教 授	榎	章 郎
(副主査)	教 授	駒 井	功 一 郎
(副主査)	教 授	田 中	裕 美