学会賞受賞論文

(奨励賞)

NMR を利用した殺菌剤の作用機構の解明

吉田 充

農業環境技術研究所

Application of NMR Spectroscopy to Fungicide Pharmacology

Mitsuru YOSHIDA

National Institute of Agro-Environmental Sciences, Kannondai, Tsukuba 305, Japan

^{13}C and ^1H NMR spectroscopy were applied on fungicide pharmacology in cellular level, and two-dimensional ^1H NMR spectroscopy in molecular level. Mycelia of *Pyricularia oryzae* were incubated with [methyl- ^{13}C]methionine, and ^{13}C NMR spectrum of the intact mycelia was measured. After 3 hr incubation, N-methyl signal of choline appeared at 54.9 ppm showing that methyltransfer from methionine into choline can be observed by the ^{13}C NMR. Treatment with 350 μM iprobenfos inhibited the choline biosynthesis. Isoprothiolane also inhibited the methyltransfer at the concentration of 140 μM . The observed spin-spin relaxation time (T_2) of intracellular water protons reflects the membrane water permeability. Effects of various types of fungicides on the membrane were, then, investigated by using the T_2 of the water protons in the mycelial cells of *Botrytis cinerea*. Treatment of the cells with ionophores remarkably increased the membrane water permeability, which suggests that the water molecules exchange through the ion channels of the ionophores. Phosphatidylcholine biosynthesis inhibitors, as well as ergosterol biosynthesis inhibitors, slightly increased the membrane water permeability. This result indicates that phosphatidylcholine and ergosterol have no direct relation to the membrane water permeability though some secondary effects were observed through the change in the membrane structure. Some SH inhibitors increased the membrane water permeability probably by binding to the proteins at ion channels. The structure of the complex of a deoxyoctanucleotide, d(GCAATTGC)₂, and berenil, a trypanosidal drug, was analyzed by two-dimensional ^1H NMR spectroscopy. The nuclear Overhauser effects (NOE) between the two molecules and the ring current shifts revealed that berenil binds in the minor groove of d(GCAATTGC)₂ retaining the overall B conformation of the octanucleotide duplex. It is likely that the complex has hydrogen bonds between the berenil amidine protons and the carbonyl oxygen of the external thymine or the purine nitrogen of the internal adenine.

はじめに

核磁気共鳴 (NMR) 法は、有機化学の分野で化合物の構造決定によく利用される分析法である。この方法によれば、数テスラの磁場の中に置いた試料に数十から数百メガヘルツのラジオ波を照射するだけでスペクトルの測定ができ、試料を破壊せずに試料中の化合物に関する情報が得られる。この特徴により、NMR は、生体試料の

分析にも応用が可能である。

生体系の NMR として最も早くから生理学や医学の分野に応用されたのが ^{31}P NMR である¹⁻⁶⁾。微生物細胞、動植物の培養細胞、摘出組織、器官、さらに無傷の動植物個体の ^{31}P NMR スペクトル中には、無機リン酸、ATP、糖リン酸、クレアチンリン酸等のシグナルが観測され、これらのシグナルの変化からエネルギー代謝に関する情報が得られる。また無機リン酸の化学シフトから

は、細胞内の pH を推定することもできる⁷⁾。

^{13}C NMR や ^{15}N NMR も生体を用いた研究に応用できるが、 ^{13}C や ^{15}N は天然存在比が低く (^{13}C は 1%, ^{15}N は 0.4%), かつシグナルの検出感度もあまり高くない。このことから、これらの核種の天然存在比におけるスペクトルの生理学への応用は、ごく一部の主要生体成分に関するものに限られてしまう。しかし天然存在比が低いことを逆手に取って ^{13}C や ^{15}N をトレーサーとして用いれば、含有量のそれほど多くない生体物質の代謝研究にも利用できる⁹⁾。

^1H NMR におけるシグナルの検出感度は他の核種に比べて最も高いのだが、生体の ^1H NMR スペクトル中には水の強いシグナルが現れ、それが他のシグナルを観測する際に妨害となり、生体の ^1H NMR の代謝研究への応用例は少ない。しかしその水のプロトンに注目し、その緩和時間から生体生理に関する情報を得ることができる⁹⁾。特に Damadian¹⁰⁾ によって、癌組織中の水のプロトンのスピン-格子緩和時間 (T_1) およびスピン-スピン緩和時間 (T_2) が正常組織の水の T_1 , T_2 よりも長いことが報告されて以来、生体組織の水の緩和時間を利用した病気の診断に関する多くの研究成果が発表されている。そして今や組織や細胞の水の緩和時間に基づいた NMR イメージング法は、医学の分野で X 線や超音波画像法とならぶ有力な診断技術として評価されている。

一方、農学の分野への NMR の応用例を見てみると、生体成分分析や植物生理学への応用例は若干あるものの¹¹⁻¹⁹⁾、農業の場面での薬理学への応用は未開拓の分野である。そこで著者は、生体の NMR の農業薬理学への応用を試みた。その結果を 1. と 2. に述べる。

また 1970 年代におけるコンピューターを装備した FT-NMR 装置の開発に続き、1980 年代にはコンピューターの演算速度と記憶容量が増し、それを利用した 2 次元 NMR 法が普及した。そしてこの数年で様々な 2 次元 NMR 用パルス系列が考案され、化合物の構造決定に盛んに利用されている²⁰⁾。中でも特に NOESY 法は、原子間の空間距離に関する情報を与え、タンパク質、核酸等高分子化合物の立体構造解析にも有力な方法として注目されている。化合物の立体構造解析には一般に X 線結晶構造解析法が用いられてきたが、NMR 法は溶液状態にある化合物の構造解析が行なえるという点で、水溶液中でその機能を発揮する生体分子の研究により適している。そこで NMR の薬理学への応用は、生体のスペクトルを用いたものに限らず、分子レベルでの立体化学的視点からの薬剤分子-生体物質分子相互作用の解析にも広がる可能性が出てきた。このような背景をもとに、著

者は 2 次元 NMR 法を用いて、薬剤とその作用点分子との結合体の立体構造解析を試みた。その結果を 3. に述べる。

1. ^{13}C NMR 法による有機リン殺菌剤の作用機構解明^{21,22)}

有機リン殺菌剤の作用機構については、Kodama らにより、イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) において [メチル- ^{14}C] メチオニンの ^{14}C -メチル基のホスファチジルコリンへの取り込みが iprobenfos および edifenphos 処理で阻害されることが報告され^{23,24)}、Greenberg 経路²⁵⁾ (Fig. 1) によるホスファチジルコリンの生合成阻害であると考えられている。しかしホスファチジルコリンの生合成経路は、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基がメチル化されてホスファチジルコリンになるこの Greenberg 経路のほか、CDP-コリンがホスファチジン酸に結合してホスファチジルコリンとなる Kennedy 経路²⁶⁾ が知られている (Fig. 1)。そして Greenberg 経路が阻害されても Kennedy 経路が生きているならば、こちらの経路を使ってホスファチジルコリンが合成され、細胞への影響は少ないと思われる。Kodama らは、コリンからホスファチジルコリンが生ずる過程は有機リン殺菌剤処理により影響を受けないと報告している^{23,24)}。一方、Kennedy 経路の出発物質コリンの生合成については、その経路ですら詳しくわかっていない。しかしエタノールアミンのメチル化によってコリンが生成される可能性は大きく、またこの生合成ステップが Greenberg 経路におけるホスファチジルエタノールアミンのメチル化と類似しており、有機リン殺菌剤処理によって阻害を受

Fig. 1 Pathways of phosphatidylcholine biosynthesis.

ける可能性もある。そこで著者は、コリンの生合成に及ぼす有機リン系殺菌剤の影響を、*P. oryzae* の無傷菌糸細胞を材料に、[メチル- ^{13}C]メチオニンを基質に用い、 ^{13}C NMR 法により測定した。

[メチル- ^{13}C]メチオニンを取り込ませた *P. oryzae* の菌糸細胞の ^{13}C NMR スペクトル変化を Fig. 2 に示した。スペクトルの測定方法は、以下のとおりである。1% グルコースと 0.1% 硫酸を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 40 ml 中で 3 時間馴らし培養した菌糸 2 g に標識メチオニン 10 mg を加え、さらに一定時間インキュベートする。その後菌糸をろ過によって集め、10 mmφ NMR 試料管に詰めて、日本電子の FX-90Q NMR 装置で ^{13}C NMR スペクトルの測定を行なった。スペクトルの積算回数は 4000 回で、測定に要した時間は約 30 分であった。

[メチル- ^{13}C]メチオニンを取り込ませる前の菌糸のスペクトル中には、細胞質に溶けて存在する α 、 α -トレハロースと油滴として存在するトリグリセリドの脂肪酸のシグナルが観測された²⁷⁾ (Fig. 2-A)。タンパク質、核

酸などの高分子化合物、また細胞壁成分やホスファチジルコリン等膜成分は運動性が低く、シグナルの線幅が極端に広がるため、細胞の NMR スペクトル中には検出されない。なおコリンは水溶性で細胞質に溶けて存在すると考えられるにもかかわらず、存在量が少ないため、標識メチオニンを取り込ませていない菌糸においてはそのシグナルは認められなかった。

菌糸を [メチル- ^{13}C]メチオニンとともに 3 時間インキュベートすると、細胞内に取り込まれたメチオニンのメチル基のシグナル (14.9 ppm) のほかに 54.9 ppm に新しいシグナルが現れた (Fig. 2-B)。このシグナルの化学シフトが N^+-CH_3 の化学シフトと一致することから、メチオニンのメチル基がエタノールアミンに転移してコリンが生合成され、その *N*-メチル基のシグナルが観測されたものと思われる。膜に存在するホスファチジルコリンは運動性が低いため、標識後もこのスペクトル中には検出できず、このシグナルは主にコリンに由来すると考えられた。なおこの 54.9 ppm のシグナルがホスファチジルコリンではなくコリンに由来することは、[メチル- ^{13}C]メチオニンを取り込ませた菌糸の分画を行ない、各々の画分の ^{13}C NMR スペクトルを測定することによって証明された。インキュベーション時間を増やすにしたがってこの 54.9 ppm のシグナルの強度は増し、一方メチオニンのメチル基のシグナル強度は減少した (Fig. 2-C, D)。

このようにメチオニンのメチル基がエタノールアミンへ転移してコリンが合成される過程を生きた *P. oryzae* 菌糸細胞の ^{13}C NMR スペクトルから観察する方法が確立されたので、この方法を用いて *P. oryzae* のメチル基転移反応に及ぼす殺菌剤の影響を調べた。薬剤を標識メチオニンとともに緩衝液に加え 3 時間処理を行なったところ、iprobefos は 350 μM の濃度でこのメチル基転移反応を 76% 阻害した (Table 1)。また有機リン系殺菌剤との交差耐性が認められている isoprothiolane²⁸⁾ もコリンの生合成を阻害することが示され、この薬剤の作用機

Fig. 2 ^{13}C NMR spectral change of *P. oryzae* during the incubation with [methyl- ^{13}C]methionine.

a, methyl group of acetic acid (standard for signal intensity); f, fatty acid moiety of triglycerides; m, methyl group of methionine; n, N^+-CH_3 ; t, α , α -trehalose; u, unknown.

Table 1 Effect of fungicides on choline biosynthesis in *P. oryzae*.

Fungicide	Concentration (μM)	Inhibition (%)
Iprobenfos	350	76
Isoprothiolane	140	73
Blasticidin S	12	0
Benomyl	3.4	0

構が有機リン殺菌剤の場合と同じであることが明らかになった。一方、タンパク質合成阻害剤 blasticidin S²⁹⁾ や細胞分裂阻害剤 benomyl³⁰⁾ は、菌糸の生育が100% 阻害される濃度 (MIC) においてもこのメチル基転移反応に全く影響を及ぼさなかった。このことは、有機リン殺菌剤および isoprothiolane の一次作用機構がここで観測されたメチオニンからのメチル基転移反応阻害であることを裏付けると同時に、この生きた菌糸を用いた ¹³C NMR 法が薬剤の作用機構研究において有用であることを示すものである。

以上のことより、Greenberg 経路におけるホスファチジルコリンの生合成阻害剤として報告されていた有機リン系殺菌剤は、ホスファチジルコリンのもう一つの生合成経路である Kennedy 経路の出発物質コリンの生合成をも阻害し、有機リン系殺菌剤はこれら二つのメチル基転移反応を阻害することによって、生体膜の主要リン脂質であるホスファチジルコリンの生合成を完全に抑制すると考えられる。このように、¹³C 標識基質を取り込ませた生きた糸状菌菌糸細胞の ¹³C NMR スペクトル変化から、有機リン系殺菌剤の殺菌機構を解明することができた。

2. 細胞水のプロトンの緩和時間を利用した殺菌剤の作用機構解明^{31,32)}

次に野菜・果樹の重要病害の病原菌である灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の菌糸細胞の ¹H NMR を用い、細胞水のプロトンの緩和時間を測定した。そして各種殺菌剤処理によるその変化から、殺菌剤の作用検定を行なった。

細胞内の水の緩和時間の測定値に関しては、Conlon と Outhred の理論³³⁾ に基づいて Stout らが次のような式を提出している³⁴⁾。

$$1/T'_{2a} = 1/T_{2a} + 1/t_a - P_a T_{2b}/P_b t_a^2$$

この式において、 T'_{2a} は細胞内の水の見かけのスピン-スピン緩和時間 (T_2)、 T_{2a} は細胞内の水の真の T_2 、 T_{2b} は細胞外の水の T_2 、 t_a は細胞膜を通した水の交換時間、 P_a と P_b は細胞内外の水の量を表わす。なお T_{2a} は、水分子の運動性や水に溶けている常磁性金属の濃度などによって決定される。そして水分子の運動性は細胞質の粘度に影響され、細胞質の粘度は細胞の水分含量や細胞質に溶けている高分子化合物の濃度などにより決定される。殺菌剤処理により、菌糸細胞の水分含量や不凍水量、可溶性タンパク質や可溶性多糖の量、常磁性金属量がほとんど変化しないことから、 T_{2a} の変化は小さく、よって殺菌剤処理による菌糸の水の T_2 の測定値 (T'_{2a}) の変化は t_a の変化、すなわち細胞膜の水透過性の変化を反映

するということが示された³¹⁾。

なお液体培地で培養した菌糸細胞中の水の緩和時間を測定する場合、細胞外の水のシグナルの妨害をどのようにして除くかが問題となる。そこで外の水を極端に速く緩和させてしまうことによりその妨害を除くことを考えた。細胞外の水の緩和時間は常磁性物質を外液に加えることによって容易に減少させることができ、一般に Mn^{2+} が外液に添加される。それは Mn^{2+} が膜透過性が小さく、ほとんど細胞膜の内側に入り込まず、かつ膜の透過性自体にもほとんど影響を与えないからである^{11,33-36)}。また細胞外の水の緩和が速いということは、上の式において T_{2b} が小さいということであり、 T_{2b} の値が T_{2a} や t_a に比べて極端に小さければ、上式の第3項は無視できるようになり、 $1/T'_{2a}$ は $1/t_a$ に比例することになる。

B. cinerea 菌糸細胞膜の水透過性に及ぼす殺菌剤の影響の測定は、以下のようにして行なった。Potato dextrose broth と yeast extract を含む液体培地で培養した菌糸を自然ろ過で集菌し、その2gを殺菌剤を含む25mM $MnCl_2$ 水溶液50mlに浸漬し、25°C中に1時間静置する。このことにより T_{2b} は0.5msecにまで短くなり、 $1/T'_{2a} \propto 1/t_a$ が成り立つ。薬剤処理後、菌糸を自然ろ過で回収し、その一部を10mmφ NMR 試料管に入れ、水の T_2 の測定を C.P.M.G. 法で行ない、 T'_{2a} の推定をシンプレックスを用いた非線形最小自乗法で行なった³⁷⁾。殺菌剤処理による T'_{2a} の変化は、処理菌糸の T'_{2a} (T'_{2at}) の無処理菌糸の T'_{2a} (T'_{2ac}) に対する比 T'_{2at}/T'_{2ac} で表わした。この T'_{2at}/T'_{2ac} が小さくなるということは、膜の水透過性の増加を意味する。また各種薬剤の細胞膜の水透過性に対する影響を比べるためには、*B. cinerea* のいろいろな薬剤に対する感受性の差を考慮して、横軸に薬剤濃度ではなく、各々の薬剤による菌糸の生育阻害度をとったグラフを用いた。

Nystatin は膜にイオンチャンネルを形成するイオノホアとして働き、細胞から K^+ を漏出させる³⁸⁾。また dehydroabietylamine も細胞からの K^+ の漏出を招く。これらの薬剤は、80% 生育阻害濃度における1時間の処理で著しく T'_{2at}/T'_{2ac} を減少させ、膜の水透過性を顕著に高めることが示された (Fig. 3-A)。かつ T'_{2a} は生育阻害度に比例して減少している。この結果より、イオンチャンネルが膜の水透過性と密接な関わりを持つことが示唆された。

Edifenphos や iprobenfos も、90~100% 生育阻害濃度における1時間の処理で T'_{2at}/T'_{2ac} を0.74~0.77に減少させ、膜の水透過性を増加させることが示された (Fig. 3-B)。これらの薬剤は、先に述べたように膜のホスファ

Fig. 3 The relationship between growth inhibition and change in the membrane water permeability of *B. cinerea* by 1 hr of fungicide treatment.

(A) Ionophores; (B) phosphatidylcholine biosynthesis inhibitors; (C) ergosterol biosynthesis inhibitors; (D) SH inhibitors.

チジルコリンの生合成を阻害し、膜の構造と機能に影響を与える。しかし、これらの薬剤による T'_{2a} の変化は、イオノホアによる T'_{2a} 変化に比べて小さかった。この理由として、薬剤処理時間が短すぎた可能性がある。もし膜のホスファチジルコリンの代謝回転時間が薬剤処理時間1時間よりもずっと長ければ、膜に対する影響がほとんど見られないのは当然のことである。そこで培地中で15時間の薬剤処理を行ってみた。この培養条件下では菌糸の倍化時間が8時間なので、15時間はホスファチジルコリンの新規合成に充分であり、薬剤の作用が完全に現れると考えられる。しかしながら、edifenphos で15時間処理した後も T'_{2at}/T'_{2ac} は0.74であった。このことから、膜中のホスファチジルコリンは膜を通した水の交換には直接関与せず、このわずかな T'_{2a} の減少は、膜の主要成分であるホスファチジルコリンの生合成阻害による膜の構造変化を通した二次作用の現れと考えられる。

エルゴステロール生合成阻害剤である triadimefon³⁹⁾ と triflumizole⁴⁰⁾ も、1時間処理であまり T'_{2a} の値を変化させなかった (Fig. 3-C)。また triflumizole で15時間処理しても、 T'_{2at}/T'_{2ac} は0.82にまでしか減少しなかつ

た。この結果から、これらエルゴステロール生合成阻害剤による T'_{2a} の減少も、リン脂質生合成阻害剤の場合と同じく、膜成分の生合成阻害による膜の構造変化を通した二次的作用であると考えられる。

SH 阻害剤の中では、captan, captafol, chlorothalonil, HgCl₂ が、40% 生育阻害濃度で膜の水透過性を増加させた (Fig. 3-D)。イオンチャンネル形成型イオノホアが膜の水透過性を高めるという事実とともに考え合わせると、これらの薬剤はおそらく膜のイオンチャンネルを構成するタンパク質のSH基に結合し、イオンチャンネルを開かせると考えられる。これはまた、膜を通した水の交換がSHタンパク質に担われているという説⁴¹⁾を裏付けるものでもある。これらのSH阻害剤の膜の水透過性への影響が、イオノホアの場合に比べて生育阻害度がより低いところから見られるのにもかかわらず、グラフの傾きが小さいのは、これらの薬剤がイオンチャンネルのタンパク質のほかにも作用点を持つためだと考えられる。

Captan 等と同じくSH阻害剤に分類される maneb, mancozeb, thiram, ziram は、MICにおいても T'_{2a} を変化させなかった (Table 2)。このことは、SH阻害がこ

Table 2 Effect of fungicides on the membrane water permeability at MIC.

Fungicide	T'_{2at}/T'_{2ac}
SH inhibitor	
Maneb	1.02
Mancozeb	1.00
Thiram	0.97
Ziram	0.96
Mitosis inhibitor	
Benomyl	1.02
Thiophanate-methyl	0.97
Protein biosynthesis inhibitor	
Blasticidin S	1.02
Cell wall biosynthesis inhibitor	
Polyoxin B	1.05
Dicarboximide fungicide	
Procymidone	1.09
Iprodione	1.03

これらの薬剤の一次作用ではないことを示唆するものである。これらの薬剤については、金属捕獲剤として働くという報告もあり⁴²⁾、この金属捕獲作用がこれらの薬剤の一次作用である可能性が高い。

Benomyl と thiophanate-methyl は、微小管タンパク質チューブリンに作用し、微小管形成を阻害することによって細胞分裂を阻害するのが作用機構とされている³⁰⁾。Blasticidin S はタンパク質生合成阻害剤であり²⁹⁾、polyoxin B はキチン生合成阻害剤である⁴³⁾。これらの薬剤で処理した菌糸の T'_{2at}/T'_{2ac} は 0.97~1.05 で、膜の水透過性に対する影響はないと判断された (Table 2)。この結果は、これらの薬剤の作用点が膜のイオンチャンネル (=水チャンネル) ではないことを裏付けるものである。

Procymidone については、膜の機能を阻害するのではないかという説が提出されているが⁴⁴⁾、その作用機構に関する定説はまだない。この殺菌剤も、また procymidone と同じくジカルボキシイミド系殺菌剤に属する iprodione も、*B. cinerea* 菌糸細胞膜の水透過性に影響を及ぼさず (Table 2)、もしこれらが膜に作用するとしても、その作用点はイオンチャンネルや膜の主要成分の生合成系ではないと思われる。

以上のように、細胞水の緩和時間は、殺菌剤の細胞膜に対する作用に関する重要な情報を与え、薬理研究に利用できることが示された。

3. 2次元 ¹H NMR 法による薬剤の DNA への結合状態の解析⁴⁵⁾

ジアリルアミジン化合物の一種ベレニル (Fig. 4) は、殺原虫活性を有し、牛のタイレリア病やパペシア病用薬

Fig. 4 Structure of berenil.

剤として使用されている。ベレニルは 370 nm に UV 吸収の極大を示すが、DNA が共存すると吸収極大は 380 nm にシフトする⁴⁶⁾。このシフトはベレニルが DNA と相互作用を持つことを示しており、他のアリルアミジン化合物同様、ベレニルの DNA への結合が推測された。しかしベレニルの結合により環状二本鎖 DNA の巻戻しが起こらないことから⁴⁷⁾、ベレニルは塩基対間にインターカレートすることなく、ディスタマイシンやネトロブシンの場合^{48,49)} のように二本鎖 DNA の副溝に結合するのではないかと考えられている。そして 4 塩基対あたりにベレニル 1 分子が結合し^{49,50)}、また A-T 塩基対のほうが G-C 塩基対の場合よりも結合しやすいことが報告されている^{50,51)}。

そこで著者は、合成デオキシオクタヌクレオチド d(GCAATTGC)₂ を DNA のモデルとして用い、ベレニル-DNA 複合体の水溶液中での立体構造を、2次元 NMR スペクトルデータに基づいて推定することを試みた。この研究に用いた d(GCAATTGC)₂ は、自己相補的で、中央に対称的な四つの A-T 塩基対があり、ここにベレニルが結合すると予想される。なお便宜上、5' 末端のグアニンを外側のグアニン、3' 末端の隣のグアニンを内側のグアニンと呼び、シトシン、アデニン、チミンについても同様に、5' および 3' 末端に近いほうを外側、末端から遠いほうを内側と称する。

NMR スペクトルの測定は、試料を 4.3 mM の濃度で、100 mM NaCl, 50 μM EDTA を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、General Electric 社の GN-500 NMR 装置を用いて行なった。まず遊離の d(GCAATTGC)₂ の各シグナルの帰属を行なった。非交換性のプロトンの帰属は、NOESY (混合時間 50 msec, 150 msec, 250 msec, 400 msec), DQF-COSY, および HOHAHA (混合時間 70 msec) のデータに基づいて行なった。その一例を Fig. 5 に示す。H1', H3' および塩基プロトンの帰属は、オリゴヌクレオチド内の塩基プロトンと糖のプロトン間の NOE, および塩基の H6 または H8 とその塩基の 5' 側の隣のヌクレオチドの糖のプロトンとの間の NOE 交差ピークを、末端のヌクレオチドから順番にたどることに

Fig. 5 Base proton-H1', H3' region in the NOESY spectrum of d(GCAATTGC)₂ at a 150 msec mixing time. The lower case letters e and i refer to the external and internal residues, respectively. The lines trace the sequential assignments of the base protons and the deoxyribose H1' and H3' protons.

Fig. 6 Aromatic proton-H1', H3' region in the NOESY spectrum of the berenil-d(GCAATTGC)₂ complex at a 150 msec mixing time. The lower case letters e and i refer to the external and internal residues, respectively. The lines trace the sequential assignments of the base protons and the deoxyribose H1' and H3' protons. Circled cross-peaks are the contacts between berenil and d(GCAATTGC)₂.

より行なった。H2' および H2'' の帰属も同様に行なった。またこれらの NOE より、この二本鎖デオキシオクタヌクレオチドは溶液中で B 型右巻螺旋構造をとっていることが確認された。

H4', H5', H5'' のシグナルが集中して混雑する 4.0~4.6 ppm の領域のシグナルの帰属には、NOESY のみでなく DQF-COSY や HOHAHA のデータも用いた。交換性のプロトン、すなわちイミノ基やアミノ基のプロトンについては、90% H₂O/10% D₂O 緩衝液中で、1331 パルスを用いて測定した混合時間 250 msec における NOESY スペクトル上で帰属を行なった。

ベレニル-d(GCAATTGC)₂ の 1:1 複合体のシグナルの帰属は、遊離型の d(GCAATTGC)₂ の場合と同じ方法で行なった。Fig. 6 に、ベレニル-d(GCAATTGC)₂ 複合体の NOESY スペクトルの Fig. 5 に相当する領域を示す。塩基プロトンとその塩基が結合している糖の 5' 側の隣の糖の H1', H2', H2'', H3' 間の NOE は複合

体形成後も観測され、d(GCAATTGC)₂ は B 型構造を保っていることが示された。さらにベレニルの二つのベンゼン環のシグナルが区別できないこと、および d(GCAATTGC)₂ の二本の鎖のシグナルが区別できないことから、複合体形成後も各々の分子の対称性が保たれていると考えられる。Fig. 6 において、ベレニル分子と d(GCAATTGC)₂ の分子間 NOE ピークを丸で囲んで示した。このほか、ベレニル-d(GCAATTGC)₂ 分子間 NOE ピークは、H4', H5'/5'' 領域にも認められた。NOESY スペクトル上で認められたベレニル-d(GCAATTGC)₂ 分子間 NOE を Table 3 にまとめて示した。また外側のチミジンの H1' および H4', 内側のチミジンの H4' のシグナルはベレニルとの結合により 1~1.5 ppm 高磁場シフトし、それに加えて 0.3~0.5 ppm の高磁場シフトが二つのチミジンのほかのプロトンにみられた。一方、内側のアデニンの H2 は 0.4 ppm 低磁場シフトし

Table 3 NOE contacts between berenil and d(GCAATTGC)₂.

	NOE ^{a)} for berenil	
	H2	H3
Ae H2	+++	++++
Ai H2	++++	++++
Ti H6	++	++
Ti CH ₃	—	++
Te H6	++	++
Te CH ₃	+	++
Gi H8	++	++
Ai H1'	+++	+++
Ti H1'	++++	++++
Te H1'	+++	+++
Gi H1'	+	++
Ti H2'	—	+
Ti H2''	+	+
Ti H3'	++	++
Te H3'	++	++
Gi H3'	—	+
Te H4'	+++	+
Gi H4'	+++	++++
Ti H5'/H5''/Te H5'	+++	+++
Te H5''	+++	++
Gi H5'		+++
Gi H5''	+++	+++

^{a)} (++++) Observed at a mixing time of 50 msec or longer; (++++) 150 msec or longer; (++) 250 msec or longer; (+) 400 msec; (—) no cross-peak at a mixing time of 400 msec or less.

た。これらのシフトは、副溝内に入り込んだベレニル分子のベンゼン環の環電流効果によるものと考えられる。

交換性のプロトンに関する NOE を観測するため、ベレニル-d(GCAATTGC)₂ を 90% H₂O/10% D₂O 緩衝液に溶解し、1331 パルスを用い、混合時間を 250 msec とし、NOESY スペクトルの測定を行なった (Fig. 7)。ベレニル分子の両末端のアミジン基のプロトンのシグナルが検出され、二つのアデニンの H2 との間に NOE が観測された。ベレニル分子の二つのベンゼン環をつなぐジアミノ基のプロトンは検出されず、このプロトンは溶媒の水にさらされ、そのプロトンと速い交換を行なっていると推測された。

一般的に NOE は二つのプロトン間の距離が 5 Å 以下の時に観測され、その強度はプロトン間の距離の 6 乗に反比例する。そこで複合体の NOESY スペクトル中に観測されたベレニル-d(GCAATTGC)₂ 分子間 NOE に基

Fig. 7 Aromatic proton and H1' region in the 1331 pulse NOESY spectrum of the berenil-d(GCAATTGC)₂ complex at a 250 msec mixing time. The lower case letters e and i refer to the external and internal residues, respectively. Circled cross-peaks are the contacts between berenil and d(GCAATTGC)₂.

Fig. 8 Model of the berenil-d(GCAATTGC)₂ complex.

づいて、複合体の立体モデルを作成してみた (Fig. 8). ベレニルは $d(\text{GCAATTGC})_2$ の B 型右巻螺旋の AATT 部分の副溝に中央のジアゾアミノプロトンを外側に向けてはまりこんでおり、アミジンプロトンと外側のチミンの O2 または内側のアデニンの N3 との間に水素結合が形成されるような構造をとっていることが示された。

このように 2 次元 ^1H NMR 法を用いて、薬剤の作用点分子への結合立体モデルを得ることに成功した。

お わ り に

NMR は生体内の反応の非破壊測定を可能にし、非放射性同位体 ^{13}C トレーサーの利用により、細胞内の生成反応に及ぼす薬剤の影響が測定できた。また細胞内の水の緩和時間からは、細胞膜の水透過性に及ぼす薬剤の影響を知ることができた。なお本研究では植物病原糸状菌の菌糸細胞を材料に殺菌剤の作用をみたが、この手法は動物や植物の細胞、組織、器官、個体の系にも応用でき、殺虫剤や除草剤の作用機構、抵抗性機構の研究や、農薬のは乳類に対する毒性の研究、代謝研究への利用が期待される。

さらに本研究では、2 次元 NMR の技術を用いて、立体化学的観点から分子レベルでの薬理機構の解明を行なった。NMR 法によれば、一つの薬剤-作用点分子複合体の構造がわかるばかりでなく、ここでは述べなかったが、遊離の分子と結合型の分子の交換速度や、リガンドの複数結合部位間の交換に関する情報も得られ、X 線結晶構造解析法では不可能な動的視点からの薬理機構の解析が可能である。

このように NMR 法は、現在注目されている医学や生理学への応用に限らず、農業の現場で使用される様々な薬剤の化学的、生理学的研究にとってもきわめて有力な分析法であり、今後の農学への応用が期待される。

本研究を行なうにあたり、ご指導、ご助言をいただいた多くの方々に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) C. T. Burt, S. M. Cohen & M. Barany: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**, 1 (1979)
- 2) D. G. Gadian, G. K. Radda, R. E. Richards & P. J. Seeley: "Biological Applications of Magnetic Resonance," ed. by R. G. Shulman, Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 463-535, 1979
- 3) K. Ugurbil, R. G. Shulman & T. R. Brown: "Biological Applications of Magnetic Resonance," ed. by R. G. Shulman, Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 537-589, 1979
- 4) D. P. Hollis: "Biological Magnetic Resonance," ed. by L. J. Berliner & J. Reuben, Plenum Press, New York, pp. 1-44, 1980
- 5) J. K. M. Roberts & O. Jardetzky: *Biochim. Biophys. Acta* **693**, 53 (1981)
- 6) J. K. M. Roberts: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 375 (1984)
- 7) R. B. Moon & H. R. Richards: *J. Biol. Chem.* **248**, 7276 (1973)
- 8) K. Ugurbil, T. R. Brown, J. A. Den Hollander, P. Glynn & R. G. Shulman: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3742 (1978)
- 9) R. Mathur-De Vre: *Br. J. Radiol.* **57**, 955 (1984)
- 10) R. Damadian: *Science* **171**, 1151 (1971)
- 11) P. M. Chen, L. V. Gusta & D. G. Stout: *Plant Physiol.* **61**, 878 (1978)
- 12) L. V. Gusta, D. B. Fowler, P. Chen, D. B. Russel & D. G. Stout: *Plant Physiol.* **63**, 627 (1979)
- 13) N. Ishida, H. Kano, T. Kobayashi, H. Hama-guchi & T. Yoshida: *Agric. Biol. Chem.* **51**, 301 (1987)
- 14) N. Ishida, H. Kano, T. Kobayashi, H. Hama-guchi & T. Yoshida: *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2771 (1988)
- 15) N. Ishida, H. Kano, T. Kobayashi & T. Yoshida: *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2777 (1988)
- 16) M. Yoshida, H. Kano, N. Ishida & T. Yoshida: *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1395 (1989)
- 17) N. Ishida, T. Kobayashi, R. Masuda, H. Kano, T. Yoshida & H. Ogawa: *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1359 (1990)
- 18) H. Kano, N. Ishida, T. Kobayashi & M. Koizumi: *Jpn. J. Crop Sci.* **59**, 503 (1990)
- 19) P. E. Pfeffer & W. V. Gerasimowicz: "Nuclear Magnetic Resonance in Agriculture," CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3-112, 1989
- 20) ラーマン著, 通 元夫・廣田 洋訳: 最新 NMR, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社, pp. 173-269, 1988
- 21) M. Yoshida, S. Moriya & Y. Uesugi: *J. Pesticide Sci.* **9**, 703 (1984)
- 22) M. Yoshida, Y. Uesugi, K. Nose & D. Lalithakumari: *J. Pesticide Sci.* **12**, 513 (1987)
- 23) O. Kodama, K. Yamada & T. Akatsuka: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1719 (1979)
- 24) O. Kodama, K. Yamada & T. Akatsuka: *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1015 (1980)
- 25) J. Bremer, P. H. Figard & D. M. Greenberg: *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 477 (1960)
- 26) E. P. Kennedy & S. B. Weiss: *J. Biol. Chem.* **222**, 193 (1956)
- 27) M. Yoshida, T. Murai & S. Moriya: *Agric. Biol.*

- Chem.* **48**, 909 (1984)
- 28) M. Katagiri & Y. Uesugi: *Phytopathology* **67**, 1415 (1977)
- 29) K. T. Huang, T. Misato & H. Asuyama: *J. Antibiot. Ser. A* **17**, 65 (1964)
- 30) L. C. Davidse & W. Flach: *J. Cell Biol.* **72**, 174 (1977)
- 31) M. Yoshida & K. Nose: *Pestic. Biochem. Physiol.* **38**, 162 (1990)
- 32) M. Yoshida, A. Kawasaki, M. Yukimoto & K. Nose: *Pestic. Biochem. Physiol.* **38**, 172 (1990)
- 33) T. Conlon & R. Outhred: *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 354 (1972)
- 34) D. G. Stout, P. L. Steponkus & R. M. Cotts: *Plant Physiol.* **62**, 636 (1978)
- 35) V. V. Morariu & G. Benga: *Biochim. Biophys. Acta* **469**, 301 (1977)
- 36) D. G. Stout, R. M. Cotts & P. L. Steponkus: *Can. J. Bot.* **55**, 1623 (1977)
- 37) M. Yoshida & K. Nose: *Agric. Biol. Chem.* **51**, 3399 (1987)
- 38) A. Finkelstein & A. Cass: *J. Gen. Physiol.* **52**, 145S (1968)
- 39) H. Buchenauer: *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 309 (1977)
- 40) S. Hashimoto, S. Sano & Y. Morishima: "Fungicides for Crop Protection," ed. by I. M. Smith, BCPC Monograph No. 31, Vol. 1, BCPC Publications, Croydon, England, pp. 227-280, 1985
- 41) P. Naccache & R. I. Sha'afi: *J. Cell Biol.* **83**, 449 (1974)
- 42) R. G. Owens: "Fungicides," ed. by D. C. Torgeson, Academic Press, New York, London, pp. 147-301, 1969
- 43) N. Ohta, K. Kakiki & T. Misato: *Agric. Biol. Chem.* **34**, 1224 (1970)
- 44) Y. Hisada, T. Kato & Y. Kawase: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **44**, 509 (1978)
- 45) M. Yoshida, D. L. Banville & R. H. Shafer: *Biochemistry* **29**, 6585 (1990)
- 46) B. A. Newton: *Biochem. J.* **105**, 509 (1967)
- 47) M. Waring: *J. Mol. Biol.* **54**, 247 (1970)
- 48) M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura & R. E. Dickerson: *J. Mol. Biol.* **183**, 553 (1985)
- 49) M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura & R. E. Dickerson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1376 (1985)
- 50) A. W. Braithwaite & B. C. Baguley: *Biochemistry* **19**, 1101 (1980)
- 51) J. Portugal & M. J. Waring: *Eur. J. Biochem.* **167**, 281 (1987)