

氏 名	もと ば かず ひこ 元 場 一 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 1824 号
学位授与の日付	平成 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	ミトコンドリア電子伝達を阻害する殺菌剤 flutolanil および殺ダニ剤 fenpyroximate の作用機構および選択毒性発現機構に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教授 岩村 俣 教授 栗原紀夫 教授 駒野 徹

論 文 内 容 の 要 旨

農業に限らず生理活性物質の作用機構を明らかにすることは、rational design, receptor mapping 等の応用分野のみならず、当該化合物の生化学的“tool”としての使用に道を開くものであり、生命現象の解明に資するところは大きい。本論文は、2,3'-置換ベンズアニリド類に分類される殺菌剤 flutolanil (α , α , α -trifluoro-3'-isopropoxy-*o*-toluanilide), および新規な 5-フェノキシピラゾール骨格を有する殺ダニ剤 fenpyroximate, [*tert*-butyl(E)- α -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneaminoxy)-*p*-toluate] の作用機構および選択毒性発現機構について精査した経緯とその結果をとりまとめたものであり、その概要は以下の通りである。

1. Flutolanil の防除対象菌の 1 つである *Rhizoctonia solani* (イネ紋枯れ病菌) 菌糸あるいは菌糸分離ミトコンドリア画分を用いた実験系において、本化合物はコハク酸を電子供与体とする電子伝達を低濃度で特異的に阻害し、その阻害点は電子伝達複合体 II (succinate dehydrogenase complex) の非イオンタンパク-ユビキノン間にあることを見いだした。また、flutolanil および類縁の 2,3'-置換ベンズアニリド類の電子伝達阻害活性と抗菌活性の間に良好な関係が存在することを示し、本化合物の抗菌活性には電子伝達阻害が直接寄与していることを明らかにした。
2. 数種の flutolanil 感受性あるいは非感受性糸状菌およびラット肝より調製したミトコンドリアの本化合物に対する感受性を検討することにより、菌糸レベルで感受性であった担子菌類のミトコンドリアのみが本化合物に感受性であり、本化合物の高い選択性はその作用点であるミトコンドリア電子伝達複合体 I そのものの感受性に支配されていることを明らかにした。
3. Fenpyroximate で処理されたナミハダニ (*Tetranychus urticae*) の ATP 含量はその死亡に先立って、速やかかつ急激に減少することを見いだした。さらに、ラット肝分離ミトコンドリアを用いた分光学的検討によって、本化合物は電子伝達複合体 I (NADH-ubiquinone reductase complex) を阻害し、その阻害点はロテノン等と同じくフラビントランパクからユビキノンへの電子伝達のステップであることを明らかにした。また、ナミハダニ雌成虫から調製した電子伝達複合体 I も、ラット肝分離ミトコンドリアのそれも、

本化合物に対して同程度の感受性を示したことから、本化合物の選択性の発現には作用点そのものの感受性の種差は関与しないことを明らかにした。

4. ナミハダニの透過型電子顕微鏡観察によって、本化合物は末梢神経細胞、表皮細胞、消化管上皮細胞のミトコンドリアにのみ膨化、クリステ配列の乱れ、マトリックスの電子密度の低下等の形態異常を惹起することを見だし、本化合物による電子伝達複合体Ⅰの阻害は *in vivo* においても発現していることを明らかにした。また、中枢神経細胞、筋肉細胞のミトコンドリアには形態異常が認められず、この形態異常の臓器／組織特異性は、本化合物によって引き起こされる種々の症状（麻痺、脱皮不全等）に良く対応することから、本化合物の惹起する症状は電子伝達複合体Ⅰの阻害に基づく二次的現象であることを明らかにした。

5. [Pyrazole-3-¹⁴C] fenpyroximate を用い、ラットによる代謝を精査し、本化合物はラット体内で容易に加水分解、解毒されることを見いだした。この加水分解は *tert*-butyl エステルの直接的な加水分解によるのではなく、*tert*-butyl 基が水酸化され生じた1-hydroxymethyl-1-methylethyl エステル体（3級アルコールエステル）から分子内環化を経るエステル転位反応によって生じた2-hydroxy-2-methylpropyl ester 体（1級アルコールエステル）が加水分解される経路によることを明らかにした。

6. ナミハダニ雌成虫を用いた *in vivo* 代謝実験では、fenpyroximate の加水分解は認められなかった。また、各種生物（サル、ウサギ、ラット、マウス、コイ、ハスモンヨトウ、ナミハダニ）より調製したS-9画分を用いた *in vitro* 比較代謝実験において、ナミハダニにのみ上記の *tert*-butyl 基の水酸化活性が認められなかったことから、fenpyroximate の選択性の発現には解毒代謝活性、特に *tert*-butyl 基の水酸化活性の有無が関与していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

農業等の生理活性物質の作用機構を明らかにすることは rational design, receptor mapping 等の応用分野の発展に大きく寄与するのみでなく、当該物質の特定の生化学反応を阻害する“tool”としての使用に道を開くと考えられ、生化学等の基礎的分野においてもその寄与するところは大きいと考えられる。本論文は2, 3'-置換ベンズアリニド類に分類される殺菌剤 flutolanil および新規な5-フェノキシピラゾール骨格を有する殺ダニ剤 fenpyroximate の作用機構および選択毒性発現機構について精査した結果をとりまとめたものであり、評価しうる成果は以下の通りである。

1. Flutolanil は *Rhizoctonia solani* 菌糸および菌糸分離ミトコンドリア画分を用いた *in vitro* 実験系において、コハク酸を電子供与体とする電子伝達を低濃度で特異的に阻害し、その阻害点はミトコンドリア電子伝達複合体Ⅱの非ヘム鉄イオンタンパク-ユビキノン間にあることを見いだした。

2. Flutolanil 感受性あるいは非感受性の糸状菌およびラット肝より調製したミトコンドリアの本化合物に対する感受性を検討し、感受性菌から調製したミトコンドリアのみが電子伝達阻害を受けたことから、その選択性は作用点である電子伝達複合体Ⅱの感受性に支配されていることを明らかにした。

3. Fenpyroximate 処理した *Tetranychus urticae* に惹起される ATP 含量の速やかな低下、ミトコンドリア微細形態の変化、およびラット肝分離ミトコンドリアを用いた分光学的検討によって、本化合物の作用点

はフラビンタンパクからユビキノンへの電子伝達にあることを明らかにした。ナミハダニ雌成虫およびラット肝から調製したミトコンドリアの電子伝達複合体Iはいずれも本化合物に対して同程度の感受性を示したことから、その選択性には電子伝達複合体Iの感受性差は関与していないことを明らかにした。

4. [Pyrazole-3-¹⁴C]fenpyroximate を用いたラットによる代謝を精査した結果、本化合物はラット体内で容易に加水分解・解毒されることを見いだした。また、この加水分解は *tert*-butyl エステルの直接的な加水分解によるのではなく、*tert*-butyl 基の水酸化、分子内環化および開裂を経るエステル転位反応によって生じた2-hydroxy-2-methylpropyl ester 体（1級アルキルエステル）が加水分解される経路によることを明らかにした。

5. 各種生物より調製したS-9画分を用いた *in vitro* 比較代謝実験において、ナミハダニにのみ上記の *tert*-butyl 基の水酸化活性が認められないことを明らかにした。これにより、fenpyroximate の選択性の発現には解毒代謝活性、特に *tert*-butyl 基の水酸化活性の有無が大きく関与していることを明らかにした。

以上のように本研究は、殺菌剤 flutolanil および殺ダニ剤 fenpyroximate の作用および選択毒性発現の分子機構について明らかにしたのみならず、fenpyroximate の解毒代謝の経路として分子内エステル転位反応を含む新しい代謝経路を見だし、農薬化学、細胞有機化学および薬物代謝生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成5年1月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。