

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	森 湖太郎
論文題目	昆虫キチン合成酵素の新規阻害剤の設計および結合様式の <i>in silico</i> 解析		
(論文内容の要旨)			
<p>昆虫は脱皮を繰り返すことで成長する。脱皮の過程では古い表皮の分解と、新しい表皮の合成がおこなわれるが、特に表皮クチクラの主要な構成成分であるキチンの生合成が重要なステップである。このような機構は哺乳類には存在しないため殺虫剤の創薬標的として重要であり、benzoylphenylurea (BPU) 類をはじめとした様々なキチン合成阻害剤が開発されている。これらのキチン合成阻害剤の作用機構は長い間不明であったが、キチン合成酵素1 (CHS1) の変異がBPU類への顕著な抵抗性をもたらすことから、キチン合成阻害剤の作用標的はCHS1であり、BPU類はこの変異部位周辺に結合すると考えられている。しかしながら、昆虫CHS1の立体構造は決定されておらず、その結合様式については明らかになっていない。本論文は、新規に設計したキチン合成阻害剤の構造活性相関研究と、CHS1の立体構造予測モデルを用いた<i>in silico</i>解析を組み合わせることで、これらの阻害剤の結合様式に関する知見を得たものであり、内容は以下の通りである。</p> <p>第1章の序論に続く第2章では、昆虫CHS1と植物セルロース合成酵素との機能ならびに立体構造の類似性に着目し、セルロース合成阻害剤であるisoxabenの構造をもとにした新規キチン合成阻害剤の設計について述べている。既存のキチン合成阻害剤であるBPU類や2-benzoylamino-5-phenylthiadiazole (TD) 類の構造を参考に、isoxabenのイソオキサゾール環3位の1-ethyl-1-methylpropyl基を、パラ置換ベンゼン環に変換した5-benzoylamino-3-phenylisoxazole (IOX) 類を設計した。ニカメイガ幼虫の培養表皮を用いた<i>in vitro</i>キチン合成阻害活性測定法によってこれらの化合物の活性を評価したところ、isoxabenには活性は認められなかったが、IOX類は顕著なキチン合成阻害活性を示すことを見出した。このことから、イソオキサゾール環3位にパラ置換ベンゼン環をもつ構造がキチン合成阻害活性の発現にとって重要であることを明らかにした。</p> <p>第3章では、IOX類の2つのベンゼン環のうち、イソオキサゾール環5位側のものをA環、3位側のものをB環と定義し、前章でのisoxabenとの活性差に関わると考えられるB環の置換基効果を検討した結果について述べている。2,6-ジメトキシ置換されたA環をもつIOX類において、B環部パラ位に種々の置換基を導入した18種の類縁体を合成し、活性を評価した。得られた結果をもとにHansch-Fujita法によるQSAR解析をおこなったところ、置換基のかさ高さが活性にとって不利にはたらき、疎水性に最適値が存在することがわかった。</p> <p>第4章では、IOX類のA環部における置換基効果について検討した結果について述べている。IOX類のA環部の無置換および2-メトキシ置換類縁体ではほとんど活性を示さなかったが、2,6-ジフッ素置換することによって活性が顕著に増大することを明らかにした。この傾向はBPU類と同じであることから、これらの阻害剤のCHS1への結合様式が類似していることが推察された。さらに、ハスモンヨトウに対する殺虫試験において、2,6-ジメトキシ置換類縁体は全く殺虫活性を示さなかったのに対し、2,6-ジフ</p>			

ッ素置換類縁体の多くは顕著な殺虫活性を示した。これらのことから、A環部における2,6-ジフッ素置換は殺虫活性の発現において重要であると結論づけた。

第5章では、まず昆虫CHS1の点変異によってBPU類への抵抗性が生じるメカニズムの解明を目的とした構造解析について述べている。AlphaFold2を用いてキイロショウジョウバエCHS1の立体構造予測モデルを作成したところ、抵抗性に関わると考えられる1056番目のIle残基は細胞膜と細胞内領域の境界に位置するヘリックスの中央部に位置していた。このIle残基がMet、Phe、Leuに変異すると側鎖β位の分岐が失われ、その結果としてこの残基の周辺に構造変化が起こると考えられた。MDシミュレーションの結果、野生型の構造では1056番目のIle残基と1052番目のTyr残基との主鎖間水素結合が存在しないのに対し、変異型ではこの水素結合が認められた。この違いによって1056番目のIle残基の前後に存在するTyr残基側鎖の配向が変わり、阻害剤との結合安定性に影響を与えると考察した。続いてニカメイガCHS1の立体構造モデルをもとにIOX類の結合様式を推定した結果、IOX類は伸長したキチンを細胞外へ輸送するトンネル状の空間内を占有することが示唆された。この結合様式においては、IOX類のA環部が、キチン合成酵素やセルロース合成酵素の間で高度に保存された構造モチーフと相互作用しており、これはisoxabenとの共通部分の重要性を示唆するものである。また、B環部は抵抗性に関わる変異領域に配置しており、変異によって構造変化が起こると推定された2つのTyr残基側鎖との芳香環相互作用が活性発現に寄与していると考えられた。一方でこのことは、isoxabenやかさ高いB環部置換基をもつIOX類縁体がキチン合成阻害活性を示さないことを支持した。

第6章では、本研究で合成したIOX類縁体の合成方法と各種機器分析データ(NMR、HR/MS、元素分析)が記載されている。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

キチン合成阻害剤は節足動物に特徴的な現象である脱皮を阻害することから、高い害虫選択性を持った防除剤として利用されてきた。その作用機構については、標的分子の同定には至っていたものの、阻害剤の結合様式に関する詳細な研究は進んでいない。そのため、抵抗性害虫にも効果を示す薬剤や、さらに高活性の化合物の開発に必要な情報が不足している。本研究は、新規に設計した阻害剤の構造活性相関研究と標的分子の予測立体構造モデルによる*in silico*解析を組み合わせることで、阻害剤の標的分子に対する結合様式の解明を目指したものである。評価できる点は以下の3点にまとめられる。

- 1) 昆虫キチン合成酵素 (CHS1) とセルロース合成酵素との類似性に着目し、セルロース合成阻害剤であるisoxabenの構造と既存のキチン合成阻害剤の構造を組み合わせ設計した5-benzoylamino-3-phenylisoxazole (IOX) 類を、新たなキチン合成阻害剤として見出した。
- 2) IOX類の活性発現に重要であるイソオキサゾール環3位のベンゼン環における置換基効果を定量的に評価した結果、置換基のかさ高さが活性に不利になること、最適な疎水性が存在することを見出した。また、イソオキサゾール環5位ベンゼン環における置換基効果についても検討し、IOX類のジフッ素置換体が高いキチン合成阻害活性ならびに殺虫活性を示すことを明らかにした。
- 3) 昆虫CHS1の予測立体構造モデルをもとにしたMDシミュレーション解析によって、BPU類に対する抵抗性がもたらされる構造要因を推察し、阻害剤との相互作用に関わると考えられるアミノ酸残基を特定した。また、IOX類の構造活性相関の結果と矛盾しない結合様式を新たに提案した。

以上のように本論文は、類縁体合成と活性測定にもとづく構造活性相関研究と、計算化学にもとづく*in silico*解析を組み合わせることによって、これまで不明であったキチン合成阻害剤の昆虫CHS1への結合様式に関する新たな知見をもたらした。これらの研究成果は、CHS1を標的とした新たな薬剤設計へ応用できるだけでなく、CHS1によるキチン合成の反応機構の解明へつながることが期待でき、農薬科学や創薬科学の発展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、令和6年2月15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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)