

核磁気共鳴法の農薬薬理学への応用

吉 田 充

①
核磁気共鳴法の農薬薬理学への応用

Application of Nuclear Magnetic
Resonance Spectroscopy to
Pesticide Pharmacology

1990

農業環境技術研究所

吉田 充

Mitsuru Yoshida

目次

| | |
|--|----|
| 緒言 | 1 |
| I ^{13}C NMR法による殺菌剤の作用機構解明 | 6 |
| (1) 材料及び方法 | |
| 1) 化合物 | 9 |
| 2) 菌株 | 9 |
| 3) 培養及び[メチル- ^{13}C]メチオニンの取り込み実験 | 10 |
| 4) <i>P. oryzae</i> 菌糸細胞の分画 | 10 |
| 5) コリン及びホスファチジルコリンの単離 | 12 |
| 6) ^{13}C NMRスペクトルの測定 | 12 |
| (2) 結果 | |
| 1) [メチル- ^{13}C]メチオニンの取り込みによる <i>P. oryzae</i> 菌糸細胞の ^{13}C NMRスペクトル変化 | 13 |
| 2) 54.9ppmのシグナルの由来 | 16 |
| 3) 殺菌剤のコリン生合成に及ぼす影響 | 20 |
| 4) コリン生合成阻害から見たPTL-PA間の負相関交差耐性 | 21 |
| (3) 考察 | 23 |
| II 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 | 28 |
| 1. 生体試料における水のプロトンの緩和時間推定法 | 29 |
| (1) 多成分系の水の緩和モデルとシンプレックス法による緩和時間の推定 | 31 |
| (2) モデル2成分系を用いたグラフ法とシンプレックス法の比較 | 32 |
| 2. 殺菌剤処理による菌糸細胞の水の緩和時間変化とその原因 | 35 |
| (1) 材料及び方法 | |
| 1) 殺菌剤 | 36 |
| 2) 培養及び菌糸試料の調製 | 36 |
| 3) 菌糸の水の緩和時間測定 | 36 |
| 4) 菌糸の ^{13}C NMRスペクトルの測定 | 37 |
| 5) 菌糸の水分含量と不凍水量の測定 | 37 |
| 6) 可溶性タンパク質、可溶性多糖、及び可溶性金属イオンの定量 | 37 |

| | |
|---|-----|
| (2) 結果及び考察 | |
| 1) <i>B. cinerea</i> 菌糸細胞の水の T_1 、 T_2 と殺菌剤処理によるその変化 | 38 |
| 2) 殺菌剤処理による菌糸の水分含量と不凍水の変化 | 43 |
| 3) 殺菌剤処理による菌糸中の可溶性物質の変化 | 46 |
| 4) 殺菌剤処理による膜の水透過性の変化 | 50 |
| 3. 細胞水の緩和時間を指標とした殺菌剤の細胞膜に及ぼす影響の測定 | 55 |
| (1) 材料及び方法 | |
| 1) 化合物 | 55 |
| 2) 菌糸の生育阻害の測定 | 56 |
| 3) 菌糸の水の T_2 の測定 | 56 |
| (2) 結果及び考察 | |
| 1) イオンチャンネル阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響 | 57 |
| 2) リン脂質生成阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響 | 57 |
| 3) ステロール生成阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響 | 59 |
| 4) SH及び NH_2 阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響 | 59 |
| 5) その他の殺菌剤が膜の水透過性に及ぼす影響 | 61 |
| III 2次元 1H NMR法による薬剤-DNA相互作用の解明 | 66 |
| (1) 実験方法 | |
| 1) 化合物及びベレニル-d(GCAATTGC) $_2$ 複合体の形成 | 68 |
| 2) 1H NMRスペクトルの測定 | 69 |
| 3) ベレニル-d(GCAATTGC) $_2$ 複合体モデルの表示 | 69 |
| 4) 完全緩和マトリックス解析(CORMA) | 70 |
| (2) 結果及び考察 | |
| 1) d(GCAATTGC) $_2$ の2次元 1H NMRスペクトル解析 | 70 |
| 2) ベレニル-d(GCAATTGC) $_2$ 複合体の1次元 1H NMRスペクトルのイミノ プロトン領域 | 77 |
| 3) ベレニル-d(GCAATTGC) $_2$ 複合体の2次元 1H NMRスペクトル解析 | 80 |
| 4) ベレニル-d(GCAATTGC) $_2$ 複合体の立体構造モデル | 90 |
| 総括 | 94 |
| 謝辞 | 100 |
| 引用文献 | 102 |

略 号

AIC: 赤池の情報量基準

BPA: dibutyl *N*-methyl-*N*-phenylphosphoramidate

CORMA: 完全緩和マトリックス解析

C.P.M.G.: Carr-Purcell-Meiboom-Gill

DSC: 示差走査熱量測定

DMF: *N,N*-ジメチルホルムアミド

ED₅₀: 50%生育阻害濃度

IR: inversion recovery

MIC: 最小生育阻止濃度

NMR: 核磁気共鳴

NOE: 核オーバーハウザー効果

PA: phosphoramidate

PCMBs: *p*-chloromercuribenzenesulfonate

PMA: phenylmercuric acetate

PTL: phosphorothiolate

RMS: 平均2乗の平方根

T₁: スピン-格子緩和時間

T₂: スピン-スピン緩和時間

THF: テトラヒドロ葉酸

TRNOE: 転位核オーバーハウザー効果

ϵ : 吸光係数

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、分析中に試料に加えられるエネルギーが小さいため、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。1970年代のコンピューター技術の発達と普及により従来のCW型NMRに代わってFT-NMRが導入され、シグナルの積算が速くできるようになって比較的感度の低い ^{13}C や ^{31}P 、 ^2H 、 ^{15}N のNMRスペクトルの測定が一般化した。このことはNMRの生理学への応用の道を大きくひらくものであった。

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。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 (Burtら、1979; Gadianら、1979; Ugurbilら、1979; Hollis、1980; Roberts and Jardetzky、1981; Roberts、1984)。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 (Moon and Richards、1973)。

^{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の研究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。NMRにおけるトレーサー法の草分けとして、Ugurbilら（1978）による ^{13}C 標識基質を用いた*E. coli*の代謝に関する研究がある。彼らは[1- ^{13}C]グルコースを添加した液中で*E. coli*を培養し、細胞を含む培養液のスペクトル中に現れる ^{13}C 標識シグナルから、グルコースの1位の炭素が酢酸、コハク酸、乳酸、フルクトース二リン酸、アラニン、バリン、エタノールに取り込まれることを明らかにした。 ^{13}C トレーサー法は、放射性同位元素 ^{14}C を用いたトレーサー法に比べると検出感度は劣るものの、 ^{13}C が非放射性で実験を行うのに特殊な施設や設備を必要としないという利点がある。また ^{14}C トレーサー法においては、標識化合物の同定はクロマトグラフィー等によるその化合物の単離によってなされ、標識が取り込まれた位置は化合物の分解産物の放射性から調べる。それに比べNMR法では、生体のスペクトル中の標識シグナルの化学シフトから、 ^{13}C がどの化合物のどの位置に取り込まれたかを直接知ることができる点も有利である。なお ^{15}N はNMRにおける相対感度が ^{13}C の1/15で、標識を行ってもシグナルの検出感度が低く、それが障害となって生体系のNMRへの応用は遅れている。

^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われ、それが他のシグナルを観測する際に妨害となって生体の ^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。生体の水のプロトンの緩和時間は、生体の水分含量や、高分子と水の相互作用、可溶性の常磁性物質の量、また細胞膜の水透過性などによって規定され、組織や細胞の生理状態を反映している (Mathur-De Vre, 1984; Conlon and Outhred, 1972)。特にDamadian (1971) 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) 及びスピン-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の応用例を見ると、種子成分の非破壊分析への ^{13}C NMRの応用 (Schaefer and Stejskal, 1974, 1975; Yoshidaら, 1989)、穀類の気候順化における水分生理や細胞膜の状態変化の ^1H NMRによる研究 (Chenら, 1978; Gustaら, 1979)、大豆等の種子の登熟や発芽生理のNMRによる解析 (Ishidaら, 1987, 1988a,b, 1990; Kanoら, 1990) などがあげられる。NMRの応用分野としては生理学のみでなく、薬理学も考えられるが、農業の場面での薬理学へのNMRの応用は未開拓の分野である。そこで著者は、生体の

NMRの農薬薬理学への応用を試みた。NMRによる非破壊測定で、*in vitro*では測定できなかった薬理作用や薬剤抵抗性機構が解明されれば、それは特異的で選択性の高い農薬開発の基礎となり、また薬剤抵抗性生物防除技術開発の新しい指針を与えるものとなる。

まず著者は、 ^{13}C トレーサー法を殺菌剤の作用機構研究に応用し、[メチル- ^{13}C]メチオニンを取り込ませたイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) 菌糸細胞の ^{13}C NMRスペクトル変化から、有機リン殺菌剤によるコリンの生合成阻害を観測した。その結果を第I章で述べる。次に灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の菌糸細胞の ^1H NMRを用い、水のプロトンの緩和時間測定を行った。そして殺菌剤処理による菌糸の水の緩和時間変化を観測し、その原因を調べた。さらに菌糸の水の T_2 を指標として、菌糸細胞膜に対する各種殺菌剤の作用を検定した。その結果を第II章で述べる。

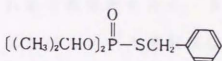
1970年代におけるコンピューターを装備したFT-NMR装置の開発に続き、1980年代にはコンピューターの計算速度と記憶容量が増し、それを利用した2次元NMR法が普及した。そしてこの数年で様々な2次元NMR用パルス系列が考案され、化合物の構造決定に盛んに利用されている。中でも特にNOESY法は原子間の空間距離に関する情報を与え、タンパク質、核酸等高分子化合物の3次元構造解析にも有力な方法として注目されている。化合物の3次元構造解析にはX線結晶構造解析法が一般に用いられてきたが、NMR法は溶液状態にある化合物の構造解析が行えるという点で、水溶液中でその機能を発揮する生体分子の研究により適している。そこでNMRの薬理学への応用は、生体のス

ベクトルを用いたものに限らず、分子レベルでの薬理機構、すなわち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。

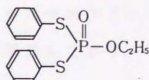
第III章ではこの2次元NMR法を用いて、動物医薬品ベレニルとその作用点であるDNAとの結合体の3次元構造解析を行い、ベレニルの作用機構を分子レベルで解明した結果を述べる。

I ^{13}C NMR法による殺菌剤の作用機構解明

有機リン殺菌剤 iprobenfos (*S*-benzyl *O*,*O*-diisopropyl phosphorothioate, IBP) 及び edifenphos (*O*-ethyl *S*,*S*-diphenyl phosphorodithioate, EDDP) はイネいもち病防除用薬剤として我が国で多量に使用されている。そしてこれらの類ばんな使用により各地に有機リン殺菌剤耐性菌が発生し、薬剤の効果の低下が農業上大きな問題となっている。この問題解決のためには、これらの薬剤の作用機構を明らかにし、さらに薬剤耐性機構を知ることが重要である。有機リン殺菌剤の作用機構については、まず Maeda ら (1970) によってキチン生合成阻害が報告された。しかしその後 Kodama ら (1979, 1980) により、*P. oryzae* において iprobenfos 及び edifenphos がメチオニンのメチル基のホスファチジルコリンへの取り込みを阻害することが報告され、この阻害がキチン生合成阻害より低濃度で起き、かつ菌糸の生育阻害度に対応することから、ホスファチジルコリン生合成阻害が有機リン殺菌剤の作用機構であると考えられている。



iprobenfos



edifenphos

ところで、ホスファチジルコリンの生合成経路は二つ知られており、そのひとつ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 Greenberg 経路であり、

(Bremerら、1960) もうひとつは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ができるKennedy経路である (Kennedyら、1956) (図1-1)。Greenberg経路におけるホスファチジルエタノールアミンへのメチル基供与体は、メチオニンから生成するメチオニンの活性体S-アデノシルメチオニンであると報告されている (Bremerら、1960)。Kodamaらは[メチル- ^{14}C]メチオニン及び[メチル- ^{14}C] S-アデノシルメチオニンを基質に用いて、 ^{14}C -メチル基のホスファチジルコリンへの取り込みを調べ、これが有機リン殺菌剤処理で阻害されることを見ている。すなわちGreenberg経路の阻害を観察したのである。しかしながら、この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 (1979、1980)。しかし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。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経路におけるメチル基転移反応と類似しており、有機リン殺菌剤処理によって阻害をうける可能性もある。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。

Greenberg's
Pathway

Kennedy's
Pathway

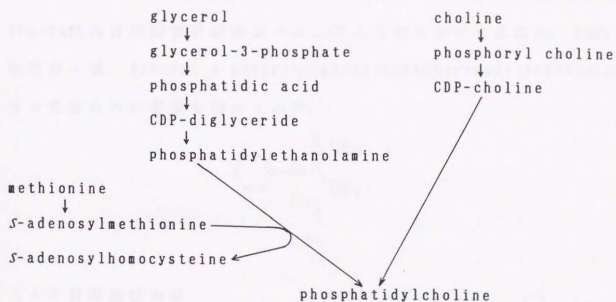
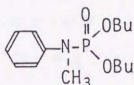


图 1-1 磷脂酰胆碱生物合成途径。

*P. oryzae*の有機リン剤耐性に関しては、iprobenfos及びedifenphosが属するphosphorothiolate(PTL)化合物と、phosphoramidate(PA)化合物の間に負相関交差耐性が見い出されている(Uesugira、1974)。すなわち、PTL感受性の*P. oryzae*菌株はPA耐性に、逆にPTL耐性の菌株はPA感受性を示す。そこで、*P. oryzae*のPTL耐性及びPTL-PA間の負相関交差耐性のメカニズムを明らかにするため、PA化合物の一種、dibutyl *N*-methyl-*N*-phenylphosphoramidate(BPA)のコリン合成への影響も調べてみた。



BPA

(1) 材料及び方法

1) 化合物

L-[メチル- ^{13}C]メチオニン(90 atom %)はPro Chem(株)及び昭光通商(株)より購入した。コリン標品とホスファチジルコリン(卵黄レシチン)標品及びiprobenfosは和光純薬工業(株)より購入した。Isoprothiolane、blasticidin S、benomyl及びBPAは農業環境技術研究所の上杉康彦博士及び片桐政子氏より分与されたものを使用した。

2) 菌株

農業技術研究所の圃場より分離された*P. oryzae*のKen-6019株(PTL感受性)、及びKen-6019株を親株として有機リン殺菌剤を含む

培地上での選抜により得られたKen-6019-R株（PTL耐性）を農業環境技術研究所の片桐政子氏より分与してもらい、それを実験に用いた。

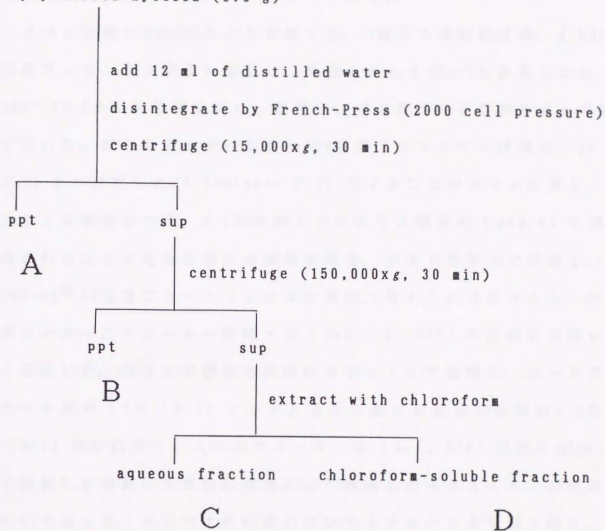
3) 培養及び[メチル- ^{13}C]メチオニンの取り込み実験

*P. oryzae*菌糸を2.4%脱水ポテトデキストロースブロス（Difco）と0.5%酵母エキス（Difco）を含むPDY培地40ml中、26.5°Cで3日間振とう培養し、対数増殖期に達したものを取り込み実験に用いた。この菌糸2gを減圧ろ過により集め、1%グルコース、0.1%硫酸アンモニウムを含む0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.8）40mlに懸濁する。これを26.5°C中で4時間ロータリーシェーカー上で馴らし培養した後、[メチル- ^{13}C]メチオニン10mgを加え（メチオニン終濃度1.67 μM ）、さらに26.5°C中で振とう培養を続けて標識メチオニンを菌糸細胞中に取り込ませた。殺菌剤のメチル基転移反応に及ぼす影響を調べるためには、*N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）0.5mlに溶解した供試薬剤を馴らし培養後の処理液に添加した。なお、blasticidin Sの場合は、グルコースと硫酸アンモニウムを含む上記のリン酸ナトリウム緩衝液0.5mlに溶解し、処理液に添加した。

4) *P. oryzae*菌糸細胞の分画

[メチル- ^{13}C]メチオニンを含む上記の処理液中で24時間インキュベートした*P. oryzae*菌糸を凍結乾燥後、図1-2に示した手順で破碎し、分画を行った。A画分は細胞壁断片や、核、細胞内小器官を含み、B画分はミクロソーム画分である。150,000 $\times g$ の上清は可溶画分であるが、これをクロロホルムで抽出し、クロロホルム可溶画分と水溶性画分とに分けた。

lyophilized mycelia (0.6 g)



1-2 Fractionation procedure of the mycelia of *P. oryzae*.

5) コリン及びホスファチジルコリンの単離

コリンは図1-2のC画分より単離した。C画分を凍結乾燥後、0.05M酢酸アンモニウム溶液に溶解し、酢酸を加えてpH4.9に調節した後、100°Cで5分間熱処理を行い、変性タンパク質等の不溶物を遠心分離で除いた。試料溶液はそのまま0.05M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5.0)で平衡化したCM-Sephadex C-25 陽イオン交換カラムに通し、コリンを吸着させた。0.05M酢酸アンモニウム緩衝液(pH9.0)で溶出されるコリンを含む画分は凍結乾燥後、少量の蒸留水に溶解し、Avicel® SF薄層プレート(フナコシ薬品(株))にスポットし、ブタノール-エタノール-酢酸-水(8:2:1:3, V/V)の溶媒系を用いて展開した。コリンの標品も同時にスポットして展開し、ヨードブラチナ試薬(5% (W/V) クロロブラチナ酸水溶液を20倍容の4.5% (W/V) ヨウ化カリウムのエタノール-水(1:1, V/V) 溶液に添加して調製)を噴霧して青色の発色により検出を行ったところ、Rf値は0.41であった。そこでこのRf値のバンドをプレートより掻き取り、エタノールで抽出してコリンの純品を得た。

ホスファチジルコリンは、[メチル- ^{13}C]メチオニンとともに24時間インキュベートした菌糸からBlighとDyerの方法(Bligh and Dyer, 1959)により抽出し、クロロホルム-メタノール-28%アンモニア(14:7:1, V/V)の溶媒系を用いたシリカゲルの薄層クロマトグラフィーにより単離した。

6) ^{13}C NMRスペクトルの測定

^{13}C NMRスペクトルの測定には日本電子(株)のFX-90Q NMR装置を

用いた。*P. oryzae*菌糸細胞のスペクトル測定にあたっては、減圧ろ過により回収した菌糸を蒸留水で2回洗浄後、10mmφ NMR試料管に詰めて試料とした。 ^{13}C NMRスペクトルは、観測幅を5000Hz（約225 ppm）とし、90°パルスを用い、繰り返し時間0.4秒で4000~4500のFIDを積算することにより得た。磁場ロックはD₂Oの外部ロックで行った。フーリエ変換にあたっては、ブロードニングファクター12Hzのexponentialウィンドウを用いてS/N比の向上をはかった。また、キャピラリー管に封入した酢酸を試料の中央にさし込み、酢酸のメチル基のシグナル（19.9ppm）を化学シフト及びシグナル強度定量のための基準とした。

A画分及びB画分の ^{13}C NMRスペクトルについては、FIDの積算回数を22,500回とし、その他は菌糸の場合と同じ条件を用いて測定を行った。可溶性画分であるC及びD画分については、90°パルスを用い、繰り返し時間を2.8秒とし、4500回のFIDの積算を行った。菌糸より抽出したコリンのスペクトルは、C及びD画分と同じ条件で、またホスファチジルコリンのスペクトルは繰り返し時間を0.4秒として測定を行った。

（2）結果

1）[メチル- ^{13}C]メチオニンの取り込みによる*P. oryzae*菌糸細胞の ^{13}C NMRスペクトル変化

[メチル- ^{13}C]メチオニンを取り込ませる前の*P. oryzae* Ken-6019株菌糸細胞の ^{13}C NMRスペクトルを図1-3Aに示した。このスペク

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る (Yoshidaら、1984a)。細胞壁成分、タンパク質、核酸など分子量が大きく運動性が低い生体分子のシグナルは、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。ホスファチジルコリン等膜成分のシグナルも運動性が低いために観測されなかった。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(14.9ppm)の他に54.9ppmに新しいシグナルが現われた(図1-3B)。このシグナルの化学シフトは $\text{N}-\overset{+}{\text{C}}\text{H}_3$ のメチル基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取り込まれ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、このスペクトル中には検出できず、この54.9ppmのシグナルは主にコリンに由来すると考えられた。インキュベーション時間を増やすにしたがってこの54.9ppm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(図1-3C, D)。

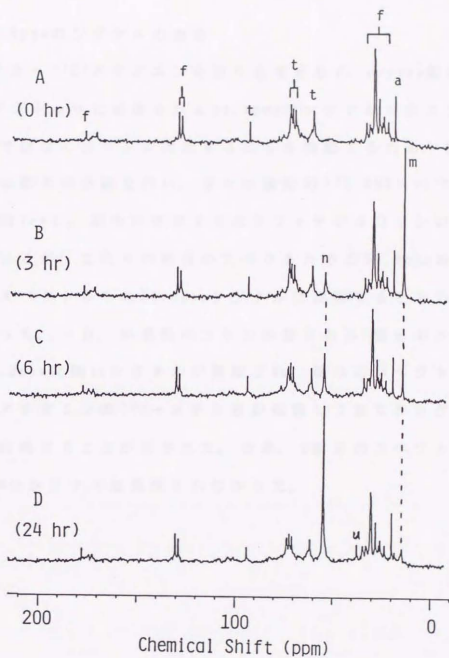
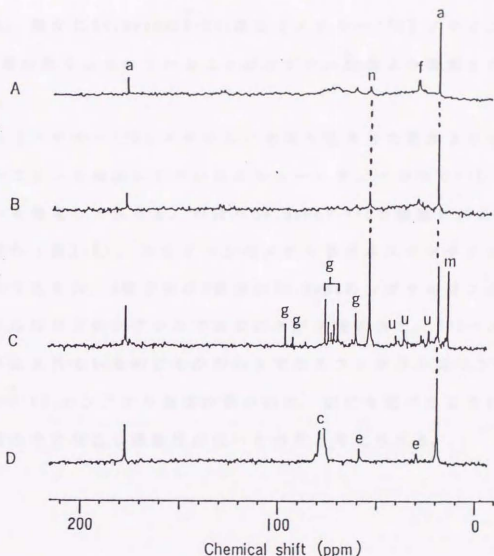


Fig 1-3 ^{13}C NMR spectral change of *P. oryzae* during the incubation with [methyl- ^{13}C]methionine.

a, methyl group of acetic acid (standard for signal intensity); f, fatty acid; m, methyl group of methionine; n, $\text{N}^+\text{-CH}_3$; t, α,α -trehalose; u, unknown.

2) 54.9ppmのシグナルの由来

[メチル- ^{13}C]メチオニンを取り込ませた *P. oryzae* 菌糸の ^{13}C NMRスペクトル中に観測される54.9ppm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を確認するため、図1-2に示したような菌糸の分画を行い、各々の画分の ^{13}C NMRスペクトルを測定した(図1-4)。膜中に存在するホスファチジルコリンはA及びB画分に含まれるが、これらの画分のスペクトル中の54.9ppmのシグナルは、菌糸のスペクトル中の54.9ppmシグナルに比較するときわめて小さいものだった。一方、水溶性のコリンが含まれるC画分のスペクトル中には54.9ppmに強いシグナルが観測され、菌糸のスペクトル中に観測されたメチオニンの ^{13}C -メチル基が転移して生じたシグナルはこの画分に由来することが示された。なお、D画分のスペクトル中には、54.9ppmにシグナルは観測されなかった。



☒ 1-4 ^{13}C NMR spectra of cell fractions of *P. oryzae*.

A to D refer to fractions A to D. A and B were obtained by 22,500 times accumulation with 0.4 sec repetition time, and C and D by 4500 times accumulation with 2.8 sec repetition time.

a*, f, m, n, u, see the legend of Fig. 1-3.

c, chloroform (solvent); e, ethanol (stabilizer in chloroform);

g, glucose (degradation product of trehalose).

* When the spectrum is measured with 2.8 sec repetition time (C, D), the relative intensity of this signal is approximately 2.5-fold stronger than with 0.4 sec repetition time (A, B).

さらにC画分よりコリンを抽出単離してそのスペクトルを測定してみると、確かに54.9ppmの N-CH_3^+ 基に[メチル- ^{13}C]メチオニンの ^{13}C 標識が取り込まれていることがシグナル強度より確認された(図1-5)。

なお[メチル- ^{13}C]メチオニンを取り込ませた菌糸よりホスファチジルコリンを抽出してクロロホルム-メタノール中で ^{13}C NMRスペクトルを測定してみると、やはり54.9ppmに ^{13}C で標識されたシグナルが現れ(図1-5)、メチオニンのメチル基はホスファチジルコリンにも取り込まれ、A画分及びB画分の54.9ppmのシグナルはこのホスファチジルコリンのシグナルであることが示唆された。 ^{13}C -メチル基が取り込まれているのにもかかわらずホスファチジルコリンを含む画分の N-CH_3^+ のシグナル強度が弱いのは、前にも述べたようにこの分子が膜の中に存在し運動性が低いためだと考えられる。

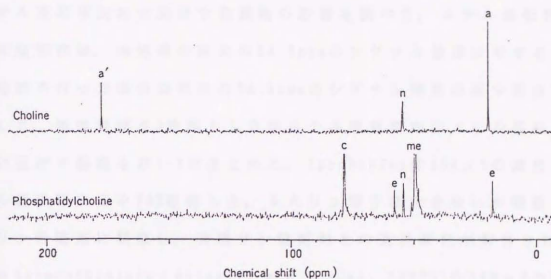
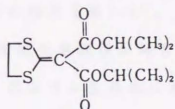


图 1-5 ^{13}C NMR spectra of ^{13}C -labeled choline and phosphatidylcholine.
 a, a', acetic acid; c, chloroform (solvent); e, ethanol (stabilizer in chloroform); me, methanol (solvent); n, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

3) 殺菌剤のコリン生合成に及ぼす影響

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 Ken-6019 株のメチル基転移反応に及ぼす殺菌剤の影響を調べた。メチル基転移反応の阻害度は、無処理の菌糸の 54.9 ppm のシグナル強度に対する殺菌剤処理を行った場合の菌糸の 54.9 ppm のシグナル強度の減少割合で表わした。処理時間を 3 時間とした場合の各種殺菌剤のメチル基転移反応に及ぼす影響を表 1-1 にまとめた。Iprobenfos は $350\ \mu\text{M}$ の濃度でメチル基転移反応を 76% 阻害した。またリン原子は含まないが構造上有機リン殺菌剤に類似し、有機リン殺菌剤との交差耐性が報告されている isoprothiolane (Katagiri and Uesugi, 1977) も $140\ \mu\text{M}$ の濃度でメチル基転移反応を 73% 阻害した。一方、タンパク質生合成阻害剤 blasticidin S (Huang ら, 1964) 及び細胞分裂阻害剤 benomyl (Davies and Flach, 1977) は、菌糸の生育が阻害される濃度 (MIC) においてもこの転移反応にまったく影響を及ぼさなかった。



isoprothiolane

表 1-1 Effect of Fungicides on Choline Biosynthesis in *P.*

oryzae Ken-6019

| Fungicide | Concentration (μ M) | Inhibition (%) |
|----------------|--------------------------|----------------|
| Iprobenfos | 350 | 76 |
| Isoprothiolane | 140 | 73 |
| Blasticidin S | 12 | 0 |
| Benomyl | 3.4 | 0 |

4) コリン生合成阻害から見た PTL-PA間の負相関交差耐性

PTL耐性株である Ken-6019-R株についても、iprobenfosによるコリン生合成阻害を同様な方法で測定し、PTL感受性の Ken-6019株の場合と比較してみた。その結果、Ken-6019-R株におけるコリン生合成阻害度は Ken-6019株の場合よりも低く、PTL耐性がコリン生合成阻害の場面においても観察された(表 1-2)。

また PTL との間に負相関交差耐性が報告されている PA 化合物の一種 BPA (Uesugira, 1974) のコリン生合成に対する影響も調べてみた。BPA もメチオニンからのメチル基転移反応を阻害しコリン生合成を抑制したが、その阻害の度合は Ken-6019-R株の方が Ken-6019株の場合よりも大きく、PTL-PA間の負相関交差耐性がコリン生合成阻害の場面においても確認された(表 1-2)。

表 1-2 Effect of Iprobenfos and BPA on Choline Biosynthesis
in the PTL-S Isolate and the PTL-R Mutant of *P. oryzae*

| Fungicide | Concentration (μ M) | Inhibition (%) | |
|------------|--------------------------|----------------|-------|
| | | PTL-S | PTL-R |
| Iprobenfos | 175 | 32 | 0 |
| | 350 | 76 | 50 |
| | 700 | -- | 74 |
| | 84 | -- | 70 |
| BPA | 167 | 41 | 83 |
| | 334 | 52 | 100 |

(3) 考察

生きた *P. oryzae* 菌糸の ^{13}C NMR スペクトルを用いて、[メチル- ^{13}C]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生成する過程を観察する方法を確立した。 ^{13}C NMR においてはコリンのメチル基もホスファチジルコリンの N-メチル基も 54.9 ppm に現われるが、細胞のスペクトル中では膜に存在するホスファチジルコリンは分子の運動性が低くシグナルが広幅化して観察できず、可溶性のコリンの生成のみが測定できることが菌糸細胞の分画実験により証明された。タンパク質のシグナルも同じ理由で生きた菌糸のスペクトル中には検出できず、タンパク質への標識メチオニンの取り込みは測定することができなかった。

これまで遊離型コリンのメチル基の由来については明らかではなかったが、[メチル- ^{13}C]メチオニンの ^{13}C 標識がコリンのメチル基に取り込まれたことから、コリンの三つのメチル基のうち少なくとも一つはメチオニンに由来することが証明された。メチオニンは細胞内で活性型の β -アデノシルメチオニンに変換され、実際には β -アデノシル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成されると考えられる。ちなみにホスファチジルコリンについては、三つのメチル基がすべて β -アデノシルメチオニンに由来することがラット及び *P. oryzae* において認められている (Bremer ら、1960; Kodama ら、1979)。しかしラットにおいては三つのうち二つのメチル基が N^5 -メチルテトラヒドロ葉酸 (THF) に由来するという報告もあるので (Stekol ら、1955)、遊離型コリンのメチル基の由

来についても葉酸依存性の酵素が関与している可能性を否定できない（図1-6）。

上記の ^{13}C NMR法を用いて殺菌剤のコリン生合成に及ぼす影響を調べたところ、Greenberg経路によ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る有機リン殺菌剤の一種iprobenfos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することが明らかになった。有機リン殺菌剤の作用点と考えられてきた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反応は、コリンの生合成におけるエタノールアミンのメチル化反応と類似しており、これらの反応を司る酵素が同一あるいは類似している可能性が大きい。そして有機リン殺菌剤は、これらのメチル基転移酵素の活性を阻害することによってGreenberg経路と同時にKennedy経路をも阻害し、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（図1-6）。

Greenberg's Pathway

glycerol
↓
glycerol-3-phosphate
↓
phosphatidic acid
↓
CDP-diglyceride
↓
phosphatidylethanolamine

methionine
↓
S-adenosylmethionine
S-adenosylhomocysteine

serine
↓
ethanolamine
methionine
↓
S-adenosylmethionine
or N⁵-methyl THF
S-adenosylhomocysteine
or THF

Kennedy's Pathway

choline
↓
phosphoryl choline
↓
CDP-choline

phosphatidylcholine

1-6 Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis by organophosphorus fungicides.

➔ inhibition site

Isoprothiolaneはリン原子を含まないが構造上有機リン殺菌剤に類似し、有機リン殺菌剤との交差耐性が認められている殺菌剤である (Katagiri and Uesugi, 1977)。また、isoprothiolaneが[メチル- ^{14}C]メチオニンの ^{14}C -メチル基のリン脂質への取り込みを阻害するという報告もある (下澄ら, 1977)。このisoprothiolaneもエタノールアミンへのメチル基転移反応を阻害し、コリンの生成を抑えることが明らかとなり、この薬剤の作用機構が有機リン殺菌剤の場合と同じであることが再確認された。

一方、タンパク質合成阻害剤blasticidin Sや細胞分裂阻害剤benomylは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及び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ものであると同時に、この生きた菌糸を用いた ^{13}C NMR法の薬剤の作用機構研究における有用性を示すものである。

有機リン殺菌剤に対して耐性の *P. oryzae* 菌株はコリンの生合成阻害の場面においても耐性を示し、また菌糸の生育阻害を指標として観察されているPTL-PA間の負相関交差耐性 (Uesugiら, 1974) が、コリン生合成阻害の場面でも観察された。このことから、PAの作用機構もPTL同様メチル基転移反応阻害によるリン脂質生合成阻害であると判断できる。また *P. oryzae* におけるPTL耐性及びPA感受性の機構が、これらの化合物の作用点であるメチル基転移酵素の変異に起因するとも考えられる。しかし一方、PTL耐性菌株におけるBPAに対する感受性の増加がBPA代謝能の低下によるという説もある (Uesugi

and Sisler, 1978; Uesugi and Katagiri, 1981)。またPTL感受性とPTLの代謝様式との関連を示唆する報告もみられ (Uesugi and Katagiri, 1983)、PTL-PA間の負相関交差耐性が菌株間の代謝の違いによる可能性も否定できない。

このように、 ^{13}C 標識基質を取り込ませた生きた糸状菌菌糸細胞の ^{13}C NMRスペクトル変化から有機リン殺菌剤及びその関連化合物の殺菌機構を解明することができた。これは生体系のNMR法の農薬薬理学への応用の第一歩である。

II 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

この章において著者は、細胞水のプロトンの緩和時間を生理状態の指標に用いて農薬の薬理作用を検定することを試みた。生体の水のプロトンの測定を行うと、一般に化学シフト値は同じでも緩和時間の異なる複数の水の成分が検出される。そこでまず何種類の成分がどのような量比で存在するのか、また各々の成分の緩和時間がいくらかを推定する必要がある。そのため、最初にシンプレックスを用いた複成分系の水の緩和時間推定法を確立し、次にその方法を用いて果樹・野菜の重要病害の病原菌である *B. cinerea* の菌糸細胞の水の緩和時間に及ぼす殺菌剤の影響を調べた。そして殺菌剤処理により引き起こされる水の緩和時間変化の原因を生物物理学的視点から検討し、細胞膜の水透過性の変化が水の緩和時間変化の主因であることを究明した。さらに著者は、細胞水の T_2 を指標として、*B. cinerea* の細胞膜に及ぼす各種薬剤の影響を調べ、水の緩和時間の測定が殺菌剤の作用機構研究において有力な手法となり得ることを明らかにした。

1. 生体試料における水のプロトンの緩和時間推定法

水のプロトンの緩和時間をinversion recovery (IR)法やCarr-Purcell-Meiboom-Gill (C.P.M.G)法で測定し、第一パルスから観測用パルスまでの時間 t に対して緩和率の対数をプロットすると、純水を試料とした場合には直線が得られその傾きから緩和時間を求めることができるのに対し、生体試料の場合は一般的に曲線が得られる。これは生体中に緩和時間の異なる水が存在するからである。

この曲線から水の各成分の存在比と緩和時間を求めるには、従来図2-1に示したグラフ法が用いられた。すなわち、まず曲線の右端 a の部分の傾きから緩和の遅い成分の緩和時間(T_a)を求め、 a の直線を延長して得られる縦軸との切片 A から水全体に対するその成分の割合を求める。次に元の曲線($a+b$)から a の寄与を差し引いて得られた直線 b の傾きから緩和の速い成分の緩和時間(T_b)を求め、切片 B からその成分の割合を求める。 b が直線にならない場合は、その曲線の右端の直線に近い部分の傾きから第二成分の緩和時間を求め、またその切片からその成分の存在割合を求める。その後、第二成分の寄与を第二の曲線から差し引き、第三、第四の成分の緩和時間を同じようにして次々と求めてゆくのである。しかしこの方法は曲線のどの範囲のデータをもとに直線を求めるかを判断するのが難しく、範囲の選び方によっては大きな推定誤差を生じる。特に二つの成分の緩和時間が近い場合は、 a の部分における b の寄与が大きき、緩和時間の推定はきわめて不正確になる。

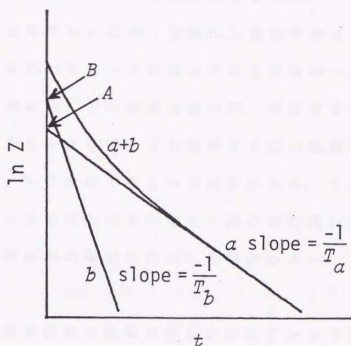


Fig 2-1 Estimation of Relaxation Time and Population Size of Each Component by Graphical Method.

t is time between the first pulse and data acquisition. Z is $(S_0 - S_t)/2S_0$ for T_1 measurement by IR method and S_t/S_0 for T_2 measurement by C.P.M.G. method, where S_t is the instantaneous value of the z component of magnetization and S_0 its equilibrium value.

そこで著者は、シンプレックスを用いた非線形最小自乗法 (Nelder and Mead, 1965; 小林, 1981) によるカーブフィッティングを利用した多成分系の緩和時間推定法を考えた。シンプレックス法は、観測データとモデルとの差 (偏差の二乗和やカイ二乗の値) を最小にするモデルのパラメータの値を求める方法の一つである。この方法は、最小値の近くでの収束は遅いが、推定するパラメータの初期値が真の値からかなり遠くても効率よく広い範囲を検定し、真の値に近いパラメータを与えるという特徴がある。この特徴は、試料ごとのパラメータのばらつきが大きく真の値に近い初期値を選ぶことが困難な生物試料の場合にたいへん都合がよい。

(1) 多成分系の水の緩和モデルとシンプレックス法による緩和時間の推定

多成分系の水の緩和モデルとして、IR法による T_1 の測定については式(1)を、またC.P.M.G.法による T_2 の測定については式(2)を考えた。

$$(S_0 - S_t)/2S_0 = C + \sum_{i=1}^n P_i \exp(-t/T_i) \quad (1)$$

$$S_t/S_0 = C + \sum_{i=1}^n P_i \exp(-t/T_i) \quad (2)$$

上式において、 S_0 は緩和前の磁化の z 成分 (= シグナル強度)、 S_t は第一パルスと観測用パルスの間の時間が t の場合の磁化の z 成分 (= シグナル強度) を表わしている。 n は緩和時間の異なる水の成分数、 P_i は i 番目の成分の存在割合を、 T_i は i 番目の成分の緩和時間を表わ

す。なお C は、測定中の試料の緩和時間変化など系統的なエラーを反映する定数である。

$t=0$ の時、IR法による T_1 測定の場合は $S_i = -S_0$ 、C.P.M.G.法による T_2 測定の場合は $S_i = S_0$ となり、式(3)が導かれる。

$$C + \sum_{i=1}^n P_i = 1 \quad (3)$$

観測値を S_0 、 S_i 、 t に代入し、式(3)を拘束条件として、式(1)、(2)中のパラメータ P_i 、 T_i 、及び C を、NECのACOS-6コンピューター上で、小林(1981)によって書かれたシンプレックスのサブルーチンを用いて推定した。 n については $n=1 \sim 3$ として求めたパラメータの組間で赤池の情報量基準(AIC)(赤池、1976)を比較し、その値が最小になるものを採用した。なおAICは式(4)によって求められる。

$$AIC = 2M + N \log \left(\sum_{i=1}^N (E_i - D_i)^2 \right) \quad (4)$$

上式において M は推定されるパラメータの数、 N はデータの数、 E_i は観測値、 D_i はそのパラメータの組を採用した場合の計算値である。そしてこのAICの値が小さいほどそのパラメータの組は観測結果をよく表わしていると評価される。

(2) モデル2成分系を用いたグラフ法とシンプレックス法の比較

緩和時間解析におけるグラフ法とシンプレックス法の比較を行うために、モデル2成分系を作り、その水の T_1 の解析を両法で行った。 0.35 mM の MnCl_2 水溶液 $15 \mu\text{l}$ を入れたキャピラリー15本と 0.7 mM の MnCl_2 水溶液 $15 \mu\text{l}$ を入れたキャピラリー5本を用意し、この合計20本のキャピラリーを 10 mm ϕ NMR試料管に入れモデル2成分系とした。こ

の水のプロトンの T_1 を日本電子(株)のFX-90Q NMR装置(^1H の共鳴周波数90MHz)を用いてIR法で測定し、2成分系のnon-exponentialな緩和曲線を得た。この緩和曲線から、グラフ法及び式(1)に基づいたシンプレックス法を用いて、各々の成分の存在割合と T_1 とを推定した。測定は、各キャピラリーの位置を変えて5回行った。なお、各々の MnCl_2 溶液のみを10mmφ試料管に入れて通常のIR法でプロトンの T_1 を測定すると、90MHzにおける前者の溶液の T_1 が421msecで、後者の溶液の水の T_1 が212msecであった。よって上記のモデル2成分系における緩和時間解析の正解は、 T_1 が421msecの水が75%で T_1 が212msecの水が25%、すなわち式(1)における $P_1=0.75$ 、 $T_1=421$ 、 $P_2=0.25$ 、 $T_2=212$ 、 $C=0$ ということになる。

グラフ法及びシンプレックス法による緩和時間解析の結果を表2-1に示した。二つの方法を比較してみると、シンプレックス法の方がより真実に近い平均値を与え、かつ推定値の標準偏差も小さく、多成分系の緩和時間の解析においてグラフ法より優れていることが証明された。またシンプレックス法による C の推定値が0に近いこと、そして $n=2$ とした場合に最もAICが小さくなることも、この方法の信頼性の高さを示すものである。

表 2-1 Comparison of Simplex Method with Graphical Method^{a)}

| | Expected value | Graphical method | Simplex method |
|-------|-------------------|---------------------|-------------------|
| P_1 | 0.75 | 0.802 ± 0.141 | 0.782 ± 0.101 |
| T_1 | 421 | 405 ± 63 | 433 ± 26 |
| P_2 | 0.25 | 0.171 ± 0.148 | 0.188 ± 0.102 |
| T_2 | 212 | 146 ± 79 | 201 ± 37 |
| C | 0 | ----- | 0.004 ± 0.009 |

a) Values are mean \pm S.D. for $n=5$.

2. 殺菌剤処理による菌糸細胞の水の緩和時間変化とその原因

前節で生体試料中の水のプロトンの緩和時間推定にシンプレックス法が有用であることが示されたので、この方法を用いて *B. cinerea* 菌糸細胞の水の T_1 及び T_2 の解析を行い、また各種殺菌剤が菌糸細胞の水の緩和時間に及ぼす影響を調べた。さらに殺菌剤処理による細胞水の緩和時間変化の原因を、生物物理学的視点から究明した。

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 (Conlon and Outhred, 1972) に基づいて Stoutら (1978) が次のような式を提出している。

$$1/T'_a = 1/T_a + 1/t_a - P_a T_b / P_b t_a^2 \quad (5)$$

この式において、 T'_a は細胞内の水の見かけの緩和時間、 T_a は細胞内の水の真の緩和時間、 T_b は細胞外の水の緩和時間、 t_a は細胞膜を通じた水の交換時間、 P_a と P_b は細胞内外の水の量を表わす。この式から、細胞内の水の緩和時間の測定値は、真の緩和時間 T_a と膜の水透過性を表す t_a の関数であるということがわかる。なお T_a は、細胞質の粘度、生体高分子と水の相互作用、また水に溶けている常磁性物質の量などによって決定される。

殺菌剤処理による細胞水の緩和時間 (測定されるのは見かけの緩和時間 T'_a である) の変化は、 T_a の変化が原因である可能性もあり、また t_a の変化が原因である可能性もある。そこで緩和時間変化の原因を探る際には、まず T_a の変化の可能性を調べ、次に t_a の変化について検討した。

(1) 材料及び方法

1) 殺菌剤

Edifenphosとprocyimidoneは和光純薬工業(株)より購入し、Benomylは農業環境技術研究所の片桐政子氏より提供されたものを用いた。

2) 培養及び菌糸試料の調製

B. cinerea (MAFF 03-05744)の菌糸は2.4%脱水ポテトデキストロースブロス(Difco)、0.5%酵母エキス(Difco)を含むPDY培地中で培養し、対数増殖期に達したところを減圧ろ過により集菌した。蒸留水で2回洗浄後、その1gを殺菌剤のDMF溶液0.5mlを添加したPDY培地150mlに懸濁し、ロータリーシェーカー上で26.5℃中、15時間インキュベートした。殺菌剤処理の終わった菌糸は自然ろ過にて回収し、蒸留水で洗浄後、菌糸の外側の水分をペーパータオルで吸い取り、以下の実験に供した。

3) 菌糸の水の緩和時間測定

菌糸0.5gを10mmφ NMR試料管に詰め、 T_1 の測定をIR法(パルス間隔10μsec~1.5sec)で、 T_2 の測定をC.P.M.G.法(180°パルス間の間隔0.5msec、180°パルスの繰り返し10~375回)で行った。測定に用いたNMR装置は日本電子(株)のFX-90Qで、磁場ロックはD₂Oの外布ロックで行った。Delay timeは最も緩和の遅いプロトンの T_1 の5倍より長い3secとした。菌糸試料中の各々の水の成分の存在率及び緩和時間は、II-1-(1)で述べたシンプレックス法を用いて求めた。

菌糸の乾燥試験では、菌糸1gを25℃中で0~9時間乾燥させた後、0.5gを10mmφ試料管に入れ、 T_1 の測定及びデータ解析を前述の方法

で行った。

MnCl₂溶液浸漬菌糸の緩和時間測定にあたっては、1gの菌糸を50 mlの25mM MnCl₂水溶液に1~9時間浸漬した後、自然ろ過により大部分の菌糸外の水を除く。まだぬれた状態の菌糸の一部を10mmφ試験管に入れ、C.P.M.G.法(180°パルス間の間隔0.5msec、180°パルスの繰り返し1~19回)でT₂の測定を行い、細胞内の水のT₂(T'_{2a})と細胞内外の水の量比をシンプレックス法で求めた。細胞外の水のT₂については、菌糸を含まない25mM MnCl₂水溶液のT₂をC.P.M.G.法で測定し、0.5msecと決定した。

4) 菌糸の¹³C NMRスペクトルの測定

1gの菌糸を10mmφ試験管に入れ、I-(1)-6)の条件で菌糸の¹³C NMRスペクトルの測定を行った。

5) 菌糸の水分含量と不凍水量の測定

細胞外の水をペーパータオルで除いた後の菌糸試料を、105℃の乾熱器中で24時間乾燥させた。このときの重量の減少を水分の蒸発によるものと考え、もとの重量との差から菌糸の水分含量を求めた。

菌糸中の凍結水量は、15~30mgの菌糸を-80℃まで冷却した後、2℃/minで加熱しつつ示差走査熱量測定(DSC)をSEIKOのSSC580+ DSC-20装置を用いて行い、融解時のDSCピークの面積から計算した。菌糸中の不凍水量は、水分含量から凍結水量を差し引いて求めた。

6) 可溶性タンパク質、可溶性多糖、及び可溶性金属イオンの定量

可溶性タンパク質は、凍結乾燥後磨砕した菌糸15mgより1mlの0.05Mのリン酸ナトリウム緩衝液で抽出し、牛血清アルブミン(和光

純薬工業（株））を標品としてBio-Rad法（Bradford、1976）で定量した。

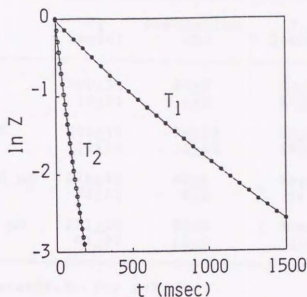
可溶性多糖は、凍結乾燥後磨砕した菌糸15mgより0.8mlの蒸留水で抽出し、その後試料中のタンパク質と脂質をクロロホルム-イソアミルアルコール（3:1）で抽出除去した。試料に4倍溶のエタノールを添加し、可溶性多糖を沈澱させた後、その沈澱を10mlの蒸留水に溶解し、グルコースを標品に用いたアンスロン法で定量を行った。

可溶性の金属イオンは10gの生菌糸より100mlの80%（V/V）エタノールで抽出し、エタノールを留去したのち試料を凍結乾燥した。試料を溶解する際、混入している少量のタンパク質など有機物が可溶性金属イオンを巻き込んで沈澱する可能性があったので、120℃中、4時間、過塩素酸-硝酸（1:1）処理を行い有機物を分解した後、日立製作所（株）の180-70型ゼーマン原子吸光分光光度計を用いてMn、Fe、Cuの定量を行った。

（2）結果及び考察

1）*B. cinerea*菌糸細胞の水の T_1 、 T_2 と殺菌剤処理によるその変化

*B. cinerea*菌糸細胞の水の T_1 と T_2 を測定し、図2-2に示した半対数プロットを行うと曲線が得られ、菌糸細胞の水は緩和時間の異なる複数の成分から成っていることが明らかとなった。そこでシンプレックス法により解析を行ったところ、二つの成分が検出され、無処理の菌糸では水の主成分の T_1 が392msec、 T_2 が64msecであった（表2-2）。一方、副成分の T_1 は49msec、 T_2 は21msceであった。



2-2 The plots for calculation of T_1 and T_2 of water protons in the mycelial cells of *B. cinerea*. t is time between the first pulse and data acquisition. Z is $(M_0 - M_t)/2M_0$ for T_1 measurement and M_t/M_0 for T_2 measurement, where M_t is the instantaneous value of the z component of magnetization and M_0 its equilibrium value. \bullet and \circ show observed z for each t , and the lines are composite relaxation curves of the two water components obtained by the simplex method.

表 2-2 Relaxation Times of Water Protons in the Mycelial Cells of *B. cinerea* and Their Changes by Fungicide Treatments^a

| Treatment | T ₁ (msec) | Population (%) | T ₂ (msec) | Population (%) |
|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
| Control | 392±36 49±34 | 84±5 4±2 | 64±2 21±8 | 82±11 17±11 |
| Benomyl 0.7 μM | 209±45 42±14 | 78±13 12±15 | 45±5 15±3 | 83±2 16±2 |
| Edifenphos 160 μM | 276±53 68±33 | 82±4 6±2 | 34±4 5±7 | 88±9 8±11 |
| Procymidone 7 μM | 221±19 61±27 | 79±8 12±4 | 30±4 4±6 | 82±13 11±16 |

^a Values are mean±S.D. for n=3.

緩和時間から見て二種類の水が検出されるという現象は、動物組織のみならず植物組織においても観察されている (Burkeら、1974; Stoutら、1978; Chenら、1978; Gustaら、1979; Ballaら、1985; Colireら、1988)。そして一般に緩和時間の長い水はsymplastすなわち原形質の水であり、緩和時間の短い水はapoplastすなわち細胞壁の水和水であると考えられている。緩和時間の短い水をapoplastの水であるとする根拠は、セルロースが周囲の水の緩和時間を短縮すること (Miftakhutdinova and Anisimov、1976; Ballaら、1985; Byrne、1986; Colireら、1988)、また植物細胞壁に沈着しているマンガン (Dittel and Sagel、1966) も水和水の緩和時間短縮を引き起こすという事実である。*B. cinerea*など糸状菌の細胞壁は主に

セルロースではなくキチンから成っているが、糸状菌菌糸においても細胞壁水和水が緩和時間の短い水の副成分である可能性が強い。

緩和時間の異なる二種類の水が異なった生育ステージにある細胞に由来するのではないかという可能性は、菌糸の生育による T_1 の変化が100msec以内であり主成分と副成分の比率が生育ステージにより変化しないという事実（データは表示せず）によって否定される。

菌糸を三種類の殺菌剤、benomyl、edifenphos、procymidoneで処理すると、50%生育阻害濃度（ED₅₀）と最少生育阻止濃度（MIC）の間で水の主成分の T_1 及び T_2 が著しく短くなった（図2-3、表2-2）。なお水の副成分の緩和時間変化及び各成分の割合の変化は誤差の範囲内だった。

以下、この殺菌剤処理による菌糸の水の主成分の緩和時間短縮の原因を調べてみた。

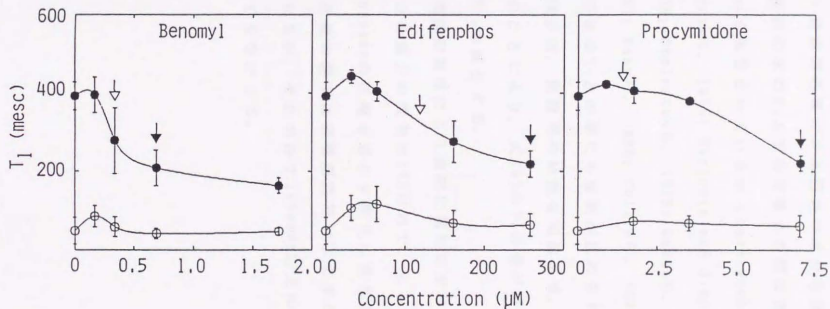


Fig. 2-3 Changes in the T_1 of water protons in the mycelial cells of *B. cinerea* by fungicide treatments. White arrows and black arrows represent ED_{50} and MIC respectively. Bars represent standard deviations for three experiments. (●) Major water component; (○) minor water component.

2) 殺菌剤処理による菌糸の水分含量と不凍水の変化

生体の水の T_1 と水分含量との間に相関があることが多くの試料について報告されているが (Hazlewoodら、1974; Inchら、1974; Horrisら、1975; Kiricuta and Simplaceanu、1975; Raaphorstら、1975; Egglestonら、1975; Gustaら、1979; Raaphort and Kruuv、1981; Kakuら、1984; Colireら、1988)、乾燥菌糸の水分含量と菌糸の水の T_1 との間にも相関が認められた (図2-4)。細胞の水分含量の減少は、細胞質の粘度を増加させ、水分子の運動性を低下させる。このことにより、式(5)の T_a の値が減少し、細胞水の緩和時間の測定値 T'_a も減少する。

殺菌剤処理により実際に菌糸の水分含量は低下したが (表2-3)、水分の減少の割合は10%以内で、これは水の主成分の T_1 で言えばわずか80msecの短縮を起こす変化に過ぎない (図2-4)。よって細胞の水分含量の低下は殺菌剤処理による水の緩和時間短縮の一因とは考えられるが、それのみで100msec以上の緩和時間の短縮を説明することはできなかった。

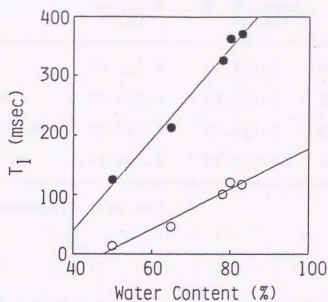


Fig. 2-4 Correlation between total water content and the T_1 of water protons in air-dried mycelial cells of *B. cinerea*.

(●) Major water component; (○) minor water component.

表2-3 Total Water Content and Amount of Unfrozen Water in the Mycelial Cells of *B. cinerea*^a

| Treatment | Total water content (%) | Unfrozen water (% of total water) | (g/g dry weight) |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Control | 81.1±1.7 | 17.7±1.8 | 0.760±0.079 |
| Benomyl 0.7 μM | 77.0±2.9 | 16.8±1.7 | 0.562±0.058 |
| Edifenphos 160 μM | 75.0±1.6 | 22.1±1.1 | 0.663±0.033 |
| Procymidone 7 μM | 72.8±2.3 | 24.6±5.0 | 0.658±0.134 |

^a Values are mean±S.D. for n=3.

薬剤処理による細胞の生理変化は、細胞中の高分子の構造変化に反映される。高分子の構造変化は水和水の状態に影響を及ぼし、また交差緩和 (Hazlewoodら、1974; Hazlewood、1979; Edzes and Samulski、1978; Mathur-De Vre、1984) により細胞質の自由水の緩和時間 T_2 の変化を引き起こす。生体高分子と水の相互作用が強くなるほど水の緩和時間は短くなる。生体高分子-水相互作用の強さは高分子結合水の量から予測できると考えられ、結合水の量はDSCにおける不凍水として測定できる。相互作用が強くなれば結合水の量が増し、すなわち不凍水が増えると予想される。

菌糸の不凍水の全水量に対する割合はedifenphos及びprocymidone処理によって増加したが、benomyl処理ではわずかながら減少がみられた(表2-3)。さらに乾物重に対する不凍水の量はどの殺菌剤

処理によっても増加することではなく、殺菌剤処理による菌糸の水の緩和時間短縮の主因を生体高分子-水相互作用の変化に求めることはできないと判断された。

ちなみにここでDSC法により測定された不凍水は、NMR法によって検出された緩和時間の短い水であるとは言えない。なぜならば-80°Cにおける不凍水は他の分子に非常に強く結合しており、運動性はきわめて低く、そのNMRシグナルは線幅が著しく広がって通常のNMR法では観測できないと思われるからである。しかしその幅広いシグナルの一部はわずかながらここで測定された緩和曲線に寄与しており、そのことが表2-2の各成分の存在率の合計が100%とならない理由の一つであると考えられる。表2-2の緩和時間の短い水の副成分は、細胞質の自由水よりは運動性が低いかも知れないがDSC分析においては凍結水として検出されるものであろう。

3) 殺菌剤処理による菌糸中の可溶性物質の変化

細胞の水分含量は変化しなくとも細胞質中の可溶性タンパク質や糖の量が増加すれば、細胞質の粘度は増し、 T_g は減少する。細胞質中の主な可溶性有機物は細胞の ^{13}C NMRスペクトルから同定できる。なぜなら液体または溶液状態の物質のNMRシグナルはシャープで容易に検出されるが、固体状態で存在するもののシグナルは線幅が著しく広く通常のNMR装置では検出が不可能だからである。

*B. cinerea*の菌糸の ^{13}C NMRスペクトルを図2-5に示した。無処理、薬剤処理後のスペクトルすべてにトリグリセリド、 α, α -トレハロ

ース、そしてマニトールのシグナル (Yoshidaら、1984a) が検出された。これらのシグナルの高さと線幅はどの殺菌剤処理によっても変化せず、またタンパク質や核酸、多糖など高分子物質のシグナルも新たに検出されることはなかった。このことから殺菌剤処理は細胞質中の主な可溶性有機物の組成に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

可溶性タンパク質及び可溶性多糖を菌糸より抽出し、常法により定量分析を行ったところ、殺菌剤処理によるタンパク質や多糖の目立った増加はみられず (表 2-4)、 ^{13}C NMR法で得られた結果と一致した。

表 2-4 Soluble Protein and Soluble Polysaccharide in the Mycelial Cells of *B. cinerea*^a

| Treatment | Soluble protein ^b | Soluble polysaccharide ^b |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Control | 8.19±0.58 | 8.48±0.34 |
| Benomyl 0.7 μM | 9.41±0.35 | 8.52±0.14 |
| Edifenphos 160 μM | 9.91±0.00 | 3.79±0.86 |
| Procymidone 7 μM | 5.36±0.71 | 3.83±0.20 |

^a Values are mean±S.D. for n=3.

^b mg/g fresh mycelia.

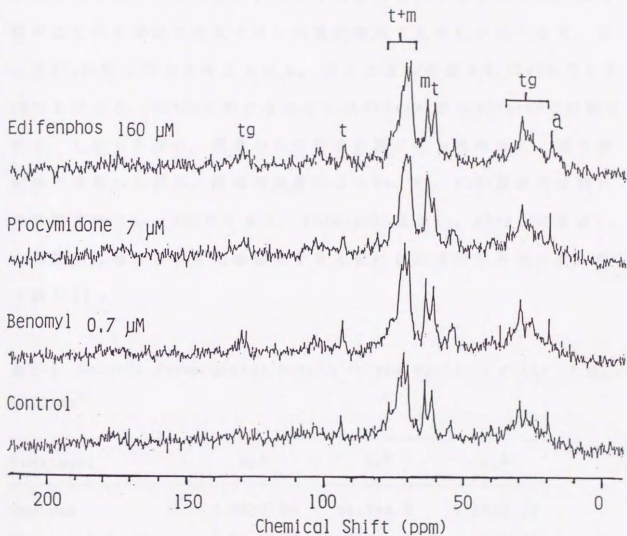


Fig 2-5 ^{13}C NMR spectra of the mycelial cells of *B. cinerea*.

(a) Methyl group of acetic acid (standard for chemical shift and signal intensity); (m) mannitol; (t) α, α -trehalose; (tg) triglyceride.

Mn、Fe、Cuなど常磁性金属原子核は大きな磁気モーメントを有し、そのため周囲の溶媒の水のプロトンの緩和時間を短縮させる。細胞質中のこれら常磁性金属イオンの量が増加すれば T_1 が短くなり、従って $T_1\rho$ が短くなると考えられる。たとえばMnの量を0.25mMから0.5mMに上げると、90MHzにおける水の T_1 は600msecから300msecに短縮される。しかしながら、菌糸から可溶性金属イオンを抽出し、原子吸光法で定量した結果、殺菌剤処理によるMn、Fe、Cuの量変化は菌糸の新鮮重当り10 μ M以下であり、180msecに及ぶ T_1 、35msecに及ぶ T_2 の殺菌剤処理による変化を説明できる量にははるかに及ばなかった(表2-5)。

表2-5 Soluble Paramagnetic Metals in the Mycelial Cells of *B. cinerea*^a

| Treatment | Mn ^b | Fe ^b | Cu ^b |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Control | 2.06 \pm 0.63 | 31.3 \pm 4.9 | 5.28 \pm 0.36 |
| Benomyl 0.7 μ M | 3.88 \pm 0.30 | 29.9 \pm 1.6 | 5.39 \pm 0.00 |
| Edifenphos 160 μ M | 2.46 \pm 0.02 | 34.6 \pm 3.9 | 8.33 \pm 0.11 |
| Procymidone 7 μ M | 3.01 \pm 0.15 | 28.5 \pm 3.2 | 4.16 \pm 0.03 |

^a Values are mean \pm S.D. for n=3.

^b μ M in fresh mycelia.

4) 殺菌剤処理による膜の水透過性の変化

これまでの実験の結果から、殺菌剤処理による菌糸の水の主成分の緩和時間 (T'_a) 変化は T_a の変化だけでは説明できないということが示された。そこで次に殺菌剤処理による t_a の変化を調べてみた。

式(5)における T_b は常磁性物質を外液 (培地) に加えることによって容易に減少させることができる。もし T_b の値が T_a や t_a に比べて極端に小さければ、式(5)の第3項は無視できるようになり、 $1/T'_a$ は $1/t_a$ に比例することになる。それに加えて、 T_b の値が小さい、すなわち外液のプロトンが早く緩和すると、緩和曲線の解析の際に外液のシグナルの影響をあまり受けずに細胞内の水のプロトンの緩和時間解析が容易にできる。一般に T_b を短くするために 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 (Conlon and Outhred, 1972; Morariu and Benga, 1977; Stoutら, 1977; Stoutら, 1978; Chenら, 1978)、且つ膜の透過性自体にもほとんど影響を与えない (Stoutら, 1977) からである。Chenら (1978) はこの Mn 溶液浸漬法を用いて凍結-融解処理の植物細胞膜に及ぼす影響を調べ、凍結-融解により細胞内の水の見かけの T_2 、 T'_2 が短くなることを報告し、それは水の結晶の生成による膜の破壊の結果 t_a が小さくなったからだと結論づけている。Bengaら (1982, 1985) は、fluoresceinmercuric acetate や p -chloromercuribenzenesulfonate (PCMBs) が $MnCl_2$ 溶液に浸漬した赤血球の T'_2 の値を増加させると報告している。そしてこの T'_2 の増加は t_a の増加に由来し、これらの薬剤が膜を通した水の交換をつか

さどるタンパク質のSH基に結合し、水の交換を阻害するという説 (Naccache and Sha'afi, 1974) を裏づけるとしている。このMn溶液浸漬法は、細胞内の水の見かけの T_1 を用いて同じ原理で赤血球膜の水透過性を求めるためにも使われているが (Fabry and Eisenstadt, 1975; Chien and Macey, 1977)、 T_2 の代わりに T_1 を用いる場合、外液の T_1 を充分短くするためにより高濃度の Mn^{2+} が必要であるという欠点がある。

*B. cinerea*の菌糸を25mMの $MnCl_2$ 水溶液に浸漬し、水の主成分の T_2 (T'_{2a}) の測定を行った。なお副成分に関しては、その存在率が小さく、また緩和曲線が外液のプロトンの緩和曲線と重なるため、 $MnCl_2$ 溶液中で T_2 の測定を行うことはできなかった。 $MnCl_2$ 溶液に菌糸を漬けて1時間後、 T'_{2a} は急激に減少した (図2-6)。これは Mn^{2+} が細胞壁を通して細胞膜のすぐ外側まで入り込んで T_{2b} が短くなり、その影響が T'_{2a} に現われて来るためであると考えられる。その後 T'_{2a} は約21msecに落ち着き、9時間後までほとんど変化はなかった。これは Mn^{2+} の菌糸細胞膜透過性が低く、細胞内に Mn^{2+} がほとんど入って来ないことを示している。もし細胞膜が Mn^{2+} を透過するならば浸漬時間とともに T'_{2a} は更に短くなり、最後には T_{2b} と同じ0.5msecとなるはずである。よってMn溶液浸漬法が*B. cinerea*菌糸細胞系の膜の水透過性の解析にも応用できることが明らかになった。

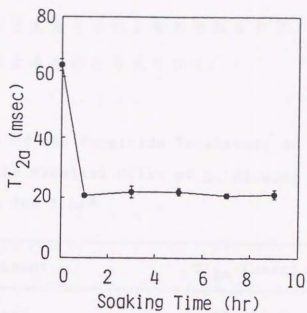


图 2-6 The apparent T_2 (T'_{2a}) change of the mycelial cells of B. cinerea after soaking in 25 mM $MnCl_2$.

殺菌剤処理を施した菌糸を1時間25mMのMnCl₂水溶液に漬けると、菌糸のT'_{2a}は無処理の菌糸のT'_{2a}よりも明らかに短くなった(表2-6)。先にも述べたように殺菌剤処理による菌糸の水の真のT₂、T_{2a}の変化はそれほど大きくないと考えられるので、このT'_{2a}の変化は主にt_aの減少によるものと考えられる。

表2-6 Effects of the Fungicide Treatments on the Apparent T₂ (T'_{2a}) of the Mycelial Cells of B. cinerea Soaked in 25 mM MnCl₂ Solution for 1 hr^a

| Treatment | T' _{2a} (msec) |
|-------------------|-------------------------|
| Control | 25.5±0.3 |
| Benomyl 0.7 μM | 19.4±1.1 |
| Edifenphos 160 μM | 14.8±1.0 |
| Procymidone 7 μM | 19.0±0.5 |

^a Values are mean±S.D. for n=3.

表2-6の結果は殺菌剤処理が菌糸細胞膜の水透過性を増加させることを示しており、表2-2及び図2-3に示された殺菌剤処理による菌糸の水の主成分の緩和時間短縮の主な原因はこの膜の水透過性の変化によるものであると考えられる。細胞質の水は膜を通して細胞壁水和水や細胞壁と細胞膜の間の水のような「細胞外の水」と交換している。そしてこのような「細胞外の水」は、菌糸の水分をベーパー

タオルで吸い取った後も残っているであろう。表 2-2 や図 2-3 に示した細胞水の緩和時間は真の水の緩和時間ではなく膜を通した水分子の交換速度を反映した見かけの緩和時間なのである。殺菌剤処理により膜の水透過性が増加すると、ペーパータオルによる吸水時により多くの水が細胞から出てゆき、その結果菌糸の水分含量を低下させることとなり、 T_a の短縮を通して T'_a の短縮をより強めることにもなると想像できる。

Edifenphos による膜の透過性増加は、第 I 章にも述べた通りこの薬剤が膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンの生合成を阻害することから予想されることである。しかし一方、benomyl は微小管タンパク質チューブリンに作用して細胞分裂を阻害するのが作用機構とされている (Davidse and Flach, 1977)。Procymidone については、膜になんらかの作用を及ぼしそれがこの薬剤の殺菌作用の原因となっているのではないかと推定されているが (Hisada ら、1978)、その作用機構に関する定説はまだない。これらの薬剤が膜の水透過性を高めるのはその一次作用によるものか、または二次的、三次的作用によるものなのかは次節で詳しく論議する。

3. 細胞水の緩和時間を指標とした殺菌剤の細胞膜に及ぼす影響の測定

殺菌剤処理による菌糸細胞膜の水透過性の変化が細胞水の緩和時間変化としてとらえられ、かつMn溶液浸漬法が菌糸細胞系の膜の水透過性検定に適用できることがII-2節で示されたので、 $MnCl_2$ 水溶液に浸漬した菌糸細胞の水の緩和時間変化から細胞膜に対する各種殺菌剤の影響を検定することを考えた。殺菌剤処理によって式(5)の T_a に大きな変化がない、すなわち $T_a \approx \text{const}$ であることがII-2節で示された。そこで外液にMnを添加することによって T_b の値を小さくして第3項を無視できる程度にすると、 $1/T'_a \propto 1/t_a$ となり、 T'_a の値から膜の水透過性を推定することができる。しかし、ペーパータオルで菌糸体試料の水分を吸い取っても細胞壁と細胞膜の間の水や細胞壁水和水までは除くことができず、細胞外の水がわずかながら残ってしまうので、膜を通した細胞内外の水の交換をなくすることはできず、 T_a を求めることはできない。よって T'_a の値から式(5)を用いて直接 t_a を求めることはできないが、 T'_a は膜の水透過性の指標となり得る。そこで $MnCl_2$ 水溶液に浸漬した*B. cinerea*菌糸細胞の T_2 すなわち T'_2 の変化から各種殺菌剤の細胞膜の水透過性に対する影響を調べ、殺菌機構との関係を考察した。

(1) 材料及び方法

1) 化合物

Nystatinとdehydroabietylamineは茨城大学の児玉治助教授から、

また benomyl、blasticidin S、polyoxin B は農業環境技術研究所の上杉康彦博士及び片桐政子氏から分与されたものである。Triflu-mazole は日本曹達（株）から、maneb と mancozeb は東京有機化学（株）から、fluazinam は石原産業（株）より提供されたものである。その他の殺菌剤は和光純薬工業（株）から、PCMBs は Sigma Chemical Co. より購入した。

2) 菌糸の生育阻害の測定

PDA 培地上に生育させた *B. cinerea* (MAFF 03-05744) の菌叢から 5 mm のディスクをコルクボーラーで打ち抜き、殺菌剤を含む PDA 培地上に置き、26.5℃ 中で培養する。殺菌剤を含まない培地上での菌叢の生育を対照として殺菌剤添加区の菌叢直径より生育阻害度を求めた。水に不溶の薬剤は DMF 又はアセトンに溶解し、その 50 μ l を 10 ml の PDA 培地に添加した。*B. cinerea* における各種殺菌剤の ED₅₀ と MIC を表 2-7 にまとめた。

3) 菌糸の水の T₂ の測定

B. cinerea の菌糸を 40 ml の PDY 培地中、26.5℃ で 3 日間ロータリーシェーカー上で振とう培養する。自然ろ過で集菌し、2g を殺菌剤を含む 25 mM MnCl₂ 水溶液 50 ml に浸漬し、25℃ 中に 1 時間静置する。水に不溶の薬剤は 0.1 ml の DMF 又はアセトンに溶解し、MnCl₂ 溶液に添加した。薬剤処理後、菌糸を自然ろ過で回収し、その一部を 10 mm NMR 試料管に入れ、水のプロトンの T₂ の測定と T'₂ の推定を II-2-(1)-3) の方法で行った。

殺菌剤の長時間処理実験においては、PDY 培地 150 ml 中で培養した

対数増殖期の菌糸を減圧ろ過によって集め、その1gを殺菌剤を含むPDY培地150mlに懸濁し、26.5℃で15時間ロータリーシェーカー上でインキュベートする。水に不溶の薬剤は、0.5mlのDMFに溶解して培地に添加した。インキュベート後、菌糸を自然ろ過で回収し、2gを25mM $MnCl_2$ 水溶液50mlに浸漬し、25℃中に1時間静置する。再び菌糸を自然ろ過で回収し、上記の方法で水のプロトンの T_2 の測定と T'_{2a} の推定を行った。

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。

(2) 結果及び考察

1) イオンチャンネル阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響

Nystatinとdehydroabietylamineは膜のイオンチャンネルに障害を与え、細胞からの K^+ の漏出を招く (Kodama and Akatsuka, 1983; 児玉、私信)。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 (表2-7、図2-7A)。かつ T'_{2a} は生育阻害度に比例して減少している。この結果より膜のイオンチャンネルの機能が膜の水透過性と密接な係りを持つことが示唆された。

2) リン脂質生合成阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響

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（表2-7、図2-7B）。

これらの薬剤は第I章で述べたように膜のホスファ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} の変化はイオンチャンネル阻害剤による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、1時間処理では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。そこで薬剤処理時間を15時間としてみた。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（表2-8）。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、ホスファチジルコリン生合成阻害剤によるわずかな T'_{2a} の減少は、膜の主要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によるものと考えられる。

また1時間処理でも15時間処理でも T'_{2at}/T'_{2ac} がだいたい0.74であったということは、1時間処理でこれらの薬剤の効果が完全に現われているということであり、膜のホスファチジルコリンの代謝回転時間は1時間くらいもしくはそれより短いということになる。ラット肝のホスファチジルコリンの代謝回転時間が72分であるという報告もあり（Wise and Elwyn, 1965）、生育中の*B. cinerea*の膜のホスファチジルコリンの代謝回転時間が1時間くらいであることも充分

考えられる。

3) ステロール生合成阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響

一方、エルゴステロール生合成阻害剤である triadimefon (Buchenauer, 1977) と triflumizole (Hashimotoら, 1985) は、1時間処理ではほとんど T'_{2a} の値を変化させない (表2-7、図2-7C)。しかし triflumizole で15時間処理すると、 T'_{2at}/T'_{2ac} は0.82にまで減少した (表2-8)。この結果は、膜中のエルゴステロールの代謝回転時間が1時間より長いということを示している。このステロール生合成阻害剤による T'_{2a} の減少も、イオンチャンネル阻害剤の場合に比べて小さく、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じた二次的作用と考えられる。

4) SH及びNH₂阻害剤が膜の水透過性に及ぼす影響

SH及びNH₂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 (図2-7D)。

イオンチャンネル阻害剤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、イオンチャンネルの機能を破壊すると思われる。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 (Naccache and Sha'afi, 1974) を裏付けるものである。これらのSH及びNH₂阻害剤の膜の水透過性への影響が、イオンチャンネル阻害剤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、図2-7の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他にも作用点を持つためだと考えられる。

しかし上述の結果は、同じくSH阻害剤であるfluoresceinmercuric acetateやPCMBsが赤血球膜の水透過性を低下させ、 T'_{2a} の値を増加させるというBengara (1982, 1985) の報告と食い違う。そこでPCMBsの*B. cinerea*菌糸細胞膜に対する影響を調べてみた。*B. cinerea*のPCMBsに対する感受性は低く、かつ75%生育阻害濃度においても T'_{2a} を変化させなかった(表2-7)。PCMBsと同じく有機水銀化合物でSH阻害殺菌剤として知られるphenylmercuric acetate (PMA) も T'_{2a} に影響を及ぼさなかった(表2-7)。無機水銀化合物 $HgCl_2$ が*B. cinerea*の膜の水透過性を著しく高めるのに対して、なぜ有機水銀SH阻害剤が水透過性に影響を及ぼさないのかは今後の研究課題である。またSH阻害剤に対する*B. cinerea*の膜と赤血球の膜の反応が逆になるのは、糸状菌細胞と脊椎動物の細胞とでは膜のイオンチャンネルのタンパク質の構造に違いがあるためかもしれない。

Captan等と同じくSH及び NH_2 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(表2-7)。このことは、SH及び NH_2 阻害が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(Owens, 1969)もあり、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強い。

5) その他の殺菌剤が膜の水透過性に及ぼす影響

まだ作用機構が明らかでない新しい殺菌剤 fluazina_m は T'_{2a} を増加させ、膜の水透過を阻害することが示唆された (図 2-7E)。この事実は fluazina_m の作用機構研究における一つの重要な知見であり、この薬剤のイオン透過性に対する影響や SH 阻害の有無に興味をもたれる。

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 (Davidse and Flach, 1977)。Blastiscidin S はタンパク質生合成阻害剤であり (Huang ら, 1964)、Polyoxin B はキチン生合成阻害剤である (Ohta ら, 1970)。これらの薬剤処理を行った菌糸の 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 (表 2-7)。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 (Hisada ら, 1978) が、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 (表 2-7)、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。

II-2-(2)-4) では benomyl や procymidone も edifenphos と同様に *B.*

*cinerea*の T'_{2a} を減少させ、膜の水透過性を高めるという結果が得られており、ここでの実験結果と食い違う。この食い違いの原因は、菌糸試料の調製法の違いに由来すると考えられる。II-2-(2)-4)では、 $MnCl_2$ 溶液に浸漬する前に菌糸の外側についている水をペーパータオルで吸い取った。このとき菌糸をペーパータオルの間にはさんで押すのであるが、この操作が薬剤処理で弱った菌糸の細胞膜を傷つけ、水分子の通るチャンネルに影響を与えるのではないと思われる。一方、無処理の細胞はこの程度の物理的衝撃には耐えられて水の緩和時間には変化がないのであろう。この節での薬剤処理時間がII-2-(2)-4)での薬剤処理時間に比べて短いため、薬剤の膜に対する影響が十分に現われていないという可能性は、処理時間を15時間とし、ただしペーパータオルでの吸水は行わずに測った T'_{2a} がbenomyl処理でもporcymidone処理の菌糸でも無処理の菌糸の T'_{2a} と変わらないことから否定された。よってII-2-(2)-4)で観察されたbenomyl処理及びporcymidone処理による膜の水透過性の増加は二次作用によるものと判断される。

ペーパータオルでの吸水により物理的に細胞外の水を除くのではなく、 $MnCl_2$ 溶液浸漬法により細胞外の水のシグナルの妨害を除き細胞内の水の緩和時間を測定することによって、菌糸細胞膜の水透過性に対する各種薬剤処理の影響を評価できることが明らかとなった。そして細胞水の緩和時間は殺菌剤の薬理研究において有用な情報を与えることが示された。

表 2-7 ED₅₀ and MIC of Fungicides for *B. cinerea* and the Effect of Fungicides on the Membrane Water Permeability

| Fungicide | ED ₅₀ (μM) | MIC (μM) | T' _{2at} /T' _{2ac} ^a |
|---------------------|-----------------------|----------|---|
| Nystatin | 0.81 | 6.5 | 0.25±0.02 |
| Dehydroabietylamine | 70 | 900 | 0.52±0.00 |
| Edifenphos | 119 | 300 | 0.77±0.07 |
| Iprobenfos | 416 | 1040 | 0.74±0.02 |
| Triadimefon | 54 | 170 | 1.02±0.09 |
| Triflumizole | 9.3 | 60 | 0.89±0.03 |
| Captan | 40 | 67 | 0.59±0.02 |
| Captafol | 7.2 | 57 | 0.60±0.18 |
| Chlorothalonil | 244 | >300 | ----- |
| HgCl ₂ | 18 | 74 | 0.43±0.06 |
| PCMS | 217 | >480 | 0.97±0.02 ^b |
| PMA | 2 | 15 | 1.00±0.03 |
| Maneb | 19 | 150 | 1.02±0.05 |
| Mancozeb | 3 (ppm) | 30 (ppm) | 1.00±0.06 |
| Thiram | 21 | 166 | 0.97±0.07 |
| Ziram | 49 | 262 | 0.96±0.03 |
| Fluazinam | 0.06 | 2.2 | 1.51±0.07 |
| Benomyl | 0.34 | 0.7 | 1.02±0.04 |
| Thiophanate-methyl | 2.2 | 12 | 0.97±0.09 |
| Blasticidin S | 78 | 237 | 1.02±0.03 |
| Polyoxin B | 2.2 | 4 | 1.05±0.03 |
| Procymidone | 1.4 | 7 | 1.09±0.05 |
| Iprodione | 0.91 | 6 | 1.03±0.16 |

^a The T'_{2at}/T'_{2ac} after 1 hr treatment at concentration of 90-100% growth inhibition. Values are mean±S.D. for n=3.

^b at the concentration of 75 % growth inhibition.

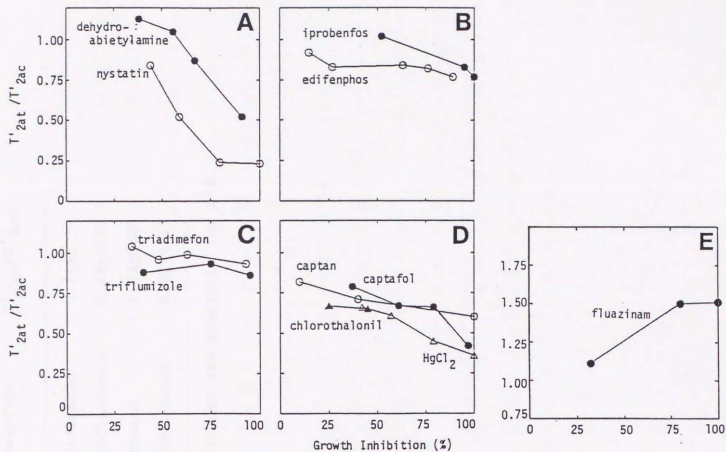


Fig 2-7 The relationship between growth inhibition and change in the membrane water permeability of *B. cinerea* by 1 hr of fungicide treatments. (A) Ion channel attackers; (B) phosphatidylcholine biosynthesis inhibitors; (C) ergosterol biosynthesis inhibitors; (D) -SH and -NH₂ inhibitors; (E) fluazinam.

表 2-8 The T'_{2at}/T'_{2ac} Ratio of the Mycelial Cells of B. cinerea after Long-Period Treatment with Fungicides at MIC^a

| Fungicide | T'_{2at}/T'_{2ac} |
|--------------|---------------------|
| Edifenphos | 0.74 ± 0.04 |
| Triflumizole | 0.82 ± 0.03 |
| Benomyl | 1.03 ± 0.06 |
| Procymidone | 0.97 ± 0.12 |

^a Values are mean \pm S.D. for n=3.

III 2次元 ^1H NMR法による薬剤-DNA相互作用の解明

第I章及び第II章では生体系のNMRの農薬薬理学への応用について述べたが、この章では2次元 ^1H NMR法による分子レベルでの薬理機構の解析について述べる。

ジアリルアミジン化合物の一種ベレニル(4,4'-(1-triazene-1,3-diyl)bis(benzamidine)、図3-1)は殺原虫活性を有し、牛のタイレリア病やバベシア病用薬剤として使用されている。ベレニルは370nmにUV吸収の極大を示すが、DNAが共存すると吸収極大は380nmにシフトする(Newton, 1967)。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(Waring, 1970)、ベレニルは塩基対間にインターカレートする事なく、ディスタマイシンやネトロブシンの場合のように(Kopkaら, 1985a, 1985b)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(Waring, 1970; Braithwaite and Baguley, 1980)、またA-T塩基対の方がG-C塩基対の場合よりも結合し易いことが報告されている(Braithwaite and Baguley, 1980; Portugal and Waring, 1987)。

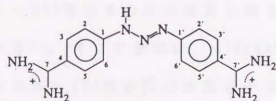


図 3-1 Structure of berenil.

ベレニル-DNA複合体の立体構造の理論化学的研究はGreshとPullman (1984) 及びPearlら (1987) によって行われている。GreshとPullmanは $d(AT)_n \cdot d(AT)_n$ のB型二本鎖をDNAのモデルとして用い、ベレニルはDNAの副溝に沿ってはまりこみ、隣り合った二つのA-T塩基対のチミンのO2とベレニル分子の2個のアミジン基との間に水素結合が形成されると予想した。Pearlらはベレニルの結晶構造解析を行い、得られたベレニルの立体構造に基づいてDNAとの相互作用を推測した。そして、 $d(AT)_4 \cdot d(AT)_4$ 二本鎖に対してはGreshとPullmanが予想した水素結合の存在を支持し、 $d(TA)_4 \cdot d(TA)_4$ 二本鎖に対しては5'末端から4番目のアデニンのN3とベレニルのアミジン基との間に水素結合が形成されることを推測している。さらに $dA_8 \cdot dT_8$ 二本鎖に対しては二つの非対称な水素結合、すなわちひとつはチミンのO2へもうひとつはアデニンのN3への水素結合の存在を予想している。しかしそのあと各モデルに対して行ったエネルギーの最小化は、これらの水素結合を弱めるかあるいは消失させる結果となり、モデルを支持する結果は得られなかった。この食い違いについて彼らは、エネルギーの最小化の際、ヌクレオチドのリン原子の負電荷の理論的評価の仕方に関係があったか、対イオンや溶媒の効果を考えに入らなかったことに起因していると述べている。

一方、ベレニル-DNA複合体そのものの結晶構造解析についての報告はなく、ベレニル-DNA複合体の立体構造に関する実験的データはまったく得られていない。そこで著者は、 $d(GCAATTGC)_2$ 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目的として本研究を行った。この研究に用いたd(GCAATTGC)₂は、自己相補的であり、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 (Braithwaite and Baguley, 1980; Portugal and Waring, 1987)。さらにこのデオキシオクタヌクレオチド二本鎖の両端にあるそれぞれ二つのG-C塩基対は、二本鎖構造の安定化に貢献すると考えられる。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'及び3'末端に近い方を外側、末端から遠い方を内側と称する。

(1) 実験方法

1) 化合物及びベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体の形成

ベレニルのジアセチユレート塩はSigma Chemical Co.より購入し、d(GCAATTGC)はPharmacia P-L Biochemicalsより購入した。

d(GCAATTGC)₂の260nmにおける吸光係数(ϵ)は、それぞれのヌクレオチドの ϵ を $6600\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ と見積り、 $105,600\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とした。ベレニルの緩衝液(20mM リン酸ナトリウム緩衝液、100mM NaCl、 $50\mu\text{M}$ EDTA (pH7.0))中での370nmにおける ϵ は $34,400\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であった。これらの ϵ の値をd(GCAATTGC)₂及びベレニルの濃度を推定する際に用いた。

2次元¹H NMR測定用のベレニル-(GCAATTGC)₂複合体は、室温下、上記の緩衝液中でベレニルジアセチユレート(4.3 mM)とd(GCAATTGC)

(8.6 mM)を混合することにより作成した。そしてベレニルと(GCAA-TTGC)₂の比が1:1であることをNMRシグナルの強度から確認した。

2) ¹H NMRスペクトルの測定

すべての¹H NMRスペクトルは、General Electric社のGN-500 NMR装置(¹Hの共鳴周波数500MHz)を用い、18℃中において測定を行った。イミノプロトン観測用の低磁場領域(12.5~14.2ppm)の1次元¹H NMRスペクトルは、0.23mMのd(GCAATTGC)₂を用い、75% H₂O/25% D₂O緩衝液中で1331パルスを用いて測定した。2次元¹H NMRスペクトルデータの処理は、Sun/AT&T system 4 コンピューターを用いて行った。NOESY、1331パルスを用いたNOESY、HOHAHAスペクトルは、*t*₂次元のデータポイントを2Kとし、*t*₁次元についてはブロック数を400とし、各々のブロックについて繰り返し時間3secで16回のFIDの積算を行って得た。DQF-COSYについては、*t*₁次元のブロック数を800として測定を行った。フーリエ変換にあたっては、ガウス型ウィンドウ関数を*t*₂、*t*₁両次元について用いた。

3) ベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体モデルの表示

ベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体モデルは、分子間相互作用研究用コンピューターグラフィックスプログラムMIDAS (Langridgeら、1981)を用いて表示した。ベレニルの初期座標は、結晶構造解析データ(Pearlら、1987)に基づいたエネルギー最小化構造(S. Neidle私信)から得た。B型d(GCAATTGC)₂の炭素、窒素、酸素原子の座標は、ArnottのB型DNAの結晶構造座標データファイルをもとに、NUCGENプログラム(U. C. Singh、N. Pattabiraman 及び S. Rao により

1986年にカリフォルニア大学サンフランシスコ校にて書かれたもの)による計算で求めた。水素原子については、標準の結合距離及び結合角度を用いて、炭素、窒素、及び酸素原子に付加した。

4) 完全緩和マトリックス解析 (CORMA)

複合体モデルにおけるベレニル-d(GCAATTGC)₂間のNOE(核オーバーハウザー効果)交差ピーク強度の推定は、CORMA(Keepers and James, 1984)によって行った。なおその際、相関時間は7nsecとした。ベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体のプロトンのT₁は分子間相互作用により比較的短く、スペクトルの測定に用いた繰り返し時間3secは、CORMAの結果との比較のための正確な実測NOE交差ピーク強度を求めるのに充分であった。ピーク強度の実測値とモデルから求めた推定値との差は平均2乗の平方根(RMS)によって表わした。

(2) 結果及び考察

1) d(GCAATTGC)₂の2次元¹H NMRスペクトル解析

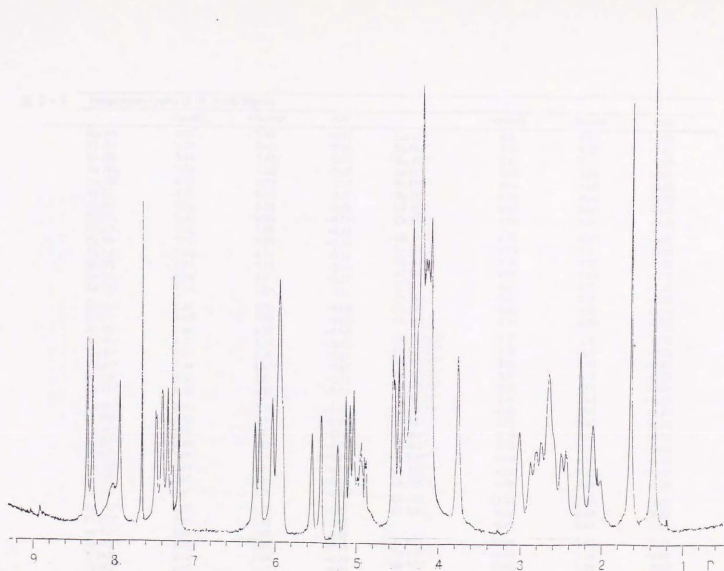
d(GCAATTGC)₂の1次元¹H NMRスペクトルを図3-2に示した。

d(GCAATTGC)₂の非交換性のプロトンの帰属は、NOESY(混合時間50msec, 150msec, 250msec, 400msec)、DQF-COSY、及びHOHAHA(混合時間70msec)のデータに基づいて行った。結果を表3-1に示す。

H1'、H2'、H2''、H3'及び塩基のプロトンの帰属は、オリゴヌクレオチドのプロトンの帰属の常法に従い、一つのヌクレオチド内の塩基プロトンと糖のプロトンとの間のNOE、及び塩基の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

クを末端のヌクレオチドから順番にたどって行くことにより可能であった(図3-3A,B)。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H1'、H2'、H2''、H3'間のNOEは混合時間150msecではっきりと観測され(図3-3A,B)、この二本鎖デオキシオクタヌクレオチドは溶液中で右巻螺旋構造をとっている(Wuthrich、1986)ことが確認された。なお5'末端のグアニンのH8とこのグアニンの結合している糖のH1'との間のNOEは150msecの混合時間では観測されないが、これは二本鎖の末端の立体構造のゆらぎのせいであると考えられる。なおこの二本鎖の末端の立体構造のゆらぎは、末端のグアニンのイミノプロトンのシグナルが溶媒のH₂Oのプロトンとの部分交換のために広幅化するという事実によって裏付けられる(図3-6A)。一つのヌクレオチド内の塩基プロトンと糖のH1'、H2''とのNOEがH3'とのNOEよりも強くでていることから(図3-3A,B)、このオクタヌクレオチド二本鎖は全体として、糖の立体配座がC2'-エンド型のB型に近い構造をしている(Wuthrich、1986)と予想された。

アデニンのH2は、そのアデニンの結合している糖のH1'、その糖の3'側の隣の糖のH1'、そしてそのアデニンと対をなしているチミンの結合している糖のH1'からのNOEをたよりに、混合時間250msec、400msecのNOESYスペクトル上で帰属された。ここで観測されたアデニンのH2とチミンの糖のH1'との間のNOEも、この二本鎖オクタヌクレオチドが右巻き螺旋構造を取っている証拠である。この他にアデニンのH2については、混合時間150msecで隣のアデニンのH2との間にNOEが観測された。



3-2 ^1H NMR spectrum of d(GCAATTGC)_2 . The duplex (4.3 mM) was dissolved in the phosphate buffer, and the spectrum was obtained by 16 scans with 4.5 sec repetition time.

表 3-1 Assignments (ppm) of ¹H NMR Signals

| | -berilil | +berilil | shift | -berilil | +berilil | shift |
|------------|----------|----------|-------|-----------------|----------|-------|
| Ge H8 | 8.07 | 7.92 | -0.15 | Ge H3' | 4.91 | -0.06 |
| Cl H5 | 5.47 | 5.41 | -0.06 | Cl H3' | 4.94 | -0.05 |
| Al H2 | 8.09 | 7.94 | -0.15 | Al H3' | 4.89 | -0.03 |
| As H2 | 7.29 | 7.72 | -0.43 | As H3' | 5.12 | -0.23 |
| As H8 | 8.35 | 8.32 | -0.03 | Ti H3' | 4.90 | -0.30 |
| Al H2 | 7.67 | 8.08 | 0.41 | Te H3' | 4.96 | -0.30 |
| Al H8 | 8.28 | 8.22 | -0.06 | Ge H3' | 5.05 | -0.08 |
| Ti H6 | 7.20 | 6.96 | -0.24 | Ce H3' | 4.55 | -0.04 |
| Ti H3 | 1.28 | 1.28 | 0.00 | Ge H4' | 4.32 | -0.07 |
| Ti H4 | 1.38 | 1.38 | 0.00 | Cl H4' | 4.23 | -0.05 |
| Te CH3 | 1.66 | 1.51 | -0.15 | Al H4' | 4.50 | -0.02 |
| Ge H8 | 7.95 | 7.77 | -0.18 | As H4' | 4.58 | -0.14 |
| Ce H5 | 5.34 | 5.22 | -0.12 | Al H4' | 4.44 | -0.14 |
| Ce H6 | 7.45 | 7.34 | -0.11 | Te H4' | 4.27 | -0.20 |
| Ge H1' | 6.00 | 5.91 | -0.09 | Ge H4' | 4.45 | -0.16 |
| Cl H1' | 5.57 | 5.50 | -0.07 | Ce H4' | 4.07 | -0.05 |
| As H1' | 6.06 | 6.02 | -0.04 | Ge H5'/5'' | 3.77 | 0.14 |
| Al H1' | 6.26 | 6.18 | -0.08 | Cl H5'/5'' | 4.18 | -0.06 |
| As H1' | 5.35 | 5.35 | 0.00 | Al H5'/5'' | 4.12 | -0.03 |
| Te H1' | 5.94 | 5.87 | -0.07 | As H5'/5'' | 4.24 | -0.05 |
| Ge H1' | 5.98 | 5.84 | -0.14 | Al H5'/5'' | 4.30 | -0.04 |
| Ce H1' | 6.22 | 6.19 | -0.03 | Ti H5'/5'' | 4.40 | -0.50 |
| Ge H2' | 2.65 | 2.58 | -0.07 | Te H5'/5'' | 4.40 | -0.77 |
| Cl H2' | 2.13 | 2.09 | -0.04 | Te H5' | 3.90 | -0.26 |
| As H2' | 2.88 | 2.87 | -0.01 | Te H5' | 3.61 | -0.55 |
| Al H2' | 2.68 | 2.60 | -0.08 | Ge H5' | 3.71 | -0.48 |
| Ti H2' | 2.04 | 1.74 | -0.30 | Cl H5' | 4.19 | -0.06 |
| Te H2' | 2.14 | 1.82 | -0.32 | Ce H5' | 4.32 | -0.07 |
| Al H2'' | 2.12 | 2.51 | 0.39 | As H5' | 4.12 | -0.26 |
| Ce H2'' | 2.27 | 2.21 | -0.06 | Ce H5'' | 4.36 | -0.26 |
| Ge H2'' | 2.82 | 2.75 | -0.07 | Ge NH | 13.03 | -0.03 |
| Cl H2'' | 2.45 | 2.75 | 0.30 | Cl NH2 | 6.44 | 0.00 |
| As H2'' | 3.45 | 3.05 | -0.40 | As NH2 | 8.47 | -0.01 |
| Al H2'' | 3.04 | 2.84 | -0.20 | Ti NH | 13.69 | 0.14 |
| Ti H2'' | 2.60 | 2.24 | -0.36 | Te NH | 13.85 | -0.05 |
| Te H2'' | 2.52 | 2.12 | -0.40 | Ge NH | 12.80 | 0.00 |
| Cl H2'' | 2.76 | 2.67 | -0.09 | Cl NH2 | 6.45 | -0.05 |
| Ce H2'' | 2.27 | 2.21 | -0.06 | Ce NH2 | 8.24 | 0.01 |
| | -DNA | +DNA | shift | -DNA | +DNA | shift |
| berilil H2 | 7.66 | 7.95 | 0.29 | berilil amidine | 8.03 | 8.79 |
| berilil H3 | 7.83 | 8.20 | 0.37 | | 8.87 | 0.84 |

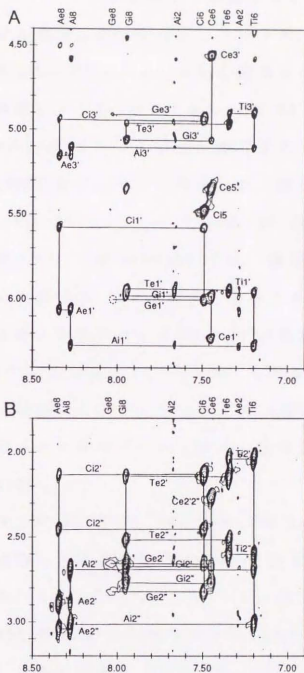


图 3-3 碱基质子-H1', H3' 区 (A) 和碱基质子-H2', H2'' 区 (B) 在 NOESY 谱中的 d(GCAATTGC)₃ 在 150-ms 混合时间。下标 e 和 i 分别指外部和内部残基。线条追踪碱基质子和脱氧核糖 H1', H2', H2'', 和 H3' 质子的连续分配。

H4', H5', H5"のシグナルが集中して混雑する4.0~4.6ppmの領域のシグナルに関する帰属は次のようにして行った。まず、H4'のシグナルをDQF-COSY及びHOHAHAスペクトル中に観測されるH3'-H4'カップリングに基づき帰属した(図3-4)。次に、H5/H5"を混合時間250 msec及び400msecのNOESYスペクトル中に観測されるH5'/H5"-H1', H2', H2'', H3'間のNOE交差ピークから帰属した(図3-5)。H5'/H5"の帰属の正しさは、HOHAHAスペクトル中のH4'-H5'/H5"交差ピークにより確認された(図3-4)。B型DNAにおいては、塩基のプロトンとその塩基に結合している糖のH5'との距離は、塩基プロトンとH5"との距離よりも近い。このことを利用してH5'とH5"の区別が塩基プロトンとの間のNOEを比べることによって行える。しかし実際には、H5'とH5"のピークが0.03ppm以上はなれており、且つ塩基プロトンとの交差ピークが他のピークと重ならない3'末端のシチジンについてのみ可能であった(表3-1)。

交換性のプロトンについては、90% H₂O/10% D₂O緩衝液中で1331 バルスを用いて測定した混合時間250msecにおけるNOESYスペクトル上で帰属を行った。シトシンのアミノプロトンは、同じピリミジン環上に存在するH5とのNOEにより帰属できた。グアニンとチミンのイミノプロトンは、それと対をなしているシトシンのアミノプロトン及びアデニンのH2との間のNOEから帰属した。アデニンとグアニンのアミノプロトンは観測できなかった。

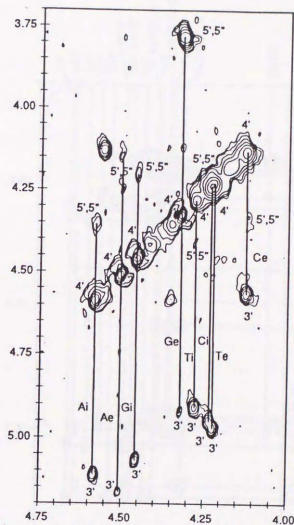


图 3-4 $H4'-H3'$, $H5'/H5''$ region in the HOHAHA spectrum of $d(GCAATTGC)_2$ at a 70-ms mixing time. The assignments of all $H4'$ protons can be made from $H3'-H4'$ cross-peaks. The assignments of $H5'/H5''$ protons which are made from NOESY spectra are confirmed by $H4'-H5'/H5''$ cross-peaks (see text).

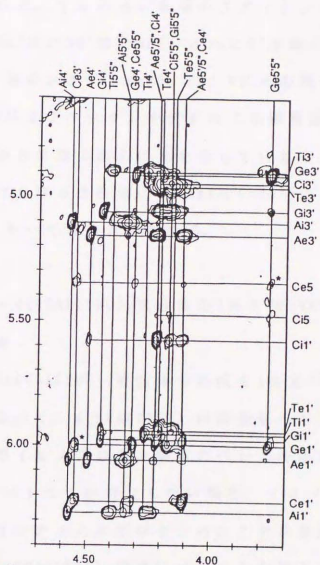


图 3-5 $H1'$, $H3'$ - $H4'$, $H5'/5''$ 区域在 NOESY 谱图中 $d(GCAATTGC)_2$ 在 250-ms 混合时间。该区域中 $H5'/H5''$ 质子的分配是在 $H4'$ 质子分配后由 COSY 和 HOHAHA 实验完成的。由星号 (*) 表示的交叉峰是从两个双链体的末端-末端关联 (see text)。

以上述べた二本鎖オクタヌクレオチド内のNOEの他に、二本鎖螺旋どうしの相互作用を示すNOEが混合時間150msec以上のNOESYスペクトル中に観測された。すなわち5'末端のグアノシンのH1'と3'末端のシチジンのH2'/H2''及び3H'間のNOE、さらに5'末端のグアノシンのH5'/H5''と3'末端のシチジンのH5、H6、H3'との間のNOEである。これらのNOEの存在はオクタヌクレオチドの二本鎖螺旋どうしが末端でくっつき合った会合状態にあることを示している。このような二本鎖螺旋間の末端における会合は、Genestら(1987)によりd(br⁵C-G)₃のZ型左巻螺旋において報告されている。

2) ベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体の1次元¹H NMRスペクトルのイミノプロトン領域

ベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体の形成を1次元¹H NMRスペクトル変化からとらえるべく、d(GCAATTGC)₂の溶液をベレニルで滴定した。d(GCAATTGC)₂のイミノプロトン領域のベレニル添加による変化を図3-6に示した。ベレニルが存在しない場合、イミノプロトン領域にはグアニンとチミンのイミノプロトンのシグナル合計4本が観測された(図3-6A)。d(GCAATTGC)₂溶液にベレニルを加えてゆくとイミノプロトンのシグナルの数は変化しないが、その化学シフトに連続的な変化がみられた(図3-6B,C,D)。遊離のd(GCAATTGC)₂とベレニルが結合したd(GCAATTGC)₂のシグナルが別々に現われず、シグナルの化学シフトの連続的な変化がみられるという現象は塩基プロトンについても観察され、ベレニルのDNAへの結合と解離がNMRのタイムスケール

ルよりも速く起きていることが示唆された。この遊離型-結合型の速い交換は2℃においても認められた。

ベレニルとの結合により内側のチミンのイミノプロトンのシグナルが大きく低磁場シフトし、外側のチミンのイミノプロトンがわずかに高磁場シフトした。このことはベレニルがA-T塩基対部分に結合するという予想を裏付けるものである。グアニンのイミノプロトンのシフトはベレニルの $d(\text{GCAATTGC})_2$ に対する割合が高くなって初めて観察され(図3-6D)、これはベレニル分子の非特異的結合によるシフトであると思われる。非特異的結合は、 $\text{poly}(\text{dA-dT}) \cdot \text{poly}(\text{dA-dT})$ 及び $\text{poly}(\text{dA}) \cdot \text{poly}(\text{dT})$ を用いたUVスペクトルの測定において、ベレニルのDNAに対する割合が高いところで第2の等吸収点が観察される(データは表示せず)という事実によっても裏付けられる。このようなDNAへの特異的、非特異的結合によるDNAの吸収スペクトルの2相的な変化は、DDUGやSN6999のような他の非インターカレート剤の場合にも認められている(Braithwait and Baguley, 1980)。

$d(\text{GCAATTGC})_2$ の非末端イミノプロトンのシグナルは45℃で広幅化を起こし、50℃では二本鎖が解離するため溶媒の H_2O のプロトンとの交換が起きて観測できなくなる。しかしベレニルと1:1の複合体を形成した $d(\text{GCAATTGC})_2$ のイミノプロトンは、55℃になるまで広幅化を起こさず、60℃に至ってやっと消滅する(データは表示せず)。これはベレニルとの結合により $d(\text{GCAATTGC})_2$ の中央部の塩基対が保護されて、熱に対する安定性が増すことを意味している。

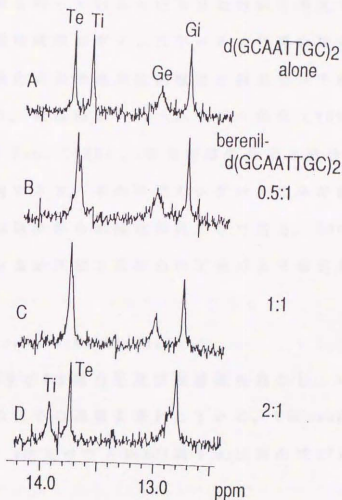


图 3-6 Spectral changes in the imino proton region of $d(\text{GCAATTGC})_2$, observed with increasing concentrations of berenil. The duplex (0.23 mM) was in 25% D_2O /sodium phosphate buffer [20 mM phosphate, 100 mM NaCl, and 50 μM EDTA (pH 7.0)], and the spectra were collected in 40 scans over a spectral width of 12 000 Hz by a 1331 pulse sequence. The four imino protons are assigned for the drug-free duplex as indicated in the figure, where e and i refer to the external and internal residues, respectively.

3) ベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体の2次元¹H NMRスペクトル解析

NOESYにおける交差ピークは双極子-双極子交差緩和による磁化の交換に由来する。生体高分子-リガンド複合体の系のように遊離型-結合型間の交換を行っているスピンの系について考えてみる。もしその交換が交差緩和時間のタイムスケールより速いならば、遊離型と結合型分子の磁化の和の減衰は遊離型と結合型分子の緩和の濃度加重平均和となり、転移核オーバーハウザー効果 (TRNOE) が観測される (Landy and Rao, 1989)。また遊離型分子と結合型分子のシグナルの各々が観測できず、その平均のシグナルのみが観測される場合、測定できるのはそれらの磁化の和だけである。LandyとRaoは速い交換を行っている n -スピン系について次のような式を提出している。

$$d(m_b + m_f)/dt = (p_b W_b + p_f W_f)(m_b + m_f) \quad (6)$$

この式において b 及び f は結合型及び遊離型を表わし、 p_b 及び p_f は結合型及び遊離型の分子の濃度を表わしている。 W は $n \times n$ 次元緩和マトリックスである。 n 次元ベクトル m の因子 m_i は次の式 (7) によって与えられる。

$$m_i = M_{zi} - M_{0i} \quad (7)$$

この式において M_{zi} はスピン i の磁化の z 成分のその時々値であり、 M_{0i} はその平衡時における値である。

ベレニルの poly(dA-dT)・poly(dA-dT) 及び poly(dA)・poly(dT) に対する結合定数が $10^4 \sim 10^5 M^{-1}$ のオーダーであることから、NMR測定時の濃度下でのベレニル-d(GCAATTGC)₂の系においては、平衡は結合

型に大きく寄っていると考えられ、 $pf \approx 0$ 、 $pb \approx 1$ となる。そこで(6)式は

$$d(m_b + m_f)/d\tau = W_b(m_b + m_f) \quad (8)$$

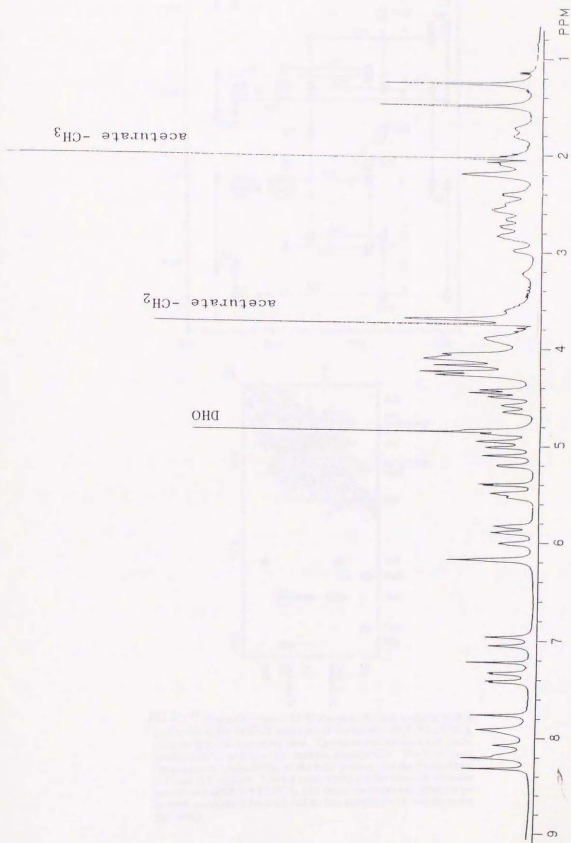
となる。ベレニル- $d(\text{GCAATTGC})_2$ の系においては、式(8)が示すように磁化の減衰は結合型の速度マトリックスにのみ依存していることから、遊離型-結合型の交換を無視して、交換のない安定な結合体の場合と同じようにNOEを取り扱えるということがわかる。

ベレニル- $d(\text{GCAATTGC})_2$ 複合体の1次元 ^1H NMRスペクトルを図3-7に示した。ベレニル- $d(\text{GCAATTGC})_2$ 複合体のシグナルの帰属は、遊離型の $d(\text{GCAATTGC})_2$ の場合と同じ方法で行った(表3-1)。塩基のプロトンとその塩基の結合している糖の5'側の隣の糖の $\text{H1}'$ 、 $\text{H2}'$ 、 $\text{H2}''$ 、 $\text{H3}'$ との間のNOEは複合体形成後も観測され、 $d(\text{GCAATTGC})_2$ はB型構造を保っていることが示された(図3-8A)。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及び $d(\text{GCAATTGC})_2$ の二本の鎖のシグナルが区別できないこと(図3-7, 8A, B)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。

螺旋のねじれや塩基の重なりの変化は、ヌクレオチド内の塩基プロトンと糖のプロトン間のNOE強度の変化や各々のシグナルの化学シフトの変化に反映される。そこで塩基プロトンとその塩基が結合している糖の $\text{H1}'$ 、 $\text{H2}'$ 、 $\text{H2}''$ の間のNOEピークの相対強度を、遊離の $d(\text{GCAATTGC})_2$ の場合とベレニルと複合体を形成した場合とで比較してみた。混合時間150msec及び250msecにおいて、内側のグアノシン、外側のアデノシン、内側のチミジンについてはこれらのNOEの相対強

度に変化はなかった。外側のチミジンのH1'は複合体を形成すると0.97ppmも高磁場シフトする。しかし残念なことに遊離のd(GCAATT-GC)₂における外側のチミジンのH6とH1'との間のNOE交差ピークは外側のチミン塩基とその隣の内側のチミジンのH1'との交差ピークと重なっており、ピークの強度を独立して求めることはできなかった(図3-3A)。内側のアデノシンのH8とH2'のNOEピークもそのアデノシンのH8と外側のアデノシンのH2'のNOEピークと重なる(図3-3B)。さらに複合体形成後は、内側のアデノシンのH8とH1'のNOEピークはそのアデノシンのH1'とベレニルのH3のNOEピークと重なってしまう(図3-8A)。このようなわけで、これらのプロトン間におけるNOEの変化については調べるができなかった。しかし測定可能な塩基-H1', H2', H2'の間NOEピークについては相対強度に変化がなかったことから、ベレニルとの結合によって螺旋のねじれや塩基の重なりに大きな変化は生じないと考えられる。

複合体においてベレニルのベンゼン環のプロトンは7.95ppmと8.20ppmに幅の広いピークとして観測された(図3-7, 8B)。1331パルスを用いたNOESYにおけるアミジンプロトンとの強い交差ピークの存在から8.20ppmのシグナルはベレニルのH3に帰属され、もうひとつの7.95ppmのシグナルはH2に帰属された(図3-10)。H2、H3のシグナルはH6、H5のシグナルと区別ができず、複合体においてもベンゼン環は速い回転を行っていることが示唆された。そして環の回転によるH2、H3とH6、H5の交換がベンゼン環のシグナルの広幅化の原因であると考えられる。



3-7 ^1H NMR spectrum of the berenil-d(GCAATTGC)₂ complex.
The spectrum was obtained by 16 scans with 4 sec repetition time.

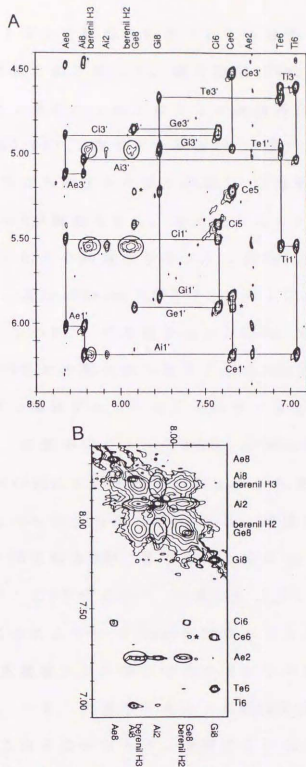


图 3-8 芳香质子-H1',H3' 区域 (A) 和芳香质子区域 (B) 在 berenil-d(GCAATTGC)₂ 复合物中的 NOESY 谱图。下标字母 e 和 i 分别指代外部和内部残基。线条表示碱基质子和脱氧核糖 H1' 和 H3' 质子的连续分配。带圆圈的交叉峰是 berenil 和 d(GCAATTGC)₂ 之间的接触，带星号的交叉峰是从两个双链的末端-末端关联中产生的（见正文）。

NOESYスペクトル上で認められたベレニル分子とd(GCAATTGC)₂の間のNOEを表3-2にまとめて示した。混合時間150msecのNOESYでは、ベレニルのベンゼン環の二つのプロトンと副溝内に位置する内外両アデニンのH2(図3-8B)、両チミジンのH1'(図3-8A)、内側のチミジンのH5'/H5"または外側のチミジンのH5'、内側のグアノシンのH4'及びH5'との間のNOEが観測された。またベレニルのH3と内側のアデノシンのH1'(図3-8A)や内側のグアノシンのH5"とのNOEも検出された。混合時間250msec及び400msec(図3-9)においては、ベレニルのH2は内側のアデノシンのH1'、外側のチミジンのH4'及びH5"、そして内側のグアノシンのH5"との間にはっきりとしたNOEを示した。一方、ベレニルのベンゼン環のプロトンと二つのチミジンのH6とH3'、内側のチミジンのH2"、内側のグアノシンのH8との間の弱いNOEも混合時間250msec及び400msecにおいて認められた。これらDNAの主溝側に位置するプロトンとベレニルの間の弱いNOEは、直接のNOEではなくスピンの拡散を介した間接的なNOEであると考えられる。

外側のチミジンのH1'及び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1~1.5ppm高磁場シフトし、それに加えて0.3~0.5ppmの高磁場シフトが二つのチミジンの他のプロトンにみられた(表3-1)。一方、内側のアデニンのH2は0.4ppm低磁場シフトした(表3-1)。これらのシフトは、副溝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。

表 3-2 NOE Contacts between Berenil and d(GCAATTGC)₂
Protons

| | NOE ^a for berenil | |
|--------------------|------------------------------|------|
| | H2 | H3 |
| Ac H2 | +++ | ++++ |
| Ad H2 | ++++ | ++++ |
| Ti H6 | ++ | ++ |
| Ti CH ₃ | - | ++ |
| Te H6 | ++ | ++ |
| Te CH ₃ | + | ++ |
| Gi H8 | ++ | ++ |
| Ad 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 ms or longer; (++++) 150 ms or longer; (++) 250 ms or longer; (+) 400 ms; (-) no cross-peak at a mixing time of 400 ms or less.

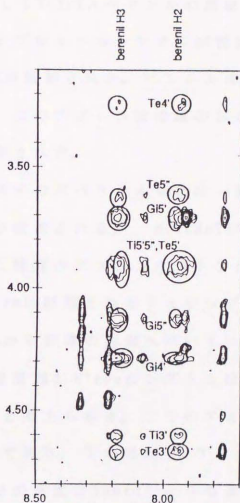


图 3-9 NOE contacts between berenil aromatic protons and H3', H4', and H5'/H5'' protons of d(GCAATTGC)₂ at a 400-ms mixing time. The lower case letters e and i refer to the external and internal residues, respectively. Circled cross-peaks are the contacts between berenil and d(GCAATTGC)₂.

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(GC-AATTGC)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250msecとしてNOESYスペクトルの測定を行った(図3-10)。ベレニルのアミジン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。ベレニルのジアゾ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のプロトンと速い交換を行っていると推測された。

遊離のベレニル分子のスペクトル中には一種類のアミジンプロトンのシグナルのみが観測されるが、d(GCAATTGC)₂との複合体のスペクトルにおいては二種類のアミジンプロトンのシグナルが観測された。高磁場側8.79ppmに観測されるアミジンプロトンはアデニンのH2とのより強いNOEから副溝の内側へ向いているNH₂のものであると推測され、一方低磁場側8.87ppmのシグナルは副溝の外側に向いているNH₂のものであると考えられる。二つのアミジンプロトンの化学シフトの差は0.08ppmであり、下の式(9)より二つのNH₂の交換、すなわちアミジン基の回転の速度は90sec⁻¹よりも遅いと考えられる。

$$k_{ex} = \pi(\Delta\nu)/\sqrt{2} \quad (9)$$

式(9)において k_{ex} はシグナルの融合点における交換速度であり、 $\Delta\nu$ は二つのシグナルの共鳴周波数の差である(Sanders and Hunter, 1988)。

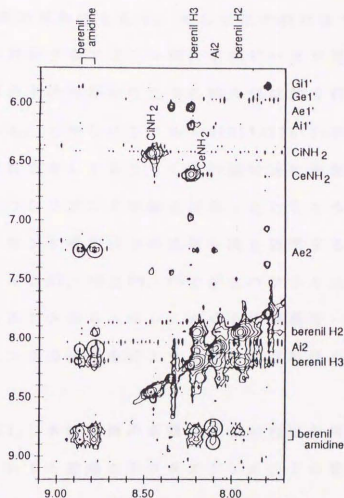


图 3-10 Base proton and H1' region in the ^{133}I pulse NOESY spectrum of the berenil- $\text{d}(\text{GCAATTGC})_2$ complex at 250-ms mixing time. Circled cross-peaks are the contacts between berenil and $\text{d}(\text{GCAATTGC})_2$.

DNAの副溝に結合する非対称形薬剤ネトロブシン (Patel and Shapiro, 1986)、ディスタマイシン (Klevitら, 1986)、SN6999 (Leupinら, 1986) は、ベレニルと異なって、DNAに結合することによりDNA二本鎖の対称性を乱す。そして化学的に非等価になったDNAの二本の鎖の対応するプロトン間に交換ピークが現われることから、これらの薬剤分子は対称的な二つの結合部位間を行き来していると考えられている。しかしベレニル-d(GCAATTGC)₂の系では、薬剤も複合体も対称性を有しており、二本の鎖は常に等価である。よってもし上記のようなリガンドの動きがあったとしても交換ピークは検出できず、リガンド薬剤分子の位置交換を証明することはできない。ただしベレニルのH2、H3とH6、H5とがスペクトル上で等価なものとして検出されることから、ベレニル分子は遊離型-結合型間の交換の間にベンゼン環の回転を行えるくらいの運動性を維持していると考えられる。

d(GCAATTGC)₂二本鎖螺旋の末端どうしの相互作用は、ベレニルとの複合体においても遊離のオクタヌクレオチドの場合と同様、NOESYスペクトル上で認められた。複合体においては末端のグアノシンのH8のシグナルがよりシャープで、かつそのグアノシンのH1'は他のシグナルからよりよく分離している。そのために5'末端のグアノシンと3'末端のシチジンとの間のNOE交差ピークがより多く検出された。以下に示す5'末端のグアノシンと3'末端のシチジンのプロトン間のNOEは明らかに二本鎖どうしの末端における会合の証拠を与えるものである：グアノシン(G)H8-シチジン(C)H5, CH6, CH1', CH2'/2";

GH1'-CH5, CH6, CH2'/2'', CH3', CH4'; GH5'/5''-CH5, CH6, CH3'。なおこれらのNOEは45°C下ではほとんど観察されなかった。

4) ベレニル-d(GCAATTGC)₂複合体の立体構造モデル

一般的にNOEは二つのプロトン間の距離が5Å以下の時に観測される。そこで複合体のNOESYスペクトル中に観測された分子間NOEに基づいて、B型構造のd(GCAATTGC)₂の副溝にベレニル分子をはめこんでみた。観測されたすべてのNOEを可能にするモデルは二つ存在した。モデルIはベレニルのアミジンプロトンと外側のチミンのO2との間に水素結合が形成されるような構造であり(図3-11A,B)、モデルIIはアミジンプロトンと内側のアデニンのN3との間に水素結合が形成されるような構造である(図3-11C)。モデルIIはベレニル-d(TA)₄・d(TA)₄の系においてPearlら(1987)により提唱されたモデルと一致する。モデルIとモデルIIにおいて副溝内でのベレニル分子の配向は大きく変わらないため、ベレニル-d(GCAATTGC)₂間のNOEは二つのモデルの間でほとんど差がない。ただ一つの大きな違いは、モデルIにおいてはベレニルのアミジンプロトンと外側のチミジン及び内側のグアノシンのH1'との間にNOEが現われることが予想されるのに対して、モデルIIではアミジンプロトンと内側のアデノシンのH1'との間のNOEが予想されることである。しかしながらアミジン-チミジンH1'の交差ピークは、チミジンのH1'のシグナル(4.97ppm)がH₂Oのシグナルのそばにあるために1331パルスを用いたNOESYにおいて検出不能であった。さらにアミジン-グアノシンH1'及びアミジン-アデノ

シンH1'の交差ピークも観測できず(図3-10)、二つのモデルのうちどちらが正しいかはこの点からは判断できなかった。

そこで二つのモデルにおけるベレニル-d(GCAATTGC)₂間のNOEをCORMAを用いてより定量的に比較してみた。各々のモデルから推定されるNOE交差ピークの強度とその実測値との差をRMSで表わしたものを表3-3にまとめた。モデルIIの方が混合時間150msec、250msecともにより小さいRMS値を与え、ベレニルのアミジンプロトンは内側のアデニンのN3により近いと思われた。しかし実際には複合体はモデルIまたはIIの構造を固定的にとっているのではなく、ベレニレ分子はIとIIの間を行き来しており、その濃度加重平均のスペクトルが得られていると考えられる。

両方のモデルにおいてベレニルのジアゾアミノプロトンはオクタヌクレオチドの副溝の外側に向いて溶媒にさらされた形を取っており、溶媒の水のプロトンとの交換のためにNMRスペクトル中に検出できないという実験結果と一致する。また前述のように、ベレニルのベンゼン環のプロトンと二つのチミンのH6及び内側のグアニンのH8との間に弱いNOEが観測されたが、これらの塩基プロトンはDNAの主溝側に存在し、両方のモデルにおいてベレニルのベンゼン環のプロトンからの距離は5~7Åである。従ってこれらのNOEはスピン拡散を介した間接的なNOEである可能性が強い。

表3-3 CORMA Analysis of Observed and Calculated NOESY Intensities (See Materials and Methods for Details)

| mixing time (ms) | model | RMS value |
|------------------|-------|-----------|
| 150 | I | 0.047 |
| 150 | II | 0.023 |
| 250 | I | 0.032 |
| 250 | II | 0.019 |

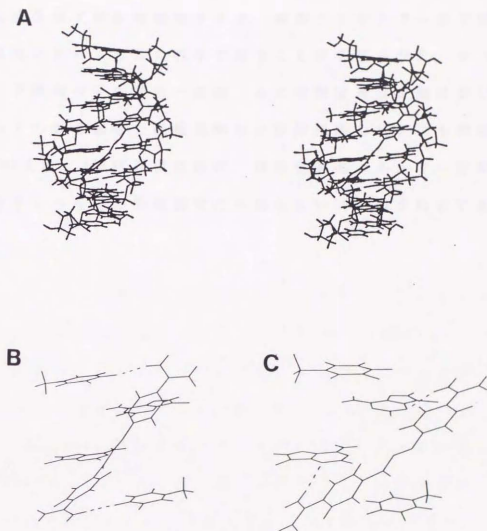


图 3-11 Stereoview of the berenil-d(GCAATTGC)₂ complex in model I with the hydrogen bond between berenil amide protons and O2 of the external thymines (A). Simplified view of model I (B) and model II (C) to show the hydrogen bonding interactions and orientation of berenil with respect to the four AT base pairs. These hand-docked models were displayed with the molecular interactive graphics program MIDAS.

2次元 ^1H NMR法を用いて薬剤のDNAへの結合立体モデルを得ることに成功した。2次元NMR法、中でも特にNOESY法は立体モデル構築のために必須な原子間距離情報を与え、薬剤-レセプター分子間相互作用の研究において非常に有用であることが実証された。かつNMR法は、リガンド薬剤分子の結合-解離、また複数結合部位間における交換、薬剤分子のある部分の回転運動など動的現象の解析にも有効である。このNMR法は、X線結晶構造解析、理論化学的エネルギー計算とともに、分子レベルでの薬理研究に今後も大いに利用されるであろう。

生体系のNMRの農薬薬理学への応用の第一歩として、 ^{13}C トレーサーを取り込ませた菌糸細胞の ^{13}C NMRスペクトルを用いて有機リン殺菌剤の作用機構の解明を行った。*P. oryzae*菌糸を[メチル- ^{13}C]メチオニンと共にインキュベートすると、メチオニンのメチル基の他に菌糸の ^{13}C NMRスペクトル中54.9ppmに ^{13}C 標識シグナルが検出された。菌糸細胞の分画によりこの54.9ppmのシグナルはコリンのN-メチル基に由来することが明らかとなり、メチオニンのメチル基がエタノールアミンへ取り込まれてコリンが生成する反応を菌糸の ^{13}C NMRスペクトルから測定できることが示された(Yoshidaら、1984b)。それと同時に、コリンのメチル基の少なくとも一つはメチオニンのメチル基に由来することが明らかになった。培地にiprobenfosやisoprothiolaneを添加するとこのメチル基転移反応は阻害され(Yoshidaら、1984b)、このことより有機リン系殺菌剤は、既報の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阻害(Kodamaら、1979、1980)のみならずエタノールアミンのメチル化阻害を引き起こし、Kennedy経路の出発物質コリンの生合成を阻害し、ホスファチジルコリンの二つの生合成経路を抑制して膜に障害を与えることが示された。さらに菌糸の生育阻害活性から知られていたphosphorothiolate化合物iprobenfosとphosphoramidate化合物BPAとの間の負相関交差耐性(Uesugira、1974)が、コリンの生合

成阻害のレベルにおいてもみられることが確認された (Yoshidaら、1987)。以上のことより、非放射線同位体トレーサーを用いた生体系のNMRが殺菌剤の薬理学の分野においても有力な手法となり得ることが実証された。

次に ^1H NMRにおける細胞水の緩和時間を利用して農薬の作用を調べることを考えた。その準備としてまず、シンプレックスを用いた非線形最小自乗法による多成分系の緩和時間推定法を確立した (Yoshida and Nose、1987)。この方法によれば、従来のグラフ法よりも正確に生体中の複数種の水の緩和時間の推定が行える。次いでこの方法を用いて、ペーパータオルで細胞外の水を除去した*B. cinerea*菌糸試料の水の緩和時間 (T_1 、 T_2) の解析を行い、緩和時間の異なる二種類の水が存在することを明らかにした。菌糸を三種類の殺菌剤、benomyl、edifenphos、procymidoneで処理すると、細胞水の主成分である緩和の遅い水の T_1 、 T_2 が短くなった。この殺菌剤処理による菌糸の水の緩和時間短縮の原因を生物物理学的視点から調べたところ、主に細胞膜の水透過性の増加に起因することが明らかになった (Yoshida and Nose、1990)。

また菌糸細胞を25mM MnCl_2 水溶液に浸漬することにより、細胞外の水の影響を考えずに細胞内の水の T_2 から細胞膜の水透過性を推定できることが確認された。そこでこのMn溶液浸漬法を用いて、*B. cinerea*菌糸細胞膜の水透過性に及ぼす各種殺菌剤の影響を調べた (Yoshidaら、1990b)。その結果、nystatin等の膜のイオンチャネル機能阻害剤は T_2 を著しく短縮し、膜の水透過性を顕著に増加さ

せることが示された。このことより、水分子の膜透過がイオンチャンネルの機能に依存していることが示唆された。Captanや HgCl_2 等一部のSH阻害剤も膜の水分子透過性を増加させ、これらの薬剤が膜のイオンチャンネルを構成するタンパク質のSH基に結合することが推測された。しかしSH阻害剤として知られているものの中には、manebやthiram等のようにMICにおいても膜の水透過性に影響を与えないものも存在した。これらの薬剤はSH阻害剤というよりは、むしろイオン捕獲剤として作用していると考えられる。生体膜の構成成分であるホスファチジルコリンやエルゴステロールの生合成を阻害するedifenphosやtriflumizoleは、膜の水透過性を増加させるもののその度合はイオンチャンネル阻害剤やSH阻害剤の場合と比べて小さかった。このことは、膜中のホスファチジルコリンやエルゴステロールが膜を通した水分子の交換に直接関与していないことを物語るものである。一方、作用機構が未だ明らかになっていないfluzinamは逆に膜の水透過性を減少させ、この薬剤の膜のイオン透過性に与える影響やSH阻害の有無に興味がもたれる。なお膜を作用点としないbenomyl、blastidicin S、polyoxin B等は、膜の水透過性を変化させず、またprocymidone等ジカルボキシイミド殺菌剤も膜の水透過性に影響を与えなかった。細胞の外側の水をベーパータオルで吸い取ると、前述のようにbenomylやprocymidoneで処理した菌糸においても膜の水透過性の増加が見られるが、これは吸水処理が薬剤処理によって弱った菌糸の膜に影響を与えるためであると考えられた。以上の実験結果から、吸水処理により物理的に細胞外の水を除

くのではなく、Mn溶液浸漬法を用いてスペクトル上で細胞外の水のシグナルの妨害を除き細胞内の水の T_2 を測定することによって、菌糸細胞の膜に対する各種薬剤の影響を検定できることが明らかになった。

2次元 ^1H NMR法による分子レベルでの薬理機構研究の例として、家畜の原虫病用薬剤ベレニルのDNAへの結合状態の解析を行った(Yoshidaら、1990a)。DNAのモデルとして $d(\text{GCAATTGC})_2$ という塩基配列のデオキシオクタヌクレオチドを選び、まずこのヌクレオチドの各シグナルの帰属をNOESY、DQF-COSY、HOHAHAにより行った。次いでこれにベレニルを添加し、1:1のベレニル- $d(\text{GCAATTGC})_2$ 複合体を形成させ、各シグナルの化学シフトの複合体形成による変化を調べた。その結果、中央のAATT部分のシグナルに大きな変化が観測され、ベレニルがAATT部分に結合することが示唆された。なおベレニル分子は遊離の状態とDNA結合状態との間で速い交換を行っており、常に両者の平均のスペクトルが観測された。また複合体形成後も、ベレニル、オクタヌクレオチドともに分子の対称性を保っていた。これらの実験結果とベレニル- $d(\text{GCAATTGC})_2$ 間のNOEデータに基づいて複合体の立体構造モデルを構築したところ、二つのモデルが得られた。両モデルにおいてベレニルは、オクタヌクレオチド二本鎖螺旋のAATT部分の副溝に沿ってはまり込んでいる。そして二つのモデルでベレニルの配向角度がわずかに違い、それによって一方のモデルにおいてはベレニルのアミジン基と外側のチミンのO2との間に水素結合が予測され、もう一方のモデルにおいてはベレニルのアミジン基

と内側のアデニンのN3との間の水素結合が予測された。NOEの実測値と各々のモデルからCORMAによって推定されるベレニル-d(GCAATT-GC)₂間のNOEとを比較してみると、後者のモデルの方がより実測値に近いNOEを与え、ベレニルのアミジン基はより内側のアデニンのN3に近いことが示された。しかし実際にはベレニルは遊離の状態と結合状態を速い速度で行き来しており、複合体の構造も固定的なものではなく、二つのモデル間を行き来し、その濃度加重平均のスペクトルが観測されていると考えられる。

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¹³Cトレーサーの利用により、細胞内の生合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、細胞膜の透過性に及ぼす薬剤の影響を知ることができた。この¹³Cトレーサー法は、本研究で試みたような農薬の作用機構の研究にとどまらず、農薬の代謝研究にも応用できる。薬剤代謝酵素系の変異は細胞の薬剤に対する感受性を変化させ、薬剤耐性化機構の一つとして注目されている。そこでNMRによる非破壊測定で手軽に農薬の代謝を測定できれば、代謝系変異の検出を容易にし、薬剤耐性菌に対抗する技術の確立にも役立つと思われる。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、この手法は微生物細胞に限らず動物の細胞、組織、器官の系にも応用でき、殺虫剤や除草剤の作用機構、抵抗性機構研究への利用が期待される。また非破壊測定は生体試料の分析だけでなく、環境中での農薬の動態研究にも役立つ。

^{13}C 等で標識した農薬の土壌や水中での変化を抽出分離操作なしで経時的に追うことによって、農薬環境化学にも大いに貢献できると考えられる。

さらに本研究では、近年発達がめざましい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った。NMR法によれば、一つの薬剤-作用点生体分子複合体の構造がわかるばかりでなく、遊離の分子と結合型の分子との交換速度や、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。もちろんこの2次元NMR法による分子レベルでの薬剤-生体分子相互作用の研究は、薬剤の代謝・解毒にかかわる酵素の反応機構の研究や天然生理活性物質の作用機構の研究にも利用できる。

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。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました元農業環境技術研究所、上杉康彦博士、能勢和夫博士、守谷茂雄氏、村井敏信博士、農業環境技術研究所、行本峰子博士、カリフォルニア大学、Richard H. Shafer教授、Debra L. Banville博士に深く感謝の意を表します。

また試料の調製及び測定にご協力いただきましたMadras大学、D. Lalithakumari教授、農業環境技術研究所、川崎晃氏に感謝いたします。

さらにNMRの測定に際して数々の有益なご助言を賜り、かつDSC分析においてもご協力いただきました食品総合研究所、石田信昭氏に厚く御礼申し上げます。

菌株と殺菌剤の標品を提供していただきました農業環境技術研究所、片桐政子氏、イオンチャンネル阻害剤を提供していただきました茨城大学、児玉治助教授に感謝いたします。

また原子吸光法による金属の分析にご協力いただきました元農業環境技術研究所、渡辺久男氏、シンプレックス法によるデータ解析に際してご指導いただき且つご自身の作成したサブルーチンプログラムを使わせていただきました農業環境技術研究所、小林和彦博士、データ入力に際しご助力いただきました農業環境技術研究所、岡田八重子氏、ベレニルのコンピューターグラフィックスのための3次元座

標を提供していただきました英国がん研究所、Stephen Neidle博士、ご自身の作成したCORMAのプログラムを使わせていただきましたカリフォルニア大学、Thomas L. James教授、コンピューターグラフィックスプログラムMIDASの使用の便を取り計らっていただきましたカリフォルニア大学、Robert Langridge教授に感謝の意を表します。

本研究に取りかかるにあたりご助言と多大なるお励ましをいただきました農業生物資源研究所、狩野広美博士に感謝いたします。

本論文の取りまとめに際しご助言とご教示を賜りました東京大学農学部、鈴木昭憲教授に御礼申し上げます。

最後に研究の遂行及び論文の取りまとめに際し、常に助言とあたたかい励ましをいただきました研究仲間であり我が夫である元農業環境技術研究所、現国際半乾燥熱帯作物研究所、伊藤治博士に感謝いたします。

引用文献

1. 赤池弘次 (1976) 情報量基準AICとは何か. 数理科学, 14, 5-11
2. Balla, Y. I., N. G. Bakradze, and Y. G. Sharimanov (1985) Detection of two states of water in plant tissues by proton magnetic relaxation. Biophysics, 30, 522-528
3. Benga, G., V. I. Pop, M. Ionescu, R. P. Holmes, and O. Popescu (1982) Irreversible inhibition of water transport in erythrocytes by fluoresceinmercuric acetate. Cell Biol. Int. Rep., 6, 775-781
4. Benga, G., O. Popescu, and V. I. Pop (1985) Water exchange through erythrocytes: p-Chloromercuribenzenesulfonate inhibition of water diffusion in ghosts studied by a nuclear magnetic resonance technique. Biosci. Rep., 5, 223-228
5. Bligh, E. G., and W. J. Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917
6. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254
7. Braithwaite, A. W., and B. C. Baguley (1980) Existence of an extended series of antitumor compounds which bind to deoxyribonucleic acid by nonintercalative means. Biochemistry, 19, 1101-1106
8. Bremer, J., P. H. Figard, and D. M. Greenberg (1960) The biosynthesis of choline and its relation to phospholipid metabolism. Biochim. Biophys. Acta, 43, 477-488
9. Buchenauer, H. (1977) Mode of action of triadimefon in *Ustilago avenae*. Pesticide Biochem. Physiol., 7, 309-320
10. Burke, M. J., R. G. Bryant, and C. J. Weiser (1974) Nuclear magnetic resonance of water in cold acclimating red osier dogwood stem. Plant Physiol., 54, 392-398
11. Burt, C. T., S. M. Cohen, and M. Barany (1979) Analysis of

- intact tissue with ^{31}P NMR. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 8, 1-25
12. Byrne, G. F., M. D. Fenn, and M. I. Burgar (1986) Nuclear magnetic resonance studies of water in tree sections. Agric. For. Meteorol., 38, 307-317
13. Chen, P. M., L. V. Gusta, and D. G. Stout (1978) Changes in membrane permeability of winter wheat cells following freeze-thaw injury as determined by nuclear magnetic resonance. Plant Physiol., 61, 878-882
14. Chien, D. Y., and R. I. Macey (1977) Diffusional water permeability of red cells independence on osmolality. Biochim. Biophys. Acta, 464, 45-52
15. Colire, C., E. L. Rumeur, J. Gallier, J. D. Certaines, and F. Larher (1988) An assessment of proton nuclear magnetic resonance as an alternative method to describe water status of leaf tissues in wilted plants. Plant Physiol. Biochem., 26, 767-776
16. Conlon, T., and R. Outhred (1972) Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR technique. Biochim. Biophys. Acta, 288, 354-361
17. Damadian, R. (1971) Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science, 171, 1151-1153
18. Davidse, L. C., and W. Flach (1977) Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tublin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. J. Cell Biol., 72, 174-193
19. Dittel, F., and C. Sagel (1966) Der Mangan und Kupfer-gehalt von Chloroplasten und Cytoplasten. Experientia, 23, 241-242
20. Edzes, H. T., and T. Samulski (1978) The measurement of cross-relaxation effects in the proton NMR spin-lattice relaxation of water in biological systems: hydrated collagen and muscle. J. Magn. Reson., 33, 207-229
21. Eggleston, J. C., L. A. Saryan, and D. P. Hollis (1975) Nuclear magnetic resonance investigations of human neoplastic and abnormal non-neoplastic tissues. Cancer Res., 35, 1326-1332

22. Fabry, M. E., and M. Eisenstadt (1975) Water exchange between red cells and plasma. Biophys. J., 15, 1101-1110
23. Gadian, D. G., G. K. Radda, R. E. Richards, and P. J. Seeley (1979) ^{31}P NMR in living tissue: The road from a promising to an important tool in biology. in Biological Applications of Magnetic Resonance, R. G. Shulman, Ed., pp 463-535, Academic Press, New York, San Francisco, London
24. Genest, D., K. Mazeau, and M. Ptak (1987) Two dimensional ^1H NMR study of $\text{d}(\text{br}^{13}\text{C-G})_3$ in the Z-form. Self association and flexibility of the left handed double helix. J. Biomol. Struct. Dyn., 5, 67-78
25. Gresh, N., and B. Pullman (1984) A theoretical study of the nonintercalative binding of berenil and stilbamidine to double-stranded $(\text{dA-dT})_n$ oligomers. Mol. Pharmacol., 25, 452-458
26. Gusta, L. V., D. B. Fowler, P. Chen, D. B. Russel, and D. G. Stout (1979) A nuclear magnetic resonance study in cold acclimating cereals. Plant Physiol., 63, 627-634
27. Hashimoto, S., S. Sano, and Y. Morishima (1985) Ergosterol biosynthesis inhibition and morphological changes in the sporidia of Ustilago maydis treated with triflumizole. in Fungicides for Crop Protection, I. M. Smith Ed., BCPC Monograph No. 31, Vol. 1, pp 227-280, BCPC Publications, Croydon, England
28. Hazlewood, C. F. (1979) A view of the significance and understanding of the physical properties of cell-associated water. in Cell Associated Water, J. Clegg and W. Drost-Hansen, Eds., pp 165-259, Academic Press, New York
29. Hazlewood, C. F., G. Cleveland, and D. Medina (1974) Relationship between hydration and proton nuclear magnetic resonance relaxation times in tissues of tumor bearing and non tumor bearing mice. Implications for cancer detection. J. Natl. Cancer. Institute, 52, 1849-1853
30. Hisada, Y., T. Kato, and Y. Kawase (1978) Mechanism of antifungal action of procymidone in Botrytis cinerea. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 44, 509-518
31. Hollis, D. P. (1980) Phosphorus NMR of cells, tissues, and

organelles. in Biological Magnetic Resonance, L. J. Berliner and J. Reuben, Eds., pp 1-44, Plenum Press, New York

32. Hollis, D. P., L. A. Saryan, J. C. Eggleston, and H. P. Morris (1975) Nuclear magnetic resonance studies of cancer. VI. Relationship among spin-lattice relaxation times, growth rates and water content of Morris hepatomas. J. Natl. Cancer Institute, 54, 1469-1472

33. Huang, K. T., T. Misato, and H. Asuyama (1964) Effect of blasticidin S on protein synthesis of Pyricularia oryzae. J. Antibiotics Ser.A, 17, 65-70

34. Inch, W. R., J. A. McCredie, R. R. Knispel, R. T. Thompson, and M. M. Pintar (1974) Water content and proton spin relaxation time for neoplastic and non-neoplastic tissues from mice and humans. J. Natl. Cancer Institute, 52, 353-356

35. Ishida, N., H. Kano, T. Kobayashi, H. Hamaguchi and T. Yoshida (1987) Estimation of biological activities by NMR in soybean seeds during maturation. Agric. Biol. Chem., 51 301-307

36. Ishida, N., H. Kano, T. Kobayashi, H. Hamaguchi and T. Yoshida (1988a) The relationship between imbibitional damage and initial water content of soybeans. Agric. Biol. Chem., 52, 2771-2775

37. Ishida, N., H. Kano, T. Kobayashi and T. Yoshida (1988b) Analysis of physical states of water in soybean seeds by NMR. Agric. Biol. Chem., 52, 2777-2781

38. Ishida, N., T. Kobayashi, R. Masuda, H. Kano, T. Yoshida and H. Ogawa (1990) Tracing metabolic changes in soybean cotyledons during germination by NMR. Agric. Biol. Chem., 54, 1359-1365

39. Kaku, S., M. Iwaya-Inoue, and L. V. Gusta (1984) Relationship of nuclear magnetic resonance relaxation time to water content and cold hardiness in flower buds of evergreen azalea. Plant Cell Physiol., 25, 875-882

40. Kano, H., N. Ishida, T. Kobayashi and M. Koizumi (1990) ^1H -NMR imaging analysis of changes of free water distribution in barley and soybean seeds during maturation. Japan. Jour. Crop Sci. 59, 503-509

41. Katagiri, M., and Y. Uesugi (1977) Similarities between the fungicidal action of isoprothiolane and organophosphorus thiolate fungicides. Phytopathology, 67, 1415-1417
42. Keepers, J. W., and T. L. James (1984) A theoretical study of distance determinations from NMR. Two-dimensional nuclear Overhauser effect spectra. J. Magn. Reson., 57, 404-426
43. Kennedy, E. P., and S. B. Weiss (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. J. Biol. Chem., 222, 193-214
44. Kiricuta, I. C., and V. Simplaceanu (1975) Tissue water content and nuclear magnetic resonance in normal and tumor tissues. Cancer Res., 35, 1164-1167
45. Klevit, R. E., D. E. Wemmer, and B. R. Reid (1986) ^1H NMR studies on the interaction between distamycin A and a symmetrical DNA dodecamer. Biochemistry, 25, 3296-3303
46. 小林和彦 (1981) シンプレックス法により多変数関数の最小値を求めるためのサブルーチン. 農林水産研究計算センター報告, A17, 51-71
47. Kodama, O., and T. Akatsuka (1983) Kitazin P and edifenphos, possible inhibitors of phosphatidylcholine biosynthesis. in Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment, Vol. 3, J. Miyamoto and P. C. Kearney Eds., pp 135-140, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt
48. Kodama, O., K. Yamada, and T. Akatsuka (1979) Kitazin P, inhibitor of phosphatidylcholine biosynthesis in Pyricularia oryzae. Agric. Biol. Chem., 43, 1719-1725
49. Kodama, O., K. Yamada, and T. Akatsuka (1980) Edifenphos, inhibitor of phosphatidylcholine biosynthesis in Pyricularia oryzae. Agric. Biol. Chem., 44, 1015-1021
50. Kopka, M. L., C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, and R. E. Dickerson (1985a) Binding of an antitumor drug to DNA netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T- ^{13}C -G-C-G. J. Mol. Biol., 183, 553-563
51. Kopka, M. L., C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, and R. E. Dickerson (1985b) The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1376-

52. Landy, S. B., and B. D. N. Rao (1989) Dynamical NOE in multiple-spin systems undergoing chemical exchange. J. Magn. Reson., 81, 371-377
53. Langridge, R., T. E. Ferrin, and I. D. Kuntz (1981) Real-time color graphics in studies of molecular interactions. Science, 211, 661-666
54. Leupin, W., W. J. Chazin, S. Hyberts, W. A. Denny, and K. Wuthrich (1986) NMR studies of the complex between the decadeoxy-nucleotide d-(GCATTAATGC)₂ and a minor-groove-binding drug. Biochemistry, 25, 5902-5910
55. Maeda, T., H. Abe, K. Kakiki, and T. Misato (1970) Studies on the mode of action of organophosphorus fungicide, kitazin. Agric. Biol. Chem., 34, 700-709
56. Mathur-De Vre, R. (1984) Biochemical implications of the relaxation behaviour of water related to NMR imaging. British J. Radiology, 57, 955-976
57. Miftakhutdinova, F. G., and A. V. Anisimov (1976) Investigation of non-freezing water of plant tissue by the method of nuclear magnetic resonance. Fiziol. Rastenii, 23, 799-804
58. Moon, R. B., and H. R. Richards (1973) Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. J. Biol. Chem., 248, 7276-7278
59. Morariu, V. V., and G. Benga (1977) Evaluation of a nuclear magnetic resonance technique for the study of water exchange through erythrocyte membranes in normal and pathological subjects. Biochim. Biophys. Acta, 469, 301-310
60. Naccache, P., and R. I. Sha'afi (1974) Effect of PCMBs on water transfer across biological membranes. J. Cell Biol., 83, 449-456
61. Nelder, J. A., and R. Mead (1965) A simplex method for function minimization. Computer J., 7, 308-313
62. Newton, B. A. (1967) Interaction of berenil with deoxyribo-

nucleic acid and some characteristics of the berenil-deoxyribo-nucleic acid complex. Biochem. J., 105, 509-519

63. Ohta, N., K. Kakiki, and T. Misato (1970) Studies on the mode of action of polyoxin D, Part II, Effect of polyoxin D on the synthesis of fungal cell wall chitin. Agric. Biol. Chem., 34, 1224-1234

64. Owens, R. G. (1969) Organic sulfur compounds. in Fungicides. D. C. Torgeson Ed., pp 147-301, Academic Press, New York and London

65. Patel, D. J., and L. Shapiro (1986) Sequence-dependent recognition of DNA duplexes. J. Biol. Chem., 261, 1230-1240

66. Pearl, L. H., J. V. Skelly, B. D. Hudson, and S. Neidle (1987) The crystal structure of the DNA-binding drug berenil: molecular modelling studies of berenil-DNA complexes. Nucleic Acids Res., 15, 3469-3478

67. Portugal J., and M. J. Waring (1987) Comparison of binding sites in DNA for berenil, netropsin and distamycin. Eur. J. Biochem., 167, 281-289

68. Raaphorst, G. P., and V. Kruuv (1981) Nuclear magnetic resonance spin lattice times of normal and transformed cultured mammalian cells and of normal and neoplastic animal tissues. Physiol. Chem. Phys., 13, 251-258

69. Raaphorst, G. P., J. Kruuv, and M. M. Pintar (1975) Nuclear magnetic resonance study of mammalian cell water. Biophys. J., 15, 391-402

70. Roberts, J. K. M. (1984) Study of plant metabolism in vivo using NMR spectroscopy. Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 375-386

71. Roberts, J. K. M., and O. Jardetzky (1981) Monitoring of Cellular Metabolism by NMR. Biochim. Biophys. Acta, 693, 53-76

72. Sakurai H., and H. Naito (1976) A cross-resistance of Pyricularia oryzae cavara to kasugamycin and blasticidin S. J. Antibiotics, 29, 1341-1342

73. Sanders, J. K. M., and B. K. Hunter (1988) Connections

through chemical exchange. in Modern NMR Spectroscopy, pp 208-214, Oxford University Press, Oxford, New York and Toronto

74. Schaefer, J. and E. O. Stejskal (1974) Carbon-13 nuclear magnetic resonance measurement of oil composition in single viable soybeans. J. Am. Oil Chemists' Soc. 51, 210-213

75. Schaefer, J. and E. O. Stejskal (1975) Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of intact oilseeds. J. Am. Oil Chemists' Soc. 52, 366-369

76. 下澄正宏, 内田又左衛門, 橋本研介, 柿木和雄, 見里朝正 (1977) イソプロチオランの作用機作 (第2報). 日本農薬学会大会講演要旨集, 113

77. Stekol, J. A., S. Weiss, and E. I. Anderson (1955) On the origin of the methyl groups of phospholipid choline in the rat. J. Am. Chem. Soc., 77, 5192-5193

78. Stout, D. G., R. M. Cotts, and P. L. Steponkus (1977) The diffusional water permeability of Elodea leaf cells as measured by nuclear magnetic resonance. Can. J. Bot., 55, 1623-1631

79. Stout, D. G., P. L. Steponkus, and R. M. Cotts (1978) Nuclear magnetic resonance relaxation times and plasmalemma water exchange in ivy bark. Plant Physiol., 62, 636-641

80. Uesugi, Y., and M. Katagiri (1981) Identification of fungal metabolites of dibutyl N-methyl-N-phenylphosphoramidate and their fungicidal activity. J. Pesticide Sci., 6, 419-424

81. Uesugi, Y., and M. Katagiri (1983) Metabolism of a phosphorothiolate fungicide IBP by strains of Pyricularia oryzae with varied sensitivity. in Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment, Vol. 3, J. Miyamoto and P. C. Kearney Eds., pp 165-170, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt

82. Uesugi, Y., and H. Sisler (1978) Metabolism of a phosphoramidate by Pyricularia oryzae in relation to tolerance and synergism by a phosphorothiolate and isoprothiolane. Pesticide Biochem. Physiol., 9, 247-254

83. Uesugi, Y., M. Katagiri, and O. Noda (1974) Negatively correlated cross-resistance and synergism between phosphoramidates and phosphorothiolates in their fungicidal actions on rice blast fungi. Agric. Biol. Chem., 38, 907-912

84. Ugurbil, K., T. R. Brown, J. A. Den Hollander, P. Glynn, and R. G. Shulman (1978) High-resolution ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3742-3746
85. Ugurbil, K., R. G. Shulman, and T. R. Brown (1979) High resolution ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of Escherichia coli Cells in vivo. in Biological Applications of Magnetic Resonance, R. G. Shulman, Ed., pp 537-589, Academic Press, New York, San Francisco, London
86. Waring, M. (1970) Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation. J. Mol. Biol., 54, 247-279
87. Wise, E. M., and D. Elwyn (1965) Rates of reactions involved in phosphatide synthesis in liver and small intestine of intact rats. J. Biol. Chem., 240, 1537-1548
88. Wüthrich, K. (1970) NOE-Observable ^1H - ^1H distances in nucleic acids. in NMR of Protein and Nucleic Acids, pp 203-223, A Wiley-Interscience Publication, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, and Singapore
89. Yoshida, M., and K. Nose (1987) Estimation of relaxation times of water proton in biological samples. Agric. Biol. Chem., 51, 3399-3401
90. Yoshida, M., and K. Nose (1990) Changes in the relaxation times of water protons in fungal cells indicates on membrane water permeability. Pesticide Biochem. Physiol., 38, 162-171
91. Yoshida, M., S. Moriya, and Y. Uesugi (1984a) Observation of transmethylation from methionine into choline in the intact mycelia of Pyricularia oryzae by ^{13}C NMR under the influence of fungicides. J. Pesticide Sci., 9, 703-708
92. Yoshida, M., T. Murai, and S. Moriya (1984b) ^{13}C NMR spectra of plant pathogenic fungi. Agric. Biol. Chem., 48, 909-914
93. Yoshida, M., Y. Uesugi, K. Nose, and D. Lalithakumali (1987) Inhibition of phospholipid N-methylation by dibutyl N-methyl-N-phenylphosphoramidate in Pyricularia oryzae in relation to

negative cross-resistance with phosphorothiolates. J. Pesticide Sci., 12, 513-515

94. Yoshida, M., H. Kano, N. Ishida and T. Yoshida (1989) Non-destructive analysis of the oil composition of soybean seeds by natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Agric. Biol. Chem., 53, 1395-1400

95. Yoshida, M., D. L. Banville, and R. H. Shafer (1990a) Structure analysis of $d(GCAATTGC)_2$ and its complex with berenil by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry, 29, 6585-6592

96. Yoshida, M., A. Kawasaki, M. Yukimoto, and K. Nose (1990b) Detection of the effect of fungicides on the cell membrane by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Pesticide Biochem. Physiol., 38, 172-177

