

論文審査の結果の要旨

氏名 西ヶ谷 有輝

本論文は、序論、第 1～5 章、総合考察と展望、付属資料で構成されており、農耕地で問題となっている施肥窒素による硝酸性窒素汚染や温室効果ガス N_2O 発生の解消に向け、その原因となるアンモニア酸化細菌(AOB)の主要酵素であるヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)を標的とする広い抗菌スペクトラムの新規硝化抑制剤の構造ベース創薬研究の成果について述べられている。

序章では、土壌の窒素動態、施肥窒素による環境汚染と硝化抑制剤による防止効果、既存の硝化抑制剤の抱える問題点を概説し、土壌における硝化の初発反応を司る AOB を標的とする新規硝化薬剤を開発する必要性を示した。AOB の硝化関連酵素であるアンモニア酸化酵素(AMO)と HAO について構造ベース創薬の標的としての適性を比較して、HAO を標的とする新規分子標的型硝化抑制剤を最新の構造ベース創薬法を駆使して開発することとした。

第 1 章では、構造ベース創薬基盤技術: (1) 6 種類の AOB(単離菌)の大量培養システム、(2)上記 6 種類のうち 5 種類の AOB 由来 HAO の簡便な高純度大量精製法、(3)AOB 生菌に対するハイスループット阻害アッセイ法、(4)ハイスループット高感度 HAO 蛍光アッセイ法、(5)HAO の X 線結晶構造解析法を構築し、HAO 標的型硝化抑制剤開発の環境を整備した。

第 2 章では、開発する新規 HAO 標的型硝化抑制剤リード化合物の生菌阻害活性目標値の設定について述べられている。第 1 章で構築した AOB 生菌に対するハイスループットアッセイ法を利用して、硝化抑制効果が報告されている 38 種類(うち上市薬 14 種類)の阻害効果を解析し、現在使用されている上市薬 3 種中で最強のニトラピリンと同等な 50%阻害濃度 $\text{IC}_{50}=1.8 \mu\text{M}$ を目標値とした。

第 3 章では、 β AOB と γ AOB の HAO 阻害剤フェニルヒドラジン(PheHZN)に対する感受性の違いとその原因を解析した。Ne 菌(β AOB)由来 NeHAO と No 菌(γ AOB)由来 NoHAO の詳細な構造比較から、薬剤結合ポケットの構造と構成アミノ酸の違いが薬剤感受性の違いの原因であることを明らかにした。ポケットを構成するアミノ酸配列は β AOB と γ AOB の各綱に属する HAO では保存性が高いことから、土壌に生息する 2 綱 3 属に及ぶ多種の AOB に効果的な広い抗菌スペクトラムを持つ HAO 標的型硝化抑制剤を開発するために、NeHAO と NoHAO をモデル酵素として選択した。

第4章では、HAO 阻害剤の *in silico* スクリーニングについて述べている。HAO 阻害活性を持つ PheHZN とアセトアルドキシムの HAO 複合体の X 線結晶構造解析結果に基づき、両化合物の特徴的な官能基をファーマコファに設定して、530 万種の市販化合物ライブラリのファーマコファサーチを実施し、最終的に 98 種の候補化合物を選抜した。

第5章では、第4章で選抜した 98 候補化合物のうち入手できた 77 化合物の HAO 阻害活性を解析した。500 μ M の阻害剤濃度で 50%以上の阻害活性を持つ化合物が、NeHAO に対して 9 種、NoHAO に対して 22 種ヒットした。最も強い阻害活性を持つ分子量 122Da の化合物は、NeHAO と NoHAO に対する IC₅₀ がそれぞれ 43nM と 250nM、生菌阻害活性(IC₅₀)は 1.85 μ M (Ne 菌)と 19.3 μ M (No 菌)で、第2章で設定した目標値に匹敵する新規 HAO 標的型硝化抑制剤のリード化合物の取得に成功した。さらに、122-Da 化合物構造をもとに膜透過性と生菌阻害活性の向上が期待される新規化合物を分子設計した。

総合考察と展望では、本論文の全般にわたる広範な考察と将来の農薬開発に向け構造ベース創薬とメタゲノム解析を融合した新規創農薬法の提案について述べられている。

添付資料では、新規硝化抑制剤のもう一つの標的候補タンパク質シトクロム c_{554} の簡便な高純度大量精製法について述べられている。

以上、本研究は、最新の構造ベース創薬法を利用して新規 HAO 標的型硝化抑制剤のリード化合物の取得に成功した。これは、構造ベース創薬法による農薬開発の初めての報告例で、今後の農薬開発の規範となる。加えて、本研究で構築した構造ベース創薬基盤技術は、HAO 酵素反応メカニズムの構造生物学的解明に大きく貢献するもので、学術的価値が高い。

なお、本論文の一部は共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験及び解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1886 字