

氏名	くりやま ただひこ 栗山 理彦
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第372号
学位授与年月日	平成17年 3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Structure-Activity Studies of Naturally Occurring GABA Receptor Antagonists (自然界に存在するGABAレセプターアンタゴニストの構造と活性に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 尾添嘉久 (副査) 持田和男 中島廣光 内海俊彦 山本達之

## 学位論文の内容の要旨

In this study, I focused on the identification of novel useful  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor ligands from natural resources. The thesis consists of three parts. The first deals with the structure-activity relationships of *secoprezizaane* terpenoids. The second deals with the receptor assay-guided isolation of novel GABA receptor ligands from fugal cultures. The third describes the results of a series of experiments carried out to identify noncompetitive GABA receptor antagonists that are effective in nematodes, as well as to examine the hypothesis that noncompetitive antagonism of the GABA receptor underlies the nematocidal activity of quassinoids against nematodes.

### 1) Structure-Activity Relationships of *secoprezizaane* terpenoids in GABA Receptors

Anisatin and 12 *secoprezizaane* terpenoids isolated from star anise species (*Illicium anisatum* L., *Illicium floridanum*, *Illicium parviflorum*, and *Illicium verum*) were investigated for their ability to inhibit the specific binding of [<sup>3</sup>H]4'-ethynyl-4-*n*-propylbicycloorthobenzoate (EBOB), a noncompetitive antagonist of GABA receptors, to housefly-head and rat-brain membranes. Veranisatin A was found to be the most potent inhibitor in both membranes, with an IC<sub>50</sub><sup>fly</sup> of 78.5 nM and an IC<sub>50</sub><sup>rat</sup> of 271 nM, followed by anisatin (IC<sub>50</sub><sup>fly</sup> = 123 nM; IC<sub>50</sub><sup>rat</sup> = 282 nM). Six of the other 11 tested compounds

were effective only in housefly-head membranes. Pseudoanisatin proved to display a high (>26-fold) selectivity for housefly versus rat GABA receptors ( $IC_{50}^{fly} = 376$  nM;  $IC_{50}^{rat} > 10,000$  nM). Although pseudoanisatin does not structurally resemble EBOB, Scatchard plots indicated that the two compounds bind to the same site in housefly receptors. Comparative molecular field analysis (CoMFA), a method of three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis, demonstrated that *seco*-prezizaane terpenoids can bind to the same site as do picrotoxane terpenoids such as picrotoxinin and picrodendrins, and the CoMFA maps allowed us to identify the parts of the molecules essential to high activity in housefly GABA receptors. Anisatin and pseudoanisatin exhibited moderate insecticidal activity against German cockroaches.

## 2) Novel GABA Receptor Ligands from Fungal Cultures

To discover GABA receptor-directed insecticides in natural products, fungal culture extracts were screened for their ability to inhibit specific binding of [<sup>3</sup>H]EBOB to housefly-head membranes. The screening efforts led to the isolation of pyrazoloquinazolinone derivatives, PF1198A (alantrypinone) and PF1198B (serantrypinone), from a culture of *Aspergillus terreus* and a dihydroisocoumarin derivative, PF1223, from a culture of *Neosartorya quadricincta*. PF1198A and -B had  $IC_{50}$  values of 0.34 and 2.1  $\mu$ M in the housefly GABA receptor, respectively. These compounds were ca. 47- to 61-fold selective for the housefly versus rat GABA receptors. Both compounds showed insecticidal activity against *Myzus persicae* in the range of 100-500 ppm. On the other hand, PF1223 inhibited [<sup>3</sup>H]EBOB binding by 65% at 2.2  $\mu$ M.

## 3) Quassinoids and Bicyclophosphorothionates: Possible GABA Receptor Antagonists in Nematodes

Fourteen known GABA receptor antagonists were first screened for the effectiveness of their nematocidal activity against the nematode Diplogastridae. As a result, 3-isopropyl-substituted bicyclophosphorothionates (BPTs) were found to have high nematocidal activities, and 4-cyclohexyl-3-isopropyl-BPT (SF-14) and 4-(2-propenyl)-3-isopropyl-BPT were the two most potent analogues; these compounds are equipotent to samaderine B and more potent than the anthelmintic abamectin. Samaderine B- and SF-14-resistant strains of nematodes, selected by challenge with each compound, showed cross-resistance to SF-14 and samaderine B, respectively. SF-14 (10  $\mu$ M) reduced [<sup>3</sup>H]SF-14 binding to nematode membranes by 30.4%. Samaderine B (10  $\mu$ M) resulted in a similar level of the inhibition, but had neither additive nor synergistic effects on the SF-14 inhibition of [<sup>3</sup>H]SF-14 binding. These findings suggest that samaderine B shares a common binding site with the GABA receptor antagonist SF-14 in Diplogastridae. The CoMFA results of quassinoids and BPTs supported this conclusion.

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、神経伝達物質 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の受容体にアンタゴニストとして作用する天然物を発見し、その構造と活性との関係を解析しようとするものである。本論文は、植物由来の *secor* プレジザンテルペノイド類とクアシノイド類、糸状菌由来のピラゾロキナゾリンジオン誘導体とジヒドロイソクマリン誘導体の GABA 受容体アンタゴニスト活性についての研究結果を記載している。

最初に、シキミ科の植物から単離された 13 種類の *secor* プレジザンテルペノイドのイエバエとラットの GABA 受容体に対するアンタゴニスト活性をアンタゴニスト結合部位に対する特異的リガンド $[^3\text{H}]$ EBOB を用いたラジオレセプターアッセイによって調べた。その結果、ヴェルアニサチン A がもっとも高い阻害活性を示し、続いてアニサチンが高い活性を示すことが明らかになった。これらはラット GABA 受容体よりイエバエ GABA 受容体に対して 2~3 倍高い活性を示したが、そのほかの 11 類縁体のうち 6 類縁体はイエバエ受容体にのみ活性を示した。特に、シュードアニサチンは 26 倍以上の選択性を示した。スキヤチャード解析によってシュードアニサチンと EBOB は同じアンタゴニスト結合部位に結合することが明らかになった。また、同じテルペノイドアンタゴニストであるピクロデンドリンやピクロトキシニンなどを含めた 22 テルペノイドのイエバエ受容体に対する親和性を CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 法を用いて三次元定量的構造活性相関解析し、これらが同じ部位に作用することを示すとともに、高活性発現に必要な構造要因を明らかにした。

次に、 $[^3\text{H}]$ EBOB を用いたラジオレセプターアッセイによって、糸状菌培養液から新規 GABA 受容体アンタゴニストを発見する研究を行った。数百種類の培養液を探索する中から、 $[^3\text{H}]$ EBOB 結合阻害物質として 3 化合物を発見した。阻害活性を示した糸状菌培養液の粗抽出物を各種方法により精製し、*Aspergillus terreus* が産生する 2 阻害物質をピラゾロキナゾリンジオン誘導体と同定した。この 2 つの化合物は置換基がメチル基であるかヒドロキシメチル基であるかの違いだけであり、メチル基を持つ方が約 6 倍イエバエ GABA 受容体に高親和性を示した。また、これらの化合物はラット受容体よりイエバエ受容体に対してそれぞれ 47 倍、61 倍高親和性であった。両化合物はモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) に対して殺虫活性を示した。一方、*Neosartorya quadricincta* 培養液からはジヒドロイソクマリン誘導体が阻害物質として同定された。

3 番目に、ニガキ科植物から取れるクアシノイド類の土壌自活線虫に対する殺線虫活性は GABA アンタゴニスト活性に由来するのではないかという仮説のもとに線虫を用いた $[^3\text{H}]$ EBOB を行った。しかし、線虫では $[^3\text{H}]$ EBOB の特異的結合を検出することができなかった。そこで殺線虫活性を指標に 14 種の代表的 GABA 受容体アンタゴニストのスクリーニングを行った。その中で 3 位にイソプロピル基を持つ架橋二環式チオリン酸エステルが高い殺線虫活性を持つことが分かったので、この化合物と代表的クアシノイドであるサマデリン B に対して耐性を示す線虫を選抜し、殺線虫活性を調べたところ、両化合物に対する交差耐性が観察された。また、高活性を

示した架橋二環式チオリン酸エステルのひとつ SF-14 をトリチウム標識し、これを用いてラジオレセプターアッセイを行ったところ、サマデリン B は $^3\text{H}$ SF-14 の特異的結合を 100% 阻害した。さらに、SF-14 類縁体とクアシノイド類を含む 35~36 化合物の殺線虫活性を CoMFA 法で解析した結果、有意な結果が得られ、研究に用いたクアシノイドと架橋二環式チオリン酸エステル類が同じ部位に作用する可能性が示唆された。

以上のように、本論文ではラジオレセプターアッセイという手法を用いて研究を行い、自然界には多くの GABA 受容体アンタゴニスト活性を持つ化合物が存在することを示し、その構造活性相関を明らかにした。本論文で記載されている研究結果は、農業科学の発展に寄与する新知見であり、本論文は博士（農学）の学位論文に値するものであると認められる。