

# 非殺菌性農薬の最近の研究・開発動向と将来展望

理化学研究所微生物制御研究室 やまぐち 山口 いさむ 勇・せきざわ 関沢 やすはる 泰治

## はじめに

非殺菌性農薬と称される植物病害の防除剤には、代表的なものとして二つの型がある。その一つは病原菌側に作用して、菌の感染過程で必須のメラニン生成にかかわる代謝反応を阻害し、病原菌の宿主植物への侵入を阻止することによって、病害を防除するものである。他の一つは宿主側に作用して、長期間にわたって全身獲得抵抗性を賦与し、病害を防除するものである。ここでは後者の、宿主側に作用して病害の防除効果を発揮する型の農薬について述べる。この型の薬剤は、本田でのほぼ20年の実用経験から、その特性の一つとして病原菌の薬剤耐性を誘導しないことが知られている。この型の薬剤は、イネいもち病を主な対象として我が国において世界に先がけて開発された経緯があるが、ここ10年における欧米での基礎的研究の展開は目覚ましく、イネだけでなくコムギ、トウモロコシ、ジャガイモ、トマトなどの作物を対象として、さらに少量で環境安全性の高い優れた薬物の探索が活発に行われるようになってきた。この型の薬剤は病原菌に対して直接抗菌性を示さないだけでなく、植物体内で活性化反応を受けて抗菌性を発揮するものでもない。さらに植物体に適用しても、そのことだけで強度の誘導抵抗反応が全身に誘起されて、長期間維持されるものでもない。医薬分野で薬理生化学的にプライミング・エフェクターと呼ばれている薬物と同様に、植物体において長時間にわたる正常代謝の著しいかく乱もない。しかしながら、病原菌感染のごく初期に素早く宿主植物の膜情報伝達系を作動させ、早期に諸抵抗反応群を活性化・誘導し、防御機構を成立させて病害を防除することができる。

## I イネの誘導防御機構の仕組み

### 1 膜情報伝達系と細胞内情報伝達系

植物・動物の細胞を問わず、外界の情報を形質膜を通して細胞内に伝達する系があり、これは細胞内情報伝達系につながっていて、環境の変化や外敵の侵襲等のストレスに対応して、各種の防御機構が発動される。生物進

化の過程で獲得されてきたに違いないこの機能は、動物においては多くの研究がなされているが、高等植物、なかでも食糧生産にかかわる作物での膜情報伝達系と、共役する細胞内情報伝達系については、4年程前まで何もわかっていなかった。病原菌の感染を宿主が感知するのは、イネいもち病菌の場合には同病原菌の細胞壁を構築している巨大分子化合物由来の物質で、今のところ3種があると考えられている。そのうちで、最もよく研究されているのは、いもち病菌の細胞壁の最外部を取り巻いているプロテオグルコマンナン由来の糖タンパク質である(岩田ら, 1982; 岩田, 1984)。約25 KDaから35 KDaの範囲にある分子量の比較的小さい糖タンパク質フラグメントで、活性に必須の部分は $\alpha$ -マンノシド結合であることが確認されているが、宿主との相互作用でさらに糖鎖フラグメントが開裂して活性を発揮するのかという点を含めて、糖化学からの詳細な研究が今後残されている。このプロテオグルコマンナン(以下、本稿ではエリシターと称する)を、パンチ(1~2 mm)したイネ葉組織に適用するか、葉身細胞のプロトプラストに加えて刺激すると、 $O_2^-$ 生成と $\alpha$ -リノレン酸の遊離が観察される(関沢ら, 1987; 1990 a; 1990 b)。 $O_2^-$ 生成は、パンチ葉身組織(6 mm ディスク)では、分析法によるがエリシターによる刺激後約15分位で、プロトプラストでは $O_2^-$ による化学発光を自記計測すると、刺激後約2分で観察される。エリシターによる刺激後ごく初期に引起される $O_2^-$ 生成の酸化還元酵素系とホスホリパーゼA<sub>2</sub>の活性化反応までの間には膜情報伝達系とそれに共役した細胞内情報伝達系が存在すると考えられる。そこで、18~20種の分子プローブを用いて、 $O_2^-$ 生成酵素系とホスホリパーゼA<sub>2</sub>の二つの酵素活性を指標として、パンチした葉身組織より調製した葉片におけるエリシター刺激後の活性動態と各分子プローブの与える効果を比較解析した。また、イネのプロトプラストをエリシターで刺激し、ホスファチジルイノシトール4,5-ジリン酸(PIP<sub>2</sub>)及びイノシトール1,4,5-トリスリン酸(IP<sub>3</sub>)の消長を測定した。それらの結果を総合考察すると、膜情報伝達系として、動物細胞の場合ときわめて類似したホスホリパーゼC系の存在が推定された(加納ら, 投稿中)。さらに、連鎖して存在している各機能素子の性状が調べ始められている。現在のところ葉身組織より得た調製品による実験で、2次

Non-fungicidal Protectants: Recent Trends of Research and Development with Future View. By Isamu YAMAGUCHI and Yasuharu SEKIZAWA

メッセンジャーである  $\text{Ca}^{2+}$  と細胞内情報伝達系をつなぐ役割をしている機能素子は、 $\text{Ca}^{2+}$  調節タンパク質であり、これに依存した細胞質タンパク因子類のリン酸化反応が両指標を活性化すると推定されるに至っている（加納ら，投稿中；関沢，1991）。 $\text{Ca}^{2+}$  調節タンパク質とは植物カルモジュリン及び  $\text{Ca}^{2+}$  依存・脂質非依存性プロテインキナーゼのいずれか，あるいは両者を意味すると考えられる（HARPER, J. P. et al., 1991；YUASA, T. et al., 1992）。

## 2 細胞内情報伝達系と防御機構を構築する酵素群の誘導生成

上記の  $\text{O}_2^-$  生成は，被侵入細胞の過敏感死にかかわるが（道家，1983），それとともに内因性エチレンの生合成の最終ステップに関与している（芳賀ら，1988；関沢ら，1990）。生成する内因性エチレンに依存して，リポキシゲナーゼが誘導され（関沢ら，1990），前述した信号依存型のホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  の活性化反応によって形質膜から切り出された  $\alpha$ -リノレン酸は，ペルオキシドを経てヒドロキシ不飽和脂肪酸となる（関沢ら，1981；志村ら，1983）。ヒドロキシ不飽和脂肪酸類には抗菌性があり（志村ら，1981），また被侵入細胞の過敏感死にかかわり（生居ら，1991），さらにイネ葉身のファイトアレキシン類の生合成系の作動を誘導する（Li, W. X. et al., 1991）。一方，内因性エチレンはフェニルアラニンアンモニアリアーゼ及びペルオキシダーゼなどを誘導し，物理的な障壁としてのリグニン生合成系の誘導に関与する。なお，内因性エチレンが防御機構の成立にかかわる酵素群を誘導することは，分子生物学上からも，これら酵素タンパク質の構造 DNA の転写，翻訳がエチレンによって始動することにより示されている（ECKER, J. R., 1987）。

## II 全身獲得抵抗性を賦与するプライミング剤の概説

### 1 プロベナゾール

プロベナゾールは，イネいもち病を主な標的として，実用に供されている防除薬剤である。化学構造〔I〕（3-アリルオキシ-1,2-ベンツイソチアゾール-1,1-ジオキソイド）を有する。薬学での定義によれば，化合物〔I〕は化合物〔II〕のプロドラッグに当たることとなる。化合物〔II〕は，カルボニル基とスルホン基の影響で N 原子が電子欠乏状態になり，水素原子がプロトンとして放たれる。すなわち，〔II〕は  $\text{H}^+$  解離性の酸（ $\text{pK}_a$  3.6 付近）で，イネ根系からの吸収が本田の土質などによって低下し，効果が変動することが考えられたので，吸収をよくするために〔I〕への薬学的手段が適用されたので

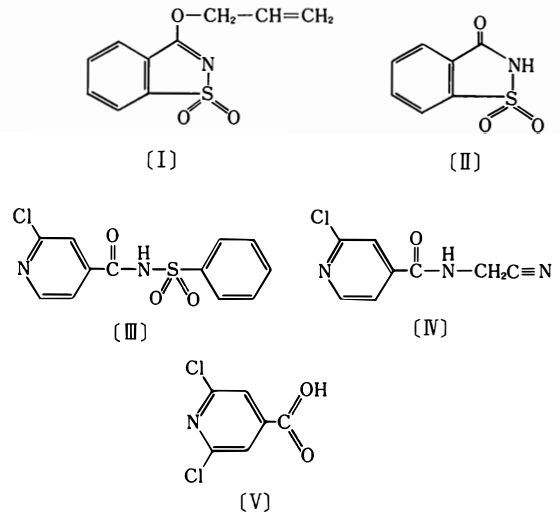


図-1 植物に全身獲得抵抗性を賦与する化合物

ある。プロベナゾールは，施用イネでは 40 日以上も全身獲得抵抗性が賦与された状態を呈する。なお，化合物〔I〕にも〔II〕にも認むべき直接的な抗菌性はない。化合物〔II〕のイミド基をメチル化すると薬効が消失するので，イミド基は薬効に必須の化学基と考えられる。ベンゼン核のない誘導體では薬効が低下することも経験されている（渡辺ら，1977；1979；関沢ら，1980）。

### 2 NPSI 及び NCI

NPSI (*N*-フェニルスルホニルイソニコチン酸アミド) は化学構造〔III〕を有する。NPSI には直接的な抗菌性はほとんど認められないが，イネ体上では高いいもち病防除効果を示す（吉田ら，1990 a）。したがって本化合物もイネ体のいもち病に対する抵抗性反応にかかわって防除効果を発揮すると考えられている。その化学構造から疎水性の部分構造が必須であることが上述〔I〕，〔II〕と比較すると察知される。しかし，プロベナゾールで推定された必須の活性基であるイミド基は必ずしも環状部に存在する必要がないことを示唆している。

NCI (*N*-シアノメチル-2-クロロイソニコチン酸アミド) は化学構造〔IV〕を持つ化合物で，直接抗菌性がないにもかかわらず，水面施用でイネいもち病に高い防除効果を有する（吉田ら，1990 b）。本物質はスルホン基がなくとも薬効のあることを示しており，〔I〕～〔III〕と比較して興味深い。定性的にはカルボニル基の結合したピリジン核の炭素原子は，幾分か塩素原子の影響で電子欠乏状態になると考えられるので，クロル酢酸にみられるようなダイポール・ダイポール反発でイミド基の水素原子がプロトン化の傾向を強めていると推定される。

### 3 CGA 41396

CGA 41396 (2,6-ジクロロイソニコチン酸)は化学構造〔V〕を有する。本化合物も認むべき抗菌性がないのに、葉面散布、土壤灌注あるいは水面施用で、イネを含む多種の作物の糸状菌病及び細菌病に薬効がある (METRAUX, J. P. et al., 1991)。この化合物のプロトン供与基は、カルボキシル基であることが注目される。しかし、いずれにしてもなぜ  $H^+$  の供与体の限られたものに薬効があるのか、まだわかっていない。

### III プロベナゾール及び NCI の作用機作

いずれの化合物についても最終的な結論には至っていないが、大要は把握されつつあって、二つの化学構造の異なる化合物で一つの研究の方向付けができてきているように思われる。前述の化合物〔II〕のナトリウム塩 1 mM 水溶液 5  $\mu$ l を、イネ葉身パンチ点 (2 mm) にのせ、1 時間後エリシターで刺激した区と、しない区を比較すると、化合物〔II〕のみの処理で  $O_2^-$  生成は幾分高進し、エリシターによる刺激でさらに増加した。しかし、持続時間は長時間にわたらず、約 6 時間以内に無処理のものと同様となった。この実験で、対照とエリシター刺激の区を比べると、 $O_2^-$  生成率の最大を示す刺激後の時間は化合物〔II〕の処理で約 1 時間早期へシフトした。一方、 $\alpha$ -リノレン酸の遊離は、対照に比べ、早期相は抑制され、後期相で著しく促進された。この後期相での高進は、ネオマイシン B, TPA, スタウロスボリン処理時にも、同じパターンがみられるので、全身獲得抵抗性を賦与された状態での  $\alpha$ -リノレン酸遊離の一つの型の特徴であろうと推察される (加納, 投稿中)。これより以前に、 $O_2^-$  生成動態がイネいもち病菌の親和性組合せと非親和性組合せで異なり、非親和性組合せのほうが、早期に最大に達すること、化合物〔II〕の前処理で、親和性組合せでのパターンが非親和性組合せでのそれに近づくことが観察されていた (関沢ら, 1987)。 $O_2^-$  生成が非親和性組合せのほうで早期に最大率に至る傾向は、フェニルアラニンアンモニリアーゼ、リポキシゲナーゼ及びペルオキシダーゼの誘導でも、それらのパターンを比較解析することで確かめられていた。前述したように、 $O_2^-$  生成及び  $\alpha$ -リノレン酸の遊離は以後の誘導抵抗反応カスケードと共役しているので、プロベナゾールの作用点は、エリシターの仮想的レセプターから  $O_2^-$  生成の酸化還元酵素系とホスホリパーゼ  $A_2$  の活性化反応に至るまでの機能素子のいずれかにあるとの考えを支持していると思われる。この考えは、NCI の作用機構の研究で確実になってきた。イネ胚培養細胞に [2- $^3H$ ] ミオイノシトールを添加

して細胞膜中のホスファチジルイノシトール (PI) を標識した後、NCI の添加区と無添加区をエリシターで刺激すると、PI のターンオーバーが NCI の添加により加速されることが認められている (瀬口ら, 1992 b)。これはエリシターの刺激によりホスホリパーゼ C 系が作動していることを示すとともに、NCI が PI ターンオーバーを加速して、PIP<sub>2</sub> をより多くホスホリパーゼ C に基質として供給し、イノシトール 1,4,5-トリリン酸 (IP<sub>3</sub>) をより高率に生成することを示唆するか、エリシターによるレセプターからの信号で、GTP 結合タンパク質を介して起こるホスホリパーゼ C の活性化反応が NCI で加速され、結果として PI ターンオーバーが加速されたかのいずれかを意味していると考えられる。したがって、これらの全身獲得抵抗性を付与するプライミング剤の作用点は、まさに膜情報伝達系のいずれかの機能素子にある公算が大きくなってきている。これら薬物の作用点を明確にすることは、その機能素子の性状を明らかにすることにつながると考えられるので、より少量で環境安全性の高い全身獲得抵抗性のプライミング剤の分子設計に寄与するところが大きいと思われる。NCI の作用機作の研究は、さらにもう一つの直接的証拠を与えた。以前からフェニルアラニンアンモニリアーゼの誘導はメチオニン経路によって生成するエチレンでなく、グルタミン酸経路によるエチレンに依存していることが、阻害実験で示されていた (芳賀ら, 1988)。また、葉身にパンチしたイネ苗 (4 葉期) にグルタミン酸モノナトリウムを適用して、エチレン自動モニタリング装置にかけると、早期にエチレン生成が観察され、次いでメチオニン経路によると考えられるパターンで第 2 相のエチレン発生が記録されていた (漆崎ら, 1988)。著名な植物ホルモンの研究者 S. F. YANG 教授は、「グルタミン酸経路は微生物特有のエチレン生成系と考えられるので信じ難いことである」とコメントされたが、イネ胚培養細胞を [U- $^{14}C$ ] グルタミン酸と保温すると  $^{14}C$ -エチレンの発生が確認され、しかも NCI の存在で顕著に加速された。また、罹病時のイネ体において、脂質同化作用の高進が [1- $^{14}C$ ] 酢酸を用いた実験により確かめられ、これも NCI の存在でさらに高進した (瀬口, 1992 a)。これらの実験結果は、II の 2 に述べた  $\alpha$ -リノレン酸カスケードの防御機構成立での重要な役割と、脂肪酸合成を支える NADPH 供給系が、 $O_2^-$  生成酸化還元酵素系の基質 NADPH の供給系としても働きうると考えられてきたことと符合すると考えられる (関沢ら, 1990 b)。

#### IV 将来展望

植物病害の防除は、従来、植物病原菌に殺菌効果をもつ薬剤が使われてきた。これらは病原菌に直接の殺菌力を持つだけに圃場においても卓効を示すが、その反面で対象外の生物に好ましくない影響を及ぼす場合もあり、また淘汰圧が高いゆえに耐性菌の出現が問題化したこともある。一方、非殺菌性植物病害制御剤と称される薬剤は、病原菌に対して通常のインピトロ試験では認むべき殺菌力が無いにもかかわらず、植物体上では病害制御効果を十分に発揮しうるのである。現在、実用に供されている薬剤は、予防的に施用され、殺菌性薬剤のような治療効果を期待することはできないが、それは薬理機構が病原菌の感染初期における病原性に阻害的に作用するか、宿主植物に病害抵抗性を賦与するかのいずれかであるからである。しかし、このことは病原菌が植物との共進化の過程で獲得した病原性に対する薬剤の特異性を意味し、標的生物以外に対する影響が小さく、また耐性菌出現の可能性の低いことを示唆するものである。近年の環境重視の観点から将来の植物病害防除技術を展望するとき、上述の性質を有する非殺菌性病害制御剤は今後ますます重要性を増すものと思われる。ただ、これらは一般的に病徴が発現する前に予防的に施用されることによってその効果を発揮しうると考えられるので、殺菌的治療剤に比べて薬剤の低投量化を図ることが難しいと予想される。その対応策として考えられることは、月並みではあるが、より活性の高い物質を検索しうる効率的なバイオアッセイ技術の開発であり、そのためには基盤としての基礎研究が必須である。本稿で述べた作用機構研究はその一環であるが、現在でもなお薬剤の直接のターゲット（タンパク質？）は不明であり、本質的な部分が欠けている。その三次元構造と薬剤の結合及び密接する反応様式が明らかになれば新規薬剤の検索やデザイン

にも大きく寄与することができると期待されるが、基礎研究における興味と実際的なスクリーニング技術との接点をどう見いだすかが今後の展開の鍵となると思われる。

#### 引用文献

- DOKE, N. (1983): *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345~357.
- ECKER, J.R. and R.W. DAVIS (1987): *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 5202~5206.
- HAGA, M. et al. (1988): *Agric. Biol. Chem.* 52: 934~950.
- HARPER, J.F. et al. (1991): *Science* 252: 951~954.
- 岩田道頭ら (1982): *日植病報* 48: 267~274.
- (1984): 東京大学学位論文, 160 pp.
- LI, W.X. et al. (1991): *Agric. Biol. Chem.* 55: 1041~1047.
- METRAUX, J.P. et al. (1991): *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1: 432~439.
- NAMAI, T. et al. (1991): *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 57: 339~344.
- SEGUCHI, K. et al. (1992a): *J. Pestic. Sci.* 17: 107~113.
- et al. (1992b): *ibid.* 17: 123~129.
- SEKIZAWA, Y. and S. MASE (1980): *Rev. Plant Protec. Res.* 13: 114~121.
- et al. (1981): *Agric. Biol. Chem.* 45: 1437~1439.
- et al. (1987): *ibid.* 51: 763~770.
- et al. (1990): *Agric. Biol. Chem.* 54: 471~478.
- 関沢泰治 (1990): 文部省重点領域研究「植物生殖機構」PRM レター No.14, pp.5~8.
- SEKIZAWA, Y. et al. (1990a): *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 561~564.
- et al. (1990b): *ibid.* 56: 565~567.
- SHIMURA, M. et al. (1981): *Agric. Biol. Chem.* 45: 1931~1935.
- et al. (1983): *ibid.* 47: 1983~1989.
- URUSHIZAKI, S. et al. (1988): *ibid.* 52: 3159~3161.
- WATANABE, T. et al. (1977): *J. Pestic. Sci.* 2: 291~296.
- et al. (1979): *ibid.* 4: 53~59.
- YOSHIDA, H. et al. (1990a): *ibid.* 15: 199~203.
- et al. (1990b): *ibid.* 15: 413~417.
- YUASA, T. and S. MUTO (1992): *Arch. Biochem. Biophys.* 296: 175~182.

### 学 界 だ よ り

#### ○ 1993 年度日本線虫学会大会

期 日：平成5年5月29日(土)13時~17時

会 場：京大会館(京都市左京区吉田河原町15-9)

日 程：総会及びシンポジウム

佐野善一(九州農業試験場)「植物寄生性線虫の防除を巡る諸問題」

石橋信義(佐賀大学農学部)「有用線虫による生物的防

#### 除—最近の進歩」

多田 功(九州大学医学部)「腸管寄生線虫のモデルとしてのネズミ糞線虫」

白山義久(東京大学海洋研究所)「深海産線虫の生態的特徴」

連絡先 〒305 つくば市観音台3-1-1

農業環境技術研究所 線虫・小動物研究室内

日本線虫学会事務局 Tel 0298-38-8316

\*本会は、日本線虫研究会をもとに、本年新たに発足いたしました。