

# ベンズイミダゾール耐性菌に対する「負相関交差耐性剤」の創製

住友化学工業株式会社宝塚総合研究所

ふじ  
藤

むら  
村

まこと  
真

## はじめに

農業用殺菌剤を利用した病害防除において耐性菌の出現による薬剤の防除効果の低下が大きな問題となっている。これは、近年開発された殺菌剤の多くが特異的な作用点を選択的に阻害するためと考えられている。選択的殺菌剤は低薬量でシャープな活性を示すが、反面、旧来の非選択的殺菌剤に比べると、作用点の変異による菌の耐性化が起りやすいとされている。実際に、ベンズイミダゾール、ジカルボキシイミド、フェニルアミド、アゾール系殺菌剤などの選択的殺菌剤において、耐性菌の出現による防除効果の低下が報告されている (STAUB, 1991)。これらの耐性菌の発達に対抗するために、作用性の異なる2種以上の殺菌剤の混合・交互使用、あるいは生物的・物理的防除法を組み入れた総合防除方法が採用されてきている。耐性問題を積極的に解決する手段としては、従来の薬剤とは交差耐性を示さない新規化合物の開発が挙げられるが、もう一つの方法として負相関交差耐性を利用した殺菌剤の開発が考えられる。ここでは、負相関交差耐性の例とそのメカニズムを紹介し、その実用性について考察するとともに、最近開発された「負相関交差耐性剤」ジエトフェンカルブについて紹介する。

## I 負相関交差耐性の例

一般に、ある薬剤に耐性を獲得した菌は、同じ作用点を阻害する同系統の薬剤に対して耐性を示す。このようにある薬剤に耐性を獲得した菌が、別の薬剤に対しても耐性を示す現象を (正相関) 交差耐性と呼ぶ。一方、ある薬剤に対して耐性を獲得した菌が、逆に他の特定の薬剤に対して感受性になる現象が知られており、これは負相関交差耐性と呼ばれている。「負相関交差耐性剤」は、耐性菌に対して選択的に高い活性を示すために、その利用は耐性菌問題を打破する方法の一つと考えられる。負相関交差耐性という現象は、これまでに多くの例が室内耐性菌及び圃場耐性菌について報告されている (De WAARD, 1984; LEROUX, 1992)。

### 1 カルボン酸アミド系薬剤

カルボン酸アミド系薬剤は、担子菌に対して選択的に

抗菌活性を示す化合物であり、イネ紋枯病、ムギ裸黒穂病などの防除剤として使用されている。カルボン酸アミド系薬剤は、ミトコンドリアの電子伝達系を阻害するが、耐性のメカニズムは、その作用点であるコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体IIに対する薬剤の結合活性の低下によるとされている。トウモロコシ黒穂病菌のカルボキシ室内耐性菌では、その遺伝的背景より、*oxr1A*, *oxr1B* 及び *oxr 2* の変異が知られており、この中で *oxr1A* をもつ株はアニリンの4位に置換を持つ4-フェニルカルボキシ等々に負相関交差耐性を示す (WHITE et al., 1978)。一方、ムギ裸黒穂病菌のカルボキシ圃場耐性菌 (UR 2) は、3位に置換を持つメプロニル等々に負相関交差耐性を示すことが知られている (LEROUX, 1992)。カルボキシとメプロニルの混合処理による、カルボキシ耐性ムギ裸黒穂病防除の可能性が考えられる。しかし、現実には、この病原菌に卓効を示すステロール阻害剤が代替剤として使用されている。

### 2 エルゴステロール生合成阻害剤

エルゴステロール生合成を阻害する農業用殺菌剤 (EBI) には、ステロールの14位の脱メチル化を阻害するDMI剤と、 $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$  イソメラーゼ (及び  $\Delta^4$  レダクターゼ) を阻害するモルフォリン系薬剤が知られている。特に、DMI剤は多くの病害の防除に卓越した活性を示すことから、現在の殺菌剤の主役といっても過言ではない。このDMI剤は、ベンズイミダゾール系薬剤等と比較して長期間使用しても、実際の圃場で耐性菌問題が大きな問題となることはなかったが、最近、各種うどんこ病を中心に耐性菌による薬剤の効力低下が知られるようになってきている。DMI剤間には一般に正相関交差耐性が認められる。しかし、例外も報告されており、1例を挙げると、ムギ眼紋病菌にはWタイプとRタイプが混在することが知られており、ほとんどのDMI剤はRタイプに対する活性が弱いが、プロクロラズは両タイプに活性を示す。LEROUX (1992) は、圃場より分離したムギ眼紋病菌をいくつかに分類し、そのうちのRタイプ-(II p) 株はプロクロラズに耐性を示すが、逆にトリフルミゾール、トリアジメノールには負相関交差耐性を示すことを報告している。また、DMI剤と負相関交差耐性の関係にある化合物として、アクリフラビン、シクロヘキシミド、グアザチンなどが知られているが、この現象はいずれも室

内耐性菌においてのみ認められている (De WAARD, 1984)。この他に、DMI 剤と異なる作用点を阻害するモルフォリン系薬剤で、DMI 剤と正あるいは負相関交差耐性がみられる例も報告されている。しかし、通常両系統の薬剤間では交差耐性が認められないので、DMI 剤耐性の問題を回避するために、ムギのうどんこ病を中心に両薬剤が併用されている。DMI 剤耐性のメカニズムについては、室内耐性菌の場合には、エネルギー依存性の薬剤排出機構の変化、ターゲット蛋白質の変化、遺伝子の増幅による耐性化等が報告されているが、圃場耐性菌における耐性のメカニズムについて統一された見解はいまのところない。

### 3 ジカルボキシイミド系薬剤

ジカルボキシイミド系薬剤の作用点は不明であるが、芳香族炭水化物系薬剤との間に正相関交差耐性がみられる。厳密な意味での負相関交差耐性とはいえないかもしれないが、室内で容易に得られるジカルボキシイミド高度耐性菌は、浸透圧に対して超感受性を示すことが多くの糸状菌において知られている (BEEVER and BYRDE, 1982)。このことが、実際の圃場でジカルボキシイミド高度耐性菌が問題とならない理由の一つとされている。

### 4 有機リン系薬剤

イネいもち病防除剤として使用されている有機リン系薬剤は、ホスファチルコリン生合成系を阻害する。IBP 耐性いもち病菌が、ホスホロアミデートにより高い感受性を示すことが知られている (上杉, 1981)。IBP の作用には、P-S 開裂が活性化に、S-C 開裂が解毒に関与しているとされており、耐性のメカニズムもこれらの薬剤の代謝とかかわっている。しかし、圃場より分離される耐性菌は、ホスホロアミデートに対して負相関交差耐性を示さない。

以上に示したように、多くの殺菌剤について負相関交差耐性が報告されている。しかし、これらの例を含めて、①室内で得られた耐性菌に認められる負相関交差耐性が、圃場耐性菌では認められない。②圃場耐性菌に負相関交差耐性が認められる場合にも、耐性菌の種類が、いくつかが存在し、負相関交差耐性を示す菌の比率が低い。③上記の条件を満たしているが、既に強力な代替剤が存在するなどの場合がほとんどでその実用性は低いと考えられる。しかし、「負相関交差耐性剤」としてその実用性が実証された例として、以下に述べるベンズイミダゾール耐性菌に対するジエトフェンカルブの利用が挙げられる。

## II 「負相関交差耐性剤」ジエトフェンカルブ開発の背景

ベノミル、カルベンダジム (MBC, 図-1)、チオファネートメチル等のベンズイミダゾール系薬剤は、強い殺菌活性や治療効果を有するため広く使用されているが、灰色かび病菌などにおいて耐性菌問題が世界的に深刻化している。LEROUX et al. (1980) により、このベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌は *N*-フェニルカーバメート系除草剤 (パーバン、クロロプロファミ) に特異的に高い感受性を示すことが報告された。住友化学では、この報告をもとに *N*-フェニルカーバメート系化合物を検索し (TAKAHASHI et al., 1988 a, b, c)、灰色かび病防除剤としてジエトフェンカルブ (図-1) を開発した。ジエトフェンカルブの物理化学的性質、安全性、生物活性、混合剤等の開発状況については、久田ら (1989) の文献を参考にされたい。ここでは、ジエトフェンカルブの「負相関交差耐性剤」としての開発の背景について紹介する。

まず第一に、灰色かび病菌におけるベンズイミダゾール耐性菌の出現が世界的に深刻な問題となっていたこと、また代替剤として登場したジカルボキシイミド系殺菌剤にも耐性菌が発生し始めたことから、新しい灰色かび病防除剤への要望が高かったことが挙げられる。

第二に、日本各地より任意に灰色かび病菌を収集し、ベンズイミダゾール耐性菌約 100 株の薬剤感受性を調査したところ、例外なく *N*-フェニルカーバメートに対する負相関交差耐性が認められ、両剤間の負相関交差耐性は、灰色かび病菌において普遍的であると考えられた。

第三に、ベンズイミダゾール耐性菌及びジカルボキシイミド耐性菌のモニタリングの結果、ジカルボキシイミドの場合には、薬剤の使用を中止すると耐性菌の占める割合が比較的早期に低下する傾向があるのに対して、ベンズイミダゾール耐性菌は安定に保持されていた。

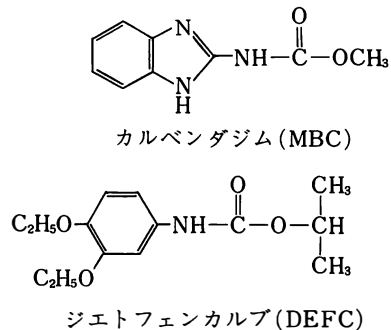


図-1 カルベンダジムとジエトフェンカルブの化学構造

第四に、理由は不明であるが、ジカルボキシイミド耐性菌の多くが、すでにベンズイミダゾール耐性を獲得しており、逆にジカルボキシイミドに単独で耐性を示す菌株の割合が有意に低いことが報告されていた(竹内, 1987)。したがって、*N*-フェニルカーバメート系薬剤の開発は、ベンズイミダゾール耐性問題の解決のみならず、ジカルボキシイミド耐性問題の軽減にも貢献できる可能性が考えられた。

第五に、比較的初期に合成された *N*-フェニルカーバメート系化合物に治療効果が認められるなど、殺菌剤の母核として比較的良好な性質を示すとともに、活性と薬害が独立している傾向が、キュウリ灰色かび病の防除効果試験において認められた(KATO et al., 1986)。

第六に、*N*-フェニルカーバメートの耐性菌に対する作用メカニズムは、ベンズイミダゾールの感受性菌に対する作用ときわめて似ていることから(SUZUKI et al., 1986)、*N*-フェニルカーバメート誘導体の最適化により高活性を持つ化合物の創製が可能であると推測された。

以上に示したように、多くの事前調査とそれに基づく発想・仮説と勢力的なスクリーニング研究により、「負相関交差耐性剤」ジエトフェンカルブは開発された。「負相関交差耐性剤」は、耐性菌に特異的に活性を示す性質上、単剤での使用には限界がある。ジエトフェンカルブの場合にもベンズイミダゾール系薬剤及びジカルボキシイミド系薬剤との混合剤として、ゲッター®(チオファネートメチルとの混合)、Sumico®(カルベンダジムとの混合)、スミブレンド®(プロシミドンとの混合)が開発され、いずれも高い評価を得ている。

### III 負相関交差耐性のメカニズム

ベンズイミダゾールと *N*-フェニルカーバメートの間の負相関交差耐性のメカニズムは、筆者らによりアカパンカビを用いて解析された。

#### 1 負相関交差耐性株の単離と解析

アカパンカビの野生株から紫外線処理により単離した MBC 耐性 F 914 株は、野生株と比較して、ジエトフェンカルブ(DEF C)に 1,000 倍以上の感受性を示し、灰色かび病菌と同等の明確な負相関交差耐性が認められた(FUJIMURA, et al., 1992 a, 表-1)。DEF C 処理した F 914 株に特異的に認められる分生胞子の発芽管及び核の形態の異常は、MBC 処理した野生株のものときわめて類似していた。さらに <sup>14</sup>C-DEF C を用いた DEF C 結合蛋白質の検索から、DEF C は負相関交差耐性株(F 914 株)のチューブリン(微小管の構成タンパク質)に特異的に結合すると考えられた(FUJIMURA et al., 1992 b)。また、F 914

表-1 ベンズイミダゾール耐性株に対するジエトフェンカルブの抗菌活性

化合物	最小阻害濃度 (μg/ml)			
	灰色かび病菌		アカパンカビ	
	Ben-S	Ben-R	Ben-S	Ben-R (F 914)
MBC	0.1	>100	0.2	>100
ジエトフェンカルブ	>100	0.1	>100	0.1

Ben-S: ベンズイミダゾール感受性(ジエトフェンカルブ耐性)株  
Ben-R: ベンズイミダゾール耐性(ジエトフェンカルブ感受性)株

株の遺伝解析の結果から、MBC 耐性と DEF C 感受性という二つの形質は  $\beta$ -チューブリン遺伝子の変異により同時に起こることが判明した。ベンズイミダゾール系薬剤は菌のチューブリンと結合することにより細胞分裂を阻害するとされているが(DAVIDSE and FLACH, 1977)、以上の結果から、負相関交差耐性は  $\beta$ -チューブリン遺伝子の変異により起こり、DEF C は変異したチューブリンに結合すると考えられた。

#### 2 負相関交差耐性の分子機構

負相関交差耐性株(F 914 株)の  $\beta$ -チューブリン遺伝子の単離とその解析から、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸のグルタミン酸からグリシンへの 1 置換が負相関交差耐性を担っていることが明らかとなった(FUJIMURA et al., 1992 c)。さらに DEF C 中等度耐性(復帰突然変異)株の  $\beta$ -チューブリン遺伝子の解析及び人為的変異導入法により作製した  $\beta$ -チューブリン遺伝子の解析から、198 番目のアミノ酸置換が負相関交差耐性を支配しており、DEF C 感受性はグルタミン酸<リジン<アラニン<グリシンの順に高くなり、一方、198 番目がグルタミン酸でない場合はいずれも MBC 高度耐性を示すことがわかった。また、DEF C 中等度耐性株において認められた 198 番目以外でのアミノ酸置換は、既知のベンズイミダゾール耐性変異と同一置換であるかその近傍のアミノ酸置換であった(藤村ら, 1992)。すなわち、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目以外の第二の変異は単独で、DEF C 耐性と MBC 耐性を同時に支配していると推定された。

以上のことから、次のようなモデルを提唱している(図-2)。ベンズイミダゾールと *N*-フェニルカーバメートは、類似した化合物群に属し、 $\beta$ -チューブリン上の結合部位を共有しているが、両化合物群間の負相関交差耐性は 198 番目のアミノ酸残基の性質により決定されている。ベンズイミダゾールが結合するためには、イミダゾール環の窒素原子と 198 番目のグルタミン酸残基の -COOH との相互作用が必須であるために、この置換は

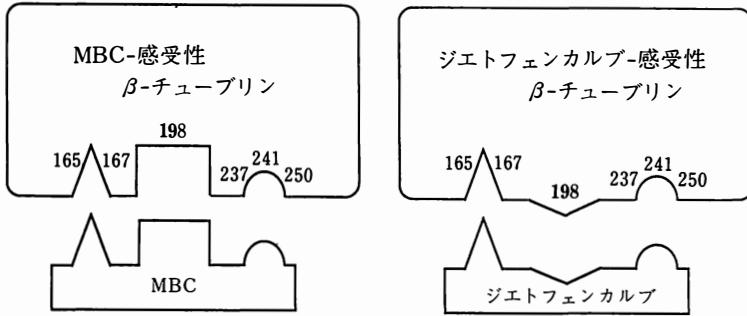


図-2 MBCとジエトフェンカルブのβ-チューブリン結合モデル

いずれもMBC高度耐性を支配する。一方、DEFCに感受性を示すためには、198番目のグルタミン酸が置換することが必要であり、置換アミノ酸は、その残基の立体的な大きさが小さいものが望ましい。

3 植物病原菌における負相関交差耐性のメカニズム

最近、灰色かび病菌及びリンゴ黒星病菌等の圃場耐性株のβ-チューブリン遺伝子が単離、解析された。灰色かび病菌のベンズイミダゾール耐性変異は、β-チューブリンの198番目のアミノ酸のグルタミン酸からアラニンへの置換であることが報告された(MARTIN et al., 1992)。リンゴ黒星病菌の場合にも、ジエトフェンカルブに感受性を示すベンズイミダゾール耐性菌は、β-チューブリンのやはり198番目のアミノ酸が、グルタミン酸からグリシンあるいはアラニンへ置換していることが報告された(KOENRAADT et al., 1992)。また、β-チューブリンの198番目以外のアミノ酸置換は、ジエトフェンカルブ感受性に関与しないことが報告され、筆者らがアカパンカビを用いて提案したモデルと基本的に良く一致している。

おわりに

以上、殺菌剤における負相関交差耐性の例について紹介するとともに、「負相関交差耐性剤」ジエトフェンカルブの開発の背景とその殺菌メカニズムについて示した。ジエトフェンカルブの開発は、負相関交差耐性の利用が耐性菌問題の打開の手段となりうることを示しており、今後も「負相関交差耐性剤」の開発が期待される。しかしながら、「負相関交差耐性剤」の開発のためには多くの条件が満たされていることが必要であり、ジエトフェンカルブはむしろそのまれなケースと考えられる。いずれにしても、今後の「負相関交差耐性剤」の開発に際しても圃場におけるモニタリングやそのメカニズム等の綿密な

事前調査が必要である。一方、負相関交差耐性は、殺菌剤の作用メカニズムの解明の糸口を与えてくれるとともに、その分子レベルでの解明は、化合物とそのターゲット蛋白質の相互作用をより一層明確にする情報を提供すると考えられ、これらの情報をもとにした新しい殺菌剤の創製の可能性も期待される。

引用文献

- 1) BEEVER, R. E. and R. J. W. BYRDE (1982) : Fungicide Resistance in Crop Protection, Pudoc, Wageningen, 101~117.
- 2) DAVIDSE, L. C. & W. FLACH (1977) : J. Cell Biol. 72 : 174~193.
- 3) De WAARD, M. A. (1984) : Proc. Brit. Crop Protec. Conf. 6B-2.
- 4) FUJIMURA, M. et al. (1992a) : Current Genetics 12 : 399~404.
- 5) ——— et al. (1992b) : J. Pestic. Sci. 17 : 237~242.
- 6) ——— et al. (1992c) : Pestic. Biochem. Physiol. 44 : 165~173.
- 7) 藤村真ら(1992) : 日本農薬学会第17回大会講要, 福岡 : A 112.
- 8) 久田芳夫・藤村真(1989) : 植物防疫 43(11) : 590~594.
- 9) KATO, T. et al. (1984) : J. Pestic. Sci. 9 : 489~495.
- 10) KOENRAADT, H. et al. (1992) : Phytopathology 82 : 1348~1354.
- 11) LEROUX, P. and M. Gredt (1980) : Weed Res. 20 : 249~254.
- 12) ——— (1992) : Resistance '91 Achievements and Developments in Combating Pesticide Resistance, Elsevier Applied Science, London and New York, 179~189pp.
- 13) MARTIN, L. A. et al. (1992) : Proc. Brit. Crop Protec. Conf. 3C-8.
- 14) STAUB, T. (1991) : Ann. Rev. Phytopathol. 29 : 443~467.
- 15) SUZUKI, K. et al. (1984) : J. Pestic. Sci. 9 : 497~501.
- 16) TAKAHASHI, J. et al. (1988a) : ibid. 13 : 63~69.
- 17) ——— (1988b) : Pestic. Biochem. Physiol. 30 : 262~271.
- 18) ——— (1988c) : J. Pestic. Sci. 13 : 587~593.
- 19) 竹内妙子 (1987) : 千葉農試特報 14 : 75 pp.
- 20) UESUGI, Y. (1981) : J. Pestic. Sci. 6 : 239~246.
- 21) WHITE, G. A. et al. (1978) : Pestic. Biochem. Physiol. 9 : 165~182.