

新規 *N*-ピリミジニルアニリン系化合物, メパニピリムとその作用機構

クミアイ化学工業株式会社生物科学研究所 三 浦 一 郎

はじめに

現在使用されている殺菌剤の作用機構をみると、プロベナゾールのような植物側に作用して全身獲得抵抗性を賦与する薬剤(山口・関沢, 1993)は別にして病原菌側に作用するものでは呼吸阻害剤が最も多い。これは除草剤や殺虫剤と比較して大きく異なる点で、殺菌剤の特徴であろう。呼吸阻害剤に位置づけられるものはSH基阻害剤から現在開発中のメトキシアクリレート系殺菌剤まで幅広いが、殺菌剤の作用機構の解明は、薬剤の特徴を明らかにするだけでなく、安全性や適正な施用方法、そして耐性菌対策などの面からも重要である。

ところで、灰色かび病では薬剤耐性菌が深刻な問題となっており、ベンズイミダゾール系とジカルボキシイミド系薬剤に対する複合耐性菌が出現し、さらに、*N*-フェニルカーバメート系薬剤にも効かない多剤耐性菌(RRR菌)の存在も報告されている(山田ら, 1992)。このような状況下では従来のものとは作用機構の異なる殺菌剤の開発が待望されている。

メパニピリム(商品名:フルピカ)は、クミアイ化学工業とイハラケミカル工業により創製された新規 *N*-ピリミジニルアニリン系殺菌剤である。ピリミジン骨格の生理活性に興味を抱いて種々の展開を図った結果、2-アニリノピリミジン誘導体が優れた植物病害防除活性を示すことを見だし、図-1に示した化学構造を有するメパニピリムを選抜した(増田ら, 1990; 永田ら, 1990; 増田ら, 1991)。昭和62年(1987年)からKUF-6201という試験コードで日本植物防疫協会の委託試験を開始し、その実用性が各種灰色かび病, リンゴ黒星病, リンゴ斑点落葉病, ナシ黒星病, モモ灰星病, モモ黒星病及び各種うどんこ病などで認められている。

ここでは、メパニピリムの作用機構について、特に従来の殺菌剤とは異なるユニークな作用を有する点を中心に紹介したい。

I メパニピリムの作用特性

殺菌剤の特性をみる場合、病原菌の伝染環のどこを強

く阻害するかを調べることはその薬剤の特徴を把握するだけでなく、薬剤の適正な使用方法を明確にする点からも重要である。予防効果が主体の薬剤なのか、治療効果も有するのかを明らかにするだけでなく、胞子形成阻止作用が強い場合には2次伝染を妨げるという防除上重要な知見が得られる。呼吸系に作用する殺菌剤の多くは胞子発芽阻止活性が強く、これが予防効果発現に貢献しているように、多くの殺菌剤は胞子発芽阻止力ないし菌糸生育阻止力が強く、ポット試験レベルの防除効果発現濃度より遙かに低い濃度でこれらを阻害する。しかし、メパニピリムの場合、図-2に示したように、胞子発芽阻止力はほとんどなく、菌糸生育阻止力もあまり強くない。菌糸生育阻止力は薬量反応曲線(D-R曲線)の勾配がきわめて緩やかであり、最小生育阻止濃度(MIC)が取れない点の特徴である。もとよりD-R曲線の勾配が緩やかであるため、例えばED₅₀を求めると、かなり低い

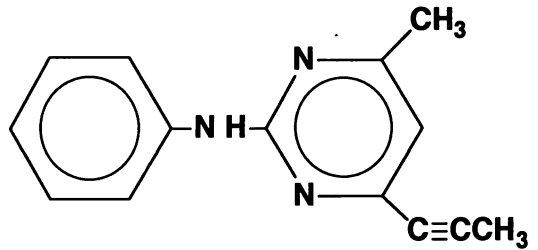


図-1 メパニピリムの化学構造

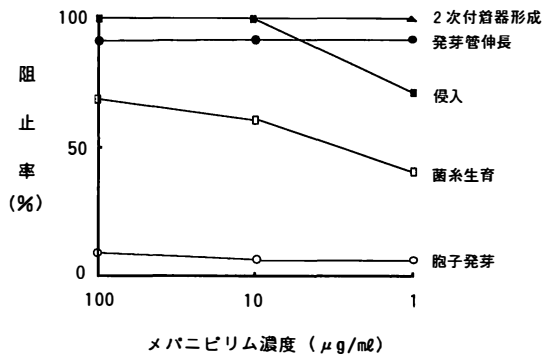


図-2 灰色かび病菌 (*B. cinerea*) の胞子発芽, 発芽管伸長, 2次付着器形成, 侵入及び菌糸生育に対するメパニピリムの阻止作用

値となるが、基本的には菌糸生育阻止力は弱いと考えた方が妥当であろう。図-2はメパニピリムの対象病原菌の一つである灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の例であるが、リング黒星病菌などでも傾向は同じである(前野ら, 1992)。一方、発芽管伸長や2次付着器形成、侵入に対する阻止作用はかなり強い。

しかし、これらの作用は「阻止」というより「遅延」という方が的確と思われる。例えば、発芽管伸長阻止作用や菌糸生育阻止作用を経時的に観察すると、メパニピリム存在下でも少しずつ生育が進行している。2次付着器形成阻止作用も図-3に示したように、薬剤処理48時間後には1 $\mu\text{g/ml}$ で完全に阻害をしているのに、96時間後では2次付着器の形成が認められるようになる。ただし、100 $\mu\text{g/ml}$ 処理では168時間後でも2次付着器形成は認められなかった。もちろん、ポット試験では十分な防除効果が得られることから、メパニピリムの *in vitro* 防除効果が緩慢ということではない。ただここでは薬剤の特性として *in vitro* の阻害活性が「遅延」であることを述べておきたい。

ところで、灰色かび病の場合、ポット試験で薬剤の効力を評価するためにいろいろな接種方法が採られ、それぞれについて圃場での防除効果との相関が論議されてい

るところが、メパニピリムの場合、接種方法により防除効果が異なる。図-4はキュウリ灰色かび病防除効果試験であるが、メパニピリムは孢子接種法では高い防除効果を示す。しかし、平板培養で生育させた菌叢をコルクボーラーで打ち抜き接種する「菌叢ディスク接種法」では防除効果はあまり高くない。「孢子接種法」は簡便な手段として田中・木曾(1991)のキュウリ子葉・ペーパーディスク法を使用しているが、キュウリ本葉やトマトなどを使用した噴霧接種でも傾向は同様である(長谷川ら, 1992)。このことは、様々な接種方法によるポット試験の結果と圃場試験の結果との相関が問われる中、菌叢ディスク接種法は必ずしも十分ではなく、薬剤の評価方法として複数の接種方法を併用することが大切であるという、新たな知見を提示していると考えられる。菌叢ディスク接種法だけに頼っていたならば、薬剤のスクリーニングの過程でメパニピリムを選抜することは恐ろしくなかったであろう。

II メパニピリムの作用機構

殺菌剤の作用機構解明においては化学構造から比較的容易に類推可能な場合を除いて、特に新規骨格では植物病原菌に対する形態的な変化に関する情報が有効となる。ポリオキシンの場合の発芽管膨潤作用がキチン生合成阻害作用の解明に繋がったり(江口ら, 1968)、トリシクラゾールによる菌叢の赤褐色化がメラニン生合成阻害作用の解明の引金となったように(YAMAGUCHI et al., 1982)、薬剤の作用機構と関連づけられた重要な形態観察の例は多い。しかし、メパニピリムの場合は灰色かび病菌などに形態的な変化を引き起こさない。そこで、やむなく一般的なアプローチ方法として、呼吸系や高分子生合成系への影響を調べることから開始した。

ところが、メパニピリムは100 $\mu\text{g/ml}$ でも呼吸系やDNA, RNA, タンパク質, 脂質, 及び細胞壁の生合成系への影響がほとんど認められなかった。ただ、その検討過程でアミノ酸やグルコースなどの菌体内への取り込みを阻害することがわかった。図-5に示したように、プラスチックSを添加し、タンパク質生合成を停止させた状態では¹⁴C標識フェニルアラニンの菌体内への取り込みを10 $\mu\text{g/ml}$ で阻害する。ただし、この作用は1 $\mu\text{g/ml}$ 以下ではほとんど認められない。また、メパニピリムは細胞内容物の漏出や細胞膜の物理的強度の変化を引き起こさないことから細胞膜の透過性に何らかの影響を与えるものの、細胞膜への直接的な破壊作用はないと推察された(MIURA et al., 1994 a)。

一般的なアプローチ法から明らかになったアミノ酸や

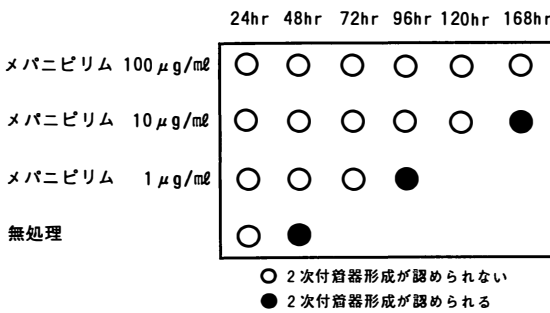


図-3 灰色かび病菌 (*B. cinerea*) の2次付着器形成に対するメパニピリムの阻止作用

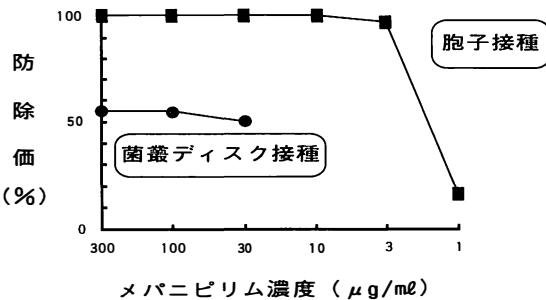


図-4 メパニピリムのキュウリ灰色かび病防除効果

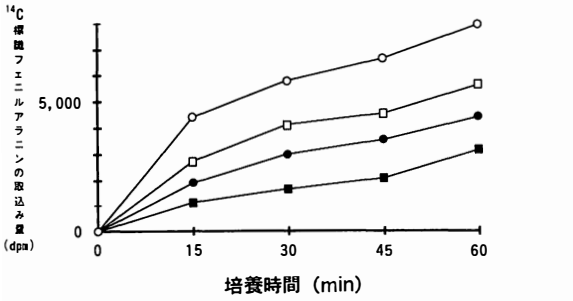


図-5 灰色かび病菌 (*B. cinerea*) におけるフェニルアラニンの菌体内取込みに対するメパニピリムの阻害作用

グルコースなどの菌体内への取り込み阻害作用は同じ N-ピリミジニルアニリン系の andoprim で報告されている阻害作用と類似している (GRUNWALDT et al., 1990)。しかし、メパニピリムの場合、アミノ酸やグルコースなどの菌体内への取り込み阻害作用は阻害濃度からみても主要な作用とは考えられず、別の作用がある可能性が高い。そこでもう一度メパニピリムの特徴を見直し、別の角度から検討を進め直すことにした。

III 宿主細胞壁分解酵素の分泌阻害作用

次のステップとしてメパニピリムが発芽管伸長に始まり、侵入するまでの菌の感染過程を強く阻害することに着目した。アミノ酸やグルコースの菌体内への取り込み阻害作用は菌体の栄養欠乏を引き起こすと考えられるため、発芽管伸長阻止作用に結び付く可能性がある。しかし、栄養欠乏という概念だけで侵入段階の阻害まで説明するのは飛躍し過ぎであろう。そこで、それまでの検討結果からは説明が困難な「侵入阻止」を重要なポイントと考えた。

植物の表面はクチクラ膜 (エピクチクラワックス, クチクラ層, クチン層) とその内側に存在するペクチン層, セルロース層からなる表層で覆われている (渡部・山口, 1993)。病原菌は侵入するためにこれらの厚い防御壁を通過しなければならないが、灰色かび病菌などでは植物の表層を分解する酵素 (宿主細胞壁分解酵素) の存在が知られている。そこで、最初にこれらの酵素活性へのメパニピリムの影響を調べたところ、表-1 に示したように、100 µg/ml でも全く影響がなかった。表-1 は灰色かび病菌の培養濾液を酵素液として使用し、酵素反応液にメパニピリムを添加した実験であるが、その検討過程で今度は、酵素液を得るための培養中にメパニピリムを添加すると、培養濾液の酵素活性が著しく低下すること

表-1 灰色かび病菌 (*B. cinerea*) の宿主細胞壁分解酵素活性に及ぼすメパニピリムの影響

メパニピリム (µg/ml)	クチナーゼ活性 (unit/ml)	ペクチナーゼ活性 (unit/ml)	セルラーゼ活性 (unit/ml)
100	0.0010	0.40	0.038
10	0.0012	0.39	0.041
0	0.0012	0.40	0.040
0.1	0.0012	0.39	0.039
0	0.0011	0.39	0.038

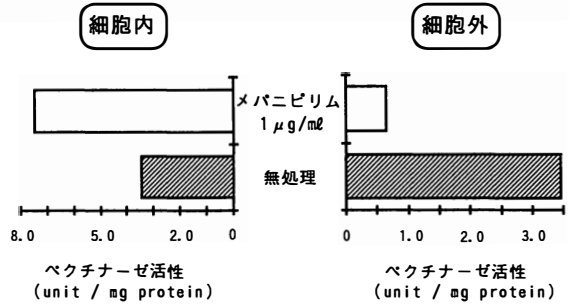


図-6 灰色かび病菌 (*B. cinerea*) のペクチナーゼ分泌に対するメパニピリムの阻害作用

がわかった。この場合、酵素活性の低下は酵素量の減少とみることができよう。なぜならメパニピリムは表-1 で示したように、酵素活性自体には影響しないはずである。考えられることは、酵素の生産 (合成) か、菌体外への分泌への阻害作用である。そこで菌体内の酵素活性 (ペクチナーゼ活性) を調べたところ、図-6 に示したように、無処理に比べ、菌体内のペクチナーゼ活性 (量) が上昇していることがわかった。しかもメパニピリム存在下では菌体外のペクチナーゼ活性 (量) が減少していることから、メパニピリムの阻害作用は酵素の生産 (合成) ではなく、菌体外への分泌段階にあることが示唆された。これはメパニピリムが高分子生合成系に影響しないことから当然かもしれない。

その後の検討でクチナーゼやセルラーゼなどの宿主細胞壁分解酵素だけではなく、インベルターゼをはじめ、多くの分泌酵素の菌体外への分泌を阻害することがわかった (MIURA et al., 1994 b)。しかし、表-2 に示したように、ナシ黒斑病菌の AK 毒素放出には影響しないのに、菌体外へのクチナーゼの分泌は阻害する。このことから単なる細胞膜の透過性の変化ではなく、分泌酵素をはじめとしたタンパク質の細胞外への転送 (分泌) 過程を特異的に阻害している可能性が窺われる。ナシ黒斑病菌の病原性発現には AK 毒素の生産と放出が必須だが、クチナーゼも重要な役割を有し、クチナーゼ欠損株の病原性

表-2 ナシ黒斑病菌のクチナーゼ分泌及び AK 毒素放出に対するメパニピリムの影響

メパニピリム ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	クチナーゼ分泌 (unit/mg protein)	AK 毒素放出 (最大希釈倍数)
1	0.009	16
0	0.303	16

AK 毒素放出は、ナシ葉に壊死斑を形成させるのに必要な培養濾液の最大希釈倍数で示した。

表-3 植物病原菌のペクチナーゼ分泌に及ぼすメパニピリムの影響

メパニピリム ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ペクチナーゼ分泌 (unit/mg protein)		
	リング斑点 落葉病菌	イネごま 葉枯病菌	キュウリ 炭そ病菌
10	0	0.38	0.26
1	0	0.29	0.28
0	0.39	0.30	0.27

が著しく低下することや、エステラーゼ阻害剤として知られている殺虫剤が病斑形成を著しく抑えることが報告されている (TANABE et al., 1988 a ; 1988 b)。メパニピリムが AK 毒素の生産・放出には影響しないが、クチナーゼの分泌を阻害してナシ黒斑病防除効果を発揮することは菌の病原性発現機構の面からも興味深い。

表-3 に示したように、ペクチナーゼ分泌阻害作用はメパニピリムの防除活性のあるリング斑点落葉病菌では灰色かび病菌やナシ黒斑病菌と同様にみられるのに対して、防除活性のほとんど認められないイネごま葉枯病菌やキュウリ炭そ病菌にはみられなかった。したがってこの宿主細胞壁分解酵素の分泌阻害作用はメパニピリムの病害防除作用と深くかかわっていると考えられる。

IV メパニピリムの作用メカニズムについての仮説

ペクチナーゼなどの分泌でみられたメパニピリムの阻害作用は一般的にタンパク質の分泌阻害作用といえよう。細胞外へ分泌されるタンパク質は粗面小胞体で糖鎖が付加された糖タンパク質であるが、この糖タンパク質はゴルジ体のシス部位、メディアル部位、トランス部位を経てトランスゴルジ網で仕分けされ、細胞膜から分泌される。この間に糖鎖はプロセッシングを受ける。糖タンパク質の転送過程は分泌タンパク質だけではなく、細胞表層を構成するタンパク質の輸送過程でもあるため、この転送段階の阻害は生育阻害に繋がる。その一つが発芽管伸長阻害作用であると考えられる。しかし、そのような作用があるのに、なぜ菌糸に対する生育阻止活性が弱いのかという点は残された課題である。また、アミノ酸

やグルコースなどの菌体内への取り込み阻害作用もメパニピリムの作用の一つと考えられるが、阻害濃度や阻害の強さからみてタンパク質の分泌阻害作用の方が重要と考えられる。

糖タンパク質の糖鎖は細胞内を輸送されるときに特定の場合で特定のプロセッシングを受けて完成することから、糖鎖構造は細胞内輸送の局面を反映していると言える。インペルターゼの活性染色電気泳動の結果、メパニピリムによって細胞内に蓄積された灰色かび病菌のインペルターゼの移動度は無処理のものに比べて若干速く、成熟型とは異なり、糖鎖が不全である可能性がある。しかし、このインペルターゼは糖鎖合成リピド中間体の形成を阻害するツニカマイシンを処理して得たアポタンパク質の移動速度とは明らかに異なることから、糖鎖プロセッシングの終わりの段階、すなわち、ゴルジ体内の転送過程の後半部分で影響を受けている可能性が高い。

ところで、図-6 に示したように、ペクチナーゼの分泌阻害作用はメパニピリム $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ でも必ずしも完全ではなく、このことが発芽管伸長への阻止作用などが完全な阻害ではなく遅延であることに結び付くと思われる。しかし、この程度の発芽管伸長の遅延作用や宿主細胞壁分解酵素の分泌阻害作用であっても実際に菌が植物体へ感染する場面では十分な力になり得ると思われる。あるいは *in vitro* におけるこれらの不完全な作用と、*in vivo* のポット試験レベルの完全な病害防除効果との間を埋める要素として、メパニピリムによる植物病原菌の感染行動の遅れが宿主側の防御機構確立への時間的猶予を与えているという考え方もあるかもしれない。

おわりに

メパニピリムはタンパク質の分泌阻害作用を有することがわかったが、このような作用を示す化合物は現在のところ、殺菌剤を含む市販農薬にはなく、メパニピリムの大きな特徴であろう。冒頭で述べたように、メパニピリムの対象病害の一つである灰色かび病では RRR 菌の存在が問題化している。メパニピリムはポット試験で RRR 菌に高い防除効果を示すことが確認されているが、複合耐性菌の存在が問題となりつつある現在、新しい作用メカニズムを有するメパニピリムは有望であると思われる。

それではメパニピリム自体に対する耐性菌はどうかという点、現在までのモニタリングでは特に感受性が低下した菌株は見つかっていない (前野ら, 1993)。もちろん、メパニピリムの過度の散布は避けるべきで、作用機構の異なる薬剤とのローテーション使用が望ましい。

ところで、菌の殺菌剤感受性はしばしば孢子発芽阻止や菌糸生育に対する MIC で判定される。ところが、メパニピリムは作用特性のところ述べてのように、孢子発芽阻止力や菌糸生育阻止力が弱い。そのため、これらの方法で検定すると、野生型感受性菌のベースラインデータの把握自体も難しく、検定したすべての菌株が低感受性菌(耐性菌)であると、間違った判定を下される可能性もある。現在のところ、着実なのは孢子接種によるポット試験での判定であるが、さらに簡便な方法について検討を行っている。感受性の検定方法の検討を含めて作用特性や作用機構の研究から得られた知見をいかに実際の防除現場で活用していくかが今後の課題であろう。

引用文献

- 1) 江口潤ら(1968) : 日植病報 34: 280~288.
- 2) GRUNWALDT, G. et al. (1990) : Pestic. Sci. 30: 323~

- 325.
- 3) 長谷川恵介ら(1992) : 同上 58: 610~611.
- 4) 前野真一郎ら(1992) : 同上 58: 610.
- 5) ———ら(1993) : 同上 59: 319.
- 6) 増田勝美ら(1990) : 日本農薬学会第 15 回大会要旨集: 58.
- 7) ———ら(1991) : 日本農薬学会第 16 回大会要旨集: 180.
- 8) MIURA, I. et al. (1994 a) : J. Pestic. Sci. 19: 103~109.
- 9) ——— et al. (1994 b) : Pestic. Biochem. Physiol. 48: 222~228.
- 10) 永田俊浩ら(1990) : 日本農薬学会第 15 回大会要旨集: 57.
- 11) TANABE, K. et al. (1988 a) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 54: 483~492.
- 12) ——— et al. (1988 b) : ibid. 54: 552~555.
- 13) 田中 薫・木曾 皓(1991) : 日植防研報 5: 17~22.
- 14) 渡部忠一・山口 勇(1993) : 植物防疫 47: 163~168.
- 15) 山田正和ら(1992) : 日植病報 58: 610.
- 16) YAMAGUCHI, I. et al. (1982) : J. Pestic. Sci. 7: 523~529.
- 17) 山口 勇・関沢泰治(1993) : 植物防疫 47: 218~221.

お知らせ

○補食・寄生性昆虫文献データベースのご紹介

平成 5 年度より、科学研究費補助金「研究成果公開促進費」(データベース)をもとに補食・寄生性昆虫研究会が行ってきた補食・寄生性昆虫文献データベースの入力作業も 2 年近くになり、文献数も 7,000 件を越えるまでになりました。この補食・寄生性昆虫文献のデータベースは、補食性昆虫と寄生性昆虫および補食性ダニに関する生理学、生態学、行動学、化学生態学、行動生態学などの分野の文献をデータベースとして入力し、これを各種のデータベースソフトで利用可能なように、テキストファイルにしてフロッピーディスク 2 枚に納めたもの(テキストファイルとして約 1.6 MB)で、著者のアルファベット順に並べた文献集と共に利用していただくことを意図したものです。現段階では、まだまだ文献のダブリ、雑誌名の不統一やキーワードの欠如、テキスト変換時の文字化けやミススペルも多いのですが、これを研究会で時間をかけて訂正するよりも早めにみなさんに利用していただき、日進月歩で増加していくデータを加えながら、ミススペル等の修正を含めて今後の改訂版へと継続していきたくと思っています。

内容に関しては、特に生物的防除に関する文献情報なども強化していき、より up to date で利用価値の高いものにしていきたくと思っています。

このデータベースの使用を希望される場合は、データベースと文献集をセットで購入していただき(実費負担)、その後利用されるときにミススペルなどの間違いがあれば、訂正箇所をコピーなどして随時事務局まで送付願えれば、それをもとに訂正し、改訂版を仕上げるつも

りですので、ご協力の程お願いいたします。詳しくは、下記事務局までお問い合わせ下さい。

補食・寄生性昆虫研究会事務局

〒305 茨城県つくば市天王台 1-1-1

筑波大学 農林学系 戒能洋一

TEL : 0298-53-4692 or 4708, FAX : 0298-53-6617

○報農会、平成 6 年度農家子弟に奨学金

財団法人報農会(吉田孝二理事長)は 1 月 31 日、平成 6 年度農家子弟への奨学金交付について審査委員会を開き、下記 5 氏に奨学金を贈ることに決めた。

この奨学金は、植物保護に関心をもち、かつ、農業後継者として科学的知識や技術を深めるために、県立農業大学校等に在籍して、優秀な研究を行った農家子弟に贈られるもので、1983(昭和 58)年度に発足して以来、今回は 12 回目に当たる。受賞者は延べ 53 校、53 名におよんでいる。なお、奨学金は各 10 万円で、それぞれの在籍大学校長から、賞状とともに授与される。

- 乾田直播栽培水稻における効率的な雑草防除法: 福島県立農業短期大学校農産学科 2 年 鈴木雄樹
- さつまいものつる割病に対する生物防除の実用性について: 栃木県農業大学校生活科 2 年 金澤早苗
- ナスの難防除害虫(アブラムシおよびミナミキイロアザミウマ)に対する薬剤の防除効果と薬害の検討: 岐阜県農業大学校園芸学科 2 年 後藤昌人
- 香川県におけるイネいもち病の発生推移とレースの変遷: 香川県立農業大学校農産課程 2 年 真鍋忍
- 水稻育苗箱施用剤の利用による本田でのウンカ類の防除: 福岡県農業大学校農業自営科 2 年 川口太