

特集：プラントアクティベーター

## プロベナゾールの開発経過・作用機作

明治製菓(株)生物産業研究所 <sup>いわ</sup>岩 <sup>た</sup>田 <sup>みち</sup>道 <sup>あき</sup>顕

## はじめに

最近、抵抗性誘導型の植物病害防除剤が注目を集めている。それは、抵抗性誘導型の防除剤は、耐性菌出現の可能性が低い、非標的生物に対する影響が少ないなどの特徴のほかに、作用機作が植物の自然免疫機能そのものに関わっていることが明らかになりつつあるからである。そのため、農業・農薬関係者ばかりでなく、植物の生理・生化学研究者からも注目されているのである。

抵抗性誘導型の防除剤が注目を集めることになった背景としては、1974年に弊社がプロベナゾールを有効成分とするオリゼメート粒剤を農薬登録して以来30余年にわたる防除剤としての使用実績と、弊社研究陣による作用機作研究の積み重ねがある。最近では、世界の化学会社が新たな抵抗性誘導剤の探索研究を行っており、また、多くの研究者が植物の病害防御システムを解析するための実験材料の一つとして抵抗性誘導剤を用いている。

抵抗性誘導型の防除剤は、作用機作研究が進んでいなかったころはメラニン生合成阻害剤などとともに「非殺菌性殺菌剤」と呼称されていたが、近年はこれらと区別されている。また最近では、抵抗性誘導型の防除剤はいくつかの定義の基に「プラントアクティベーター」と呼称されているが、筆者は「プラントディフェンスアクティベーター」のほうがより薬剤の性状を表現しているのではないかと考え、この名称を用いるようにしている。

本稿では、プロベナゾールの探索とその後の開発過程および作用機作について紹介する。

なお、プロベナゾールの開発と作用機作および他の薬剤も含めた抵抗性誘導剤の総説に関しては、筆者の拙著も参考とされたい(岩田, 2003; 岩田, 2004)。

## I プロベナゾールの開発経過

## 1 プロベナゾール創出の発端

プロベナゾールを創出することになった発端は、探索

担当者の観察力と感性にあったと筆者は整理している。1966年当時、弊社におけるいもち病防除剤のスクリーニングは、カスガマイシン発見の教訓に学び、いわゆる“ぶっかけ試験”で行っていた。カスガマイシンは植物を用いた接種試験で非常に高い防除効果示すことにより発見された抗生物質であったが、発見当初はいもち病菌に対する抗菌力を見出せていなかった。そのことから、シャーレ試験(抗菌試験)で一次選抜した物質についてのみ植物接種試験を行う探索方法では、有用な化合物を見逃してしまう可能性があることが明らかになったわけである。抗菌活性に関する情報が全くない物質を対象にして行う“ぶっかけ試験”では、植物体上で起きている現象だけが唯一の情報であるため、探索担当者は必然的に観察力が養われていくことになる。

そのような中で、弊社研究所では、たまたまある抗生物質について種々の塩を調製し接種実験を行っていた。探索担当者は、ある塩を処理したイネを観察したときに塩そのものが防除活性をもっているのではないかと感触をもった。防除価として数値化すると、塩をもつ抗生物質とまたない遊離の抗生物質とはわずかな違いでしかなかったが、繰り返し実験で塩そのものの効果を確認し、それを合成研究のリード化合物とするに至ったのである。元々は塩そのものの防除活性を評価するのが試験の目的ではなかったが、探索担当者は、体験的にわずかな違いを見逃さなかったのである。確かな観察力の大切さを示す実例である。

図-1に、その塩の防除効果を確認するために行った1966年9月21日付の試験結果を示す。この試験で、塩自身にも防除活性があることが確認されたのである。また、抗生物質を塩として処理した場合にわずかに防除効果が高くなっていることも読み取れる。最初の試験で探索担当者はこれを塩自身の防除作用によるものと解釈したのである。

図-1に示された程度の防除効果を示す薬剤は、現在では殺菌剤のリード化合物としての価値はないと判断される。しかし、この当時は、このレベルでもリード化合物として選抜されたのである。今日では、抵抗性誘導型の防除剤を探索する場合は、通常の殺菌剤と異なる探索方法と選抜基準が一般的に採用されている。

Story of Development of a Plant Defense Activator Probenazole and its Mode of Action. By Michiaki IWATA

(キーワード: プロベナゾール, オリゼメート, 抵抗性誘導剤, プラントディフェンスアクティベーター, 作用機作, イネいもち病, 酸化型脂肪酸, アブジジン酸)

## 2 プロベナゾールの開発とオリゼメート粒剤の誕生

塩に防除効果が見出されたことで開始された構造活性  
 相関研究の結果、程なくベンゾイソチアゾール骨格をも  
 つプロベナゾールが合成され、開発化合物として選抜さ  
 れた。当初は、散布剤として開発しようとしていたの  
 で、日本植物防疫協会に委託して行った圃場試験では、  
 水和剤と粉剤を供試した。しかし間もなく弊社研究陣  
 は、プロベナゾールは茎葉散布処理よりも、根を介して  
 吸収させたほうがより高い防除効果が得られることを見  
 出した。当時まだ使用実績の少なかった粒剤の製造にも  
 成功し、1969 年からは水面施用剤として開発を開始し

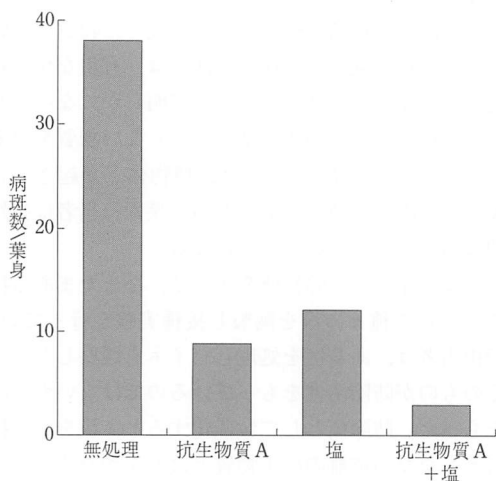


図-1 塩の病害防除効果確認試験  
 1966 年 9 月 21 日付の社内試験データ。

た。同時にプロベナゾールを有効成分とする製剤の商品  
 名を、オリゼメート粒剤と命名した。

オリゼメート粒剤の最適施用量、施用適期について  
 は、ポット試験の結果からは判断することが難しく、  
 1970 年度、71 年度に全国規模で行われた日本植物防疫  
 協会の「農薬の新施用法に関する特別研究」の中で、よ  
 うやく基礎的でかつ実用的なデータが得られた。また、  
 この特別研究の中で、オリゼメート粒剤はこれまでの薬  
 剤より葉いもち防除効果と、残効性に優れているという  
 特徴をもつことが実証された。

オリゼメート粒剤は、1974 年 4 月 24 日付でいもち病  
 防除剤として農薬登録された。しかし、翌年に試売はした  
 ものの本格発売は 1976 年になってからである。1973 年  
 末からの第一次オイルショックでプロベナゾールの原料  
 となる石油製品が高騰し、それに伴い発売を見合わせた  
 ためである。オリゼメート粒剤にとっては幸運なこと  
 に、発売は見合わせていたが継続していた展示圃試験地  
 でたまたまいもち病が大発生し、本剤がいもち病に対し  
 卓越した防除効果を示すことが観察された。プロベナゾ  
 ールは、これまでの殺菌性を有する薬剤とは異なった圃  
 場効果をもつ薬剤であることが認識されたのである。同  
 時に弊社研究陣は、プロベナゾールはポット試験の結果  
 からは予測できないほどの優れた圃場性能を有する薬剤  
 であることを体験したのである。

## 3 適用病害の拡大

いもち病防除剤としてオリゼメート粒剤が全国に普及  
 するにつれて、いもち病以外の病害にも効くらしいとい  
 う情報が弊社に届くようになった。農業試験場や農業改

表-1 オリゼメート粒剤の主な適用病害

| 病害           | 宿主植物   | 病原菌 <sup>a)</sup>                                      |
|--------------|--------|--------------------------------------------------------|
| いもち病         | イネ     | <i>Magnaporthe grisea</i> (F)                          |
| 白葉枯病         | イネ     | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (B)        |
| もみ枯細菌病       | イネ     | <i>Burkholderia glumae</i> (B)                         |
| 穂枯れ (ごま葉枯病菌) | イネ     | <i>Cochliobolus miyabeanus</i> (F)                     |
| 斑点細菌病        | キュウリ   | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> (B)  |
| 腐敗病          | レタス    | <i>P. cichorii</i> (B)                                 |
| 斑点細菌病        | レタス    | <i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i> (B)            |
| 黒腐病          | キャベツ   | <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (B)         |
| 黒腐病          | ブロッコリー | <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (B)         |
| 軟腐病          | ハクサイ   | <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (B) |
| 軟腐病          | ネギ     | <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (B)      |
| 軟腐病          | カリフラワー | <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (B)      |
| 斑点病          | ピーマン   | <i>Cercospora capsici</i> (F)                          |
| うどんこ病        | ピーマン   | <i>Oidiopsis sicula</i> (F)                            |

<sup>a)</sup> F: 糸状菌, B: 細菌。

良普及所の研究員・技術指導者が、オリゼメート粒剤を処理した水田でいもち病以外の病害状況も同時に観察・調査しているときに発病の違いに気付いた例が多かった。また、難防除病害を防除するために、様々な薬剤を使ってみたり色々工夫しているときに、オリゼメート粒剤の効果を発見した例もあった。共通しているのは、確認試験を繰り返し行い、試験結果に確信を得てから弊社に情報提供してくださっている点である。最初の例は、イネ白葉枯病についてであり、次は、キュウリ斑点細菌病についてであった。

このような情報を基に、これまでに、いもち病以外に農業登録され適用拡大された病害の主なものを表-1に示す。

適用病害が多岐にわたっているのは、プロベナゾールは宿主植物の防御システムを活性化するため、病原菌の分類学上の位置に関係なく広い範囲の病害を防除することができるためと考えられる。

## II プロベナゾールの作用機作

### 1 植物の感染防御システムを活性化していることを発見

前章までに述べた開発経過から明らかのように、プロベナゾールは抵抗性誘導型の薬剤を志向して創出されたわけではない。もっぱらポット試験による評価を繰り返して選抜されたプロベナゾールが、結果的に抵抗性誘導を主たる作用メカニズムとする化合物であったのである。開発した当時は、学会誌などで抵抗性を誘導する物質があることは報告されていたが、それは研究材料としての位置づけでしかなく、抵抗性誘導剤が圃場で本格的に防除剤として使用されたことはなかった。したがって、開発した当初は、プロベナゾールはいもち病菌に対し抗菌作用をもたない作用機作不明の化合物であり、その作用メカニズム研究は暗中模索で手探り状態であった。

様々な作用メカニズム解析研究の中で、いもち病菌に対する直接的な作用ではプロベナゾールの防除効果を説明することができないことが次第に明らかになってきた。ヒートショック試験によりプロベナゾールの防除効果発現に植物の機能が関与していることが示唆され、さらに、プロベナゾールで処理されたイネにいもち病菌を感染させるとイネの感染防御系が亢進する実験結果が次々と得られた (WATANABE et al., 1979 ; IWATA et al., 1980)。

それらは現象的には、

- ①スーパーオキシドなどの活性酸素種の生成による細胞死の誘導

- ②ファイトアレキシンや酸化型不飽和脂肪酸などの抗菌物質の産生

- ③リグニン化による物理的障壁の形成

とまとめることができる。イネに非親和性の関係にあるいもち病菌を接種した場合にもこれらと類似した現象が観察される。さらによく観察すると、親和性の菌を接種した場合も、時間が遅れるが同じような現象が観察される。筆者は、いもち病の場合、非親和性か親和性かの違いは、現象的にはイネの抵抗反応の開始が早いか遅いかであると考えている。プロベナゾールを処理したイネでは、親和性の関係にあるいもち病菌を接種した場合にも、非親和性の場合と同様に速やかに上述の反応が進行するように観察される。また、プロベナゾールで処理されたイネは、病原菌の侵入に対し敏感になっているように思われる。このようなことから、プロベナゾールの作用機作は、植物の病害抵抗性を誘導することにあると結論付けたのである。

筆者らの研究グループは、プロベナゾールを処理したイネにいもち病菌を接種すると、抗菌性のある酸化型不飽和脂肪酸がイネ体内で蓄積することを見出し (SHIMURA et al., 1983), その生合成経路も推定した (図-2)。オクタデカノイド系で合成されるこの酸化型不飽和脂肪酸は、非親和性の関係となるようにいもち病菌を接種し抵抗反応を誘導させると、プロベナゾールを接種していなくとも蓄積する。図-2に示したように、水酸化不飽和脂肪酸が合成される過程で過酸化脂肪酸を経由するが、過酸化脂肪酸も一種の活性酸素と見なすことができる。また、ここで合成された脂肪酸は、植物の抵抗性誘導に関与しているとされるジャスモン酸 (植物ホルモンの一種) の生合成の原料となるものである。

### 2 プロベナゾールで誘導されるイネ遺伝子

プロベナゾールは、病原菌が侵入する際に宿主植物の防御システムを活性化することから、防御に関連した遺伝子の発現を制御していると考えられる。これまでに、プロベナゾールで誘導される遺伝子として *PBZ1*, *RPR1* などの新規遺伝子がクローニングされており、さらにいくつかの遺伝子についても研究が行われている。しかし、これらの研究では解析対象の遺伝子が限定的であり、プロベナゾールの抵抗性誘導のメカニズムの全貌を解明するまでには至っていない。

筆者らは、Agilent 社から 21,495 種の遺伝子が搭載された Rice Oligo Microarray が初売されたのを機に、プロベナゾールによって制御を受けるイネ遺伝子の網羅的解析を行った (岩田ら, 2007)。その結果を要約すると、①マイクロアレイスライドに搭載されている遺伝子のう

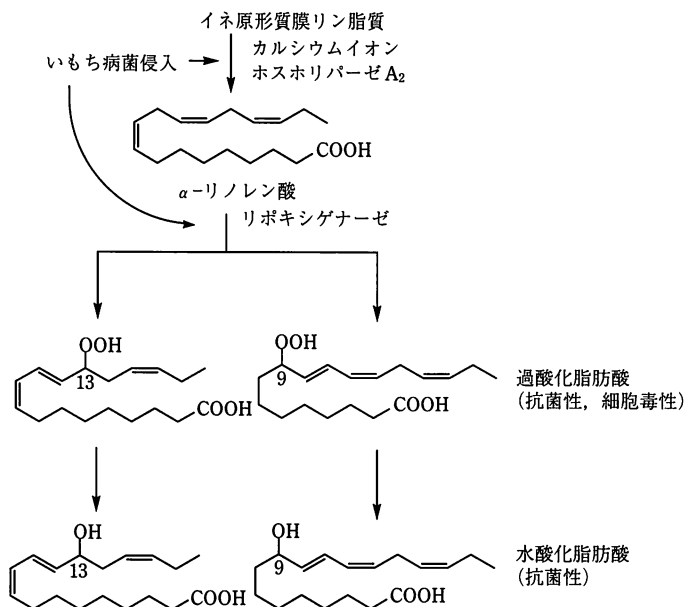


図-2 プロベナゾール処理イネで蓄積する酸化型脂肪酸の推定合成経路

ち, 1,988 種がプロベナゾール処理後に発現が変動した, ②その発現変動は, 処理 4 時間後から既に観察され, 抗酸化, 防御, シグナル伝達, 植物ホルモン代謝, 薬剤排泄等に関わる遺伝子 (計 212 種) が活性化され, 光合成, シグナル伝達等に関わる遺伝子 (計 203 種) が抑制されていた, ③処理 168 時間後には光合成, シグナル伝達, 防御, 抗酸化に関わる遺伝子が活性化され (計 593 種), 防御, シグナル伝達, 抗酸化に関わる遺伝子 (計 407 種) が抑制されていた, ④チトクローム P450, グリオキシル酸アミノ転移酵素 (GA), アントシアニン 5-芳香族アシル基転移酵素, グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST), サリチル酸グルコシル転移酵素 (SA-GTase), UDP-グルコース: グルコシル転移酵素 (GT) などの遺伝子は解析した全期間を通じて強い誘導が認められた, ⑤ NBS-LRR タイプの病害抵抗性遺伝子ホモログ, 乾燥応答性エレメント結合タンパク (DRE), ジンクフィンガータンパク (ZF) などは処理 72 時間後までは強く抑制されていたが, 120 時間後以降は逆に活性化された, などである。

これらの結果は, プロベナゾール処理によって多くの遺伝子の発現が複雑に制御されることを示すとともに, プロベナゾールによる病害防御システムの確立には, 処理直後から多くの遺伝子が関与していることを示している。個々の遺伝子の発現制御と抵抗性誘導との関わりについての解析は, 今後の課題である。

### 3 プロベナゾールに対する耐性菌出現の可能性が低い理由

殺菌剤に対する耐性菌出現の原理は, プラスミドによる耐性遺伝子の水平移動を除けば, 突然変異により生じた低感受性の病原菌が薬剤により選抜されて顕在化することにある。医療分野, 農業分野を問わずそれまで使用していた薬剤に対して耐性菌が出現し, 治療上・防除上大きな問題となることがある。

抗菌活性を実質的にもたないプロベナゾールをはじめとする抵抗性誘導剤は, 変異した病原菌を直接選抜することはない。しかし, 抵抗性誘導剤といえども, 耐性菌出現の可能性はゼロであるとは言えない。それでは, どのような性状を獲得した場合に病原菌は抵抗性誘導剤に対し耐性となるのであろうか。それは, 抵抗性誘導剤により誘導される様々な防御システムのすべてに対し非感受性となった場合である。そして, 非感受性菌が, 抵抗性誘導剤を処理した宿主植物上で選抜された場合に耐性菌として顕在化する。プロベナゾールにより誘導される防御システムについては, 上述したとおりである。プロベナゾールで処理されたイネにいもち病菌が侵入することができるのは, 具体的には, 活性酸素種を無毒化する能力を獲得するとともに, ファイトアレキシン (モミラクトン類, ファイトカサン類, オリザレキシン類等), 酸化型脂肪酸, PR タンパクなどすべての抗菌性物質に対して同時に耐性となった場合である。さらには, リグ

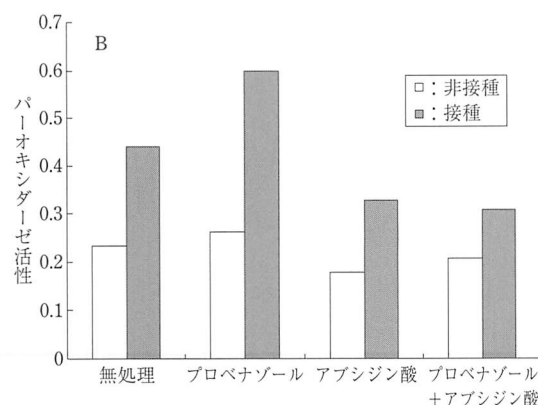
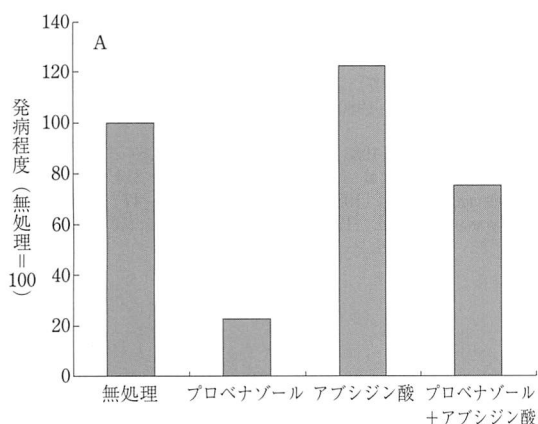


図-3 アブシジン酸がプロベナゾールの抵抗性誘導に及ぼす影響

A：イネいもち病防除効果，B：パーオキシダーゼ活性。接種 48 時間後に測定。プロベナゾール灌注処理 5 日後にいもち病菌を接種。接種 4 時間前にアブシジン酸 (25 ppm) を散布処理。

ニ化された細胞壁のような物理的障壁を突破できる能力も獲得した場合である。しかし、現実には、ここに述べたようなプロベナゾールで誘導される様々な防御システムのすべてを打ち破ることのできる病原菌が自然界で出現する確率は極めて低いと考えられる。実際に、プロベナゾールの製剤が発売されてから 30 余年経過したが、いまだに耐性菌が出現したとの報告はない。

#### 4 プロベナゾールの作用と植物ホルモン

植物ホルモンが、イネの抵抗性誘導に関与していることが知られている (MATSUMOTO et al., 1980 ; IWATA et al., 1981)。その中で、アブシジン酸 (ABA) は他の植物ホルモンとは異なり、非親和性の抵抗反応を抑制することが観察されている。図-3 は、1980 年に行った実験の結果である。ABA の水溶液 (25 ppm) をいもち病菌接種

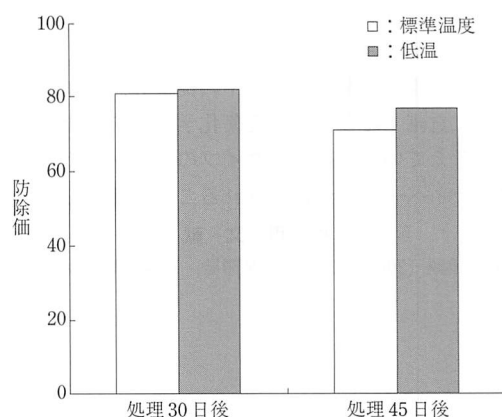


図-4 低温下におけるプロベナゾールのイネいもち病防除効果

低温：仙台市の 1981 年の気温 (昼間温度 15 ~ 25℃, 夜間温度 8 ~ 17℃), 標準温度：仙台市の平年気温 (昼間温度 20 ~ 29℃, 夜間温度 10 ~ 21℃). ファイトトロン内でワグネルポット栽培した 'ササニシキ' に移植 46 日後にオリゼメート粒剤を水面施用。パンチ付傷法により接種。オリゼメート粒剤技術資料 (明治製菓, 1987) 記載のデータから作図。

の 4 時間前に散布処理すると、プロベナゾールの防除効果が低下しパーオキシダーゼの活性化も抑制された。一般的に ABA は乾燥や低温ストレスにより誘導的に合成されることが知られている。しかし植物体内の ABA 濃度は極めて低く、数~数十 ng/g レベルである。さらに、これまでにを行った冷害を想定した低温処理試験でも、プロベナゾールは十分に高い防除効果を発現している (図-4)。これらのことは、例え環境ストレスを受けてイネ体内で ABA が合成されたとしても、実質的にプロベナゾールの防除効果は期待通りに得られることを明示している。

#### おわりに

プロベナゾールは、結果的に世界で初めて実用化された抵抗性誘導剤であった。ここに紹介したプロベナゾールの開発過程、作用機作研究が、その後に登場した抵抗性誘導剤の開発、作用機作研究に少なからず役立っていると思われる。新たに開発した薬剤の適用可能な病害の範囲を予測したり、抵抗性誘導反応のチェックポイントをトレースすることができるからである。弊社で開発したプロベナゾールが、その後の抵抗性誘導剤の探索研究に役立ち、そのことにより稲作農家が使用する薬剤の選択肢が広まったとするなら、望外の喜びである。植物の基本的な機能を活性化することによって病害を防除する

薬剤は、耐性菌出現の可能性が少ない、非標的生物に対する影響が軽微であるなどの特徴をもっている。筆者は、このような優れた薬剤を世の中に提供し、農作物の安定的生産に貢献することが、農薬化学会社の社会的使命の一つと考えている。新しいタイプのプラントディフェンスアクティベーターが創生されることを期待している。

### 引 用 文 献

1) 岩田道顕 (2003) : 日本の農薬開発, 日本農薬学会, 東京, p.

195 ~ 208.

2) ——— (2004) : 次世代の農薬開発, ソフトサイエンス社, 東京, p. 161 ~ 170.

3) ———ら (2007) : 日本農薬学会第 32 回大会講演要旨集 : 66.

4) IWATA, M. et al. (1980) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 46 : 297 ~ 306.

5) ——— et al. (1981) : ibid. 47 : 646 ~ 653.

6) MATSUMOTO, K. et al. (1980) : ibid. 46 : 307 ~ 314.

7) SHIMURA, M. et al. (1983) : Agric. Biol. Chem. 47 : 1983 ~ 1989.

8) WATANABE, T. et al. (1979) : J. Pesticide Sci. 4 : 53 ~ 59.

## ！発行図書！

### 「農薬概説 (2007)」

監修 農林水産省消費・安全局 農産安全管理課, 植物防疫課

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

B5判 280頁 定価1,890円 (本体1,800円) 送料340円

農薬取扱者が知っておかなければならない農薬に関する法令とその解説, 基礎知識についての詳細を掲載。

#### 第1章 作物保護と農薬

- 1 作物保護の目的
- 2 病害虫と雑草による被害
- 3 作物保護における農薬の位置づけ

#### 第2章 植物防疫行政

- 1 農薬と植物防疫
- 2 植物防疫行政の組織体制
- 3 病害虫発生予察事業
- 4 防除事業
- 5 農林水産航空事業
- 6 植物検疫

#### 第3章 農薬行政

- 1 農薬行政の歴史
- 2 農薬行政の概況
- 3 農薬の登録
- 4 農薬の果たす役割
- 5 指導者の認定等

#### 第4章 関係法令 解説

- 1 農薬に関わる法体系
- 2 農薬取締法解説
- 3 関係法令と動向
  - (1) 毒薬及び劇物取締法
  - (2) 食品衛生法
  - (3) 環境基本法
  - (4) 水質汚濁防止法
  - (5) 水道法
  - (6) 消防法
  - (7) 廃棄物の処理及び清掃に関する法律
  - (8) 食品安全基本法

#### 第5章 農薬の一般知識

- 1 農薬の種類
- 2 農薬の特性
- 3 農薬の開発
- 4 農薬の生産と流通

#### 第6章 施用技術

- 1 散布技術の基礎
- 2 施用 (散布) 方法

#### 第7章 農薬のリスクと安全性評価

- 1 農薬のリスク
- 2 安全性評価
- 3 農薬リスクの実態

#### 第8章 農薬の安全・適正使用

- 1 農薬使用者の責務
- 2 安全使用の基本事項
- 3 安全使用のための知識
- 4 使用上の諸注意
- 5 農薬散布時の飛散防止対策

#### 第9章 病害虫・雑草とその防除

- 1 病 害
- 2 害 虫
- 3 雑 草
- 4 植物の生育調節

#### 資 料

農薬取締法および関連する法令通知等