

学会賞受賞論文

(業績賞)

水稻用殺菌剤メトミノストロビンの開発

益子道生, 片岡隆博*, 市成光広**, 新川 求

塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズ

* 塩野義製薬株式会社製造本部製造企画部

** 塩野義製薬株式会社国際事業部

Development of New Fungicide, Metominostrobin

Michio MASUKO, Takahiro KATAOKA,* Mitsuhiro ICHINARI** and Motomu NIIKAWA

Aburahi Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., 1405 Gotanda, Koka-cho, Koka-gun, Shiga, 520-3423, Japan

* Manufacturing Planning Dept., Manufacturing Div. Shionogi & Co., Ltd., 1-3, Terashima 2-chome, Kuise, Amagasaki, Hyogo 660-0813, Japan

** International Business Div., Shionogi & Co., Ltd., 1-18, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka 541-0045, Japan

はじめに

メトミノストロビン (Fig. 1, 商標名: オリブライト) は塩野義製薬株式会社によって開発された新規殺菌剤である。本化合物はイソオキサゾール環を含む化合物から誘導されたメトキシイミノ酢酸アミド誘導体であるが、化学構造的にも生物活性的にも天然物由来のメトキシアクリル酸誘導体 (ストロビルリン系化合物) と同じグループの化合物とみなし得る。

メトキシアクリル酸誘導体は最初 Musilek ら^{1,2)} によって担子菌の一種である *Oudemansiella mucida* から発見され、さらに Anke ら³⁾ および Schramm ら⁴⁾ は同じ担子菌の一種である *Strobilurus tenacellus* からストロビルリン誘導体を単離した。1980年代に入って、Becker ら^{5,6)} はストロビルリン誘導体の作用機作として菌類のミトコンドリア呼吸鎖のチトクローム *bc₁* 複合体を阻害することを報告している。その後さらにオーデマンシン⁷⁾ やミクソチアゾール⁸⁾ などの一連の化合物が発見された。これらの化合物はいずれもメトキシアクリル酸残基を有しており、これらをモデルに多くの化合物が合成され、農業用殺菌剤として開発されている^{9,10)}。

塩野義製薬株式会社では古くからイソオキサゾール環を有する化合物の合成研究を行っており、昭和33年には医薬用抗菌剤シノミン®を、昭和48年には農業用除草剤イソキシール® (Fig. 2) を開発してきた経緯がある。イソオキサ

ゾール環と生理活性物質をキーワードとして永年農業用薬剤の探索研究を行い、その結果メトミノストロビンの誕生に結びついた。本稿ではメトミノストロビンの研究経緯と水稻用殺菌剤としての作用特性について紹介する。

リード化合物の発見と最適化

1. イソオキサゾール環の開裂とリード化合物の発見

イソオキサゾール環を含む種々の化合物を合成し生物活性を調べた結果、イソオキサゾールカルボキサミド誘導体 (Fig. 3) に殺菌活性を認め構造改変に努めたが実的に評価できる活性にはいたらなかった。一方、除草剤イソキシールの代謝研究の過程で、本化合物が土壌微生物によってイソオキサゾール環が開裂することを見出し¹¹⁾、この代謝物 (Fig. 4) が弱いながら殺菌活性を有することを見出した。これをヒントにイソオキサゾール環を開環した場合に想定される化合物を種々デザインし (Fig. 5) 殺菌活性を調べた。その結果、Fig. 5のbの部分で開裂した場合に想定されるオキシムイミノ酢酸アミド誘導体の中で、*N*-フェニル-2-メトキシイミノプロピオンアミド (Fig. 6) がイネいもち病に対して水面施用で予防効果と同時に治療効果を示し、浸透移行性も認められることが明らかとなった。さらに、フェニル基とメチル基を入れ替えた2-メトキシイミノ-2-フェニル-*N*-メチル酢酸アミド誘導体も同程度の活性を示したが、フェニル基の2-位にフェノキシ基が導入された化合物により強い抗菌活性と幅広い抗菌スペクトラムが認められ

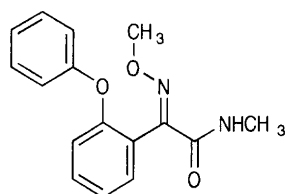


Fig. 1 Chemical structure of metominostrobin.

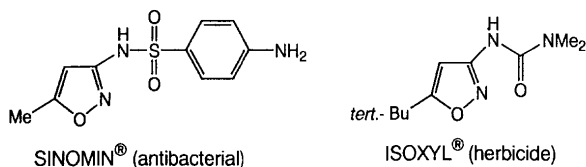


Fig. 2 Chemical structure of SINOMIN® and ISOXYL®.

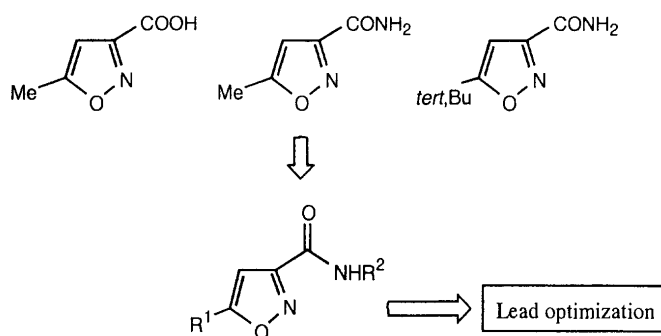


Fig. 3 Design of isoxazolecaryamides for fungicide.

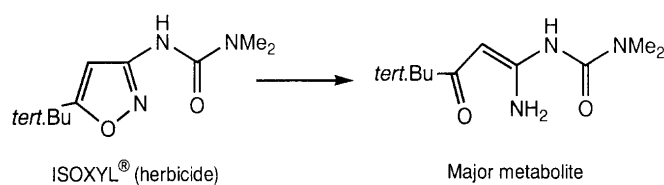


Fig. 4 Cleavage metabolite of ISOXYL®.

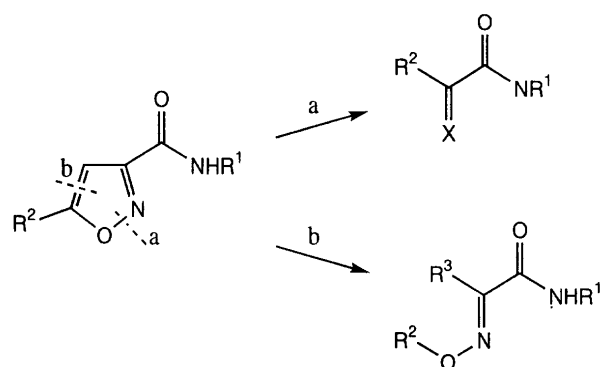


Fig. 5 Ring cleavage design of isoxazolecaryamides.

(Table 1), これを基本骨格として, 化合物の最適化を試みた.

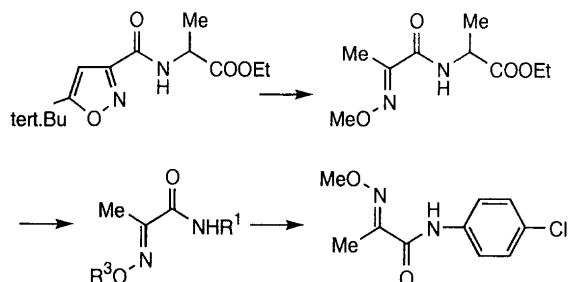
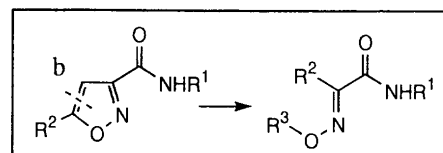


Fig. 6 Type b design for fungicide from isoxazolecaryamides.

Table 1 Modification of Methyl and Phenyl group.

X	Rice	Cucumber		
	Blast	Powdery mildew	Gray mold	Downy mildew
H	0	0	0	0
4-Cl	1	2	1	0
3-Cl	1	2	2	0
2-Cl	0	2	3	2
2-Me	1	2	0	0
2-OMe	0	1	0	0
2-O-allyl	0	2	0	0
2-O-CH ₂ Ph	0	1	2	0
2-O-C ₆ H ₁₁	3	3	4	3
2-O-Ph	4	3	4	3

4; Excellent, 3; Good, 2; Moderate, 1; Poor, 0; No effect

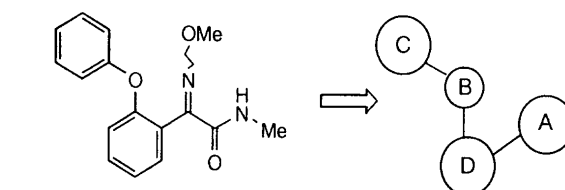
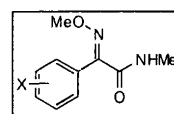


Fig. 7 Systematic optimizations of four parts.

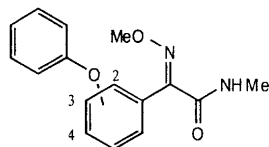
A : alkoxyimino-*N*-substituted acetamide, B : bridge part, C : benzene ring part, D : benzene ring part.

2. リード化合物の最適化

基本骨格をアルコキシイミノ-*N*-置換-酢酸アミド部 (A), 二つのベンゼン環 (C, D) およびそのブリッジ部分 (B) に分け (Fig. 7), 各部分の構造と抗菌活性について調べた. 先ず, 基本となるベンゼン環 (D) に結合するアルコキシイミノ酢酸アミド部 (A) をメトキシイミノ-*N*-メチル

酢酸アミドに固定し、Dに結合するもう一方のベンゼン環(C)の結合部位を検討した結果、2-位(オルト位)に結合した時幅広い病害に対して活性が高く、メタ位、パラ位と

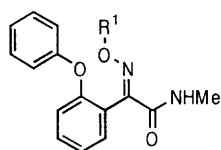
Table 2 Positional effects of phenoxy group attached to the benzene ring on fungicidal activities^{a)} by preventive application.



Compound No.	Position of phenoxy	mp(°C)	Rice		Cucumber		
			Blast	Sheath blight	Powdery mildew	Gray mold	Downy mildew
1a	2	86-87	4	3	3	4	3
8	3	59-60	2	1	1	2	0
9	4	95-97	1	0	1	1	0

a) Fungicidal activities were expressed as an index of 4, 3, 2, 1 or 0, each corresponding to approximately 70% control at 2.0, 7.8, 31.3, 125ppm or less than 70% control at 125ppm, respectively.

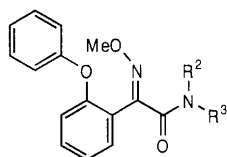
Table 3 Effects of oxime substituent R¹ on fungicidal activities^{a)} by preventive application.



Compounds No.	R ¹	mp(°C)	Rice		Cucumber		
			Blast	Sheath blight	Powdery mildew	Gray mold	Downy mildew
1a	Me	86-87	4	3	3	4	3
2	Et	oil	1	0	1	1	0
3	i-Pr	oil	1	0	0	0	0
4	H	184-185	0	0	0	1	0

a) Fungicidal activities were expressed as in Table 2

Table 4 Effects of substituents R² and R³ on amide moiety on fungicidal activities^{a)} by preventive application.



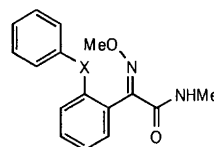
Compound No.	R ²	R ³	mp(°C)	Rice		Cucumber		
				Blast	Sheath blight	Powdery mildew	Gray mold	Downy mildew
1a	Me	H	86-87	4	3	3	4	3
5	H	H	93-99	1	0	1	2	0
6	Me	Me	63-64	1	1	1	1	0
7	Et	H	oil	2	1	1	2	0

a) Fungicidal activities were expressed as in Table 2

も活性は著しく低下した (Table 2).

次にオキシムイミノ酢酸アミド部(A)のオキシム部の置換基(R¹)についてイネいもち病および紋枯病に対する活性を検討した結果、メチル基を導入したメトキシイミノ体(**1a**)が高活性を示し、嵩高い置換基を導入した場合や無置換の化合物は活性が低下した (Table 3). アミド部の N-置

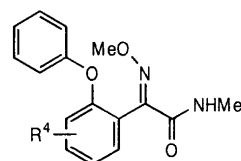
Table 5 Effects of the bridge part between two benzene rings on fungicidal activities^{a)} by preventive application.



Compounds No.	-X-	mp(°C)	Rice		Cucumber		
			Blast	Sheath blight	Powdery mildew	Gray mold	Downy mildew
1a	-O-	86-87	4	3	3	4	3
10	-CH ₂ O-	123-126	0	0	1	1	0
11	-OCH ₂ -	119-120	3	2	2	3	3
12	-S-	105-107	2	1	3	2	1
13	-SCH ₂ -	oil	1	1	2	3	1
14	-CH=CH- (cis)	94-95	3	1	2	3	1
15	-CH=CH- (trans)	165-166	1	0	3	3	2
16	-CH ₂ CH ₂ -	130-131	1	0	1	2	0
17	-COO-	170	0	0	1	1	0
18	-CO-	oil	1	0	0	1	0
19	-NHCH ₂ -	115-118	0	0	0	1	0

a) Fungicidal activities were expressed as in Table 2.

Table 6 Effects of the substituent R⁴ on the benzene ring on fungicidal activities^{a)} by preventive application.



Compounds No.	R ⁴	mp(°C)	Rice		Cucumber		
			Blast	Sheath blight	Powdery mildew	Gray mold	Downy mildew
1a	H	86-87	4	3	3	4	3
20	5-F	oil	3	2	2	3	1
21	4-Me	98-100	2	2	3	3	2
22	5-Me	oil	2	1	3	3	1
23	5-OMe	oil	2	1	1	2	1
24	5-CF ₃	oil	0	0	0	0	0
25	5-SiMe ₃	86-88	0	0	0	0	0
26	3-NO ₂	oil	0	0	0	0	0
27	5-NO ₂	oil	0	0	0	1	0
28	6-OMe	106-108	1	0	0	2	0

a) Fungicidal activities were expressed as in Table 2

換基はモノメチル体 (**1a**) が最も活性が高く、無置換体 (**5**) やジメチル体 (**6**)、モノエチル体 (**7**) などは全ての病害に対して明らかに活性が低下した (Table 4).

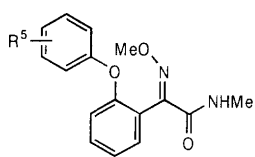
ブリッジ部分(B)に関しては、二つのベンゼン環が-O-で結合したジフェニルエーテル体 (**1a**) がイネ病害の他、キュウリ病害にも高い活性を示した。また-OCH₂-で結合した化合物 (**11**) にも幅広い病害に対して活性が認められたが、ジフェニルエーテル体より劣った (Table 5)。D のベンゼン環の2-位のフェノキシ基以外に置換基 (R⁴) を導入すると活性は低下する傾向が見られた (Table 6)。

C のベンゼン環の置換基 (R⁵) がイネおよびキュウリの各種病害防除活性に及ぼす影響について検討した (Table 7)。R⁵ が低級アルキルの場合はそのベンゼン環上の置換位置によって活性が大きく異なった。すなわち、2-位にメチル基が導入された化合物 (**29**) は3-位 (**30**) または4-位 (**31**) に導入された化合物に比べて全ての病害に対する活性が低く、4-位にハロゲンが導入された化合物 (**35, 36, 37**) は4-メチル体とはほぼ同レベルの活性を示した。しかしながら、

4-位に枝分れしたアルキル基 (**32, 52**) や *tert*-ブチル基 (**33**)、トリシリルメチル基 (**34**)、フェノキシ基 (**44**)、ベンジルオキシ基 (**51**) などのように嵩高い置換基の導入は活性を低下させる傾向が見られた。また、ニトロ基 (**38, 39**)、水酸基 (**42**)、などのような分子全体の親水性を増すような置換基の導入は導入位置に関わらず活性を低下させた。

一方、3-位にフェノキシ基 (**43**)、プロパルギルオキシ基 (**45**) およびアリールオキシ基 (**49**) を導入した化合物は無置換の化合物 (**1a**) に近い活性を示した。3-フェノキシ誘導体 (**43**) および3-プロパルギルオキシ誘導体 (**45**) はいずれも茎葉散布でイネいもち病に高い活性を示したが、水面施用では3-プロパルギルオキシ誘導体 (**45**) は高い活性を示したものの、3-フェノキシ誘導体 (**43**) は水面施用では茎葉散布よりやや劣った。一方、4-クロロ (**35**)、4-プロモ (**36**)、4-ヨード (**37**)、4-メトキシ (**41**) および3-メチル-4-クロロ (**47**) 誘導体はイネいもち病に対して水面施用の方が茎葉散布より高い活性を示した。このように、化合物によっては施用法が異なることによって防除活性に違い

Table 7 Effects of the substituents R⁵ of the phenoxy group on fungicidal activities.^{a)}



No.	Compounds R ⁵	mp(°C)	Rice			Cucumber					
			Blast		Sheath blight	Powdery mildew		Gray mold		Downy mildew	
			Fol. ^{b)}	Sub. ^{c)}	Pre. ^{d)}	Pre.	Cur. ^{e)}	Pre.	Cur.	Pre.	Cur.
1a	H	86-87	4	4	3	3	4	3	4	3	2
29	2-Me	oil	2	2	0	2	1	2	2	0	NT ^{f)}
30	3-Me	oil	3	4	2	2	2	3	3	2	1
31	4-Me	113-115	4	4	1	3	2	3	4	0	NT
32	4-i-Pr	oil	2	1	1	3	3	2	3	1	NT
33	4-t-Bu	oil	1	2	1	2	2	2	3	0	0
34	4-SiMe ₃	oil	0	0	0	1	1	1	0	0	NT
35	4-Cl	108-109	2	4	1	3	3	3	4	2	1
36	4-Br	99-101	2	4	1	3	2	2	4	0	0
37	4-I	96	1	3	1	3	3	3	4	1	1
38	4-NO ₂	110-112	1	NT	0	1	1	2	3	0	0
39	2-NO ₂	oil	0	NT	0	0	0	0	0	0	0
40	3-OMe	49-50	3	4	2	3	3	3	4	1	0
41	4-OMe	118	2	4	2	3	3	3	4	1	1
42	3-OH	157-159	1	NT	1	0	NT	1	NT	0	NT
43	3-OPh	oil	4	2	2	3	3	3	4	2	1
44	4-OPh	oil	1	1	1	2	3	1	NT	0	NT
45	3-OCH ₂ C≡CH	80-81	4	4	1	1	0	3	3	2	0
46	3-OCH ₂ CN	oil	0	0	0	1	1	1	NT	0	NT
47	3-Me-4-Cl	oil	0	3	1	3	2	3	3	3	1
48	3,4-Cl ₂	80-81	3	1	1	3	3	3	4	2	1
49	3-OCH ₂ CH=CH ₂	oil	3	2	2	3	3	3	4	4	1
50	3-OCH ₂ Ph	oil	1	0	1	2	2	2	2	1	NT
51	4-OCH ₂ Ph	130-131	0	NT	0	0	0	0	NT	0	NT
52	2,4-i-Pr ₂	92-95	1	NT	1	1	1	1	NT	0	NT

a) Fungicidal activities were expressed as in Table 2, b) Foliar application, c) Submerged application,

d) Preventive activity, e) Curative activity, f) Not tested

が見られるのは化合物の水溶解性または分配係数 ($\log P$) の違いに起因すると思われる。3-位にプロパルギルオキシ基 (45) やアリールオキシ基 (49) を導入した化合物は幅広い病害に高活性を示したが、プロパルギルオキシ基と等価と見られるシアノメチルオキシ基を3-位に導入した化合物 (46) には全ての病害に対する活性が著しく低下した点は興味深い。

フェノキシフェニルメトキシイミノ酢酸アミド誘導体の構造-活性相関性から、フェニル酢酸アミド部のベンゼン環の2-位に結合したフェノキシ基と分子全体の親水性が抗菌活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. 幾何異性体間の活性

フェノキシフェニルメトキシイミノ酢酸アミド誘導体のオキシム部分において *E*-体 (ベンゼン環に対してトランス配位) と *Z*-体 (ベンゼン環に対してシス配位) の2種の

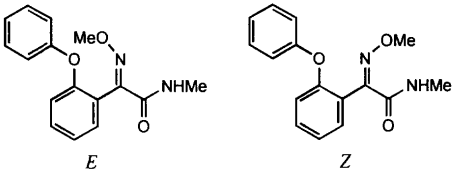
幾何異性体が存在するが、両異性体はシリカゲルカラムクロマトグラフで容易に分離することが出来る。*In vitro* における菌糸伸長阻害活性 (Table 8) および *in vivo* における病害防除活性 (Table 9) はいずれも *E*-体のほうが *Z*-体より高かった。

以上の結果より (*E*)-2-メトキシイミノ-*N*-メチル-2-(2-フェノキシフェニル)アセトアミドを開発候補材として選抜した。Scheme 1 にフェノキシフェニルアルコキシイミノ酢酸アミド誘導体の一般的な合成ルートを示した。

4. 化合物の名称および性状

名称：上述のとおり本化合物はイソオキサゾールカルボキサミド誘導体のイソオキサゾール環を開裂することによって誘導されたメトキシイミノフェニル酢酸アミド誘導体であるので、最初一般名はメトミノフェンとして ISO に申請したが、化学構造的にも生物活性的にもストロビルリ

Table 8 Effects of metominostrobin and its geometrical isomer on mycelial growth of several plant pathogenic fungi *in vitro*.



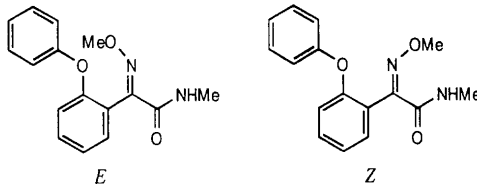
Compounds	No.	Is ^{a)}	EC ₅₀ (ppm)									
			P.a.	S.s.	G.c.	C.r.	B.c.	A.m.	F.o.	P.o.	C.l.	C.h. ^{b)}
1a	E		2.8	2.0	7.2	2.5	1.1	20.8	6.2	5.6	4.7	4.5
1b	Z		28.1	11.9	16.2	41.1	11.7	>64.0	58.1	49.1	61.8	41.8

a) Geometrical configuration (*E/Z*).

b) The abbreviation for the plant pathogenic fungi are as follows;

P.a.: *Pythium aphanidermatum*, S.s.: *Sclerotinia sclerotiorum*, G.c.: *Glomerella cingulata*, C.r.: *Corticium rolfsii*, B.c.: *Botrytis cinerea*, A.m.: *Alternaria alternata* apple pathotype, F.o.: *Fusarium oxysporum*, P.o.: *Pyricularia oryzae*, C.l.: *Colletotrichum lagenarium*, C.h.: *Cladosporium herbarum*.

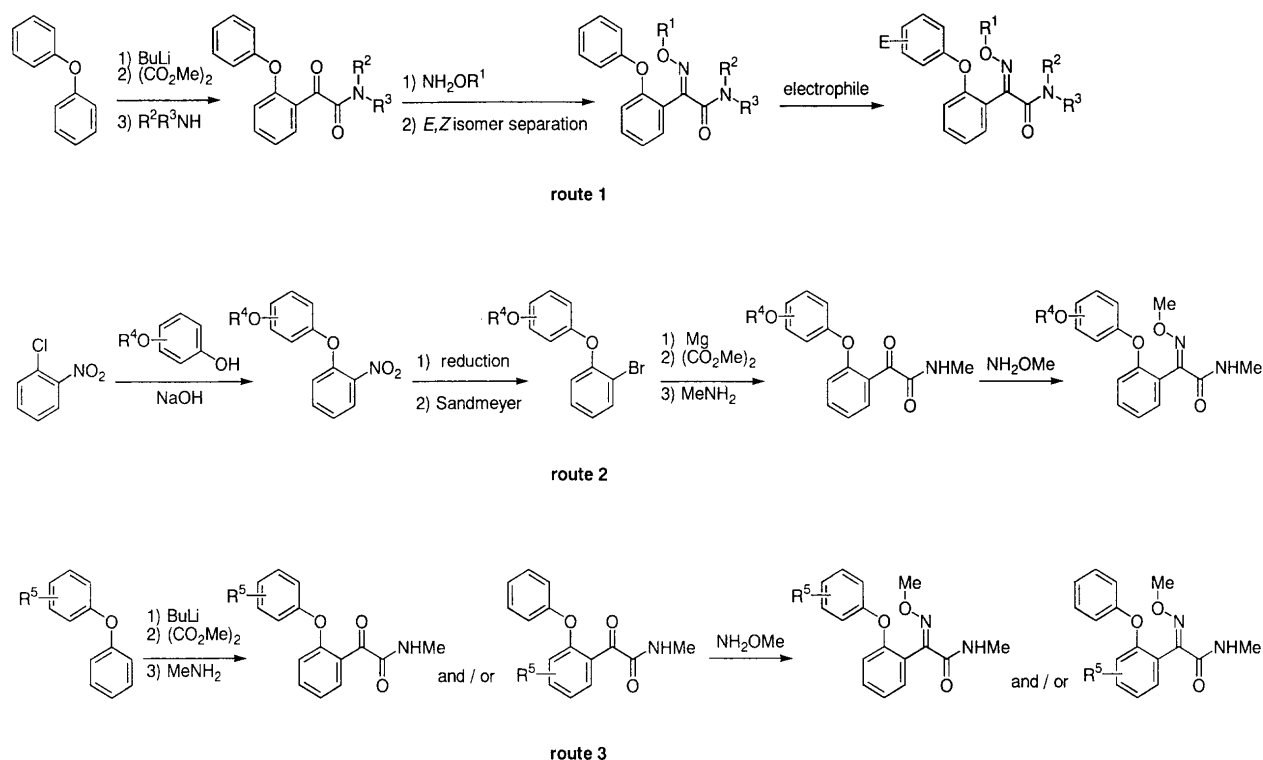
Table 9 Controlling activities^{a)} of metominostrobin and its geometrical isomer against several plant diseases by preventive foliar application.



Compounds	No.	Is ^{b)}	Rice						Cucumber					
			Blast			Sheath blight			Powdery mildew			Glary mold		
			125 ^{c)}	31.3	7.8	500	125	31.3	125	31.3	7.8	125	31.3	7.8
1a	E		97	90	30	70	70	50	100	100	70	95	92	73
1b	Z		50	30	0	50	0	0	100	100	40	44	36	18

a) Percent of control by preventive application, b) Geometrical configuration,

c) Concentration of active ingredient (ppm)



Scheme 1 General synthetic routes for the phenoxyphenylalkoxyiminoacetamides.

ン系の化合物とみなしうることから、一般名はストロビルリンを連想させるようにとの指導により、メトミノストロビン (metominostrobin) とした。

商標名；オリプライト®，化学名；(E)-2-methoxyimino-N-methyl-2-(2-phenoxyphenyl) acetamide，分子式；C₁₆H₁₆N₂O₃，分子量；284.32，融点；88.8°C，蒸気圧；1.8×10⁻⁵ Pa (25°C)，分配係数 (n-オクタノール/水)；log P=2.3 (20°C)，水溶解度；0.128 g/l (20°C)

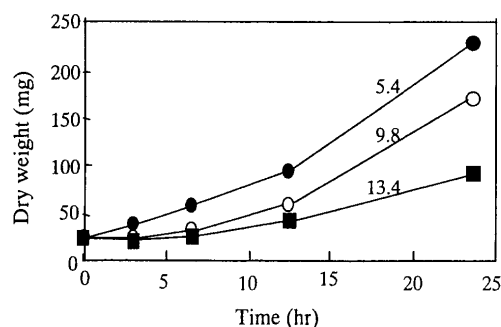
安 全 性

急性経口毒性はラット雄および雌に対して LD₅₀ がそれぞれ 776 mg/kg および 708 mg/kg，マウス雄および雌に対して LD₅₀ がそれぞれ 1778 mg/kg および 1413 mg/kg であった。急性経皮毒性はラット雄，雌いずれに対しても LD₅₀ が 2000 mg/kg 以上であり，変異原性 (Ames) は陰性である。したがって本剤は普通物であり，哺乳動物に対する安全性が高い薬剤である。魚毒性はコイに対する TLm 値 (48 hr) が 158 ppm，ミジンコに対する TLm 値 (3 hr) が 3910 ppm であり，A 類に相当する。また，鳥類，ミツバチ，ミズミズなどの環境生物にも毒性が低く，環境への負荷が低い薬剤である。

生 物 活 性

1. 基礎活性

メトミノストロビンは *in vivo* においてイネいもち病，紋枯病，キュウリうどんこ病，灰色かび病，べと病など幅広

Fig. 8 Effect of metominostrobin on the mycelial growth of *P. oryzae*.

Mycelial suspension was transferred into potato dextrose liquid medium and cultured at 25°C. The figures along the growth curves are mass doubling period in hours. ● ; Untreated control, ○ ; Metominostrobin 5 μM, ■ ; Metominostrobin 50 μM.

い病害に対して強い防除活性を示した (Table 9) のに対して，*in vitro* では藻菌類，子囊菌類，担子菌類および不完全菌類の幅広い病原菌に対して活性は高くないものの菌糸の伸長阻害を示した (Table 8)。メトミノストロビンは *in vitro* においてイネいもち病菌の菌糸増殖を薬量に依存して阻害するが時間とともに回復し，50 μM でも致死的な作用は示さなかった (Fig. 8)。

2. イネいもち病に対する防除効果

ポット試験においてメトミノストロビンはイネいもち病に対して茎葉散布では 31.3 ppm 以上の濃度で高い予防効

Table 10 Controlling activity^{a)} of metominostrobin on rice blast by foliar spray and submerged application.

	Foliar spray			Submerged application	
	Conc. (ppm)	Pre ^{b)}	Cur ^{c)}	g a.i./10a	Pre
Metominostrobin	125	97	97	100	97
	31.3	90	97	25	97
	7.8	50	50	6.3	50
Reference	Fthalide		EDDP	Pyroquilon	
	125	97	97	100	97
	31.3	90	70	25	70
	7.8	70	30	6.3	30

a) Controlling activity was expressed as percent of control

b) Preventive activity, c) Curative activity

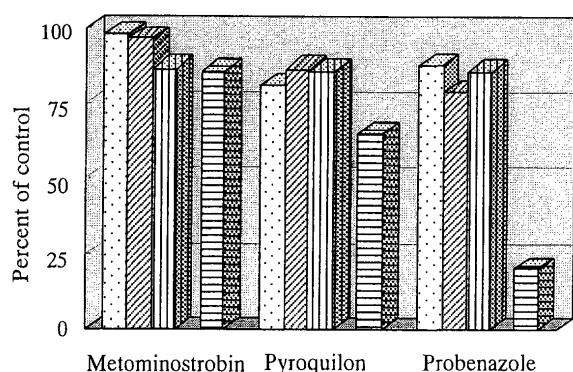


Fig. 9 Controlling activity of metominostrobin on leaf and ear blast by different inoculation timing after submerged treatment. (Pot test)

Metominostrobin was treated into the paddy water at a rate of 150 g a.i./10a. Inoculation was carried out by spraying the conidial suspension of *P. oryzae* onto the rice seedlings and assessed the activity of leaf blast at 10 (▤), 30 (▨) and 60 (▧) days after treatment. Activity against ear blast was also assessed at 60 days after treatment (▩).

よび治療効果を示し、水面施用でも 25 g a.i./10a 以上の薬量で高い防除効果を示した (Table 10). 本剤 150 g a.i./10a を水面施用した場合速やかに根から吸収され地上部へ移行し防除活性を発揮する。本剤は処理後の残効期間も長く、処理 60 日後にイネもち病菌を接種した場合でも葉いもちに対してほぼ 80% の防除率を示し、穂いもちにも高い防除効果を示した (Fig. 9). 圃場試験においても本剤は葉いもち初発 6 日前、初発時および初発 7 日後いずれの処理時期においても葉いもちに対して高い防除活性を示し、予防効果のみならず治療効果にも優れることが確認された。穂いもちに対してもいずれの処理時期においても対照の体系防除区より優れ、とくに処理時期が遅いほど穂いもちに対する活性は高くなる傾向が見られた (Fig. 10).

3. その他のイネ病害に対する防除効果

メトミノストロビンはイネいもち病以外にもイネ紋枯病

Table 11 Controlling activity^{a)} of metominostrobin on rice diseases by foliar application.

	Conc (ppm)	Sheath blight		Brown spot
		Pre ^{b)}	Cur ^{c)}	Pre
Metominostrobin	125	90	90	100
	31.3	50	70	100
	7.8	30	50	97
Reference	Flutoluanil		Ferimuzone	
	125	100	97	97
	31.3	97	90	97
	7.8	50	50	50

a) Controlling activity was expressed as percent of control

b) Preventive activity, c) Curative activity

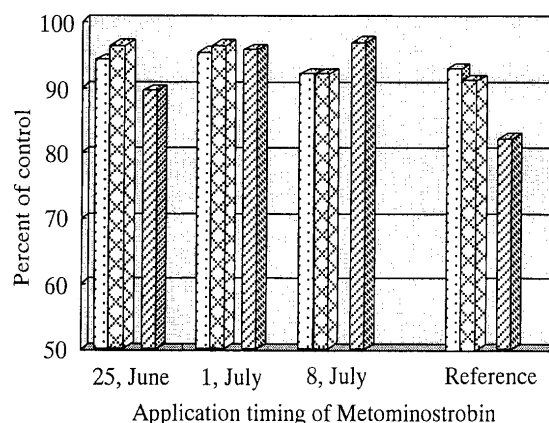


Fig. 10 Controlling activity of metominostrobin on rice blast with different application timing (Field test in 1993). Metominostrobin granule was applied at 6 days before (25th June), just the day (1st July) and 7 days after (8th July) the first outbreak of leaf blast at a rate of 150 g a.i./10a. Assessment was carried out on 22nd July (▤) and 2nd August (▨) for leaf blast, and 6th September (▧) for ear blast. Reference application was done with probenazole granule on 25th June for leaf blast, followed by foliar treatment with kasugamycin/fthalide DL on 12th and 23rd August for ear blast.

Table 12 Controlling activity^{a)} of metominostrobin on rice diseases by submerged application.

	Dosage (g a.i./10a)	Sheath blight	Brown spot
Metominostrobin	100	90	100
	25	50	100
	6.3	30	97
Reference	Flutoluanil		Iprodione
	100	100	70
	25	100	30
	6.3	40	0

a) Controlling activity was expressed as percent of control

およびごま葉枯病に対して茎葉散布 (Table 11) および水面施用 (Table 12) で高い防除活性を示したが、紋枯病に対する防除活性はいもち病およびごま葉枯病に対する活性より

劣る傾向が見られた。また、本剤は葉鞘腐敗病にも有効であり、現在はイネいもち病と葉鞘腐敗病に登録されている。

メトミノストロビンの作用機作

Becker ら⁶⁾はストロピルリン誘導体の作用機作として、糸状菌のミトコンドリアにおける呼吸鎖のチトクローム bc_1 複合体と結合し電子伝達を阻害することにより呼吸を阻害すると報告している。メトミノストロビンも同様にイネいもち病菌のミトコンドリアにおける酸素消費を濃度に依存して阻害する (Fig. 11)。しかしながら、メトミノストロビンはイネいもち病菌に対して人工培地上では菌糸伸長を一時的に遅延させるが、時間の経過に伴って菌糸伸長が回復する (Fig. 9)。すなわち、本化合物は人工培地上では殺菌的な効果を示さず、いわゆる静菌的な作用を示す。また、本化合物を好氣的条件下でイネいもち病菌のミトコンドリアに処理すると処理直後には強い酸素消費阻害活性が認められるが、30分以内には酸素消費が回復し呼吸が回復する。本化合物処理後に回復した酸素消費は、シアン化カリでは影響されずに耐性を示し、シアン耐性呼吸の阻害剤として知られているサリチルヒドロキسام酸 (SHAM) に感受性を示す (Fig. 12)。一方、無処理のイネいもち病菌のミトコンドリアによる酸素消費は、SHAM には影響されずシアン化カリによって完全に阻害される。以上の結果は、メトミノストロビンを処理することによってイネいもち病菌のミトコンドリアの呼吸鎖にシアン耐性呼吸と呼ばれる電子伝達のバイパスが誘導され、その結果呼吸が回復し菌糸伸長や胞子発芽が回復することを示唆している。このバイパスの誘導が、本化合物が人工培地上では殺菌的ではなく静菌的である理由と考えられる。

ところで、メトミノストロビンを稲に処理するとイネいもち病の発病を強く阻害する。イネいもち病菌を接種した稲に本化合物を処理し接種5~7日後に接種葉を顕微鏡観

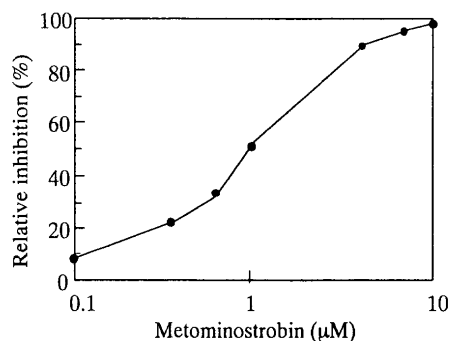


Fig. 11 Effect of metominostrobin on oxygen consumption by *P. oryzae* mycelia.

20 Mg of mycelia was suspended in 3 ml HEPS-Tris buffer (pH 7.0) and O_2 consumption was measured polarographically at 25°C. The activity of untreated control was 43.2 nmol O_2 /min/f.w. 20 mg mycelia.

察すると、葉肉組織に侵入した菌糸が死んでいる像が観察され、病斑拡大が停止し発病が抑制される。人工培地上では静菌的である本化合物が、宿主植物に侵入した菌糸に対しては殺菌的に作用する理由としては次のように考えられる。

Minagawa ら¹²⁻¹⁴⁾はイースト菌においてミトコンドリアのチトクローム bc_1 複合体の阻害剤であるアンチマイシン A を処理すると、 O_2 ラジカルが生成しこれがシアン耐性呼吸を誘導することを示唆している。また、Nakayama ら¹⁵⁾は植物界に広く存在するフラボノイド系化合物が O_2 ラジカルを消去する作用があることを報告している。メトミノストロビンを処理したイネいもち病菌にフラボン、ナリンゲニン、サクラネチンなどのフラボノイド系化合物を処理すると、シアン耐性呼吸の誘導が完全に阻害された (Table 13)。また、メトミノストロビン 1 ppm を添加した人工培地ではイネいもち病菌の菌糸伸長は遅延はするが完全には阻害されず、これにフラボン 10 ppm を添加した培地上では本菌の菌糸伸長は完全に阻害された (Fig. 13)。

以上の結果より、メトミノストロビンのイネいもち病防除機構としては、メトミノストロビンを処理することによってイネいもち病菌のミトコンドリアの電子伝達が阻害され、電子がオーバーフローして O_2 ラジカルが生成する

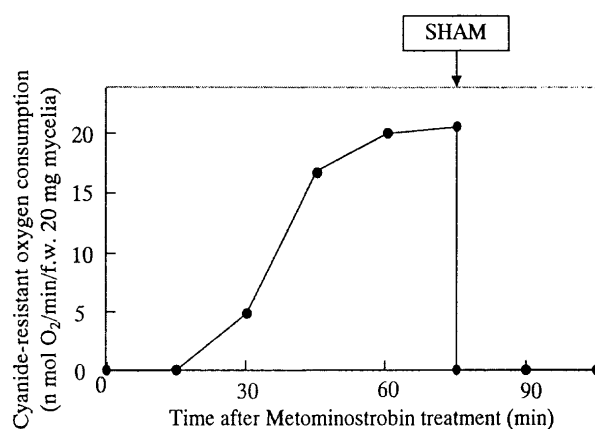
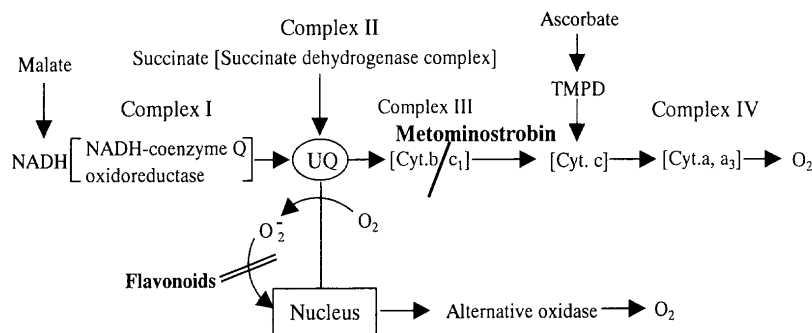


Fig. 12 Induction of cyanide-resistant respiration in *P. oryzae* with metominostrobin and effects of salicylhydroxamic acid (SHAM).

Cyanide-resistant respiration was measured as oxygen consumption in the presence of 10 μ M metominostrobin and 1 mM potassium cyanide. Salicylhydroxamic acid (1 mM) was added at 75 min after treatment of metominostrobin.

Table 13 Effects of flavonoids on induction of cyanide-resistant respiration in *P. oryzae*.

Flavonoids	Percent inhibition
Flavon	100
Flavanone	100
Naringenin	100
Quercetin	100
Sakuranetin	100



Scheme 2 Schematic diagram of electron transport pathway and inhibition site of metominostrobin in the mitochondrial respiration in *P. oryzae*. UQ: Ubiquinone, Cyt.: cytochrome.

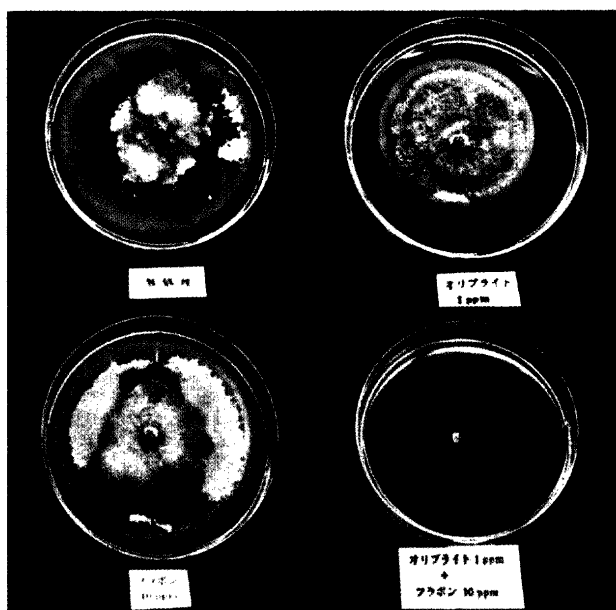


Fig. 13 Mycelial growth of *P. oryzae* on the PDA in presence of metominostrobin (1 ppm) and/or flavon (10 ppm). (Clockwise from upper left): Untreated control, metominostrobin 1 ppm, metominostrobin 1 ppm+flavon 10 ppm, flavon 10 ppm.

が、生成した O_2 ラジカルは稲葉中のフラボノイド系化合物によって消去されるためバイパス（シアン耐性呼吸）が誘導されず死に致ると推察される (Scheme 2)。以上のようにメトミノストロピンはイネいもち病に対してイネ葉中の成分と協力して防除効果を示すというユニークな作用機作を示す化合物である。

おわりに

筆者らがイソオキサゾール系化合物から新規殺菌剤を開発することを目標にして研究を開始したのが 1988 年頃であり、メトミノストロピンは 1989 年に特許を出願した。本化合物の広い抗菌スペクトラムと特徴的な治療効果に着目し農業用殺菌剤として開発すべく 1990 年代に入っすぐに実用性評価試験を開始し本格的な開発作業に入り、1998

年イネいもち病を対象に農薬登録され、さらにイネ葉鞘腐敗病にも適用拡大された。本剤はまた、イネ紋枯病とごま葉枯病菌およびすじ葉枯病菌による穂枯症にも有効であり 2000 年 12 月これら両病害に対する適用拡大の申請を行った。

メトミノストロピンはイネの幅広い病害に対して予防効果も治療効果も高く、残効期間が長く処理適期幅が広い殺菌剤であるので、従来の病害防除体系と比べて薬剤散布回数の低減が可能となる。このことは農家の防除作業の省力化と同時に、環境に対する負荷の軽減が期待される。

環境にやさしく、省力的な病害防除を可能にするオリブライトが、今後日本のコメの安定生産と環境保全に寄与することを期待している。

最後に、オリブライトの開発上市にあたり、社内外の多くの方のご指導とご支援を賜りました。本剤の薬効薬害評価をいただいた日本植物防疫協会ならびに各試験場の諸先生方に厚くお礼申し上げます。また、本剤は筆者らの研究のみならず、塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズの多くの方々ならびに製造、開発、営業各部門の関係者が一致団結した努力の成果として製品化出来たものであり、ここに深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) V. Musilek: Czeck Pat. CS136492 (=British Pat. GB 1163910) (1965)
- 2) V. Musilek, J. Cerna, V. Sasek, M. Semerdzieva & M. Vondracek: *Folia Microbiol. (Prague)* **14**, 377-387 (1969)
- 3) T. Anke, F. Oberwinkler, W. Steglich & G. Schramm: *J. Antibiot.* **30**, 806 (1977)
- 4) G. Schramm, W. Steglich, T. Anke & F. Oberwinkler: *Chem. Ber.* **111**, 2779 (1978)
- 5) W. F. Becker, G. Von Jagow, G. Thierbach & H. Reichenbach: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 1467 (1980)
- 6) W. F. Becker, G. Von Jagow, T. Anke & W. Steglich: *FEBS Lett.* **132**, 329 (1981)
- 7) T. Anke, H. Hecht & G. Schramm: *J. Antibiot.* **32**, 1112 (1979)
- 8) N. Bedorf, B. Kunze, H. Reichenbach & G. Hofle: "Scientific Annual Report of the Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbGH," Braunschweig (Germany), p.

- 14, 1986
- 9) J. R. Godwin, V. M. Anthony, J. M. Clough & C. R. A. Godfrey: "Brighton Crop Protection Conference, —Pests and Diseases—," Vol. 1, British Crop Protection Council, Farnham, U.K., p. 435, 1992
 - 10) E. Ammermann, G. Lorenz, K. Schelberger, B. Wenderoth, H. Sauter & C. Rentzea: "Brighton Crop Protection Conference, —Pests and Diseases—," Vol. 1, British Crop Protection Council, Farnham, U.K., p. 403, 1992
 - 11) Y. Hayase, M. Ozaki, Y. Takeuchi & S. Kobayashi: *J. Pesticide Sci.* **7**, 401 (1982)
 - 12) N. Minagawa & A. Yoshimoto: *J. Biochem.* **101**, 1141 (1987)
 - 13) N. Minagawa & A. Yoshimoto: *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2263 (1987)
 - 14) N. Minagawa, S. Koga, M. Nakano, S. Sakajo & A. Yoshimoto: *FEBS Lett.* **302**, 217 (1992)
 - 15) T. Nakayama, M. Yamada, T. Osawa & S. Kawakishi: *Biochem. Pharmacol.* **45**, 265 (1993)

略 歴

益子道生

生年月日: 1942年3月1日

最終学歴: 大阪府立大学大学院農学研究科修士課程園芸農学専攻修了

趣 味: 音楽観賞

片岡隆博

生年月日: 1950年8月21日

最終学歴: 名古屋大学大学院工学研究科修士課程修了

趣 味: ウォーキング, 園芸

市成光広:

生年月日: 1958年3月16日

最終学歴: 九州大学大学院薬学研究科修士課程修了

趣 味: ドライブ

新川 求

生年月日: 1949年6月1日

最終学歴: 岐阜県立農林高等学校農芸化学科卒業

趣 味: ゴルフ, 水泳, 釣り

Society Awards 2001

(on prominent achievement)

Development of New Fungicide, Metominostrobin**INTRODUCTION**

Metominostrobin is a new methoxyiminoacetamide fungicide with novel mode of action invented by Shionogi & Co. Ltd. The compound which is derived from isoxazole-ring containing analogues is seemed to be the same category as methoxyacrylate derivatives, from the aspect of biological activity and chemical structure.

Methoxyacrylate derivatives were first discovered by Musilek *et al.* as a second metabolite of *Oudemansiella mucida*, a species of Bacidiomycotina. Anke *et al.* isolated strobilurins from *Strobilurus tenacellus*, also a species of Bacidiomycotina. Becker *et al.* first reported the fungicidal activity of strobilurins and other natural compounds, of which the mode of action was demonstrated to be inhibition of the *bc₁* segment of the respiratory chain of mitochondria. Structural modification of the methoxyacrylate compounds has progressed aggressively. In 1992, ZENECA group and BASF group introduced β -methoxyacrylate and methoxyimino acetic acid derivatives independently, which were both derived from strobilurins, as a promising new class of broad spectrum fungicides with a new mode of action.

Shionogi & Co., Ltd. developed the antibacterial agent SINOMIN[®] for pharmaceutical use, and ISOXYL[®], an

agricultural herbicide, which contain an isoxazole ring structure. The authors further continued to developed the isoxazole chemistry to invent new agrochemicals. This paper deals with the course of invention, development and the biological characteristics of metominostrobin as a new fungicide for rice diseases.

DISCOVERING AND OPTIMIZATION OF LEAD COMPOUNDS

Previously, we synthesized some carbamoylisoxazole derivatives by developing our isoxazole chemistry, and assessed their fungicidal activities for agricultural purposes. These compounds were especially active against rice blast by submerged application to the water in the rice fields, despite their weak fungicidal activity *in vitro*. Furthermore, during the course of metabolic studies of ISOXYL[®], an isoxazole ring-cleaved metabolite was obtained as a soil metabolite. These observations suggested that these compounds would be activated by cleavage of the isoxazole ring in the paddy water or soil. Accordingly, we designed new compounds by cleaving the isoxazole ring. In the course of screening, it had been suggested that *N*-phenyl-2-methoxyiminopropionamides had good preventive and curative activities with good systemicity against rice blast and other dis-

eases such as cucumber gray mold and powdery mildew. 2-Alkoxyimino-2-phenylacetamide derivatives showed similar fungicidal activity, and when a phenoxy group was introduced on the benzene ring of the 2-phenylacetamide moiety, marked improvements in both strength and spectrum of the fungicidal activity were obtained. These findings and the simplicity of the structure motivated further investigation of the synthesis of methoxyiminoacetamide compounds as new fungicides. We selected the 2-alkoxyimino-2-phenyl-*N*-substituted acetamides as the lead compound.

For systematic optimization of the lead compound, the molecule was divided into four parts, alkoxyimino acetamide moiety (A), bridge part of the two benzene rings (B) and the two benzene rings (C and D). Firstly, the effects of the *O*-substituent (R^1) of 2-alkoxyimino-*N*-methylacetamide derivatives were investigated and it was revealed that only methoxyimino derivative showed excellent activity against all of the diseases examined. Concerning the *N*-substituents (R^2 , R^3) of the acetamide group, the monomethylamide derivative exhibited the best activity. The structure-activity relationships suggest that the bulkiness of the amide group is not necessary for the activity, and steric hindrance in the vicinity of the methoxyimino group is unfavorable for the activity.

The examination on the positional effects of the phenoxy group attached to the benzene ring of the phenylacetamide moiety revealed that the *ortho*-position is the best for the fungicidal activity.

The effects of the bridge part between the two benzene rings were examined. The fungicidal activity was excellent when the two benzene rings were connected with oxygen (**1a**). An oxymethylene group between the two benzene rings (**11**) also showed some extent of activity.

The effects of the substituents R^5 of the phenoxy moiety varied markedly depending on the position of the substituent. However, the best fungicidal activity was obtained when the phenoxy moiety was not substituted ($R^5=H$). Structure-activity relationship studies on phenoxyphenylmethoxyiminoacetamide derivatives suggested that the phenoxy group at the 2-position of phenylacetamide moiety and overall hydrophilicity may play important roles in fungicidal activity.

Oxime formation gave the *E* isomer as the major product along with the *Z* isomer. Fungicidal activities of both (*E*) and (*Z*) isomers of *N*-methyl-2-methoxyimino-2-(2-phenoxyphenyl)acetamide were compared *in vitro*, and *in vivo*. The results indicated that the *E*-form (**1a**) is a favorable configuration for fungicidal activity. Consequently, we selected the unsubstituted compound, (*E*)-2-methoxyimino-*N*-methyl-2-(2-phenoxyphenyl)acetamide (**1a**) for the candidate, and the development studies were started.

FUNGICIDAL ACTIVITY OF METOMINOSTROBIN

Metominostrobin exhibited excellent fungicidal activity against wide range of crop diseases. Basically, strobilurin derivatives are known as wide spectrum fungicide, and metominostrobin is also a wide spectrum fungicide. Especially, it showed good control against rice blast caused by *Pyricularia oryzae* by foliar spray and by submerged application at 31.3 ppm and 25 g a.i./10a, respectively in pot tests. Metominostrobin expresses its controlling activity against rice blast immediately after application. Furthermore, it shows long-lasting activity against blast disease when applied to paddy water. It can control not only leaf blast but also ear blast even at 60 days after submerged application. Under the field condition, metominostrobin demonstrated excellent control against leaf blast when it was applied before or after the epidemic of the disease at a dose rate of 150 g a.i./10a. Moreover, metominostrobin exhibited good control against ear blast with one application at the same dosage.

Metominostrobin also showed good control against rice sheath blight caused by *Thanatephorus cucumeris*, sheath rot (*Sarocladium oryzae*), brown spot (*Cochliobolus miyabeanus*) and Cercospora leaf spot (*Sphaerulina oryzae*).

MECHANISMS OF CONTROLLING ACTIVITY OF METOMINOSTROBIN

The experiments revealed that metominostrobin inhibits the oxygen consumption by *P. oryzae*. Metominostrobin interacts with the cytochrome *bc*₁ segment of the mitochondrial respiratory chain, suggesting that the target site of metominostrobin is similar to that of the strobilurin analogues. However, when the mycelia of *P. oryzae* was cultivated in the presence of metominostrobin, mycelial growth was suppressed for the first several hours. But the mycelia continues to grow even in the presence of 50 μ M metominostrobin, which is sufficient to fully inhibit oxygen consumption by the mycelia. The recovered respiration is sensitive to salicylhydroxyamic acid (SHAM), a potent inhibitor of the cyanide-resistant pathway, and resistant to KCN, an inhibitor of cytochrome *c* oxidase. The results suggest that metominostrobin first inhibits the electron flux through the cytochrome *bc*₁ segment of the mitochondrial respiratory chain, and then induces cyanide-resistant respiration (alternative oxidase) in *P. oryzae*. Minagawa *et al.* indicated that the yeast cells induced cyanide-resistant respiration by treatment with antimycin A, a known cytochrome *bc*₁ inhibitor, and they suggested that superoxide anion which was generated by blockage of electron flux through the cytochrome *bc*₁ segment in the mitochondrial respiratory chain, was involved in antimycin A-dependent induction of the respiration in

the yeast. After treatment of metominostrobin, superoxide anion generation was also observed, thus superoxide anion was suggested to be involved in the metominostrobin-dependent induction of the cyanide-resistant respiration in the mycelia of *P. oryzae*. It is well known that flavonoids which are widespread in the plant kingdom can scavenge oxygen radicals. In our experiments, flavonoids such as flavon etc. scavenged the superoxide anion generated by the submitochondrial particles of *P. oryzae* in the presence of metominostrobin.

From these experimental results, the mechanism of control of rice blast by metominostrobin can be explained as follows. The mycelial cells which invaded the metominostrobin-treated rice plant generate superoxide anion as a consequence of blockage of the cytochrome-mediated respiration by metominostrobin. In response to the superoxide anion generated, the fungus switches its electron transport from respiration via the cytochrome-mediated pathway to that via the alternative pathway in order to survive. Flavonoids in the host plant block the induction of the cyanide-resistant path-

way by scavenging superoxide anion and lead to complete suppression of fungal respiration with the resulting death of the fungus. Consequently, metominostrobin can express its controlling activity against rice blast caused by *P. oryzae* accompanied by rice plant components.

CONCLUSION

Metominostrobin was registered as a new agricultural fungicide by MAFF in 1998. At first, it was registered only for rice blast, then the target disease was expanded for rice sheath rot. Metominostrobin was also submitted to expand the target diseases in 2000 for control of rice sheath blight, brown spot and *Cercospora* leaf spot. Metominostrobin is very safe to the mammals and environmental animals. It shows long-lasting activity and wide range of fungicidal spectrum, so it is expected that metominostrobin can contribute to sustainable Japanese rice production and protect the environment by reducing the farmers labor cost and disease controlling cost.