

Session Lecture 9

Mode of Action and Resistance Mechanism—Plant Disease Control

本セッションでは、殺菌剤の作用機構と病原菌の耐性機構に関して、合計 8 題の講演があった。その概要は以下のとおりである。

S9-1. Mode of action of the selective fungicide cyazofamid: specific inhibition of mitochondrial complex III. S. Mitani (石原産業)

ミトコンドリア電子伝達系阻害剤のうち、ストロビルリン系薬剤 (QoI 剤) が各種病原菌で耐性菌の出現を招いているのとは対照的に、同じ複合体 III の阻害剤でありながら、QiI 剤として世界で初めて実用化されたシアゾファミドには耐性菌の報告がない。呼吸阻害剤であるシアゾファミドは卵菌による病害や根こぶ病に高い防除活性があり、キュウリべと病では各地に分布する QoI 剤耐性菌にも有効である。ジャガイモ疫病菌のすべての生育ステージに影響するが、なかでも遊走子の遊泳をもっとも強く阻害する。*Pythium spinosum* の菌糸から抽出したミトコンドリアを用いてミトコンドリアの複合体 III、とくにチトクローム *b* ヘムの還元に対するシアゾファミドの影響が詳細に調べられ、その結果から本剤の作用部位は複合体 III の Qi 部位であることが分かった。Dimefluazole やアミスルブロム (amisulbrom) もあることから、新たな QiI 剤も今後開発されよう。

S9-2. Complex II inhibitors. Y. Yanase (三井化学)

最近、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 II を阻害する薬剤が再び注目されている。すでにわが国でも農薬登録されたボスカリドに続いて、現在開発中のペンチオピラド (penthioopyrad) も新規 carboxamides に属する複合体 II の阻害剤である。合成展開によって各種の alkyl-thiophene 誘導体から選抜されたペンチオピラドは、担子菌のみならず子の菌や不完全菌にも高い抗菌活性を有し、防除スペクトラムも広い。灰色かび病菌では分生子の形成や発芽を強く阻害し、succinate-ubiquinone oxidoreductase の活性を低濃度で阻害する。ペンチオピラドはヨーロッパにおける圃場試験で、DMI 剤やストロビルリン系薬剤に耐性となったリンゴ黒星病菌の防除にも有効であった。一方、FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) はボスカリドやペンチオピラドを含む複合体 II 阻害剤の耐性菌発達リスクを中程度と考えている。これは carboxin のような初期の carboxamides の中に、耐性菌発生事例があるためである。これらを踏まえて、ペンチオピラドの場合予防的な使用がもっともよい

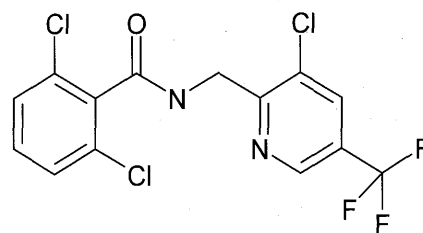
と思われる。

S9-3. Fluopicolide: mode of action. R. Beffa (Bayer Crop-Science, France)

フルオピコリドは新規化合物群 acylpicolides に属する殺菌剤で、卵菌による病害に高い防除活性を示す。ジャガイモ疫病菌やブドウべと病菌のライフサイクルにおいて、遊走子の放出や遊泳、被のう胞子の発芽、菌糸生育、遊走子の形成に影響を及ぼす。フルオピコリドはフェンアミドンやメトラキシル、zoxamide など従来の薬剤とは異なる新しい作用機構をもち、ミトコンドリア電子伝達系や核酸代謝、チューブリン重合などには影響しない。

イプロバリカルブ (iprovalicarb) やジメトモルフ耐性菌との間にも交差耐性はみられない。ジャガイモ疫病菌にフルオピコリドを処理すると、菌糸先端から細胞内容物が漏出した。蛍光標識した市販の spectrin 抗体で菌糸や遊走子における spectrin 様たんぱく質の局在を調べた結果、フルオピコリドはこのたんぱく質の分布に影響を及ぼすことが明らかになった。

Spectrin のような細胞骨格因子はアクチンやチューブリンと同様、クロスリンクして細胞の安定性に寄与すると考えられ、フルオピコリドは直接あるいは間接的に spectrin 様たんぱく質を標的とする可能性が高い。現在、このたんぱく質をコードする遺伝子の解析や、同剤処理後に減少するリン酸化たんぱく質のプロテオーム解析を進めている。



フルオピコリドの化学構造

S9-4. Studies on the mode of action of metrafenone, a new systemic fungicidal compound. B. T. Navé (BASF, Germany)

Metrafenone はムギの重要病害の 1 つ、うどんこ病の防除剤として開発された浸透性殺菌剤である。予防的な処理によりうどんこ病菌の分生子発芽は抑制され、正常な付着器形成が妨げられて吸器ができなくなり、生育を停止する。

ムギの防御反応を誘導するような現象はみられていない。菌のたんぱく質合成やミトコンドリアの電子伝達、チューブリンの重合やステロール合成、メチオニン合成を阻害することはなく、既存薬剤とは異なる新しい作用機構をもつ。

Metrafenone は菌糸先端の膨潤や破裂、崩壊を引き起こして、細胞質の漏出をもたらす。そこで、菌糸を FM4-64 や蛍光抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡で詳細に調べた結果、metrafenone は F-アクチンキャップを崩壊させ、細胞壁を弱めて菌糸先端における小胞の輸送に影響を及ぼすことが明らかになった。また、分生子柄における隔壁形成が不規則となり、DAPI 染色で細胞の多核化も観察された。Metrafenone にはうどんこ病に対する保護効果だけでなく、治療効果や胞子形成抑制、胞子の離脱阻害のほか vapor action も確認されている。

S9-5. Disease resistance inducers. H. Ishii (農環研)

QoI 剤や MBI-D 剤などで耐性菌が大きな問題となる中で、これまで約 30 年間全く耐性菌問題を起こしていないプロベナゾールは異彩を放っている。植物がもつ種々の生体防御機能を最大限活用する抵抗性誘導剤には、そのユニークな作用機構から耐性菌が生じにくい。イネ育苗箱への薬剤処理は本田での防除回数削減を可能にし、環境保全型農業の推進に大きく貢献したとされるが、そこで使用される病害防除剤の約 60% は現在抵抗性誘導剤である。近年上市されたチアジニルのほかイソチアニル (isotianil) も開発途上にある。韓国や米国などではアシベンゾラル S メチル (ASM) も市販されている。ASM は室内試験でほとんどの糸状菌に抗菌活性を示さず、圃場で散布しても植物の葉面糸状菌相に影響しない。ASM はまたキュウリを用いた試験で高い全身抵抗性誘導活性と優れた効果の持続性を示し、ビニルハウス試験では対照の殺菌剤に比べて、散布回数を削減してもうどんこ病やべと病を防除することができた。最近、ナシ黒星病で耐性菌による一部 DMI 剤の効力低下が問題化しているが、ASM は圃場試験で本病にも高い効果を示した。ASM による抵抗性誘導機構の研究をキュウリとナシで進め、活性酸素種や各種 PR たんぱく質、カロース、リグニン、さらには PGIP (polygalacturonase inhibiting protein) 等の関与を明らかにした。現在はプロテオミクス解析を行っている。また、ASM により作物に時折葉害が生じるため、この問題を回避しさらに抵抗性誘導効果の持続性を高める目的でマイクロカプセル剤についても、現在検討を進めている。

S9-6. Mechanism and molecular detection of dicarboximide resistance. M. Fujimura (東洋大)

ジカルボキシイミド系殺菌剤イプロジオンとフェニルピロール系殺菌剤フルジオキシニルの作用機構をアカパンカ

ビを用いて解析した。両剤はヒスチジンキナーゼと下流の MAP キナーゼカスケードからなる浸透圧シグナル伝達 (OS) 経路を過剰に活性化して抗菌活性を示した。OS-2 MAP キナーゼのリン酸化 (活性化) 解析から、OS 経路は殺菌剤・浸透圧・ヒートショックなどのマルチストレスで活性化されること、いずれのストレスに対しても OS-4 MAPKK キナーゼと OS-5 MAPK キナーゼが OS-2 リン酸化に必須であること、殺菌剤による OS-2 リン酸化には OS-1 ヒスチジンキナーゼが必須であることが明らかになった。このことが OS-1 ヒスチジンキナーゼと下流の MAP キナーゼカスケードの因子の変異株が、イプロジオンとフルジオキシニルのいずれにも高度耐性を示す原因と考えられる。なお、ヒスチジンキナーゼからのシグナルを MAP キナーゼカスケードに受け渡す histidine phosphotransfer (HPT-1) の遺伝子破壊株は致死し、その致死は os-2 変異により抑制されることが遺伝学的手法を用いて明らかにされた。このことから、HPT-1 は MAP キナーゼにカスケードを負に制御しており、イプロジオンとフルジオキシニルは OS-1 をとおして HPT-1 を失活させ、抗菌活性を発現している可能性もある。

次に、灰色かび病菌の殺菌剤耐性変異を検出する遺伝子診断法としてハイブリプローブ法が紹介された。ジカルボキシイミド剤およびベンズイミダゾール剤に対する耐性変異として、ヒスチジンキナーゼ *BcOS1* 遺伝子の 3 種類の変異および β -チューブリン遺伝子の 4 種類の変異がそれぞれ報告されている。これらの変異がいずれも同一遺伝子上の狭い領域に集中していることに着目し、ハイブリプローブを用いた融解温度曲線解析から、それぞれ 1 回のリアルタイム PCR 反応により各剤の耐性変異を判別することが可能となった。この遺伝子診断法を用いて、大阪府および神奈川県分離株について実際に解析した事例が報告された。

S9-7. DMI resistance: an overview. B. A. Fraaije (Rothamsted Research)

DMI 剤 (ステロール脱メチル化阻害剤) による病害防除と同剤の作用機構、耐性機構に関する医真菌と植物病原糸状菌の比較、さらには現在ヨーロッパのコムギで最も重要な病原菌ともいわれる葉枯病菌 *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) について研究が紹介された。エルゴステロールなどのステロールは糸状菌細胞膜の構造や機能の維持に必須であり、DMI 剤は農薬のみならず医薬としても重要である。耐性機構には作用点たんぱく質 (ステロール脱メチル化酵素) の変異や過剰発現、DMI 剤の細胞外への排出など複数が知られ、同一の菌種であっても複数の耐性機構が関与することもある。代表的な医真菌である *Candida albicans* の DMI 剤耐性菌ではステロール脱メチル化酵素遺伝子 *CYP51* にアミノ酸置換を伴う変異がいくつか認められ、その部位や組み合わせによって耐性レベルにも違いがある。

ムギやブドウのうどんこ病菌の DMI 剤耐性菌では、*CYP51* に Y136F の変異がみられるが、カンキツの *Penicillium* 属菌などでは *CYP51* の変異やステロール脱メチル化酵素の過剰発現のほか、薬剤排出ポンプも DMI 剤耐性の原因となる。最近コムギ葉枯病に対する DMI 剤の効果が低下傾向を示しているが、これはテブコナゾールの EC_{50} 値が徐々に上昇するという薬剤感受性検定の結果とも一致する。*M. graminicola* の DMI 剤耐性菌に共通してみられる *CYP51* の変異 I381V は PCR-RFLP や定量リアルタイム PCR により検出することができ、英国ローザムステッド研究所では古くから保存されているサンプルについても解析を進めた。このほか ABC トランスポーターやその働きを阻害して DMI 剤耐性を回避するための研究なども紹介された。

S9-8. QoI inhibitors: resistance mechanisms and its practical importance. K. H. Kuch (Bayer CropScience, Germany)

QoI 剤（ストロビルリン系及び関連薬剤）は 1996 年に初めて上市され、2004 年には世界の殺菌剤マーケットで 20%

以上のシェアを占める。1999 年まで QoI 剤の耐性菌発達リスクは medium とされていたが、その後相次いで耐性菌が報告され、今日では high risk をもつ薬剤となっている。耐性菌に関するリスクを予測することは、今日でもかなり難しい。圃場で問題となる QoI 剤高度耐性はこれまでのところチトクローム *b* 遺伝子の点変異に伴うアミノ酸置換、すなわち G143A に起因することが 20 種以上の病原菌で明らかになっている。このほかに F129L もいくつかの病原菌で見ついているが、この変異では耐性レベルが低く通常薬量による防除では問題とならない。また、他の耐性機構たとえば病原菌のエステラーゼによる一部薬剤の代謝なども報告されたが、実際の耐性菌問題への関与は低いか全くない。したがって、耐性菌対策を考える場合は当面チトクローム *b* 遺伝子の G143A 変異に的を絞ればよい。シアン耐性呼吸の QoI 剤耐性への関与も考えられるが、その詳細は明らかになっていない。

石井英夫（農業環境技術研究所）