

Session Lecture 17

Emerging Technologies in Crop Protection and Crop Production

セッション名を和訳すると「作物保護と作物生産に関する新技術」。農薬科学に関係する分野は幅広く、様々である。将来の作物保護さらには作物生産にインパクトを与えよう新技術を概観したいという趣旨で設けられた。しかし与えられたテーマが大きすぎ、実際に何に焦点を定めるか、オーガナイザー（宮川）としては大いに苦慮した。議論を経て、結局、担当オーガナイザーの一人である Schleifer 氏（BASF）の専門領域に関連した「化合物探索におけるコンピュータ利用」を第1のテーマとして取り上げ、コンピュータ技術の進歩が農薬科学の発展にどのような形で寄与するかを考えてみようということになった。

S17-1. Virtual screening as integral part of the agrochemical research process. Klaus-Jürgen Schleifer (BASF, Germany)

今日、新規な活性化合物を得ようとする場合、非常に多数の化合物をスクリーニングにかけてリード化合物を見いだすことが試みられる。しかしすべての化合物を合成し、実際に活性試験するのには時間とコストがかかる。化合物の物理化学的な性質や、分子の形、反応性などの大量のデータから、コンピュータを使って活性を予測し、効率よく活性化合物を探し当てようというアプローチがバーチャル・スクリーニング（VS）である。まず本セッションのオーガナイザーの一人である演者が、VS で用いられる方法の原理を概説した。

VS は3段階からなる。まず第一段階は、分子量、疎水性、水素結合性置換基の数など物性・物理化学的パラメータをリストにすることから始まる。リストには、さらに置換基の種類、置換基間の距離、分子の大きさ、荷電の状態など化学構造の特徴がパラメータ（構造記述子）化されて加えられる。経験則によって、化合物が活性を示すためには物理化学的パラメータがある一定の範囲になければいけないというルールがいくつか提唱されている（それぞれの研究グループで独自の経験則に従ったルールがすでに設定されていることだろう）。これをもとに試験化合物をまずふりかけることができる。

次にふるいにかけられた化合物の中から、できるだけ「性質の異なる」化合物を選ぶ。選び方にはクラスターサンプリング法、グリッドサンプリング法などがある。選ばれた化合物群（サブセット）が化学的な多様性に富んでいるかどうかは、化合物の構造記述子を用いて数学的に評価される。

この選ばれた化合物を実際の評価試験に供する。活性が認められた化合物があれば、それと「性質が類似した」ものを全体の化合物群の中から選ぶ。「類似性」の指標には Tanimoto 係数がよく用いられる。選ばれた化合物について活性評価を進め、構造活性相関を解析しながら、最適な化合物を見つけ出す。構造活性相関の解析には分子の形や、置換基の空間配置を考慮した3次元構造活性相関の手法が有効である。またターゲットにしている受容体の構造情報が得られている場合には、それをコンピュータ上でモデリングし、活性化合物との分子間相互作用を目で確認しながら、構造の最適化＝活性が期待できる化合物のライブラリからの選抜が可能になる。

このように VS では、ある化合物ライブラリの中からどの化合物を優先して活性検定するかが重要なポイントである。優先させる基準は、化合物の構造とそれに由来する物理化学的な性質に基づいて作られる。しかし農薬の場合、化合物を処理してからかなり複雑なプロセスを経て活性が発現する。受容体との相互作用以外にも活性の変動要因はたくさんあり、そのような複雑なプロセスにおける挙動を、化合物の物性のみからの的確に予測するのは極めて難しい。実験科学者の観察結果から多面的なフィードバックを引き出し、それをうまくデータベース化してより正確な化合物選抜基準、構造最適化の方法論を構築していくことが重要であろうと思われる。

S17-2. Efficient lead discovery of GCPR ligands using active learning with descriptor sampling. Minoru Asogawa (NEC, Japan)

VS では一次スクリーニングのヒット化合物から構造活性相関のルールを作成し、そのルールをもとに未知の化合物の中から活性のありそうなものが選択される。このルール作成のプロセスが「学習」と呼ばれる。この講演では演者のグループによって開発された学習機能に焦点を当てて VS の具体的な方法が説明された。最初に、約 1400 個の既知生体アミン受容体作用性リガンドについて、共通する構造情報（構造記述子）をコンピュータに「学習」させ、その判断基準に基づいて化合物ライブラリから、活性化合物をスクリーニングした例が示された。学習には、ヒット化合物をグループに分け、複数のルールをつくる Qbag (Query by bagging) という手法が用いられた。これによりルールに融通性が与えられ、より多様な化合物を選択できるようにな

る。この方法によりコンピュータは20万個以上の化合物の中から20個を活性化合物の候補として選び出し、実際にアッセイしたところそのうちの8化合物に活性が認められたという。すべての化合物をアッセイするのに比べるととても効率がよい。しかし、この例のようにすでに活性化合物が得られている場合はよいが、めざしているターゲットに関して知見が得られてない場合はどうするか。演者が一つのアプローチとして紹介したのは、ターゲットに構造が類似した受容体のリガンドの構造情報を利用する方法である。ここでは、生体内のターゲット分子間に構造の類似性があるなら、活性化合物の構造にも互いに何らかの類似性が見られるだろうという考え方が前提になっている。モデル実験として、上と同様に20万個以上の化合物ライブラリから、G蛋白質共役型受容体(GPCR)に属すエンドセリン受容体およびタキキニン(神経ペプチド)受容体に作用するリガンドを探し出した結果が説明された。構造情報の「学習」には、オピオイド活性化合物とアンジオテンシンII受容体作用リガンドが用いられた。これらの受容体はいずれもGPCRのClassAに分類される。また「学習」にあたっては、先のQbagに加えて、記述子サンプリングという手法が用いられた。これは活性にとって重要と判定された構造記述子を適当に間引いてルールを緩くするもので、これも多様な化合物の選択に有効に働くという。この方法でエンドセリンおよびタキキニン受容体結合リガンドをそれぞれ約40個見つけることに成功したそうだが、Qbagと記述子サンプリングを組み合わせることによってランダムスクリーニングに比べ効率が11倍が向上したという。また、Tanimoto係数を使ったVSに比べても、効率は2倍高く、演者らが開発した手法は大量の化合物群から少数のヒット化合物を選抜する上で大変すぐれていると言える。

S17-3. A fragment-based design approach to ACP-enoyl reductase inhibitors. Russell Viner (Syngenta, UK)

タイトルの fragment-based design とは、受容体などの標的分子に結合できる分子のフラグメントを探し、別の分子の中に組み込んで新しい阻害剤を探そうとするデザインのことである。考え方としては比較的単純でわかりやすい。この手法を用いた研究例として、除草剤開発を目指した acyl-carrier protein enoyl reductase 阻害剤の探索が紹介された。この酵素は脂肪酸の生合成に関与し、植物で遺伝子をノックアウトすると致死になるので除草剤のターゲットとなることが期待される。酵素は大腸菌で大量に発現させることができ、活性測定法も確立されている。有機溶媒を多少加えても安定であるという点も、阻害実験には好都合である。

探索は、まず阻害活性をもつことが知られる抗菌活性化合物 triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy-diphenylether) と酵素の複合体を結晶化し、X線解析でその構造を検討する

ことから始められた。Triclosan のメタクロロフェノール部分が酵素の活性中心にフィットしていることがわかったので、化合物ライブラリから類似構造をもつ化合物を選びタンパクに取り込ませて、相互作用をNMRで検討した。試験した化合物のうち3種が、活性中心に結合することが認められ、それらの部分構造を組み合わせたところ、有意な阻害活性を持つ azaquinolone 誘導体がいくつか見つかった。残念ながらこの化合物は植物体内での安定性が悪く、開発は見送られたものの、方法としての有用性が示されたため、さらに研究が進められた。

これまでのスクリーニング結果および大腸菌 ACP-ER 阻害剤として報告されている化合物から46個の構造フラグメントを抽出、次に、これらのフラグメントを構造として持つ化合物を調達した。このすべてについて酵素の活性中心と相互作用するかどうかをNMRでNOEを観測することにより調べた。Fragment-based design ではこのようにNOE測定あるいは先のX線解析を用いて、リガンドが確かに酵素の活性中心と相互作用していることを確かめながら進めていくのが重要であるという。言葉で表せば簡単だが、実際は大変な作業であろうと思われる。活性中心との結合が観察された化合物については、高濃度(2mM!)でよいからとにかく阻害実験をしてみる。これにより活性中心に結合してかつ阻害に寄与するフラグメントを見つけ出し、それを基本骨格として構造展開を図ったところ、高活性な化合物が得られたという結果だった。このように既存阻害剤の構成部品に分けて活性を測定すると、結合に重要な部分構造が明らかになる。従来は活性の弱い化合物から出発して構造展開するという方法が一般的であった。いったん部品に分解してからそれらの再構築によって高活性化合物を得るという方法は、化合物探索における新しい戦術として興味深い。

S17-4. Estimation of molecular reactivity by quantum chemical calculation—application to biotic degradations. Michael E. Beck (BayerCS, Germany)

ある薬剤の生体内あるいは環境中での挙動を理解することが重要であるのは言うまでもない。代謝分解も化学反応である。ある分子の反応性や反応部位を予測することは理論的には可能はずだ。コンピュータの性能が向上すれば、そのような予想はかなり精度よくできるようになっているのではないだろうか？ 計算化学の分野に詳しくない筆者のような素人はすぐにそのように考えてしまうのだが、実際のところはどうなのだろうか？ 4番目の講演は、この問題を扱った。分子のエネルギー状態を計算により求めるのは、正確にやろうとすると、薬物として用いられるような程度の構造の複雑さをもつ化合物ではまだまだかなり困難なようだ。化合物の物性に関する計算を簡略化する

アプローチの一つとして、分子内の電子密度を利用する Density Functional Theory (和訳は密度汎関数理論と言うらしい) によるものがある。本講演では、DFT により導かれる Fukui 関数を、異物代謝で重要な役割を果たすシクロム P450 によって触媒される酸化反応の予測に用いてみようという研究が紹介された。

Fukui 関数は、分子に電子が加わる (求核種によって攻撃される) あるいは分子から電子が奪われる (求電子種によって攻撃される) 際におこる電子密度の変化の度合い (それぞれ f^+ および f^-) を、分子の部位ごとに示すものである。変化の度合いが大きいところほど分子に対する求核反応あるいは求電子反応が起こりやすいと考える。計算は、他の半経験的なものを含めた量子化学計算に比べて簡単である。P450 による酸化反応は、酸素原子と結合したヘム鉄による求電子反応見なすことができるので、分子の f^- が反応性の指標となるはずである。

このような考えに基づき、いくつかの農薬について予測例が示された。主に P450 で代謝されることがわかっている化合物では、計算結果からの代謝物生成予想が実験結果と一致し、Fukui 関数を指標とすることの妥当性が認められた。例えば、有機リン殺虫剤で酸化的に代謝されることがよく知られている P=S の硫黄上には、はっきりとした f^- の極大が表れるという。また、代謝への P450 の関与が明らかにされていないイミダクロプリドのような化合物でも、イミダゾリジン環上で水酸化が起こることは、 f^- の極大がこの部分にあることでよく説明される。一方で、実際に生成する代謝物が、計算上で予想されるのとは異なる場合も確かにある。カルプロパミドではシクロプロパン環に結合したメチル基の水酸化が起こるが、この部分での反応は f^- からは考えにくいということだ。一般に、芳香環の水酸化、ヘテロ原子付近の酸化や結合開裂はよく予測できるが、分子内に存在するアルキル基の水酸化の予測は困難なようだ。また溶液中に存在する状態に基づいて計算するので、酵素の反応中心で起こる立体特異的な反応を予測することができない。実測との不一致はこのような要因によるものと考えられる。

P450 分子上の反応中心近傍の原子のみで Fukui 関数を計算した結果も示された。詳細は十分にフォローできなかったが酸素原子が結合した Fe イオンの f^+ が、活性中心で起こる反応をよく説明する。将来は活性中心に、薬剤分子をドッキングさせて、活性中心で特異的に起こる反応を予測するように改良が進められていくのであろう。

代謝反応の予測のために計算化学を活用しようという研究は、医薬分野で盛んである。しかし医薬の場合は、ヒトが持っている代謝系による反応を予測できれば十分である。これに比べ農薬の場合は、はるかに多様な要因が代謝分解に関わっている。標的生物や環境中での挙動を正確に予想

できるようになるためには、コンピュータが超えなければいけないハードルがまだかなりたくさんあるように思われる。ただし、比較的簡単な操作で起こりうることを可能性の高い順に整理して並べてくれるのは、実際に分析作業を進める上で大きな手助けになるだろう。今後の技術の進展が期待される。

以上の化合物探索における新しい手法の紹介に続いて、第2部では、探索のヒントとなるような新しいタイプの生理活性物質にフォーカスが当てられた。取り上げられたのはいずれも植物の発芽を促進する物質である。言うまでもなく、作物でも雑草でも、発芽は生活環を開始する上で重要な段階である。その化学制御は作物生産あるいは保護における重要な研究課題になっている。

S17-5. Strigolactones, germination stimulants for parasitic weeds *Striga* and *Orobanchae*; action mechanisms, *in vitro* production and biosynthesis. Yukihiro Sugimoto (Kobe Univ., Japan)

寄生雑草のストライガ (*Striga*) とオロバンキ (*Orobanchae*) はアフリカや地中海沿岸の半乾燥地で農作物に大きな被害をもたらす寄生雑草である。寄生を成立させるために宿主の根から放出されるストリゴラクトン類を感知して始めて発芽するという特徴をもっている。演者らは *Striga hermonthica* の種子発芽がエチレンによって制御されていることをエチレン合成阻害剤などを用いた発芽試験によって生化学的に証明した。さらに、*S. hermonthica* よりエチレンの生合成に関与する ACC オキシダーゼおよび ACC シンターゼの遺伝子をクローニングし、発現解析を行った。その結果、ストリゴラクトン類は ACC シンターゼ遺伝子の発現を誘導するのに対し、ACC オキシダーゼ遺伝子はコンディショニング (これら寄生植物の種子は、発芽刺激物質を受容するために適温、湿潤環境下に一定期間さらされる必要があり、これを人為的に行うことをコンディショニングと呼ぶ。) によって発現が誘導されることが明らかになった。このように、2つの因子によってエチレンの生合成が活性化され、生成するエチレンが発芽を誘導するという知見は、ストライガの防除法を考える上で極めて有用であろう。

ところで、ストリゴラクトン類はセスキテルペンであるが、植物から放出される量がごくわずかであることもあってその生合成経路については未だ不明である。演者らはコウモリカズラの根培養系およびミヤコグサがストライガの発芽活性物質を多く生産することを見だし、それぞれが (+)-ストリゴールと(±)-5-デオキシストリゴールを放出していることを明らかにした。さらに、コウモリカズラ根培養系を用いて ^{14}C 標識メバロラクトンの取りこみ実験を行ったところ、ストリゴラクトン類画分に放射活性は認められ

ず、ストリゴラクトン類の生合成は一般にセスキテルペン類の生合成経路と考えられているメバロン酸経路を経由していないという興味深い知見が得られた。今後、ミヤコグサ等ゲノム情報の豊富な植物を用いることでストリゴラクトン類の生合成経路が解明されるものと期待される。

S17-6. A potent new phytoactive molecule isolated from smoke. Kingsley W. Dixon (Kings Park and Botanic Garden, Australia)

演者は、植物が燃えた時の煙（山火事などの煙）中に発芽促進物質が含まれることに注目し、その単離同定、生理作用について研究を展開している。同定された化合物は、セルロース由来のブテノライドであり、これが植物を燃焼させた時の煙に含まれる発芽促進活性本体であると考えられている。先のストリゴラクトン類と同じ、 γ -ラクトン構造が含まれているのがとても興味深い。これまでカリフォルニア、南アフリカ、オーストラリア等世界各地で煙によ

り発芽が促進される植物種が認められているが、ブテノライドはそれらの植物の発芽を促進する。さらに様々な園芸種あるいは穀類に対しても、非選択的にその発芽を促進するという。この活性は ppt (part per trillion) という極低濃度で認められるため、森林の再生には 2.5 g/ha 程度しか必要でないという計算になる。今後、植物分野での様々な応用が期待できる。その作用メカニズムは未だ不明であるが、興味深い知見として、ブテノライドがジベレリン様作用をもつことが示された。例えば、光発芽を行う植物種の光要求性をキャンセルし、暗所でも発芽を誘導できる。また、ブテノライド投与によってジベレリンに対する感受性が高まることも明らかになった。大変興味深い化合物であり、これからの研究の進展を見守りたい。

宮川 恒（京都大学大学院農学研究科）・

岡澤敦司（大阪大学大学院工学研究科）