ミニレビュー

新規殺菌剤トルプロカルブの作用機作と生物活性[#]

萩原 寛之*

三井化学アグロ株式会社農業化学研究所

(2019年7月4日受理)

Modes of action and biological activities of a novel fungicide tolprocarb

Hiroyuki HAGIWARA

Agrochemicals research center, Mitsui chemicals Agro, Inc., Mobara, Chiba 297-0017, Japan

Keywords: melanin biosynthesis inhibitor (MBI), plant defense activator, biological activity.

はじめに

イネいもち病は、農作物の収量を著しく低下させるため、水稻栽培における最重要病害として防除が不可欠な病害とされている。

イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) は水稻における最重要病害であるため、その防除剤として多くの殺菌剤が開発されてきた。しかしながら、本菌は耐性菌の発達リスクが高く、これまでにカスガマイシン耐性菌 (1971年)、有機リン剤耐性菌 (1977年)、メラニン生合成経路の dehydratase 阻害剤 (melanin biosynthesis inhibitor-dehydratase; MBI-D) 耐性菌 (2001年)、呼吸鎖複合体III阻害剤 (Quinone outside Inhibitor; QoI) 耐性菌 (2012年) の存在が確認されている。¹⁻⁸⁾ したがって、生産現場における薬剤防除の選択肢が少なくなっており、新規イネいもち病防除剤が要望されている。

トルプロカルブ (tolprocarb) は、三井化学アグロ(株)が開発した新規殺菌剤であり、イネいもち病に対し高い防除効果を示すことに加え、イネもみ枯細菌病に対しても防除効果

を示す (図1)。本化合物は、疫・べと病に防除活性を示すバリニアミドカーバメート系化合物の構造展開から、イネいもち病に対し防除活性を示すリード骨格を見出し、浸透移行性を指標に合成展開した化合物の中から選抜した。⁹⁾ トルプロカルブは水稻用殺菌剤として育苗箱処理剤、本田処理剤が開発され、2015年に上市されている。

トルプロカルブの作用点はメラニン生合成経路の新規作用点として、Polyketide合成酵素を阻害することが知られており、Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) では、還元酵素 (reductase) を阻害する MBI-R 剤 (MBI-reductase)、脱水酵素 (dehydratase) を阻害する MBI-D 剤 (MBI-Dehydratase) とは異なる新規サブグループとして、Polyketide合成酵素 (polyketide synthase; PKS) を阻害する MBI-P 剤 (MBI-polyketide synthase) として分類されている。^{10,11)}

本報告では、細菌病に対する作用性解析から明らかにされたトルプロカルブの新たな作用性と生物活性について紹介する。

図1. トルプロカルブの構造式。

[#] 第43回大会シンポジウムを取りまとめた解説。

* 〒297-0017 千葉県茂原市東郷

E-mail: Hiroyuki.Hagiwara@mitsuichemicals.com

© 日本農薬学会

表1. トルプロカルブの性状

項目	性状
一般名	tolprocarb
IUPAC名	2,2,2-trifluoroethyl (S)-[2-methyl-1-(p-toluoylaminomethyl)propyl] carbamate
融点	133.7–135.0°C
pH	7.6–7.9 (saturated aqueous solution)
密度	1.277 g/cm ³ (20°C)
溶解性	41.2 mg/L (water), 0.0543 g/L (hexane), 358 g/L (methanol) (20°C)
急性毒性 経口LD ₅₀ ラット (Female)	>2000 mg/kg
経皮LD ₅₀ ラット	>2000 mg/kg
吸入LC ₅₀ ラット	>5.212 mg/L
急性毒性 (コイ)	LC ₅₀ (96 hr) >18.0 mg/L
急性遊泳阻害 (<i>Daphnia magna</i>)	EC ₅₀ (48 hr) >22.6 mg/L
成長阻害 (Algae)	ErC ₅₀ (0–72 hr) >17.9 mg/L

1. 有効成分と性状

トルプロカルブの諸性状を表1に示す。哺乳類、水生生物に対し高い安全性を示す化合物である。

2. トルプロカルブの作用性I：メラニン生合成阻害活性

2.1. 作用機作の探索

イネいもち病菌において、メラニンが宿主への感染、特に付着器から宿主への侵入過程に重要な役割を果たすことが

明らかにされている。^{12,13)} これまでに、メラニン生合成阻害剤として、メラニン生合成経路の阻害部位が異なるフサライド、ピロキロン、トリシクラゾール等のMBI-R剤、ジクロシメット、カルプロパミド、フェノキサニル等のMBI-D剤が開発されている。¹¹⁾

トルプロカルブは培地上で各種糸状菌、細菌に対し抗菌活性を示さず、イネいもち病菌に対して菌叢着色阻害を示すが、既存のメラニン生合成阻害剤に比べその着色程度が異なる。Polyketide synthase (PKS) の反応生成物である

図2. イネいもち病菌におけるメラニン生合成経路と各種メラニン生合成阻害剤の作用点。図中の略語は以下の通り；MBI-P, melanin biosynthesis inhibitor-polyketide synthase (PKS), MBI-R, melanin biosynthesis inhibitor-Reductase, MBI-D, melanin biosynthesis inhibitor-Dehydratase. イネいもち病菌のメラニン（DHNメラニン）はMalonyl-CoAから縮合、環化反応を経たのちに還元反応と脱水素反応を繰り返して生合成される。各メラニン生合成阻害剤はそれぞれの酵素反応を阻害する。

図3. イネ葉鞘細胞へのイネいもち病菌の感染に対するトルプロカルブ及びメラニン中間体 (1,8-DHN) 添加の影響. 1,8-DHNおよびトルプロカルブを単独または混合してイネいもち病菌分生子懸濁液に添加し、イネ葉鞘細胞に感染させた. A: 附着器のメラニン化率および附着器からのイネ葉鞘細胞への侵入率. エラーバーは99%信頼区間. B: 各薬剤処理区および無処理区でのイネ葉鞘細胞への侵入の様子. a, 無処理区; b, 1,8-DHN添加区; c, tolprocarb添加区; d, 1,8-DHNおよびtolprocarb混合添加区.

1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (1,3,6,8-THN) の添加回復試験により菌叢着色が回復したことから、PKSを阻害していることが予想された. さらに、作用点を明確にするためにイネいもち病菌のPKS遺伝子をコウジカビ菌 (*Aspergillus oryzae*) に導入し、*in vitro*でのPKS阻害試験を実施した. その結果、濃度依存的に1,3,6,8-THNの蓄積阻害を確認し、トルプロカルブの作用点がメラニン生合成経路におけるPKS阻害であることを明らかにした (図2).¹⁰⁾ これをもとにFRAC Code List[®]では新規サブグループ (MBI-P; melanin biosynthesis inhibitors-polyketide synthase) に分類されている.¹¹⁾

3. トルプロカルブの作用性II: 抵抗性誘導活性

3.1. 植物における抵抗性誘導

全身獲得抵抗性 (Systemic acquired resistance; SAR) は植物の非宿主特異的防御応答の一種であり、サリチル酸 (SA) がシグナル物質として関与することが知られている.¹⁴⁾ SA

シグナル伝達系においては、*NPR1*や*WRKY45*などの制御遺伝子が*PR-1*や*PR-2*, *PR-5*, *PBZ1*といった防御関連遺伝子の発現を制御している. 一方、植物の防御応答経路として、SA系の他にジャスモン酸 (JA) が関与する誘導抵抗性 (Induced systemic resistance; ISR) があることが知られている. JAシグナル伝達系では*PDF1.2*や*VSP1*といった遺伝子の発現が制御され、非病原性菌や草食性昆虫の食害などによって誘導されることが知られている.^{15,16)} プロベナゾール、アシベンゾラルSメチル、チアジニル、イソチアニルは、SAシグナル伝達系を活性化する化合物として開発されており、水稻を中心とした農業現場において使用されている. トルプロカルブは、細菌による病害であるイネもみ枯細菌病にも防除効果を示すことが知られているが、イネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) に対し抗菌活性を示さないことから、2つ目の作用性として植物に対する抵抗性誘導能を有すると推定し、その仮説の検証を行った.

図4. SCL寒天培地上でのイネいもち病菌の感染に対するトルプロカルブ及びメラニン中間体（1,8-DHN）添加の影響. 1,8-DHNおよびトルプロカルブを単独または混合してイネいもち病菌分生子懸濁液に添加し、SCL media上で付着器からの侵入の様子を観察した. A: 付着器のメラニン化率および付着器からのSCL mediaへの侵入率. エラーバーは99%信頼区間. B: 各薬剤処理区および無処理区でのSCL mediaへの侵入の様子. a, 無処理区; b, tolprocarb添加区; c, 1,8-DHNおよびtolprocarb混合添加区.

3.2. シロイヌナズナに対する抵抗性誘導活性と病害防除効果

遺伝子組み換えシロイヌナズナ（PR-1a::Fluc）評価系（横浜バイオテクノロジー株式会社）を用い、トルプロカルブのPR-1a発現誘導活性を評価した. 本シロイヌナズナはタバコPR-1a遺伝子プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として組み込んでおり、PR-1a遺伝子の発現活性をルシフェリンの発光強度として検出できる.¹⁷⁾ トルプロカルブは、発芽直後のシロイヌナズナ幼苗（化合物浸漬処理）、3週齢のシロイヌナズナ本葉（化合物を根圏に灌注処理）においても、安定したPR-1a発現誘導活性を示した.¹⁸⁾

さらに、細菌病に対する抵抗性誘導活性を評価するため、黒斑細菌病菌（*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*）のPR-1a::Flucシロイヌナズナでの増殖抑制効果を評価した. 3週齢のシロイヌナズナの根圏に200μMのトルプロカルブを添加し、薬剤処理約10日後に*P. syringae*の細菌懸濁液を本葉にインフィルトレーション接種した. 接種3日後に*P. syringae*のDNAを接種葉から抽出し、リアルタイムPCRでDNAの量を比較して増殖抑制効果を評価したところ、トルプロカルブ処理シロイヌナズナでは*P. syringae*の増殖が有意に抑制されることが示された.¹⁸⁾

3.3. イネに対する抵抗性誘導活性

インキュベータ内で栽培したイネ幼苗（日本晴；3葉期）の第3葉を用い、トルプロカルブのイネにおける抵抗性関連遺伝子の誘導活性をqRT-PCRによって評価した. SAシグナル伝達系によって主に発現が誘導される遺伝子として、PBZ1（Probenazole-inducible protein）、PR1b（Pathogenesis-related protein 1b）、POX22.3（Peroxidase）、β-1,3-Glucanase、Chitinase 1、KSL7（Ent-kaurene synthase 7; Phytocassane 生合成経路）、CYP99A2（Cytochrome P450 99A2; Momilactone 生合成経路）を、JA系によって主に発現が誘導される遺伝子としてRBB12-3（Proteinase inhibitor）、RCI-1（Lipoxygenase）、NOMT（Naringenin 7-O-methyltransferase; Sakuranetin 生合成経路）を含む計10遺伝子を指標とした. その結果、トルプロカルブは試験に用いたSAシグナル伝達系遺伝子（PBZ1、β-1,3-Glucanase等）の発現を、対照剤であるプロベナゾールと同等程度に亢進した. 一方、JAシグナル伝達系の遺伝子（RBB12-3、RCI-1等）の発現は亢進しなかった.¹⁹⁾ これらの結果から、トルプロカルブはSAシグナル伝達系に作用すると推測されるが、詳細な作用機作は解明されていない.

表2. トルプロカルブ含有製剤の一覧

製剤	商品名	有効成分	施用方法
粒剤	サンブラス [®] ／ゴウケツ [*]	トルプロカルブ 3%, 9%, 18%	湛水散布
	サンブラス [®] パック	トルプロカルブ 20%	水田に小包装（パック）のまま投げ入れる。
	ガッツスター [®] ／ゴウケツモンスター [*]	トルプロカルブ 3% シメコナゾール 1.5% ジノテフラン 1.67%	湛水散布
	サントリプル [®] ／サンフェスタ [®]	トルプロカルブ 4% シメコナゾール 6% クロラントラニリプロール 0.75%	育苗箱の上から均一に散布する。
箱粒剤	サンエース [®]	トルプロカルブ 4% シメコナゾール 4.5% トリフルメゾピリム 0.75% クロラントラニリプロール 0.75%	育苗箱の上から均一に散布する。
	サンスパイク [®]	トルプロカルブ 4% トリフルメゾピリム 0.75% クロラントラニリプロール 0.75%	育苗箱の上から均一に散布する。
	トリブルキック [®]	トルプロカルブ 9% シメコナゾール 4.5% シアントラニリプロール 0.75%	育苗箱の上から均一に散布する。
	ツインキック [®]	トルプロカルブ 9% シアントラニリプロール 0.75%	育苗箱の上から均一に散布する。

*北興化学工業株式会社。

3.4. 抵抗性誘導によるイネいもち病感染への影響

トルプロカルブの抵抗性誘導によるイネいもち病防除効果への影響を検証するため、イネ葉鞘裏面接種法を用いた添

加回復試験を実施した。イネいもち病菌を接種する際にトルプロカルブとメラニン中間体（1,8-DHN）を添加した場合、付着器のメラニン化は回復するが付着器を介したイネへの侵

図5. トルプロカルブ含有箱粒剤の穂いもちに対する防除効果。各プロットはトルプロカルブおよび各対照剤の防除効果を示す。

入率は回復しなかった（図3）。上記の結果から、トルプロカルブによって、イネへの侵入が阻害されていると推定された。

トルプロカルブ処理時のイネにおけるイネいもち病菌の侵入阻害が、イネいもち病菌への直接的な作用か、抵抗性誘導に起因する作用かを明確にするため、Surface-Cross-Linked agar media (SCL media) を用いた試験を実施した。なお、SCL培地は、植物細胞を介さずにイネいもち病菌の付着器からの侵入行動を観察できる培地である。²⁰⁾ その結果、トルプロカルブと1,8-DHNを同時に添加した場合でも付着器のメラニン化、付着器からの侵入率が共に回復した（図4）。植物体と培地上における侵入の違いから、イネいもち病に対する防除効果にも、トルプロカルブ処理による植物側の抵抗性反応が関与していることが示された。

4. トルプロカルブのイネいもち病に対する防除効果

4.1. 圃場試験結果

トルプロカルブは浸透移行性を示し、箱粒剤、粒剤として根圏に処理することで根から吸収され、葉に移行することでイネいもち病防除効果を示す。²¹⁾ 表2にトルプロカルブ含有製剤の一覧を示す（2018年10月現在）。2007–2015年の社内圃場試験において、トルプロカルブ箱粒剤（4%, 9%）は葉いもち、穂いもちの両方に対し高い防除効果を示した。特に穂いもちに対する防除効果については、統計学的解析としてメタアナリシスを実施、変量効果モデル（restricted maximum likelihood method）を用いてリスク比を算出した結果、対照剤と比べ有意に優ることを確認した。トルプロカルブ粒剤（3%）についても、2007–2015年の社内圃場試験において出穂29日前–5日前の処理で穂いもちに対し高い防除効果を示すこと、統計学的解析結果においても対照剤と比べ有意に優ることを確認した。²²⁾

4.2. 薬剤耐性イネいもち病菌に対する防除効果

農業において薬剤耐性菌の発達は、その薬剤の防除効果を著しく低下させ、作物の栽培を困難にさせる重要な問題である。トルプロカルブは近年問題となっているMBI-D剤またはQoI剤耐性菌に対しても感受性菌と同等の防除効果を示すことから、実際の圃場においても安定した防除効果を示すと推察された（図5）。²³⁾

5. おわりに

トルプロカルブは、イネいもち病防除剤として高い防除効果を示すことが特長である。また、メラニン生合成経路におけるPKS阻害は新規であり、既存の薬剤耐性イネいもち病菌（MBI-D, QoI剤）と交差耐性を示さない。さらに、トルプロカルブの病害防除効果には抵抗性誘導が関与していると推定されることから、耐性菌発達リスクが低い可能性があ

る。今後は定期的に感受性検定を実施するとともに、本仮説を検証していく予定である。トルプロカルブを水稻の防除体系における選択肢の一つとして使用頂ければ幸いである。

謝 辞

トルプロカルブの抵抗性誘導活性を検証するに当たり、横浜バイオテクノロジー株式会社 小倉里江子先生、平塚和之先生に多大なるご協力を賜りました。また、SCL mediaの作製方法について石川県立大学 田中栄爾先生にご教授いただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a_8（2019年6月18日閲覧）
- 2) 三浦春夫, 伊藤 弘, 高橋昭二: 日植病報**41**, 415–417 (1975).
- 3) 飯島章彦: 第4回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨, pp. 11–20 (1994).
- 4) 廣岡 卓, 宮城幸男: 第4回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨, pp. 21–30 (1994).
- 5) 山口純一郎, 口本文孝, 平八重一之, 宗 和弘: 日植病報**68**, 261 (2002).
- 6) 宗 和弘, 富士 真, 岩淵博己, 金山正人, 山口純一郎: 日植病報**68**, 262 (2002).
- 7) 相原 穂, 田中桂子, 執行拓宇, 久池井 豊, 新木康夫, 草場基章, 高垣真喜一, 永山孝三, 沢田治子: 日植病報**68**, 262 (2002).
- 8) 宮川典子, 富士 真: 第23回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨, pp. 25–35 (2013).
- 9) S. Banba, T. Hamada, N. Araki and K. Ebihara: *J. Pestic. Sci.* **42**, 25–31 (2017).
- 10) T. Hamada, M. Asanagi, T. Satozawa, N. Araki, S. Banba, N. Higashimura, T. Akase and K. Hirase: *J. Pestic. Sci.* **39**, 152–158 (2014).
- 11) http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf?sfvrsn=98ff4b9a_2（2019年6月18日閲覧）
- 12) C. P. Woloshuk and H. D. Sisler: *J. Pestic. Sci.* **7**, 161–166 (1982).
- 13) Y. Kubo, K. Suzuki, I. Furusawa and M. Yamamoto: *Phytopathology* **72**, 1198–1200 (1982).
- 14) D. Horvath and N. Chua: *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 131–136 (1994).
- 15) D. Tamaoki, S. Seo, S. Yamada, A. Kano, A. Miyamoto, H. Shishido, S. Miyoshi, S. Taniguchi and K. Gomi: *Plant Signal. Behav.* **8**, e24260 (2013).
- 16) L. Wang and J. Wu: *J. Genet. Genomics* **40**, 597–606 (2013).
- 17) S. Ono, M. Kusama, R. Ogura and K. Hiratsuka: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1796–1800 (2011).
- 18) 小倉里江子, 萩原寛之, 福元健志, 安楽城夏子, 小原敏明, 平塚和之: 平成30年度日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集p. 98 (2018).
- 19) 萩原寛之, 小倉里江子, 福元健志, 安楽城夏子, 平塚和之, 小原

敏明：平成30年度日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集，p. 98 (2018).

- 20) E. Tanaka: *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, fnv066 (2015).
- 21) 明瀬智久，安楽城夏子，江崎竜太郎，戸村直文，森實邦彦，海老原耕一：平成27年度日本農薬学会講演要旨集，p. 127 (2015).
- 22) 萩原寛之：EBC (Evidence-based Control) 研究会ワークショップ2016講演要旨，pp. 36-42 (2016).
- 23) 櫻井誠也，安楽城夏子，明瀬智久：日植病報 **81**, 253 (2015).

略 歴

萩原寛之（はぎわら ひろゆき）

生年月日：1982年9月5日

最終学歴：北海道大学大学院農学院修士課程修了

研究テーマまたは主な職歴：農薬の生物評価

趣味：アクアリウム