

学位論文審査の結果の要旨

氏名	木村 幸
審査委員	主査 西脇 寿
	副査 山内 聡
	副査 八丈野 孝
	副査 秋光 和也
	副査 曳地 康史

論文名

新規殺菌剤フルチアニルの創製と生物学的、形態学および毒性学的研究

審査結果の要旨

うどんこ病菌は幅広い作物種に甚大な被害を与える重要病害の一つであり、FRACの病原菌リスクリストにおいて耐性菌発生リスクが高い病原菌に分類されている。現在、農業現場で使用されている殺菌剤に対して耐性を示す各種作物うどんこ病菌が数多く報告されており、実用場面では常に新規作用機構の剤が求められている。本論文では、既存の農薬には見られないシアノメチレンチアゾリジン環を有する構造を有するうどんこ病菌専用の殺菌剤フルチアニルに関して、その創製、うどんこ病菌の形態ならびに遺伝子発現に対する影響、毒性学的諸性質を詳細に検討している。

第1章では、新規殺菌剤の創製研究に関して述べられている。はじめに、ユニークな骨格を持つ化合物が含まれている各種化合物ライブラリーからランダムスクリーニング法により探索し、キュウリうどんこ病菌 *Podosphaera xanthii* に対して比較的高い活性を示すチアゾリジン骨格を有する化合物を新規リード化合物として選抜した。この骨格は既存の殺菌剤にはない骨格であり、新規作用機構を有する可能性が期待されたため、合成展開し、構造活性相関を解析した。その結果、チアゾリジンの窒素原子と硫黄原子に結合する2つの芳香環を各種アルキル基に変換した化合物やチアゾリジン骨格のエチレン部位を種々修飾した化合物は活性が低下することが明らかとなった。次に、高活性に必要である芳香環の置換基を種々検討し、*N*-phenyl基ならびに*S*-phenyl基がそれぞれ2-CH₃O基ならびに2-F-5-CF₃基をもつ化合物が*P. xanthii*だけでなく、コムギうどんこ病 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* に対しても高活性を示すことをつきとめ、新規構造を有する殺菌剤としてフルチアニルを創製するに至った。

第2章では、フルチアニルの作用特性および既存殺菌剤との交差抵抗性について調査した結果が述べられている。フルチアニルの各種植物病原糸状菌および植物病原細菌に対する抗菌活性を評価したところ、本剤は10 mg/Lの低濃度で、キュウリうどんこ病菌 (*P. xanthii*)、コムギうどんこ病菌 (*B. graminis* f. sp. *tritici*)、ナスうどんこ病菌 (*Sphaerotheca fuliginea*)およびブドウうどんこ病菌 (*Erysiphe necator*) などの各種作物うどんこ病菌に対して高い防除効果が確認できた一方で、多くの他の病原菌にはほとんど活性を示さなかった。このことから、本剤はうどんこ病菌特異的なスペクトラムを有することが示された。さらに、本剤はキュウリうどんこ病菌を用いたポット試験において10 mg/Lと極めて低濃度で、優れた残効性、浸達性および耐雨性を示すことが明らかとなった。また、治療効果にも優れており、病原菌接種14日後の薬剤散布において、新たな分生子形成および病斑の拡大を抑制した。EUでのブドウうどんこ病菌、日本でのキュウリおよびイチゴうどんこ病菌に対する薬剤感受性試験において、既存の殺菌剤と交叉耐性を示さないことを明らかにした。

第3章では、フルチアニルのうどんこ病菌に対する作用部位に関して、形態学的知見から検討した成果を述べている。光学顕微鏡、走査型および透過型電子顕微鏡などを用いた形態学的解析を行った。まず、オオムギうどんこ病菌 *B. graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) の感染初期における本剤の影響を光学顕微鏡により観察した。オオムギうどんこ病菌の一連の感染プロセスにおいて、本剤は分生子の発芽、第一次発芽管発芽、付着器形成、付着器突起形成を阻害せず、既存の殺菌剤であるトリフルミゾール、アズキシストロビン、トルフェンピラド、キノキシフェン、ベノミル、キノキサリン系およびメトラフェノンの阻害パターンとは明らかに異なる一方で、吸器の形成のみを阻害し、既存殺菌剤シフルフェナミドの阻害パターンと類似していることを見出した。この知見をうけ、フルチアニルまたはシフルフェナミド処理がオオムギうどんこ病菌の吸器形成阻害後の菌の発達へ与える影響を比較した。吸器形成後に0.1 Mのグルコースを加え、薬剤処理区と無処理区における24時間後の二次菌糸の長さを測定したところ、無処理およびシフルフェナミド処理区におけるグルコースの有無による二次菌糸伸長率の割合は、同等の伸長率であり、二次菌糸の長さに有意差が見られた。一方で、フルチアニルの伸長率はわずかであり、グルコース添加と無添加における二次菌糸の長さには有意差は認められなかった。以上より、フルチアニルは吸器の形成だけでなく、宿主からのグルコースの吸収も阻害することで、二次菌糸の伸長を抑制していることを見出した。次に、透過型電子顕微鏡を用いてフルチアニルのオオムギうどんこ病菌の細胞小器官への影響を観察し、吸器細胞の吸器外マトリックス部位や吸器細胞壁だけでなく、菌糸においても細胞壁の不明瞭化を引き起こすことを明らかにした。以上の形態学的解析によりフルチアニルの一次作用点が吸器であることを示した。本研究により殺菌剤の新規作用点を示すことができ、この成果は将来の殺菌剤の開発に役立つ重要な知見を与えている。

第4章では、フルチアニルの作用部位に関して遺伝子発現量をもとに検討した成果を述べている。フルチアニル処理および未処理のオオムギうどんこ病菌の遺伝子発現を網羅的にRNA-sequencingを用いたtranscriptome解析し、フルチアニル処理がオオムギうどんこ病菌においてコンスタントに発現している遺伝子群にほとんど影響しないことを明らかにした。一方で、フルチアニル処理により上方制御または下方制御される遺伝子群のうち、主に吸器細胞で発現する3種類の糖輸送体遺伝子を同定することができた。Transcriptome解析には、宿主表面に寄生したオオムギうどんこ病菌の着生組織を用いており、メトラフェノンやシフルフェナミドと異なり、フルチアニル処理がオオムギうどんこ病菌の着生組織の遺伝子発現にはほとんど影響を与えないことが明らかになり、フルチアニルの主な標的は着生組織ではなく、吸器組織である可能性を示した。なお、フルチアニルと既存殺菌剤のメトラフェノンまたはシフルフェナミドの遺伝子発現プロファイルにはほとんど類似性がなく、本剤の作用機構が他の既存殺菌剤とは異なることを示した。以上の網羅的な遺伝子発現解析からも、フルチアニルの主な作用部位が吸器の機能阻害である可能性が考えられた。

第5章では、フルチアニルの人畜や環境への安全性を担保するため、各種毒性試験を実施した結果を述べている。フルチアニルの急性毒性を評価するために、ラットに対する急性経口ならびに経皮毒性試験を実施したが、毒性は極めて低く、経口毒性は雌雄ともにLD₅₀の値が5000 mg/kg以上、経皮毒性についても雌雄ともに5000 mg/kg以上を示した。また、吸入毒性試験については雌雄ともにLC₅₀の値が5.17 mg/L以上であり高い値を示した。皮膚刺激性および感作性は認められないことに加えて、遺伝毒性も陰性であることが明らかとなった。ラットおよびマウスに対する90日間の亜急性毒性試験およびラットに対する亜急性経皮毒性試験でも毒性は認められなかった。28日間の亜急性吸入毒性試験では、1 mg/Lの曝露で雌雄ともに肺細葉中心性の炎症が認められ、NOAELは0.1 mg/Lであった。ビーグル犬に対する1年間の慢性毒性試験、ラットに対する2年間の慢性毒性/発がん性併合試験、マウスに対する18か月の発がん性試験でも毒性は認められなかった。ラットに対する2世代繁殖毒性試験では、最高用量の2000 ppmを処理した雌雄で肝臓の比重量が増加したが、児動物に毒性はなく、2000 ppmで雌雄親児ともに毒性は認められなかった。ラットまたはウサギに対する発生毒性試験では、母児ともに毒性は認められなかった。各種試験で得られたNOAELをもとに設定したADIの値は、既存農薬の中でも高いものであり、フルチアニルの人畜に対する高い安全性が認められた。

以上のように、本論文は新規構造を有する殺菌剤の創製から作用機構の検討、毒性試験にいたるまで実施された研究成果をまとめたものである。農薬科学ならびに生物制御化学の研究分野に重要な知見を与えており、特に殺菌剤の新規作用機構を見出したことは意義深く、将来の殺菌剤開発研究に資するものである。

学位論文の公開審査会は令和4年2月1日にリモートシステムを利用して実施され、口頭発表と質疑応答が行われた。続いて学位論文審査委員会を開催して本論文の内容を審査した。その結果、審査委員全員一致して本論文が博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。