

特集：ゲノム創農薬

# 殺菌剤開発におけるゲノム創農薬の可能性

呉羽化学工業(株)錦総合研究所 須 藤 敬 一

## はじめに

化学合成農薬はこれまで、食料となる作物を安定的に収穫するために重要な役割を果たしてきた。しかも、将来地球上の人口がさらに増大することから、その重要性は変わらないであろう。しかし、世界的な環境問題の意識は向上しており、農薬に対する風当たりが強まっていることも否定できない。世界的に推進されている環境保全型農業では、過度の農薬使用による環境への負荷を抑制するような農業が行われる。こうした環境保全型農業で使用される農薬に求められる特徴としては、より使用量を減らせるように、すなわちより高活性の薬剤、そして、既存薬剤に耐性を示す有害生物を防除できるような、新規の作用機作を有するような薬剤であることが挙げられる。こうした市場のニーズに対応した薬剤をいかに効率的に開発するか、農薬メーカーは今まで以上に困難となったこの問題に立ち向かわなければならない情勢になってきている。

## I 農薬開発の現状

医薬品の開発には膨大な費用と期間が必要であるということはよく知られているが、農薬の開発の場合も、同じように費用と期間がかかる。しかし、医薬品と比較すると市場規模が小さいので、開発費用を回収することはなかなか難しい。また、より高活性、新規作用を有するという性質を付加させることは、新規農薬の開発を一層困難にしており、実際、新規な作用を有する画期的な薬剤は、近年なかなか開発されていない。こうした状況もあり、農薬業界では世界的な再編が行われ、欧米では、大手の農薬メーカー同士で統合が行われ、次第に寡占化してきている。日本においても、農薬事業から撤退していく化学企業が現れている。

こうしたなか、欧州の大企業には、より多くの化合物を効率的に評価して、新規農薬を見出そうと、コンビナトリアルケミストリーや High Throughput Screening

(HTS)といった技術を、多額な開発費用を投じて導入している企業がある。しかし、そうしたことが可能な農薬メーカーはごく限られ、より効率的に新規化合物を探索できる別のアプローチが模索されている。

## II ゲノム創薬

そこで筆者らは、医薬品探索分野において主流になりつつある『ゲノム創薬』に注目した。ゲノム情報を薬剤の探索段階で応用するこの方法は、多数の化合物をランダムに合成、評価するよりも効率的にリード化合物を発見できる可能性が高いと考えられる。

医薬品や農薬は、その薬効が認められる場合、標的となる酵素と相互作用している場合が多い。逆にいえば、薬剤の標的酵素の構造に関する情報が得られれば、それに相互作用すると予想される構造の化合物を合成することが可能となり、新規薬剤への近道になると考えられる。医薬品においては、臨床試験に供試する候補化合物を選定する際に、薬剤の *in vitro* 試験で効果を確認するが、ヒトゲノムが解読されたことで、人間の遺伝子、酵素に関する情報が増えるので、試験をより効果的なものにできる。このように、ゲノム情報を用いて新薬の探索を行うことが、医薬品開発における『ゲノム創薬』なのである。

これと同様なことが、農薬の探索においても行われることが可能であると思われるが、医薬品開発ほど進んだ研究は行われていない。この理由としては、農薬の評価では、医薬品とは異なり、いわゆるポット試験や圃場試験で、医薬品の臨床試験と同等のことが簡単に行えることから、それほどゲノム情報が重要視されてこなかったこと、そして、ヒト以外のゲノム研究がまだ進んでいなかったことが挙げられる。しかし、『ゲノム創薬』の発展により、医薬品開発が新しい展開を見せているように、農薬開発においても『ゲノム創農薬』が、これまでとは別の、しかもより効率的な探索アプローチに十分なり得ると考えられることから、その可能性を探ってみた。

先述のように、薬剤が薬効を示すには、薬剤とその標的酵素が相互作用していることが重要であることが多い。これまでの創薬では、多数ある薬剤候補の化合物を

Possibility of Genomic Agrochemicals Discovery in Development of Fungicide. By Keiichi SUDO

(キーワード：ゲノム創農薬、アゾール系殺菌剤、CYP 51, QSAR 解析, モデリング, アミノ酸配列)

評価し、その結果から標的酵素と相互作用するのに適した化合物を選別していたといえる。それに対し、『ゲノム創農薬』では全く逆に、まず標的酵素の構造を予測し、そこから、相互作用するのに適した構造の化合物を、合成する前に選択しようという手法である。そこで、こうした手法が可能であるかどうか、**異羽化学で開発されたメトコナゾールを用いて、手法確立を試みた。**

### III アゾール系殺菌剤と標的酵素 CYP 51 の 3D モデリング

#### 1 アゾール系殺菌剤の探索

異羽化学では、ムギ用莖葉散布剤メトコナゾール（商品名：カランバ）とイネ用種子消毒剤イブコナゾール（商品名：テクリード）というアゾール系殺菌剤を2剤上市している（図-1）。農薬の開発においては、数万個の化合物の中から農薬として商品化されるのは1化合物、というほどの確率の世界であるが、この2剤は、数百個の化合物を合成した中から商品化することができた。これには、コンピュータケミストリー技術を駆使した、詳細な構造活性相関研究が大きな役割を果たした。

定量的構造活性相関（Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR）を行うことで、その結果、薬剤と標的酵素が相互作用している状態を予想すること

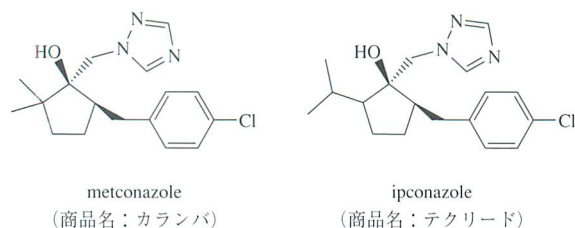
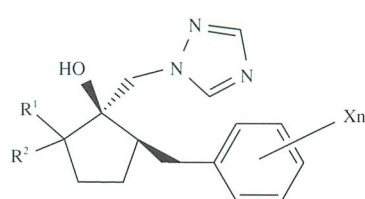


図-1 メトコナゾールとイブコナゾール



$$\begin{aligned}
 \text{pIC}_{50}(\textit{Botrytis cinerea} \textit{ in vitro}) &= -0.761L_2 - 0.862W - 0.669D + 3.237 \log P - 0.418(\log P)^2 + 0.428I + 9.782 \\
 n &= 32, r = 0.933, s = 0.377, \log P_{\text{opt}} = 3.87, I = 0 \text{ for } R^1 = R^2 = \text{H}, I = 1 \text{ for } R^1 \text{ or } R^2 = \text{alkyl}
 \end{aligned}$$

図-2 Hansh-Fujita 法によるメトコナゾールの QSAR 解析

が可能となり、標的酵素との相互作用に対し、最適な構造へとリード化合物を変換させていった。つまり、化合物合成へフィードバックされる解析結果より、標的酵素の構造を推測した試みであったともいえる（図-2）（CHUMAN, 1995）。

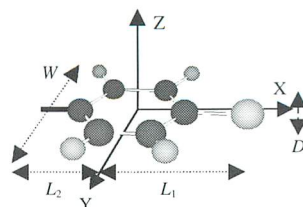
#### 2 モデリング手法の確立

このように、新規農薬探索において、QSAR 解析は有効な手段であることが知られているが、この手法には、ゲノム情報は導入されていない。標的酵素の構造は、先に合成された、酵素に作用する化合物の構造から予測しているに過ぎない。ところが、薬剤候補化合物を用意する前に、標的酵素の構造に関する情報があれば、QSAR 解析を用いた探索よりも、さらに効率的なリード化合物への到達が可能ではないかと考えた。

酵素の構造は、一般的に特異的な立体構造をもち、生体反応に重要な基質特異性を有するようになる。しかし、様々な生物から多数の酵素が単離、精製されているが、立体構造まで決定されているものはごくわずかで、しかも、その中に薬剤の標的となり得る酵素である可能性は少ない。よって通常、決定されていない酵素の構造は、モデリングと言われる、すでに立体構造が判明している酵素から予測することが多く、コンピュータ技術の発達により、以前よりも比較的容易に行えるようになったのである。

『ゲノム創農薬』の第一歩は、標的酵素の情報である。アゾール系殺菌剤の標的酵素、14  $\alpha$ -デメチラーゼ（CYP 51）は、糸状菌のステロール生合成経路に働く酵素の一つで、アゾール系殺菌剤の作用により生合成が阻害され、糸状菌は正常に細胞膜を構成できず、生育できない。CYP 51 の立体構造は、殺菌剤の対象となる植物病原菌はもとより、どの生物においても決定されていなかった。

よって、CYP 51 の立体構造は、*Candida* 菌の



CYP 51 を用いて、モデリングに関する研究が詳細に行われていた。これは、*Candida* 菌が人間に感染し重篤な症状を引き起こして問題となるので、これを防除する医薬品探索への足がかりになるからと考えられる。これまで、*Candida* 菌の CYP 51 の立体構造のモデリングは、すでに立体構造が解明されている P 450 cam や P 450 BM 3 といった、同じ P 450 酵素でも、作用は全く異なる酵素を用いて行われていた (BosCOTT and GRANT, 1994; Ji et al., 2000)。しかし、これらのアミノ酸配列の相同性は 20% 以下であった。そうしたなか、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の CYP 51 の X 線結晶構造解析が行われ、CYP 51 としては初めてその立体構造が明らかにされた (PODUST, 2001)。そこで、この結核菌の CYP 51 (MTCYP 51) の立体構造を基にして、これまで例のなかった、植物病原菌の CYP 51 の立体構造のモデリングを行い、メトコナゾールとの関係を推測してみた。

### 3 遺伝子情報のホモロジー検索

『ゲノム創薬』では、まず初めに遺伝子情報を準備する。

CYP 51 は、バクテリアから植物、動物まで、生物界に広く存在する酵素であり、多種の生物の CYP 51 遺伝子がクローニングされている。初めに、農薬のアゾール系殺菌剤が標的となる、植物病原菌の CYP 51 について、MTCYP 51 のアミノ酸配列を用いた BLAST による相同性検索を行った。その結果、遺伝子データベース DDBJ/EMBL/GenBank には、12 種類の植物病原菌の CYP 51 遺伝子が同定されていることが判明した。また、昨年公表されたイネいもち病菌のゲノム中にも、CYP 51 と予想される遺伝子が存在することがわかった (表-1)。これらの遺伝子と MTCYP 51 との相同性は、

表-1 CYP 51 遺伝子がクローニングされている植物病原菌 (いもち病菌は、ゲノム情報のみ)

<i>Botrytis cinerea</i>	灰色かび病菌
<i>Erysiphe graminis</i>	コムギうどんこ病菌
<i>Septoria triticii</i>	セプトリア菌
<i>Tapesia yellundae</i>	コムギ眼紋病菌
<i>Tapesia acufomis</i>	〃
<i>Uncinula necator</i>	ブドウうどんこ病菌
<i>Venturia inaequalis</i>	リング黒星病菌
<i>Venturia nashicola</i>	ナシ黒星病菌
<i>Monilinia fructicola</i>	モモ灰星病菌
<i>Ustilago maydis</i>	黒穂病菌
<i>Penicillium italicum</i>	カンキツ青かび病菌
<i>Penicillium digitatum</i>	カンキツ緑かび病菌
<i>Pyricularia oryzae</i>	イネいもち病菌

それぞれ約 26% であった。立体構造のモデリングには、約 30% 前後の相同性があると比較的正確な予測が可能となると考えられており、先述のように、*Candida* 菌の CYP 51 のモデリングで用いられた、相同性が 20% 以下しかない酵素よりも、MTCYP 51 を用いることは有効であると判断した。別に、植物病原菌同士では 60~75% という高いアミノ酸配列の相同性があることもわかった (表-2)。

### 4 活性部位の推定

酵素の立体構造をモデリングする際、分子全体をモデリングすることは可能であるが、農薬としての化合物を探索するには、まず活性部位、すなわち薬剤が結合し得る部位のみをモデリングする方が、計算処理時間も短縮でき、効率的であろうと考えた。報告されている MTCYP 51 の立体構造は、抗真菌剤フルコナゾールが結合した、すなわち複合体である (Protein Data Bank 1EA1)。そこで、この複合体構造のうち、フルコナゾールと隣接している MTCYP 51 の部位に注目し、それらの部位を、CYP 51 のアゾール剤結合部位、すなわち活性部位として定義づけた。フルコナゾールより 8Å 以内に隣接するアミノ酸配列部分を確認したところ、六つのドメインがあり、MTCYP 51 中のこの六つのドメインと、それぞれ植物病原菌の CYP 51 のアミノ酸配列とアライメントさせ、植物病原菌 CYP 51 のアゾール剤結合部位を推定した。

結核菌と植物病原菌の間では、この活性部位においても相同性は約 30% であったが、植物病原菌同士では非常に高い相同性が見られた。このことが、アゾール剤が広スペクトルな殺菌剤である理由であるとも考えられた。

表-2 植物病原菌と結核菌の CYP 51 のアミノ酸配列の相同性 (%)

M. t : 結核菌。

	B. c	E. g	S. t	T. y	U. n	V. i	M. f	U. m	P. d	P. i	P. o
B. c	—	72	61	75	70	61	92	49	60	59	65
E. g		—	57	71	72	60	72	46	59	57	62
S. t			—	60	59	60	60	45	56	56	56
T. y				—	69	63	75	46	57	58	64
U. n					—	59	69	47	60	57	60
V. i						—	62	46	58	57	60
M. f							—	48	59	58	64
U. m								—	45	44	45
P. d									—	87	56
P. i										—	55
P. o											—
M. t	27	26	26	28	25	27	27	27	27	27	27

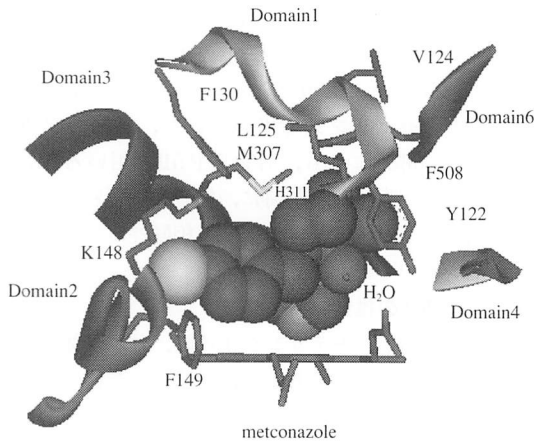


図-3 灰色かび病菌 CYP 51 とメトコナゾールの複合体モデル

### 5 複合体モデリング

今回、モデリングを行う植物病原菌として、多種の作物に感染し、被害も甚大となる灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) を選んだ。初めに、MTCYP 51 とのアライメントから推定した灰色かび病菌の CYP 51 (BC-CYP 51) 中の、六つの活性部位について、それぞれのペプチド構造の最適化を行った。MTCYP 51 の活性部位中のアミノ酸を、BCCYP 51 の対応するアミノ酸に変換した後、Tripos 力場を計算することで、BCCYP 51 のペプチド構造が最小エネルギーとなるように最適化を行った。

一方、メトコナゾールが CYP 51 と相互作用する際にとり得る配座を、MTCYP 51 に結合しているフルコナゾールの配座から予測した。最後に、活性配座をとるメトコナゾールを、最適化した BCCYP 51 の活性部位に挿入することで、BCCYP 51 とメトコナゾールの複合体モデリングを完成させた (図-3)。

### IV QSAR 解析と複合体モデリング

以前の QSAR 解析からは、標的酵素の構造は、薬剤化合物の立体的、静電的な特徴から逆に予測していたに過ぎなかったが、この複合体モデリングの結果からは、化合物の構造だけでなく、それと相互作用する標的酵素側のアミノ酸残基についても、より詳細に観察することができた。その検討の結果、QSAR 解析で疎水性相互作用していると予想された、メトコナゾールのクロロフェニル基、およびシクロペンタン環上のジメチル基の近傍には、それぞれ Phe 130, Leu 143, Phe 149, または、Leu 125, Ile 374, Phe 508 といった疎水性残基が存在していると考えられる。また、QSAR 解析の結果

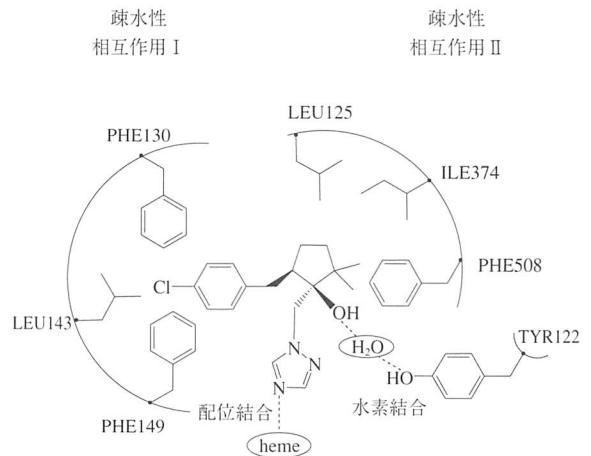


図-4 灰色かび病菌 CYP 51 とメトコナゾールの相互作用

から、シクロペンタン環上の水酸基は水素結合に重要であると予測していたが、モデリングの結果からも、水酸基のすぐ近傍に、Tyr 122 が位置していることがわかった (図-4)。メトコナゾールの殺菌活性には、この水酸基は必須であるが、逆に、Tyr 122 が変異するとメトコナゾールに対する感受性が低下する CYP 51 となるのではないかと考えられる。

このように、複合体モデリングを行うことで、以前までの QSAR 解析で予想していた相互作用様式は、より具体的に予測が可能になることが確認でき、新しい創農薬の可能性を示すことができたと考えている (菊池, 2001; 須藤, 2001; 菊池, 2002; Sudo, 2002)。

### おわりに

標的酵素のモデリングを用いた『ゲノム創農薬』では、計算を行うコンピュータとゲノム情報が必要となる。コンピュータは日々進歩しているので、高度な計算も、高価なコンピュータを用いなくても行えるようになってきた。そして、何より、ゲノム研究が大きく発展しているので、『ゲノム創農薬』は今後積極的に行われていくであろう。植物では、シロイヌナズナに続いて、イネゲノムの解読も完了した。昆虫では、鱗翅目のオオタバコガのゲノム解読完了が報告されており、日本では、カイコのゲノム解読および遺伝子解析の研究が、急ピッチで行われている。また、植物病原菌でも、イネいもち病菌、白葉枯病菌などのゲノムが解読されてきており、これらのゲノム情報は、『ゲノム創農薬』に大いに役立つものである。

しかし、ゲノム情報が増えてきたとしても、そこから

農薬のターゲットとなるような標的酵素をどのようにして見いだすか、また、予想された標的酵素の構造に適した薬剤の構造をどのようにして構築するか、など解決する問題もあるが、ゲノム研究を広く進めている官学と、農薬メーカーである産の三者が連携できるような仕組みができれば、『ゲノム創農薬』はより発展するのではないかと考えられる。

#### 引用文献

1) CHUMAN, H. et al. (1995): Classical and 3D QSAR in Agrochemistry (eds. HANSCH, C. and T. FUJITA), ACS

Symposium Series No. 606, ACS, p. 171~185.

- 2) BOSCOY, P. E. and G. H. GRANT (1994): J. Mol. Graphics 12: 185~195.
- 3) Ji, H. et al. (2000): J. Med. Chem., 43: 2493~2505.
- 4) PODUST, L. M. et al. (2001): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 3068~3073.
- 5) 菊池真美ら (2001): 第29回構造活性相関シンポジウム要旨集, p. 207.
- 6) 須藤敬一ら (2001): 同上, p. 239.
- 7) 菊池真美ら (2002): 日本農薬学会第27回大会講演要旨集, p. 112.
- 8) SUDO, K. et al. (2002): 10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection Book of Abstracts, p. 46.

## 中央だより

### ○食品の安全性の確保のための農林水産省関係法律の整備等に関する法律について

政府は平成15年6月11日付で、「食品の安全性の確保のための農林水産省関係法律の整備等に関する法律」を公布した。同法第四条では農薬取締法の一部改正などが含まれている。

### ○廃棄物の処理及び清掃に関する法律の一部を改正する法律について

政府は平成15年6月18日付で、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律の一部を改正する法律」を公布した。

### ○食品安全基本法の施行期日を定める政令について

政府は平成15年6月20日付で、「食品安全基本法の施行期日を定める政令」を公布し、施行期日を7月1日からと制定した。また、同日「食品安全委員会令」も公布した。

### ○農林水産省の組織令の一部を改正する政令について

政府は平成15年6月25日付で、「農林水産省の組織令の一部を改正する政令」を公布し、平成15年7月1日から施行することとした。同政令により、生産局植物防疫課及び生産局生産資材課農薬対策室は、新設された「消費・安全局」に「農産安全管理課(含む農薬対策室)」や「植物防疫課」を含む6課と消費者情報官が置かれることになった。

### 人事異動(本省関係)

中川 担氏(食糧庁次長)は、消費・安全局長へ  
 坂野雅敏氏(大臣官房審議官兼生産局)は、大臣官房技術総括審議官へ  
 岡島敦子氏(大臣官房参事官兼総合食料局)は、大臣官房審議官兼消費・安全局長へ  
 斉藤 登氏(生産局植物防疫課長)は、大臣官房参事官兼消費・安全局長へ  
 細田 久氏(農林水産技術会議事務局地域研究課長)は、消費・安全局農産安全管理課長へ  
 福田豊治氏(生産局種苗課長)は、同上局植物防疫課長へ  
 姫田 尚氏(生産局畜産部飼料課草地整備推進室長)は、同上局消費者情報官へ  
 長谷川裕氏(農林水産技術会議事務局技術安全課長)は、農林水産技術会議事務局技術政策課長へ

宮坂初男氏(生産局植物防疫課長補佐)は、生産局農産振興課課長補佐(長生指導班担当)へ

大岡高行氏(生産局植物防疫課生産専門官兼総務課)は、果樹花き課生産専門官兼総務課及び大臣官房国際部貿易関税課併任へ

横田敏恭氏(生産局生産資材課農業生産資材調整官)は、消費・安全局総務課調査官及び農産安全管理課併任へ

朝倉健司氏(生産局農産振興課課長補佐)は、同上局総務課食品安全危機管理官へ

阪本 剛氏(生産局農産振興課課長補佐)は、同上局植物防疫課課長補佐(農業航空班担当)へ

小倉一雄氏(生産局生産資材課生産専門官)は、同上局農産安全管理課生産安全専門官へ

瀬川雅裕氏(環境省環境管理局水環境部土壌環境課課長補佐)は、消費・安全局農産安全管理課課長補佐(土壌汚染防止班担当)へ

谷 順一氏(生産局農産振興課土壌保全班汚染防止係長)は、同上局農産安全管理課土壌汚染防止班汚染防止係長へ

宇井伸一氏(生産局生産資材課企画班企画係長兼総務課)は、同上局農産安全管理課企画班法令係長へ

横山武彦氏(生産局生産資材課農薬企画班農薬国際調整係長)は、関東農政局消費・安全部安全管理課生産安全係長へ

関谷 仁氏(生産局生産資材課農薬指導班農薬環境基準係長)は、消費・安全局農産安全管理課農薬指導班農薬使用基準係長へ

堀川克己氏(横浜植物防疫所業務部)は、同上局同上課農薬企画班農薬国際調整係長へ

梅村武司氏(食糧庁計画流通部消費改善課品質管理班品質管理係長)は、同上局同上課農薬指導班農薬適正管理係長へ

澁澤 学氏(食糧庁計画流通部消費改善課流通表示指導班流通改善係長)は、同上局同上課農薬検査班取締係長へ

新荘裕之氏(食糧庁総務部経理課国有財産班契約係長)は、同上局植物防疫課鳥獣害対策班鳥獣害対策技術係長へ

(45 ページに続く)