

電子伝達系を作用点とする新規殺ダニ剤Cyenopyrafen

誌名	Journal of pesticide science
ISSN	1348589X
著者	中平, 国光
巻/号	36巻4号
掲載ページ	p. 511-515
発行年月	2011年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



電子伝達系を作用点とする新規殺ダニ剤 Cyenopyrafen: 抵抗性回避を目指した探索戦略[#]

中 平 国 光*

日産化学工業(株)生物科学研究所

(2011年7月31日受理)

Keywords: cyenopyrafen, miticide, electron transport chain inhibitor, complex II.

はじめに

ミカンハダニのシュラーゲン抵抗性の報告(1958年)が、ハダニ類におけるわが国最初の報告とされている。その後、さまざまな薬剤への抵抗性発達が報告されてきている¹⁾。

ハダニ類の薬剤抵抗性の獲得は、①産卵数の多さ、②生育日数の短さ(発生回数の多さ)および③移動性が小さいことによる近親交配の容易さによるとされている。ハダニの自然突然変異率が、同程度の世代の長さをもつ節足動物に比べ数百倍高頻度になる場合があることも薬剤抵抗性獲得の要因の一つに挙げられている。さらに、ハダニ類は繁殖力が旺盛で、卵から成虫まで全ステージが同時に生活している場面で防除する必要があり、各生育ステージに対する化合物の活性差も、薬剤抵抗性発達要因として指摘されている¹⁾。

すなわち、新規殺ダニ剤の探索・開発において、現在の抵抗性問題を解決できる剤であることは重要な課題の一つである。

薬剤抵抗性の発達要因は作用点変異、作用点酵素(レセプター)などの増進、代謝活性増大、薬剤の取り込み・排出などが挙げられる。殺ダニ剤の主な作用点である神経系に作用する薬剤及び呼吸阻害剤においても作用点変異に由来する抵抗性の発達が報告されており^{2,3)}、これらに類似した作用特性を有する化合物をリード母核とする場合、誘導展開する前に詳細な解析が必要となってくる。

日産化学工業(株)において発見され、主に果樹・野菜類におけるハダニ類防除剤として上市された殺ダニ剤⁴⁾である cyenopyrafen (試験コード; NC-512 商品名; スター

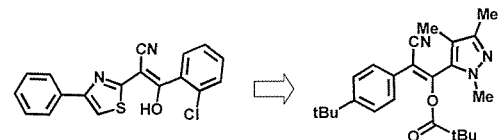
マイト)は上述したハダニ類の抵抗性を回避した薬剤である。本報告では、抵抗性回避に成功した cyenopyrafen の生化学的側面からの解析結果を中心に報告する。

1. リード母核の将来性判断

リード母核とした thiapronil (SN72129, シェーリング社, 特開昭 53-92769) は速効的な致死作用を特徴とする。しかし、神経系に作用する薬剤に特有の興奮症状を示さず、細胞増殖阻害や弛緩誘導など呼吸阻害様の作用特性を示す。

そこで、本剤の呼吸阻害活性をカイコ由来ミトコンドリアを用いて調べた。それぞれの呼吸阻害活性はチトクローム C 還元量を指標にした。複合体 I 阻害剤であるロテノン⁵⁾は複合体 I のみを IC₅₀ 値 0.031 μM と強力に阻害し、複合体 II は 50 μM 処理でも阻害活性を示さなかった。今回採用した評価系では、複合体 III 阻害剤は複合体 I および複合体 II の両方を阻害する。すなわち、複合体 I および複合体 II を同程度に阻害するアゾキシストロピンは複合体 III 阻害剤であることがわかる。一方、thiapronil は複合体 II のみ特異的かつ強力に阻害 (IC₅₀ 値 0.016 μM) していることから、複合 II 阻害剤であることが判明した (Table 1)。

呼吸鎖は複合体 I から IV および ATP 合成酵素により構成され、TCA 回路から生産される NADH を基質として複合体 I → 複合体 III → 複合体 IV と電子が受け渡される経路と TCA 回路の酵素である複合体 II (コハク酸からフマル酸を合成する) から複合体 III → 複合体 IV が共存する。



Thiapronil: Lead compound

Cyenopyrafen

Fig. 1. Discovery of a novel miticide cyenopyrafen.

[#] 第 36 回大会シンポジウムを取りまとめた解説

* 〒 349-0294 埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡 1470

E-mail: nakahira@nissanchem.co.jp

© Pesticide Science Society of Japan

Table 1. Inhibition of respiration of thiapronil using mitochondria of *Bombyx mori*

	Complex I	Complex II	
	IC ₅₀ (μM)		
Rotenone	0.031	≥50	complex I inhibitor
Thiapronil	≥50	0.016	complex II inhibitor
Azoxystrobin	0.21	0.41	complex III inhibitor

ピリダベンに代表される呼吸阻害型殺ダニ剤および殺虫剤の作用は複合体 I 阻害が主であり、複合体 II を作用点とする殺ダニ剤および殺虫剤は探索開始した当時、上市されていなかった。殺菌剤ではカルボキシニンに代表されるアニライド型複合体 II 阻害剤がある。

すなわち、thiapronil の複合体 II 阻害は殺ダニ剤および殺虫剤として新規作用点であり、thiapronil は既存の作用点変異株に対して有効なリード母核であることが明らかとなった (Fig. 2)。

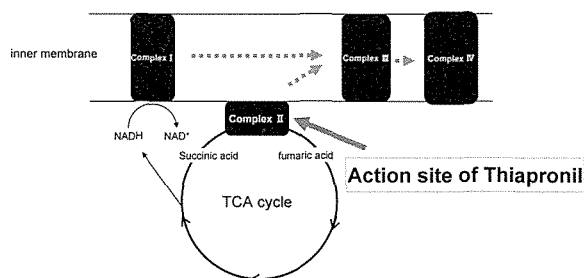
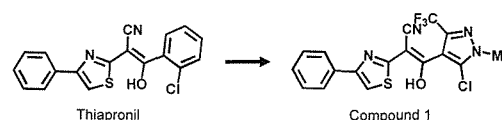
2. 殺虫スペクトラム

Thiapronil はチョウ目、カメムシ目およびコウチュウ目に幅広い殺虫スペクトラムを示すが、殺ハダニ活性を示さない。そこで、そのリード母核としての有用性を *vivo* 試験のみならず作用点から推定するために、ハダニおよび各種昆虫由来複合体 II 阻害活性を調査することとした。その結果、作用点レベルではナミハダニ由来複合体 II を含めいずれも極めて強力 (IC₅₀ 値: 1.0–5.3 nM) に阻害することが明らかとなり、スペクトラムの拡大が見込める有用な母核であると判断した。

その後の誘導展開により殺ダニ活性が、thiapronil の 2-クロロフェニル基を 3-トリフルオロメチル-4-ピラゾリル誘導体 (化合物 1) に変換することによって出現することを発見した (Fig. 3)。

3. 殺ダニ剤としての特性

殺ダニ剤を開発するうえで天敵に対する影響を最小に抑える必要がある。これは、使用した薬剤による天敵の減少

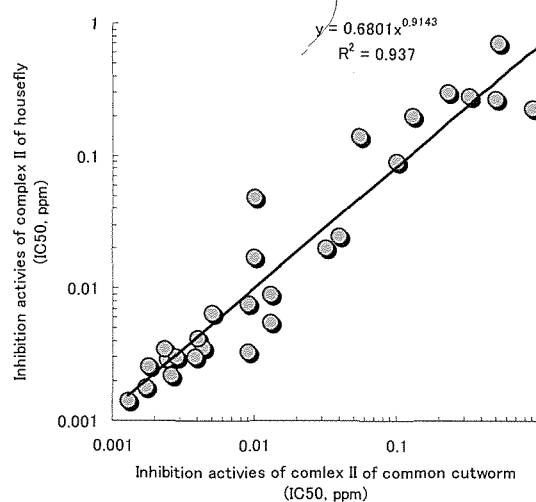
**Fig. 2.** Electron transport chain.**Fig. 3.** Onset of miticidal activity.

などにより、ハダニ類が散布前よりも多くなるリサージェンス現象を抑える必要があるためである⁵⁾。

天敵に安全な殺ダニ剤の創製の可能性を検証する目的で、thiapronil 誘導体 30 化合物を用いて各種生物由来複合体 II 阻害活性を昆虫と昆虫間およびハダニと昆虫間で比較した。イエバエおよびハスモンヨトウ由来複合体 II 阻害活性の相関係数は $R^2=0.937$ を示し、昆虫間では高い相関が保持されていることが示された (Fig. 4)。一方、多くの化合物はナミハダニ対ハスモンヨトウ間においても極めて良い相関を示したが、一部、相関から外れる (ハスモンヨトウ由来複合体 II に対して 1/100 以下に活性が低下) 化合物が見いだされた (Fig. 5)。相関を外れる化合物は昆虫由来複合体 II に対しては阻害活性が低く、ハダニ類に対して特異的に強い阻害活性を示すことから、これらの化合物の延長線上に天敵昆虫に安全な化合物が発見できる可能性が示唆された。

4. 作用点の確定

Thiapronil 誘導体から見いだされた殺ダニ活性を示す化合物群の作用点を確定させるために、誘導展開した 50 種類の化合物を用いてナミハダニ由来複合体 II 阻害活性と殺ダニ活性を比較することとした。これらの化合物は殺ダニ活性の強弱と複合体 II 阻害活性が連動するか、もしくは、複合体 II 阻害活性は高いが殺ダニ活性は低かった。一方、複合体 II 阻害活性が低い、殺ダニ活性が高い化合物は認められなかった (Fig. 6)。これらの結果は、thiapronil 誘導体が複合体 II 阻害によって殺ダニ活性を発現していることを示

**Fig. 4.** Comparative inhibitory activities of thiapronil derivatives on complex II of housefly and of common cutworm.

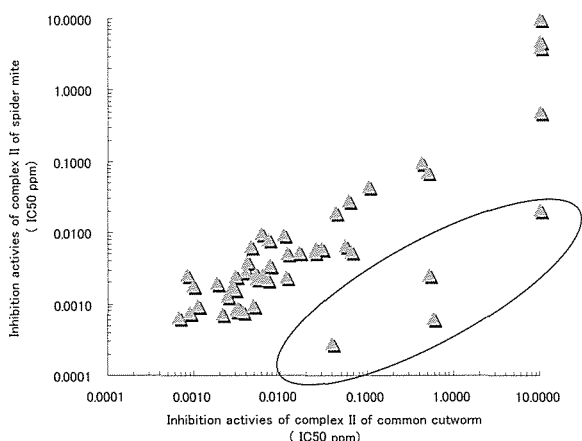


Fig. 5. Comparative inhibitory activities of thiapronil derivatives on complex II of spider mite and of common cutworm. Circle line shows the compounds have about 100 times stronger inhibitory activity of the spider mite complex II than of the common cutworm.

している。殺ダニ活性の発現は、取り込み・代謝などのさまざまな影響を受ける。In vitro 活性は高いが in vivo 活性が低い化合物は、これらさまざまな要因によって殺ダニ活性が低下した化合物と推察された。

5. Cyenopyrafen の天敵に対する安全性

Cyenopyrafen は thiapronil 誘導体から見いだされ、主に果樹・茶・野菜類におけるハダニ類防除剤として発見・上市された殺ダニ剤である。本剤の 30%SC 製剤は 150 ppm の濃度で、チリカブリダニ、ミヤコカブリダニ、タイリクヒメハナカメムシなどの天敵類に対して、致死、苦悶等の悪影響を全く示さなかった (Table 4, 5)⁴⁾。

Cyenopyrafen は保護基としてのピパロイル基を保持している。そこで、thiapronil 同様に cyenopyrafen-OH 体を用いて作用点レベルの特性を把握することにした。Cyenopyrafen-OH 体はナミハダニ由来複合体 II を極めて強力に阻害するが、一方、昆虫類由来複合体 II に対する阻害活性は大きく (約 1/200 強) 低下する (Table 2)。本化合物群の昆虫由来複合体 II に対する阻害活性はよく保持されていることから (Fig. 4)、cyenopyrafen は作用点レベルでタイリクヒメハナカメムシなどの天敵昆虫類に安全な薬剤である可能性が推察された。

Table 2. Comparative inhibitory activity of cyenopyrafen on complex II of spider mite, housefly and common cutworm

Complex II	IC ₅₀ (nM)	Ratio
Spider mite	3.2	1
Common cutworm	725	226
Housefly	744	232

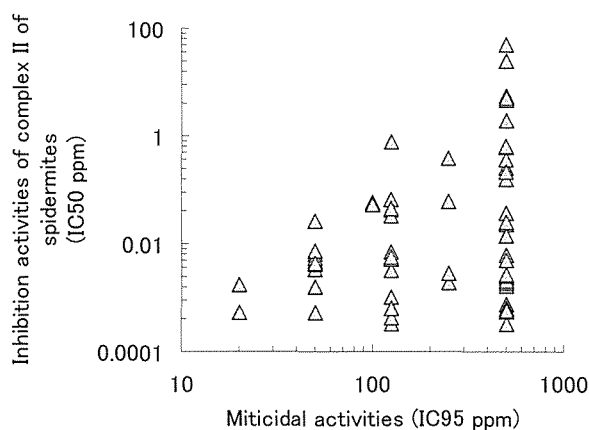


Fig. 6. Relationship between complex II inhibitory activities of spidermite and miticidal activities of thiapronil derivatives.

Cyenopyrafen はハダニ類の天敵であるカブリダニ類に対しても安全である。そこで、cyenopyrafen-OH のチリカブリダニ由来複合体 II 阻害活性を調査したところ、その阻害活性 (IC₅₀) は 63 nM であり、ナミハダニ由来複合体 II 阻害活性に比べ 1/10 程度であった。しかしながら、本剤はチリカブリダニ由来ミトコンドリアとの共存時間に依存して、その阻害活性が低下する傾向を示し、30 分共存時にはナミハダニ由来複合体 II 阻害活性の約 1/50 まで低下した (Table 3)。

これらの結果は、cyenopyrafen がハダニのミトコンドリア内では cyenopyrafen-OH 体として安定した阻害活性を維持できるが、一方、天敵であるカブリダニのミトコンドリア内では不安定であり、急速に阻害活性が低下することを示唆している。このように、本剤のカブリダニに対する安全性は、cyenopyrafen がカブリダニ体内では代謝などによる急速な不活性化に基づくと推察した (Table 5)。

6. 作用点の速度論的解析

殺菌剤であるカルボキシシンに代表されるアニライド型複合体 II 阻害剤には、すでに、さまざまな作用点変異による抵抗性菌が出現している。複合体 II は 4 種のサブユニットからなり、カルボキシシン抵抗性変異体は sdhB, sdhC および

Table 3. Effect on inhibitory activities of pre-incubation

Source of mitochondria	Pre-incubation time		
	0 min	20 min	30 min
	IC ₅₀ (nM)		
Spider mite (sm)	6.3	4.3	4.3
Phytoseiid mite (pm)	63.5	142.8	204.0
Ratio pm/sm	10	33	48

Table 4. Selectivity to beneficial arthropods

Order	Species	Stage	Method	Result
Acari predatory mites	<i>Amblyseius californicus</i>	females	Spray	◎
		eggs		◎
	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	females	◎	
		eggs		◎
	<i>Amblyseius womersleyi</i>	females		◎
Hemiptera	<i>Orius strigicollis</i>	adults		◎
Thrips	<i>Scotothrips takahashii</i>	adults		◎
Neuroptera lacewings	<i>Chrysoperla nipponensis</i>	adults		◎
Diptera aphid midge	<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	adults	Dry film	◎
		eggs	Spray	◎
Hymenoptera	<i>Aphidius colemani</i>	adults	Dry film	◎
Hymenoptera parasitic wasps	<i>Encarsia formosa</i>	adults		◎
Araneae spider	<i>Pardosa pseudoannulata</i>	adults	Spray	◎
Coleoptera ladybird beetles	<i>Harmonia axyridis</i>	adults		◎
		larvae		◎

◎: no impact (0–30% mortality)

sdhD における変異が報告されている⁶⁾。sdhA は FAD を含有するフラボタンパク質であり、コハク酸をフマル酸に変換する。sdhB は FeS-cluster 部であり、sdhC および sdhD は膜アンカーである。sdhC および sdhD に近接する sdhB 部分にユビキノン結合部が存在する⁷⁾。

Cyenoptyrafen がカルボキシシンと同様の結合様式をもった場合、アニライド型複合体 II 阻害剤のさまざまな作用点変異体情報は、将来出現するであろう cyenoptyrafen 抵抗性ハダニ類の対処法に有用な情報を提供することが考えられる。そこで、速度論的手法を用いて結合様式を解析することにした。

6.1. 両逆数プロット

本手法を用いることにより、基質であるコハク酸に対する阻害様式を調べることができる。cyenoptyrafen-OH 体のナ

ミハダニ由来複合体 II に対する阻害様式を求めたところ、アニライド型のカルボキシシンと同様に拮抗阻害を示し、拮抗阻害を示す既知阻害剤であるマロン酸とは異なる阻害様式であった (Fig. 7)。マロン酸は第一段階反応であるコハク酸脱水素酵素の FAD 結合部位近傍に作用すると報告されている⁷⁾。マロン酸が基質に対して拮抗阻害を示したことは、マロン酸が複合体 II の第一段階反応であるコハク酸脱水素酵素に結合することを支持している。

6.2. Multiple inhibition study⁸⁾

Cyenoptyrafen-OH 体はカルボキシシンと同様に、マロン酸とは交差的な反応を示した (データ未掲載) ことから、マロン酸とは結合部位が異なることが判明した。これらの結果は、cyenoptyrafen-OH 体が複合体 II の第一段階反応である

Table 5. Selectivity to beneficial arthropods

Order	Species	Methods	Result
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	oral, topical, spray greenhouse	◎
	<i>Bombus terrestris</i>	spray greenhouse	◎
	<i>Osmia cornifrons</i>	spray	◎

◎: no impact (0–30% mortality)

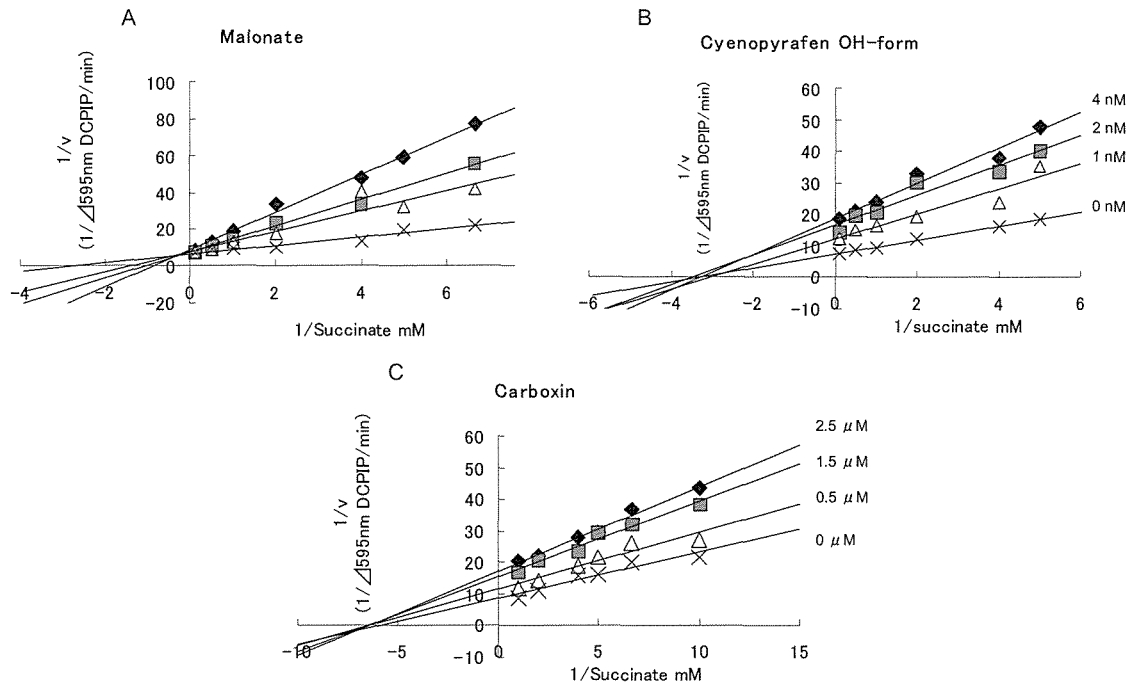


Fig. 7. Inhibition kinetic studies of malonate and cyenopyrafen OH-form. Double reciprocal plot of $1/v$ versus $1/[succinate]$ for complex II of spider mite. A: malonate concentrations were 0, 0.5, 1 and 2 mM. B: cyenopyrafen OH-form concentrations were 0, 2, 3 and 4 nM. C: carboxin concentrations were 0, 0.5, 1.5 and 2.5 μ M.

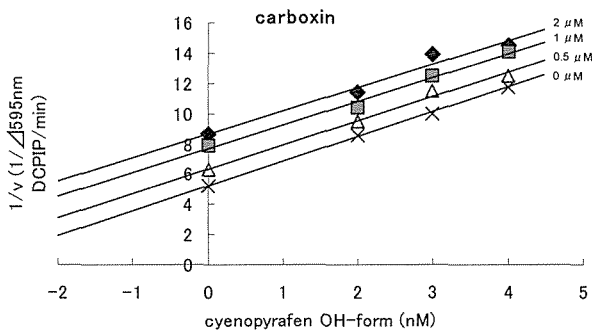


Fig. 8. Yonetani–Theorell plot for inhibition of complex II of spider mite in the presence of cyenopyrafen OH-form and carboxin. Carboxin concentrations of 0, 0.5, 1, and 2 μ M. Concentrations of the titrated inhibitor cyenopyrafen OH-form were 0, 2, 3 and 4 nM. The parallel set of lines indicates that the two compounds bind in a mutually exclusive fashion.

コハク酸脱水素酵素には結合せず、それ以降の部位に結合していることを示した。さらに、cyenopyrafen-OH 体がアニライド型殺菌剤であるカルボキシンは結合部位を共有していることも示唆された (Fig. 8)。これらの結果は、cyenopyrafen-OH 体がアニライド型複合体 II 阻害剤と結合部位を共有することを強く示唆した⁹⁾。

おわりに

主に果樹・茶・野菜類における薬剤抵抗性ハダニ類にも有効な防除剤として市販している殺ダニ剤 cyenopyrafen の

特性を、生化学的側面から説明した。本剤が、殺ダニ剤としての必要条件である¹⁾ 交差抵抗性をもたないことおよび²⁾ 天敵への安全性を保持した剤であることを理解していただければ幸いである。

引用文献

- 1) 浅田三津男：日本農薬学会誌 3, 61–68 (1978).
- 2) S. D. Mills, W. Yang and K. MacCormack: *Antimicrob. Agents Chemother.* 2524–2530 (2004).
- 3) T. V. Leeuwen *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(16) 5980–5985 (2008).
- 4) 瀧井新自他：農薬学会第 31 回大会，講演要旨集 (2006).
- 5) A. Szczepaniec *et al.*: *PLoS One.* 6(5) e20018 (2011).
- 6) P. Leroux *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, 6615–6630 (2010).
- 7) L.-S. Huang *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta.* 1757(9–10), 1073–1083 (2006).
- 8) T. Yonetani and H. Theorell: *Arch. Biochem. Biophys.* 106: 243–251 (1964).
- 9) 中平国光他：農薬学会第 31 回大会，講演要旨集 (2006).

略歴

中平国光 (なかひら く にみつ)
 生年月日：1961 年 2 月 22 日
 最終学歴：東京農工大学連合大学院農学研究科卒業
 農学博士
 研究テーマ：新規農薬発見を目指した作用機構解析
 趣味：サッカー (浦和レッズ)