植物ウイルス病の化学療法に関する研究

I. 浸漬法による未知抗生物質の第一次スクリーニング*

平井篤造**・下村徹**・山口昭**・松井千秋**・西川陽之助***

Tokuzo HIRAI, Toru SHIMOMURA, Akira YAMAGUCHI, Chiaki MATSUI, AND
Yonosuke NISHIKAWA: Studies on the chemotherapy for plant virus diseases.

I. Screening tests of the new antibiotics for their effect on TMV multiplication in tobacco leaf.

植物ウイルス病の化学療法は, Schneider, Commoner らの purine・pyrimidine antagonist^{1,2)} いわゆる antimetabolite の導入によつて一新生面を拓いたが, 抗生物質による可能性も軽視することはできない。Gray の noformicin³⁾ はこの要望に答えるものであろう。

われわれはこの研究をウイルス感染機作の解明と平行して進める計画を立て, まず未知抗生物質のスクリーニングをもつて開始した。その結果 in vivo において TMV の増殖をかなり阻止するものを見出したので, ここにその大要を報告する。

起稿にあたり, 貴重なサンプルを供給された武田薬品工業研究所立岡部長, 本研究に種々配慮を賜つた日本農薬熊野研究部長に, それぞれ深甚の謝意を表する。

1. 実験材料および方法

供試抗生物質はすべて粗物質であつて, 武田薬品工業研究部によつて分離されたものである。それらの物理的性質, 動物に対する毒性などはすでに調べられているが, 本報では触れない。これらを所定濃度(おおむね 50~1000ppm) に水で溶解し, または難溶性のものでは有機溶媒(主として acetone, MeOH) にかし, これを水でうすめてエマルジョン状とし, それぞれ pH6.0 に修正して使用した。

用いたウイルスはタバコモザイクウイルス(TMV)で, その起原は秦野試験場から分譲された Typical strainである****。タバコの品種は主として Turkish を, 後にいくらか Bright Yellow を用いた。

第一次スクリーニングに採用した方法は下記のとおりである。

りである。いま仮にこれを浸漬法と名付けることとする。

すなわち, 葉数 5~8 枚のタバコの, 大きさの比較の均一な中間葉をえらんで, 裏面に TMV を罹病汁液をもつて接種し, 24 時間後接種葉を切断, これを中肋から半葉に 2 分し, ペトリ皿に 20ml づつ満した水または供試抗生物質含有液にそれぞれ浮游した。1 ペトリ皿の葉の生重は 1.0~2.0g である。各ペトリ皿は 20~25°C の硝子張恒温器に納め, 螢光燈で連続照射した。3~4 日後とり出して葉をよく洗滌し, 増殖した葉中のウイルスを分離定量した。

ウイルスの分離定量: 葉を生重の 3 倍量の水を加えて磨砕し, 磨砕液を 60°C・10 分加熱して, 葉緑粒その他易熱性物質を遠沈し去り, 上澄 3~6ml についてウイルスを分析した。すなわち硫酸による沈澱と水抽出を反覆し, 緑色のなくなつた後, pH を等電点としてウイルスを沈澱させた。このウイルス蛋白は Folin 試薬で発色させ, これを光電管比色計で定量した。その経過を第 1 図(次頁)に示す。

葉害の検定: 肉眼的葉害をみるほか, 葉液浸漬葉の呼吸を測定して対照区のそれと比較した。すなわち径 7mm の disk を 10 個打ち抜き, 傷の影響をさけるため Warburg vessel 中で 1 時間放置し, 次のとおり装置して 90 分間の O₂ uptake を暗黒下で測定した。

Warburg vessel

主室 0.01 M phosphate buffer (pH7.0) } 1.8ml
0.2 M sucrose

副室 濾紙に 15% KOH を含ませる 全量 2.0ml
温度平衡 10 分, 温度 30°C

抗生物質の葉の組織中への滲透度検定: 呼吸測定に使用した葉の残りを磨砕し, カップ法で, 各抗生物質のそれぞれの test organism を使用して阻止円を測つた。これによつて葉組織内への葉液の滲透度を検定した。

* 本論文の要旨は昭和31年4月13日日本植物病理学会大会で講演した。

** 名古屋大学農学部植物病理学教室

*** 日本農薬農薬試験場

**** 同系統を分譲された日高博士に深謝する。

Figure 1. Scheme for separation of TMV from the infected leaf.

2. 実験結果

(1) 試験方法の検討 切取葉培養法によるわれわれの実験条件での、ウイルスの増殖曲線を第2図に示す。すでに記したとおり、ウイルスの分析はふつ

Fig. 2. The time-course of TMV synthesis in detached tobacco leaf tissue.

う接種後4～5日で行ったが、これは、とくに薬液浸漬区では葉の衰弱がはげしく、長くおくと葉が黄化して実験に供しがたくなるためである。薬液区と対照区を比較してウイルス増殖阻害度を出すばあい、すべて Folin 試薬による発色を比色計で読みとって行つた。ゆえに、比色計の読み、(Optical density=O. D.) とウイルス蛋白の実量との関係を調べておく必要がある。罹病葉から分離したウイルスの種々の濃度の溶液 (pH 3.3) を作り、各濃度液から一定量とつて、ウイルス量を Folin 試薬による O. D. か

ら決定する。一方同量の溶液を、あらかじめ秤量した濾紙上にとり、105°C で乾燥して、ウイルス乾量を測定した(第3図)。

Fig. 3. Folin calibration curve for TMV protein. The TMV content is based on dry-weight determination of the sample purified as shown in figure 1. The optical density is read by an electrophotometer (filter S_{72}).

つぎに、硫酸塩析法によるウイルス定量の確かさを知るため、罹病汁液をおのおの 2.0, 1.0, 0.5 ml づつとつて、上記の方法でウイルス量を定量した。比色計の読みで示すと、それぞれ 0.665, 0.380, 0.190 であり、低い方ではよく比例する。ふつう、われわれの

実験では 0.350 以下の O. D. であるから、誤差はほとんどないことになる。なお、同じ罹病汁液を 2 分して別々に定量した誤差の範囲は、5% 以下であった。

(2) スクリーニングの結果 現在まで検定を完了した未知物質はやく 62 標品である。これらをウイルス阻害度にしたがって表示すると、第 1 表のようになる。

Table 1. Inhibitory effect of the new antibiotics upon the TMV multiplication in tobacco leaf.

Rate of inhibition	Respiratory rate of tissue placed on antibiotic solution		
	normal	increased*	decreased**
50% or more	21(50)*** 62(250) 65(250)		
40~50	13(500), 36(100) 26(100), 51(30) 29(500)	22(50)	50(200)
30~40	11(500), 39(250) 14(250), 44(100) 25(50), 55(250) 27(500)	43(200)	4(250)
20~30	9(500) 10(1000) 20(500)	47(200)	28(500)
10~20	5(1000), 49(250) 7(500), 53(250) 23(250), 56(50) 24(500), 69(500) 34(250), 71(250) 37(200)	3(1000) 33(100)	49(250)
0~10	2(1000), 38(250) 6(100), 40(200) 12(500), 44(100) 16(250), 66(250) 19(1000), 70(250)	33(1000)	15(500), 48(500) 18(100), 51(100) 21(100) 30(50)
-10~0	31(100), 64(250) 46(200)		
-10 or less	17(200), 41(100) 32(250), 42(500) 35(200), 54(60)		45(250) 68(250)

* Increased rate is 20% or more, ** decreased rate is 20% or more, both are compared with the control (placed on water) tissue.

*** Figures show the test Nos. of antibiotics, and parentheses show their concentration in ppm.

いま仮に、ウイルス阻害度 20% 以上を合格とみな

すと、合格品は 24 となり、全体の 38% にあたる。これら合格品につき、くわしい data を示すと第 2 表である。

Table 2. Antibiotics which showed 20 per cent or more inhibition to virus multiplication.

Anti-biotics Nos.	Concentration of antibiotics in ppm	Percentages of inhibition to virus multiplication	Percentages of inhibition to leaf respiration	Trans-location of antibiotics
62	250	58	-5.1*	
65	250	57	+2.7*	
21	50	52		
26	100	49		
36	100	49		good
29	500	42	+6.3	good
13	500	40		good
51	30	40		
22	50	48	+71.2	
50	200	41	-42.4	
25	50	38		good
55	250	35		scarcely
14	250	34		
11	500	33	+0.8	good
39	250	31	-19.1	
27	500	30		
44	100	30		scarcely
43	200	31	+73.9	scarcely
4	250	37	-25.5	good
9	500	26	+0.8	
20	500	25	-6.7	scarcely
10	1000	22	-14.5	good
47	200	20	+32.5	
28	500	29	-22.6	

* plus means the rate of respiration increased, and minus means that decreased, as compared with that of the control disks.

3. 論 議

ウイルス、とくに TMV の定量法については、Steere のくわしい検討がある。けつきよく、超遠心でウイルスをおとし、spectrophotometer その他で定量するのがもつとも正確のようであるが、われわれは設備の点から、これ以外の方法にたよらざるをえない。それには硫酸塩析法と、Commoner らの pH によつて健全蛋白とウイルス蛋白を分別する方法がある。ここでは前者によつたが、この方法の正確度について検討したことは前述のとおりである。

薬剤のウイルス増殖阻害程度をあらわすばあい、種々の濃度の薬液で試験し、増殖阻害を示すその薬剤の

最小濃度を出すのが、もつとも合理的かもしれない。しかしわれわれの実験では、供試サンプルも少量で、また一つの検定にも相当の労力を要するため、ここに提出したとおりの表現になった。本報では、20%以上のウイルス増殖阻害を示すものを、合格品とみなしたが、この数字はなんら意味のあるものではない。別の実験で、TMV にとくに有効と今まで考えられている 8-azaguanine (Azan, 田辺製) および Merk から提供された noformicin のウイルス増殖阻害度は、われわれの実験条件では、それぞれ 32, 39% であったから、ここに合格したものも、かならずしも効力が少いとはいえないであろう。

つぎに、スクリーニングの方法に問題がある。ウイルスに対する薬剤効果のスクリーニングでは、今まであまりとられた方法がないが、本報のいわゆる浸漬法が最適とはかぎらない。なぜならこれは薬剤がききうる最良の条件で試験しているからである。がんらいスクリーニングの方法としては、もつとも簡易な、しかも実用に近い方法がとられるべきかもしれないが、菌に対する薬剤と異り、ウイルスでは、きく薬剤がほとんどないことを前提としており、そのため、最良の条件で最初のテストをすることも許されるであろう。ここに合格したものをを用い、葉面撒布その他第二次、第三次の試験を行い、次第に実用化に近づく計画である。

葉害の一指標として呼吸の阻害をとらえた。すなわち、肉眼的葉害以外に、呼吸阻害その他で葉の生理的状态が少しでも乱されると、薬剤が直接ウイルスに作用するよりも、ウイルスが葉中でふええない条件が作られたことになる。しかしわれわれの結果から、葉の呼吸がほぼ正常で、阻害度のわりに大きなものが見出

されたことは幸である。なかには、ウイルスの増殖を阻害しつつ、葉の呼吸をいちじるしく促進したものもあつた。これらはおそらく、uncoupler として作用したものであろう。

とにかく、薬剤の効果のテストは、ただちに薬剤の作用機作に連る問題であり、それはまた、生体内でのウイルス増殖の様相を解決することをもせまつている。将来両者が平行して解析されることが望まれるのである。

本研究の費用の一部は文部省科学研究費(各個研究)によつた。記して謝意を表する次第である。

4. 摘 要

1) 一連の未知抗生物質を使用して、TMV 接種のタバコ葉をその薬液に浸漬し、生じたウイルスを硫酸塩析法で分離定量することによつて、供試物質のウイルス増殖阻害度を検定した。

2) 62 標品のうち、20% 以上のウイルス阻害度を示すもの 24 を得た。これらを用いて第二次、第三次のスクリーニングが行われる。

3) ウイルスの定量法、スクリーニングの方法などに関して、多少の議論が述べられた。

(1956 年 9 月 3 日受理)

引用文献

- 1) Schneider, I. R.: *Phytopath.*, 44: 243. (1954).
- 2) Commoner, B. & F. Mercer: *Nature*, 168: 113. (1951).
- 3) Gray, R. A.: *Phytopath.*, 45: 281. (1955).
- 4) Steere, R. L.: *Phytopath.*, 45: 196. (1955).
- 5) Commoner, B. et al.: *Biochem. Biophys.*, 27: 271. (1950).

Summary

The present state of knowledge on the chemotherapies for plant virus diseases has recently been considerably broadened. The discovery of purines and purine analogs has made it possible, with greater success, to provide a reliable information on this subject. Furthermore, R. A. Gray has reported a new antibiotic, noformicin, which inhibits both the production of local lesions and systemic infections caused by southern bean mosaic virus and by tobacco mosaic virus in intact plants.

In the following are presented the results of the studies, although the preliminary nature, obtained in an effort to extend a fundamental investigation on this approach, especially on

the effect of the new antibiotics upon the tobacco mosaic virus (TMV) multiplication in tobacco leaf tissues.

The mature leaves which had been inoculated one day ago by rubbing with a gauze pad soaked in TMV-infected tobacco juice, were removed from tobacco plants (*Nicotiana tabacum*, Turkish) and split along the midrib. One-half of each detached leaf was floated on the solution containing the antibiotics in Petri dishes under fluorescent lamp in an incubator at 20-25°C. The opposite leaf-halves which had been inoculated with the same virus were kept on water and served as controls. After 3-4 days incubation, the leaf tissues were removed and ground in a

mortar for virus analysis. The procedure shown in figure 1 was undertaken for precipitating virus protein, the relative concentration of which in each samples was determined by a colorimetric procedure using the Folin reagent. Readings were obtained with an electrophotometer.

Phytotoxicity of the antibiotics: Injury symptoms were noted for each antibiotics over a wide range of concentrations. Moreover, the rate of respiration of leaf disk floated on the antibiotic solution was measured by using Warburg's manometer and was compared with the control disk placed on water.

Antibiotic translocation: Translocation in the detached tobacco leaves of the antibiotic solution was ascertained. Leaf tissues floated on the solution were crushed with mortar and pestle to secure an extract for antibiotic assay. These extracts were assayed by the cup-method using the test organisms for each antibiotics.

Inhibition zones were measured after 18 hours incubation at 37°C.

The antibiotics used in these studies were supplied from the Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd. and most of them were the crude substances.

Some of the results obtained are summarized in tables 1 and 2. As seen in the tables, 24 samples out of 62 samples tested were found to exhibit 20 per cent or more virus-inhibition. Most effective inhibition to virus multiplication was 58 per cent shown by the sample No. 62, whereas 8-azaguanine ($10^{-3}M$) and noformicin (200 ppm, crude), the latter was kindly supplied by Dr. R.A.Gray, showed 32 and 39 per cent virus-inhibition, respectively, under our experimental conditions. The successive experiments, applying the antibiotic solution by leaf-spraying method and so on, are now under progress.

(Faculty of Agriculture, Nagoya University)

文 献 紹 介

フザリウム菌の培養性質に及ぼす環境の影響

Zachariah, A. T., Hansen, H. N., and Snyder, W. C.: The influence of environmental factors on cultural characters of *Fusarium* species.

Mycologia, 48: 459~467. (1956).

フザリウム菌 7 種を用いて培養性質に及ぼす光や温度の影響をみた。 *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. rigidiuscula* 及 *F. roseum* は光や温度を変動させることによつて著しい輪紋を生じた。*F. rigidiuscula* と *F. roseum* は暗黒下で著しい色素を, その他の菌は光にさらしたものにだけ色素を生じた。暗黒下, 20°C の一定温度の下では *F. solani* 以外は凡て sporodochia 又は pionnote を生成せず, 光の変動は孢子形成を良好にしたが, 温度を著しく変動したり, 光に長くさらすと異常の孢子が形成された。試験管内での正常な発育環境は凡ての菌が光の変動を必要としたが, 温度は *F. moniliforme* は 20~23°C, *F. oxysporum* と *F. solani* は 20~25°C, *F. rigidiuscula* と *F. episphaeria* は 25~30°C, *F. roseum* と *F. tricinctum* は

20°C 以下の狭い範囲内で夫々温度の変動を必要とした。(山中 達)

糸状菌保存培養の凍結貯蔵

Carmichael, J. W.: Frozen storage for stock cultures of fungi.

Mycologia, 48: 378~381. (1956).

糸状菌の培養保存法には, (1) 頻繁に移植し適当な培地及温度に保つて代謝活動を正常に行わせる方法, (2) 5~10°C 以下に保存したり, 鉱物油で培養面を被覆したりして代謝活動を制限する方法, (3) 凍結又は乾燥によつて代謝活動を殆んど止める方法等がある。著者は凍結による培養の保存を試みた。Sabouraud's agar の斜面上に約 2 カ月間生育せしめた総数 400 の糸状菌を -20°C の冷室に入れ, 約 9 カ月後その生死をみた所, その殆んど大部分の菌が生存していた。この期間中, 培養を冷室から取り出し, 再び凍結させることを 3 回繰返した結果, 多量の水分が寒天から滲出するため, 1 回以上の凍結は好ましくないとされた。更に長期間の保存に耐え得るか現在試験を継続している。(山中 達)