殺菌剤による稲熱病菌々体磨砕液のTTC還元力の阻害

高 村 芳 三 郎*

Yoshisaburō TAKAMURA: Inhibition of TTC reduction of the mycelial homogenates of the rice-blast fungus by fungicides.

菌体のSH酵素, その他の酵素系及呼吸等が薬剤によつて阻害されることはすでに多く報告されている。佐藤⁹⁾は植物幼胚を用いてTTC還元に関与するのはコハク酸脱水素酵素とみなしてよいと述べている。また平山¹⁰⁾は植物病原菌約20種のうち稲熱病菌を含む数種はコハク酸脱水素酵素の活性が極めて強いことを報告している。本報告は稲熱病菌々体磨砕液のTTC還元力によつて, コハク酸脱水素酵素系の存在を明らかにし, 且つ各種薬剤のそれに対する阻害様式を観察した結果である。

起稿に当り御薫陶を賜つた岐阜大学橋岡良夫教授, 並に実験を御指導下さつた本学平井篤造教授, その他山口昭, 今泉照男の諸氏に感謝の意を表する。

1. 材料及方法

京大植物病研究室から分譲を受けた稲熱病菌(K₉)を馬鈴薯煎汁添加 柄内培養基に, 27°C 72時間振とう培養したもの(孢子形成前)を供試した。実験

に当つては上述の培養菌体を充分洗滌し, 菌体湿重あたり約5倍の磷酸緩衝液(0.1 M, pH 6.8)で冷却しながら磨砕し, 軽く遠沈(2,000 rpm, 5 min.)して, その上澄部を供試液とした。使用した薬剤は第6表に示した12種類(水銀剤6, 銅剤1, その他5)である。各薬剤は蒸溜水またはアセトン等の溶媒で 10^{-3} Mに稀釈し, 以下 10^{-6} Mまで対数稀釈とした。実験方法は佐藤¹⁰⁾に準じ, Thunberg 管中に第1表に示す各液を加え, 排気後 28°C 恒温器中に保ち10分後に反応を開始した。各実験毎に薬液を加えないもの(無処理), 薬液及び基質を加えないものを設け, それぞれ蒸溜水で全量を5 mlとした。反応開始2時間後20%トリクロル酢酸で反応を停止, 形成されたtriphenyl formazan (TPF)を酢酸エチルで抽出しAKA光電比色計(Antimon, filter S 48)を用い蒸溜水を基準として定量した。結果は特別の場合を除いてすべて無処理に対する百分比で示した。

第1表 Thunberg 管中の試験液の組成
Table 1. Constituents of the test solution in Thunberg tube.

	Component	Final concentration	Volume(ml)
Main tube	Phosphate buffer (pH 6.8)	0.02 mol	1.5
	Mycelial homogenates (20 %)	6 %	1.5
Side arm	Sodium succinate	0.02 mol	0.5
	TTC solution	0.02 %	1.0
	Fungicide solution or dist. water		0.5
Total			5.0 ml

2. 実験結果

(1) 磨砕液に対する菌体濃度

磨砕液に対する菌体湿重の割合を25~1%とし, TTC還元力との関係を調べた(第2表)。磨砕液のTTC還元は基

第2表 異なる濃度における菌体磨砕液のTTC還元力
Table 2. The TTC reduction of homogenates at different concentrations of wet mycelia (% in weight to homogenizing media).

Percentage of mycelial weight (w/v)		25	20	15	10	5	1
Rate of TTC reduction (%)	(+) Substrate	135	100	67	37	14	13
	(-) Substrate	80	70	43	24	8	6

* 名古屋大学農学部

質を加えなくとも認められたが、基質の添加でそれは増加を示した。第2表のように20%菌体添加磨砕液でかなりの還元力が認められたので、以下の実験ではすべてこれに基質を加えて行つた。またこの菌体磨砕液1mlの乾燥重量は約30mgであつた。

(2) 菌体磨砕液の遠心分割とTTC還元力

前述の菌体磨砕液を第1図のようにフラクシヨネーションし、各分割についてTTC還元力を比較した(第3表)。最初の分割上澄部(S_1 fraction)に認められた活性は第2の分割によつて上澄部(S_2 fraction)に

みられ、残渣(R_2 fraction)には活性はほとんど認められなかつた。

(3) 耐熱性

菌体磨砕液のTTC還元力の熱失活について検討した(第4表)。すなわち50°C10分の処理で活性が完全に失われた。

(4) マロン酸の阻害作用

TTC還元に関与する酵素の性質を検討するためマロン酸の阻害について実験を行つた。反応液は第1表に示した組成で、基質として最終濃度0.02Mのコハ

ク酸ソーダを加え、マロン酸は蒸留水の代りに最終濃度0.001~0.1Mになるように加えた。結果は第5表である。なお50%阻害におけるコハク酸:マロン酸の濃度比は13:1であつた。

(5) 各種薬剤によるTTC還元阻害

供試薬剤及び実験結果はそれぞれ第6表及び第2, 3図に示した。

実験毎に測定値は一定しなかつたが、数回の反覆で比較的斉一な傾向が確められた。すなわち水銀剤はMEMC, EMP, MC, PMA, PMTS, EMTSの順で最も強い阻害を示し、銅剤CS, 有機硫黄剤TMTD, Zbがそれに次ぎ、その他の薬剤は阻害力が弱かつた。難水溶性の薬剤に用いる各種溶媒の影響が考えられたのでacetone, polyethylene glycol (PEG)-300等について同様の方法で実験を行つた。その結果10%の濃度では何

第1図 菌体磨砕液のフラクシヨネーション

Figure 1. Fractionation of the mycelial homogenates.

第3表 第1図の各分割によるTTC還元力の比較

Table 3. Relative TTC reduction of each fraction shown in figure 1.

Fraction	S_1		R_1		S_2		R_2	
Substrate	+	-	+	-	+	-	+	-
Rate of TTC reduction (%)	100	72	9	8	64	45	4	4

第4表 TTC還元に対する菌体磨砕液の熱処理の影響

Table 4. Effect of heat on the TTC reduction of mycelial homogenates.

Temperature (°C)	—	40	40	45	45	50	55
Time of treatment (min)	—	10	20	10	20	10	10
Rate of TTC reduction (%)	100	26	15	9	6	0	0

第5表 菌体磨砕液のTTC還元力に対するマロン酸の阻害

Table 5. Effect of malonate on the TTC reduction of mycelial homogenates.

Malonate concentration (mol)	0		0.001		0.002		0.01		0.02	
Succinate (0.02 M)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Rate of TTC reduction (%)	100	56	63	32	39	8	6	6	0	0

第6表 TTC還元力の阻害実験に供試した殺菌性物質

Table 6. Fungicidal substances used.

Fungicidal substances	Abbreviation	Remarks
Phenyl mercuric acetate	PMA	* Supplied from Hokko Chemicals Co.
Mercuric chloride	MC	
Ethyl mercuric phosphate *	EMP	
Methoxyl mercuric chloride *	MEMC	
Phenylmercuri-p-toluene sulfonanilide *	PMTS	** Supplied from Nihon Noyaku Chemicals Co.
Ethylmercuri-p-toluene sulfonanilide *	EMTS	
Copper sulfate	CS	
Tetramethyl thiuram disulphide **	TMTD	*** Supplied from Washima Chemicals Co.
Zinc ethylene bisdithiocarbamate **	Zb	
Dinitro phenyl thiocyanate ***	DNPTC	
Pentachloro nitrobenzen ***	PCNB	
Trichloro dinitrobenzen ***	TCDNB	

Note ; These chemicals are raw ingredient of commercial fungicides, and have been purified by various solvents at the laboratories of the respective Chemicals Co., except for Zb, which is marketing goods, containing a carrier of 32.1 per cent.

第2図 異なる殺菌性物質によるTTC還元力の阻害比較

Figure 2. Comparison of the inhibitory action of the different fungicidal substances at different concentrations to TTC reduction.

Concentrations of fungicidal substances (Mol)

第3図 有機水銀剤によるTTC還元力の阻害

Figure 3. Inhibitory action of the different organomercurials at different concentrations to TTC reduction.

Concentrations of fungicidal substances (Mol)

れも顕著に阻害を示した。最終濃度アセトン1%以下、PEG-300 0.1%以下では影響がなかったため、前述の各種殺菌性物質の溶解にはアセトン1%、PEG-300 0.1%を用いた。

(6) SH試薬の影響

SH基をもつ酵素系に対する阻害剤の作用が、SH試薬の添加で再賦活されることについては、すでに多くの報告がある。前述の菌体磨碎液にL-システイン塩酸塩を加えてこれを試験した。無添加区の活性100に対し、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} Mの各濃度のシステイン添加ではそれぞれ121、214、240と著しいTTC還元増加を示した。またシステインはTTCを無気の状態条件下で自動的に還元することがある¹⁰⁾ので、上述の反応液に菌体磨碎液を加えないで同様の処理を行った。その結果TPFの生成が認められたが菌体磨碎液を加えた対照100に対し、菌体磨碎液を加えないでシステインを 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} M加えた区では、TTC還元力はそれぞれ0.2、0.6、1.7の程度であった。

次に水銀剤PMA、MC、EMP等についてシステインの影響を調べた。 10^{-4} M以上の濃度のシステイン添加でこれらの薬剤による阻害の賦活が認められた。賦活の程度及びシステイン添加の方法などについては今後更に検討する予定である。

3. 論 議

中村ら⁹⁾及田中ら¹⁸⁾は合成培地を用いて稲熱病菌の呼吸代謝が培養開始後2週間目までは高いがその後急激に減少することを述べ、また平山²⁾は稲熱病菌を馬鈴薯(または杏)煎汁で培養し、コハク酸脱水素酵素

の活性は培養10日目の材料で強いが、35日目の材料では認められないとしている。著者は本実験に先立ち、同じ菌株を用い馬鈴薯寒天培養基 10~15 日培養のものを材料とし、その菌そう（菌糸及び胞子を含む）を剥ぎとつて磨砕し、本報告と同様の方法で TTC 還元力を測定した¹¹⁾。その場合、反応に要する時間が非常に長い（15~18時間）ので、供試磨砕液の pH を 6.0 とした。さらに基質、磨砕液、TTC 等の濃度を高くしても反応時間は僅かしか早められなかつた。それ故馬鈴薯煎汁添加柄内液体培地を用いたが、これでは 4~7 日静置培養した材料（胞子形成前）で強い活性が認められ、さらに 72 時間振とう培養したものでは前述のように、反応開始後 2 時間で同様の強い活性が認められた。以上のように稲熱病菌々体磨砕液の TTC 還元力は培養日数によつて異なり、菌令の若い 4~7 日の材料（生育初期の菌糸）で極めて強いことが確かめられた。しかし菌糸と胞子の活性を比較するには更に綿密な実験を要する。

菌体磨砕液の遠心分劃と活性の関係では、松代⁹⁾が *Bacillus cereus* で発育の段階を経るにつれて上澄の酵素活性が低下し、逆にそれが沈渣で増大することを報告している。稲熱病菌の生育初期の菌糸では 12,000 rpm 遠沈上澄に強い活性が認められた。TTC 還元力の熱失活については、佐藤⁹⁾が植物幼胚で 50°C 30 分、山口¹⁴⁾が緑葉で 50~60°C 10 分と報告しているが、著者の結果も 50°C 10 分を示しよく一致した。マロン酸による阻害は前述のように特異的で Quastel⁹⁾の示した阻害指数*(10:1)に比較的一致し、また基質として加えたコハク酸ソーダによつて活性の高められたこと、等の結果から本実験の TTC 還元に関与するものは、稲熱病菌由来のコハク酸脱水素酵素系と考えてよいようである。

コハク酸脱水素酵素の殺菌剤による阻害については、Byrde¹⁾が *Sclerotinia laxa* について、lime sulphur, o-phenyl phenol が阻害を示し、captan, Cu SO₄ が影響ないことを報告し、三浦⁴⁾は 4 種の細菌について chlortetracycline, streptomycin がそれぞれ阻害を示すことを報告している。本実験で銅剤 (CS) の影響が少ないことは Byrde の結果と類似したが、更に水銀剤の阻害が最も強く、dinitro 化合物が弱いことが確かめられた。水銀剤の阻害では MEMC, EMP が最も強く、次いで PMA, MC であり、PMTS,

EMTS はやや阻害力が劣っていた。これは水沢⁹⁾、田村¹⁵⁾等が稲熱病菌及び胡麻葉枯病菌について行つた、有機水銀化合物の蒸気殺菌作用及び胞子発芽試験の順位とよく一致した。この結果、上記の試験における薬剤の作用点として、コハク酸脱水素酵素系が阻害されているものと考えることができる。また Owens⁷⁾は PMA, MC について、pancreatic amylase に対して MC は 10^{-5} ~ 10^{-6} M の間でシグモイド型阻害、PMC はその間に二つの阻害の山があることを報告しているが、本実験の succinodehydrogenase system ではそのような作用の特異性はなく、何れの薬剤も 10^{-4} ~ 10^{-7} M の間でシグモイド型阻害を示した。最後に、システインを添加すると薬剤による阻害が再賦活されるので薬剤の作用がコハク酸脱水素酵素の SH 基との結合によることが考えられた。

4. 摘 要

各種殺菌剤が稲熱病菌々体磨砕液の TTC 還元及び発芽作用について検討した。菌体は馬鈴薯煎汁添加柄内培養基に 27°C 72 時間振とう培養したものを主として用いた。反応は 28°C 2 時間。耐熱性 50°C 10 分。コハク酸ソーダの添加で活性は高められた。またマロン酸は基質として同時に与えたコハク酸と等濃度またはそれ以上の濃度で強く阻害した。以上の結果から本実験の TTC 還元に関与するのはコハク酸脱水素酵素系と考えられる。

各種殺菌剤による阻害は水銀剤 MEMC, EMP が 10^{-5} ~ 10^{-7} M で最も強く、次いで PMA, MC が 10^{-4} ~ 10^{-6} M, PMTS, EMTS が 10^{-4} ~ 10^{-8} M の順を示し、銅剤 CS, 有機硫黄剤 TMTD, Zb は 10^{-3} ~ 10^{-5} M, dinitro 化合物 DNPTC, TCDNB は 10^{-3} ~ 10^{-4} M でそれぞれ阻害した。PCNB は影響がなかつた。アセトン, PEG-300 等の溶媒も最終濃度 1% 以上では阻害がみられた。 10^{-4} M 以上のシステイン添加で薬剤の阻害が再賦活された。

(1957 年 10 月 3 日受理)

引 用 文 献

- 1) Byrde, R. J. W. et al. : Nature, 178 (4534): 638~639. (1956).
- 2) 平山重勝: 帝国学士院紀事, 9 (10): 639~641. (1933).
- 3) 松代愛三, 他: 生物科学, 8 (特): 7~10. (1956).
- 4) 三浦義彰, 他: 科学, 26 (7): 362~363. (1956).
- 5) 水沢芳名: 農技研病理中報, 9: 97~100. (1956).
- 6) 中村幸彦, 他: 北大農邦紀, 2 (1): 30~34. (19

* 50%阻害の時のコハク酸に対するマロン酸のモル比。

- 55).
 7) Owens, R. G. : Contris. Boyce Thompson Inst., 17(3) : 221~242. (1953).
 8) Quastel, J. H. et al. : Biochem. J., 21: 1224~1251. (1927).
 9) 佐藤七郎：植維，69(816)：273~280. (1956).
 10) 佐藤 了：標準生化学実験. (1953) p. 304.
 11) 高村芳三郎：日植病報，22(1)：33. (1957).
 12) 田村浩国：日植病報，22(1)：28. (1957).
 13) 田中正三，他：日化，74(1)：35. (1952).
 14) 山口 昭，他：ウイルス，6(1)：1~8. (1956).

Summary

A study has been made on the TTC reduction of the mycelial homogenate of rice-blast fungus, *Piricularia oryzae* Cav., particularly on its inhibition by several fungicides. The mycelia grown on Tochinai's synthetic media containing potato decoction at 27°C for 72 hours in shaken culture, were homogenized and fractionated according to the scheme shown in fig. 1, and the supernatant obtained was poured into Thunberg tube for test. After 2 hours of incubation at 28°C, the produced TPF (triphenyl formazan) was measured by an electrophotometer (filter S 48). As a relatively marked TTC reduction of the homogenates was noted at a rate of 20 g mycelia per 100ml homogenate, this concentration was used throughout the experiments.

A considerable portion of the activity of TTC reduction was retained in the supernatant fraction after the centrifugation of mycelial homogenates (Table 3). TTC reductivity of the homogenate was lost by heat treatment at 50°C for 10 minutes, and by addition of malonate at a concentration of 0.02 M, while reduction was

accelerated by adding 0.02 M succinate (Tables 4 and 5). Therefore it seems to be reasonable to assume that the TTC reduction above mentioned is probably attributable to succinodehydrogenase system of the present fungus. As shown in the figures 2 and 3, TTC reduction was retarded by various fungicides, especially by those belonging to mercuric group, among which MEMC and EMP exhibited a strong inhibition at concentrations of $10^{-5} \sim 10^{-7}$ M. The grade of inhibition decreased in the following order; PMA, MC $10^{-4} \sim 10^{-6}$ M; PMTS, EMTS $10^{-4} \sim 10^{-5}$ M; copper sulfate, thiram and zineb $10^{-3} \sim 10^{-5}$ M; DNPTC, TCDNB $10^{-3} \sim 10^{-4}$ M; PCNB did not inhibit at all. These results are consistent with those obtained in the author's another experiment on the vapor action of fungicides and the direct fungitoxicity to spore germination. Cysteine at concentrations of $10^{-2} \sim 10^{-4}$ M increased the rate of TTC reduction, and reversed the inhibition by the mercuric compounds such as PMA, MC and EMP. (Faculty of Agriculture, Nagoya University)

雑 録

キューバのイネの Hoja blanca 病

Raya blanca 時に Cinta blanca と呼ばれる。Venezuela, Panama 及び北米 Florida にも発生が知られている。病徴はシマハガレ病に似ているが、葉の斑紋はもつと鮮かで、又新葉が展開しないで早く枯れる事はないようである。昨年私達が現地調査して実験計画を立てて置いて来たが、最近 Habana の試験場の J. Acuña Galé 博士から vector が1つみつかったという来信があつた。これは *Sogatia oryzicola* Muir (セジロウンカに類

似)で、野外からとつた虫の8%の個体が媒介可能で、ウイルスの虫体内潜伏期間8—9日、植物体内での病徴潜伏期間17—19日となっている。この虫は同国至るところの水田及び水田以外にも甚だ多い。又米国 Louisiana の J. G. Atkins 博士からの来信によると、米国農務省で行つた現地試験の結果、日本及び附近産のイネの品種の中に耐病性と考えられる品種が多数みつかったとの事である。

(向秀夫・飯田俊武)