抗生物質によるいもち病防除に関する研究
(その 4) Blasticidin S のいもち病菌解糖系コハク酸脱水素酵素、
酸化了的磷酸化、核酸合成および蛋白合成に対する作用

見里朝正*・沖本陽一郎*・石井 至*・浅川 勝*・福永一夫*

Tomomasa MISATO, Yōichiro OKIMOTO, Itaru ISHII, Masaru ASAKAWA and Kazuo
FUKUNAGA : Antibiotics as protectant fungicides against rice blast. (4). Effect of
Blasticidin S on the metabolism of *Piricularia oryzae*.

筆者らはさきに¹⁾ Blasticidin S (以下 BS と記す)の葉いもち病治療効果はその優れないもち病菌菌糸生育阻害作用によるものであることを明らかにし、ついで²⁾ 同菌胞子および菌糸の呼吸に及ぼす影響を検討した結果、BS はその静菌的濃度で胞子および菌糸の基質添加による呼吸増加をある程度まで阻害するが、自家呼吸は阻害せず、また菌糸の電子伝達系を阻害しないことから、本剤による菌糸生育阻害は末端呼吸酵素系以外の酵素系の阻害によるものであると推察した。その点につきさらに検討を進めた結果、BS はいもち病菌解糖系、コハク酸脱水素酵素、酸化了的磷酸化、³²P の核酸への取込みは阻害しないが、¹⁴C-グルタミン酸の蛋白への取込みをその静菌的濃度で強力に阻害することが判明した。したがってこのような蛋白合成に対する阻害が本剤がいもち病菌菌糸の生育を強力に阻害し、葉いもち病治療効果を示す原因と考えられるのでその結果を報告する。

本実験を行うに際し終始御指導・御鞭撻を賜わった東大農学部住木諭介教授、明日山秀文教授、東大応微研米原弘助教授、同丸尾文治教授、同高橋圃助教授および東大農学部舟橋研究室大村京正博士に篤く感謝の意を表する。

I. 解糖作用に及ぼす影響

いもち病菌の解糖系に対する醋酸フェニル水銀、Antimycin A および Blastmycin の作用について原田ら³⁾は Sucrose を基質とした場合の利用度および乳酸の蓄積量に及ぼす影響を調べた結果、醋酸フェニル水銀は解糖作用を阻害するが、Antimycin A および Blastmycin は影響がないことを認めている。筆者らは原田らの方法に準じていもち病菌の解糖系に及

第1表 解糖作用阻害実験のためのタンベルグ管内組成

Table 1 Constituents in Thunberg tube for the experiment of glycolysis inhibition

組 成 Constituents	容 量 Volume
Mycelium suspension	2 ml
1/10M Sucrose	1
Thiamine 10 mg/500 ml	2
1/15 M pH 7.0 Phosphate buffer	4 or 5
Chemicals	1
Total volume	10

第2表 Blasticidin S のいもち病菌解糖におよぼす影響

Table 2 Effect of Blasticidin S on glycolysis in *P. oryzae*

供 試 薬 剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	4 時 間		6 時 間	
		PH	乳酸量 ($\mu\text{g/ml}$)	PH	乳酸量 ($\mu\text{g/ml}$)
PMA	1000	6.8 6.8	2.0 2.0	7.0 6.8	2.0 2.0
Blasticidin S	1000	6.8 6.8	136.0 136.0	6.8 6.8	200.0 200.0
Iodoacetate	100	6.8 6.8	2.0 2.0	6.8 7.0	6.0 6.0
control		6.8 6.8	132.0 172.0	6.8 6.8	300.0 300.0

ぼす BS の作用を検討した。

実験方法 : glucose 2%, 粉末酵母エキス 0.5%, イネわら煎汁 10% の組成からなる液体培地に 27°C 3日間培養した菌体を集め、3回滅菌蒸留水で洗滌した菌体を使用した。第1表に示す組成を Thunberg 管に入れて真空にし、嫌気的条件下で 27°C 4時間お

* 農業技術研究所

よび9時間反応させた。反応後トリクロロ醋酸を終末濃度5%になるように加え遠心分離して除蛋白を行ない、上澄液について乳酸を Baker-Summerson の方法⁴⁾によつて測定した。

実験結果：第2表に示すように醋酸フェニル水銀、沃度醋酸では明らかな阻害がみられたが、BS ではほとんど阻害がみられなかった。したがつて本剤は解糖作用に直接的な阻害作用はないものと思われる。

II. コハク酸脱水素酵素に対する作用

いもち病菌のコハク酸脱水素酵素に対する殺菌剤の作用について高村²⁾は Thunberg 管を用いた TTC 還元法により醋酸フェニル水銀、硫酸銅など多くの薬剤が同酵素を阻害することを認めている。また原田³⁾も同様の方法を用い、Antimycin A, Blastmycin がコハク酸脱水素酵素には作用しないことを認めている。筆者らも同様の方法でコハク酸脱水素酵素に対する BS の作用を調べた。

実験方法：前章と同じ方法で調製した菌体に菌体湿重あたり約5倍量の pH 7.0, 0.1 M 磷酸緩衝液を加え、冷却しながら磨砕し、軽く遠沈(1000 r. p. m, 10min)して、その上澄液を供試酵素液とした。第3表に示す組成を Thunberg 管に入れ、真空にした後 28°C の恒温槽中に保ち 10 分後に内容物を混合し反応を開始した。反応2時間後トリクロロ醋酸で反応を停止し、形成された Formazan を醋酸エチル 4 ml で抽出し光電比色計で定量した。

実験結果：第4表に示すように本剤のコハク酸脱水素酵素に対する阻害はほとんど認められなかった。100 $\mu\text{g/ml}$ ではわずかに阻害がみられるようであるが、本剤の静菌濃度(0.1~1 $\mu\text{g/ml}$)に比較すると遙

第3表 コハク酸脱水素酵素阻害実験のためのタンベルグ管内組成

Table 3 Constituents in Thunberg tube for the experiment of succinic dehydrogenase inhibition

組 成 Constituents	容 量 Volume
Enzyme preparation	1 ml
0.2% TTC soln.	0.5
0.005% Methylene blue soln.	0.5
1 M pH 7.0 Phosphate buffer	1
1/10 M pH 7.0 Phosphate buffer	1 or 2
Chemicals	1
Total volume	5

第4表 いもち病菌のコハク酸デヒドロゲナーゼに及ぼす Blastidicin S の影響

Table 4 Effect of Blastidicin S on succinic dehydrogenase in cell free extract of washed-mycelium of *P. oryzae*

Blasticidin S 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.D
Control (without succinic acid)	0.055
0 (with succinic acid)	0.220
10 ()	0.197
100 ()	0.176

かに高濃度なので、薬剤の一次的作用とは考えられない。

III. 酸化的磷酸化に対する作用

物質代謝によつて生じたエネルギーは酸化的磷酸化反応により一旦高エネルギー磷酸結合(主として ATP)として貯蔵されてから、いろいろの生活活動のために消費される。したがつて酸化的磷酸化反応は生体の代謝過程で重要な役割を果している。この酵素系は細胞内の不溶性顆粒であるミトコンドリア内部に集約的に存在していることが知られているが、不安定で失活し易い。酸化的磷酸化阻害実験の材料として、ラッテのミトコンドリアを使用した例は多いが、糸状菌を用いた例は少ない。いもち病菌については原田³⁾が菌体から調製した粗酵素液を使用して Antimycin A などの阻害の有無をみた実験があるが、この実験結果では無機磷酸の消失量が明示されておらず、果して酵素に活性があつたかどうか明らかでない。筆者らは最初いもち病菌ミトコンドリアを使用して BS の本酵素阻害実験を行なつたが、酵素は吸収しても無機磷酸を消費するようなミトコンドリアの抽出は困難であつたので、酸化的磷酸化阻害実験のみはいもち病菌を使用せず、ラッテのミトコンドリアを使用した。

実験方法：ミトコンドリア様顆粒調製法は Schneider⁶⁾のミトコンドリア分画法に基づいて行なつた。ラッテは 100~150 g の雄を使用し、冷室にて肝臓を取り出し、0.25 M sucrose を 10 倍量加え blender 型 homogenizer で 15~20 秒ホモジナイズする。この液を低速度遠心分離(1000 r. p. m., 5 分間)し、その上層混濁液を高速度遠心分離(14,000. r. p. m., 20 分間, International 冷凍遠心器使用)にかけ、生じた沈澱に 0.25 M sucrose 液を加えてミトコンドリア酵素液として使用した。Warburg 検圧法により酸素吸収を測定し、無機磷酸の定量は中村法⁸⁾によつ

第5表 酸化的磷酸化阻害実験のための Warburg 容器内組成

Table 5 Constituents in Warburg's vessel for the experiment of oxidative phosphorylation inhibition

	組 成 Constituents	容 量 Volume
Vessel	10^{-3} M ATP	0.3 ml
	1 M Na-succinate	0.1
	10^{-2} M $MgCl_2$	0.2
	10^{-1} M pH 7.4 Phosphate buffer	0.5
	10^{-4} M Cytochrome C	0.2
	Rat liver mitochondria fraction	0.5
Side arm	Chemicals	0.3
	1 M glucose	0.2
	20 mg/10 ml hexokinase	0.5
Center well	20% KOH	0.5

第1図 各種薬剤の Rat liver mitochondria の酸素消費阻害作用

Fig. 1 Effect of some chemicals on oxygen consumption by mitochondrial fraction from rat liver

第6表 Rat liver mitochondria を使用しコハク酸を基質とした時の各種薬剤の酸化的磷酸化阻害効果

Table 6 Effect of some chemicals on oxidative phosphorylation by mitochondrial fraction from rat liver

薬 剤 濃 度	$O_2(N)$ μl	ΔP μM	ΔO μ atoms	P/O
control	1	612.6	12.41	10.66
	2	512.7	9.16	8.92
Blasticidin S	100 $\mu g/ml$	499.2	11.83	8.69
	10	541.6	12.0	9.43
	1	548.0	12.4	9.54
Blastmycin	1	18.6	0	0.33
Phenylmercuric acetate	100	13.9	0	0.24
	10	355.4	7.5	6.18

た。Warburg 容器内の組成は第5表に示す通りである。対照薬剤として醋酸フェニル水銀, Blastmycin を使用した。薬剤の終末濃度は BS は $100 \mu g/ml$, $10 \mu g/ml$, $1 \mu g/ml$, 醋酸フェニル水銀は $100 \mu g/ml$, $10 \mu g/ml$, Blastmycin は $1 \mu g/ml$ とした。30°C の浴槽中で 10 分間温度平衡に達してから側室の液を主室に加え, 30 分後の酸素吸収を測定した後無機磷酸を定量した。

実験結果：供試薬剤のラッテ肝臓ミトコンドリアの酸素吸収に対する阻害効果を第1図, 酸化的磷酸化反応に対する阻害効果を第6表に示す。BS はいもち病菌ミトコンドリアの時と同じく, ラッテ肝臓ミトコンドリアの酸素吸収に対してもほとんど阻害作用を示さなかった。また酸化的磷酸化反応をも阻害せず, かえって促進的に作用するように考えられる。醋酸フェニル水銀および Blastmycin では酸素吸収と同時に酸化的磷酸化反応に対する阻害もみられた。薬剤無添加の際のコハク酸を基質とした時の P/O 比が理論値に近いことから, 本実験において磷酸化はかなり行なわ

第7表 ^{32}P のとりこみ阻害実験のための L 字管内組成Table 7 Constituents in tube for the inhibition experiment of ^{32}P incorporation into *P. oryzae*

組 成 Constituents	容 量 Volume
Mycelium suspension	2 ml
1 M glucose	0.1
pH 7.0 Tris buffer	2
^{32}P -Phosphate (0.85 μC)	0.3
Blasticidin S (final concentration $1 \mu g/ml$)	0.6

第8表 磷脂質・核酸・蛋白質の分画方法

Table 8 Method of preparing phospholipid, nucleic acid, and protein fraction from mycelium of *P. oryzae*

れていると考えられる。

IV. ^{32}P の核酸への取込みに対する作用

放射性同位元素を利用した研究が盛んになるに従つて、 ^{32}P を使用して核酸の磷酸代謝をしらべる研究も多くなつたが、いもち病菌について行なつた研究はまだない。筆者らは対数増殖期にあるいもち病菌の菌体を使用し、glucose を基質として加えた時の ^{32}P のいもち病菌菌体の磷脂質分画、核酸分画、蛋白分画への取込みとそれに対する BS の阻害の有無をしらべた。

実験方法：第1章と同様にして調製したいもち病菌菌体を pH 7.0 Tris 緩衝液で十分に洗滌した後、同緩衝液を加えて軽く (blender 型 homogenizer で 15～20秒) ホモジネートしたものを供試菌体とした。L 字型の容器に第7表に示す組成を入れ 30°C で2時間振盪した。試料採取は反応開始直後、1時間および2

時間後の3回行なつた。反応液は Schneider 法²⁾ に準拠して第8表に示す操作をへて磷脂質分画、核酸分画、蛋白分画に分けた後、各分画の放射能を G. M. counter により測定した。

第9表 いもち病菌の磷酸 (^{32}P) 代謝に対する Blasticidin S の作用

Table 9 Effect of Blasticidin S on incorporation of ^{32}P into *P. oryzae*

	測定時間	Phospholipid 分画	Nucleic acid 分画	Protein 分画
control	0	c. p. m 700	c. p. m 100	c. p. m 0
	1	3400	17800	2200
	2	5800	20600	3600
Blasticidin S 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0	700	100	100
	1	3400	18600	2700
	2	6200	25800	3500

実験結果：第9表に示すように本条件下で ^{32}P のいもち病菌菌体による取込みがおこなわれ、特に磷脂質や蛋白部分よりも核酸部分に著しく多量に取込まれることが判明した。またこれらの作用は BS により阻害されないことが明らかになった。しかしながら核酸は RNA も DNA も“塩基—糖—磷酸”という構成単位からなっており、 ^{32}P の取込みを阻害しないということは“塩基—糖—磷酸”の結合が引き続き行なわれていることを意味するが、BS はその構造中にシトシンやグアノシンを含むとされているので、これらの塩基またはヌクレオシドが ^{32}P と結合して異常な形態の核酸を形成している可能性も考えられる。したがって BS が ^{32}P の核酸への取込みを阻害しないという本実験結果のみでは、正常な核酸代謝の阻害が全くないとは断定できない。一方 ^{32}P のこれら分画への取込みが BS によつて阻害されないことは、BS が酸化的磷酸化反応を阻害しないという前述の実験結果の傍証ともなえると思われる。

V. ^{14}C -グルタミン酸の蛋白への取込みに対する阻害作用

近年標識アミノ酸を使用した蛋白代謝の研究が盛んになっているが、特にグルタミン酸を中心としたアミノ酸から蛋白質への生合成に関する研究は多い。Penicillin は *Staphylococcus aureus* によるグルタミン酸の摂取は阻害しないが、これから蛋白質が合成される過程を阻害し、摂取されたアミノ酸はペプチドとなつて菌体外に排泄されることが認められている⁹⁾。また Chloramphenicol も *Staphylococcus aureus* におけるグルタミン酸の蓄積には影響ないが、これから蛋白質への合成を完全に阻害することが認められている¹⁰⁾。その他 Streptomycin¹⁰⁾, Aureomycin¹²⁾, Terramycin¹²⁾, Cycloheximide¹³⁾ など細菌または酵母の蛋白合成を阻害する抗生物質は多い。

一方グルタミン酸はいもち病菌の窒素源としてのみ

でなく炭素源としてもよく利用され、イネがいもち病に罹病性となる原因は窒素過多、日照不足など環境条件によりイネ葉組織内にグルタミン酸が増加することがいもち病菌の生育を促進させる結果である¹⁴⁾とされていることなどから考えても、グルタミン酸はいもち病菌菌体蛋白の構成アミノ酸として重要な役割を占めると思われる。したがって本実験ではグルタミン酸から蛋白質が合成される過程が BS により阻害されるかどうかを検討した。

実験方法：第10表に示す組成を反応容器内に入れ、供試いもち病菌菌体調製方法、反応条件、分画方法、反応後の測定方法などは前章の ^{32}P の時と同様にして行なつた。

実験結果：本条件下では第11表に示すようにいもち病菌による ^{14}C -グルタミン酸の取込みがおこなわれ、特に核酸や磷脂質部分よりも主として蛋白部分に取込まれることが判明した。そしてその蛋白分画への取込みは BS により強力に阻害された。この阻害濃度 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ はいもち病菌に対する生育阻害濃度 ($0.1\sim 1\text{ }\mu\text{g/ml}$) とほぼ一致するので、この蛋白合成阻害は本物質の一次的作用によるものであると考えられる。したがって BS のいもち病菌に対する強力な生育阻害作用は、本剤がグルタミン酸から蛋白質への生合成

第10表 ^{14}C -グルタミン酸のとりこみ阻害実験のためのL字管内組成

Table 10 Constituents in tube for the inhibition experiment of ^{14}C -glutamic acid incorporation into *P. oryzae*

組 成 Constituents	容 量 Volume
Mycelium suspension	1 ml
pH 7.0 Tris buffer	1
^{14}C -glutamic acid ($1.54\mu\text{C}$)	0.2
Blasticidin S (final concentration $1\text{ }\mu\text{g/ml}$)	0.3

第11表 いもち病菌の ^{14}C -グルタミン酸代謝に対する Blasticidin S の作用
Table 11 Effect of Blasticidin S on incorporation of ^{14}C -glutamic acid into *P. oryzae*

	測定時間 (hr)	Phospholipid	Nucleic acid	Protein 分 画	
		分 画	分 画	alkali 可溶部	alkali 不溶部
control	0	600 c. p. m	200 c. p. m	0 c. p. m	0 c. p. m
	1	1200	400	900	4400
	2	2500	400	1600	9500
Blasticidin S $1\text{ }\mu\text{g/ml}$	0	600	200	100	0
	1	1400	400	100	300
	2	1800	300	200	900

の過程を阻害するためと考えられる。

VI. 結 論

いもち病菌の代謝系に及ぼす Blasticidin S の作用をしらべた結果、本剤は解糖系、コハク酸脱水素酵素、電子伝達系、酸化的磷酸化などのエネルギー代謝系の酵素は阻害せず、また ^{32}P の核酸への取込みに対しても阻害がみられなかつたが、 ^{14}C -グルタミン酸の蛋白質への取込みがほぼ静菌の濃度で強力に阻害された。したがつてこのような蛋白合成に対する著しい阻害作用が、本剤のいもち病菌菌糸生育に対する強力な阻害作用の原因と考えられる。

(1960. 11. 4 受理)

引用文献

- 1) 見里朝正, 他 (1959). 日植病報, 24 : 302.
- 2) 見里朝正, 他 (1960). 日植病報, 提出中
- 3) 原田雄二郎, 他 (1959). 日植病報, 24 : 255.
- 4) Barker, S. B. W. and Summerson, W. H.

- (1941). J. Biol. Chem., 138 : 535.
- 5) 高村芳三郎 (1957). 日植病報, 22 : 225.
- 6) Schneider, W. C. (1948). J. Biol. Chem., 176 : 259.
- 7) Schneider, W. C. (1946). J. Biol. Chem., 164 : 747.
- 8) 中村道徳 (1951). 24 : 197.
- 9) Hotchkiss, R. D. (1950). Ann. N. Y. Acad. Sci., 53 : 13.
- 10) Wissemann, C. L. et al. (1953). Fed. Proc. 12 : 466.
- 11) Cohen, S. S. et al. (1946). J. Biol. Chem. 166 : 393.
- 12) Gale, E. F. and Folkes, J. P. (1953). Biochem. J. 53 : 483.
- 13) Kerridge, D. (1958). J. gen. Microbiol. 19 : 497.
- 14) 田中正三 (1959). 生化学講座, 9 : 285.

Summary

1) Effect of Blasticidin S on glycolysis in *Piricularia oryzae* was examined by measuring lactic acid according to the method of Backer Sammerson, using the suspension of washed mycelium prepared by the method described previously. The glycolysis was almost not inhibited by Blasticidin S, but was remarkably inhibited by phenyl mercuric acetate and moniodoacetate.

2) Effect of Blasticidin S on succinic dehydrogenase in cell free extract of the mycelium of *Piricularia oryzae* was examined by the method in which TTC reduction was measured by the Thunberg technique. Blasticidin S had no significant influence on the succinic dehydrogenase.

3) Effect of Blasticidin S on the oxidative phosphorylation by mitochondrial fraction from rat liver was examined. Oxygen consumption was measured manometrically and phosphorylation was estimated by the determination of inorganic phosphate. The oxygen uptake and the oxidative phosphorylation by the rat liver mitochondria were not affected by Blasticidin S, but both reactions were inhibited by phenyl mercuric acetate and Blastmycin.

4) Effect of Blasticidin S on the turnover of inorganic phosphate by respiring mycelium of *Piricularia oryzae* was studied with the aid of exogenous inorganic phosphate labelled with ^{32}P . ^{32}P from labelled phosphate in the medium was taken up more into the nucleic acid fraction than into the phospholipid or the protein fraction of the mycelium. Each fraction was isolated by the method of Schneider. It was found that the incorporation of ^{32}P into each of the fractions was not influenced by Blasticidin S.

5) Addition of ^{14}C -glutamic acid to the suspension of the mycelium above mentioned resulted in the incorporation of ^{14}C into the mycelium. Since ^{14}C -glutamic acid was incorporated more into the protein fraction than into the nucleic acid or the phospholipid fraction, the incorporation was taken as a measure of examining protein synthesis. The incorporation into the protein fraction of the mycelium was strongly inhibited by Blasticidin S at a concentration of $1\text{ }\mu\text{g/ml}$. Because this inhibitory concentration was almost equal to the minimum growth inhibitory concentration ($0.1\text{--}1.0\text{ }\mu\text{g/ml}$), it seemed that the inhibition of protein synthesis was a primary effect of Blasticidin S on the metabolism of *Piricularia oryzae*.

(National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo Japan)