フェナジン-5N-モノオキシドの イネ白葉枯病菌に対する作用機構*

渡 辺 哲 郎**・関 沢 泰 治**

Tetsuro WATANABE** and Yasuharu SEKIZAWA**: Action Mechanism of
Phenazine-5N-monooxide against Rice Leaf Blight Bacterium

Abstract

1. The action mechanism of phenazine-5N-monooxide (II) against rice leaf blight bacterium was investigated relating to the electron transport system of the bacterium on the basis of the action mechanism of phenazine (I) already reported.

2. (II) was reduced non-biologically to (I) by the addition of L-ascorbate or L-cysteine or reduced biologically in the presence of the bacterial cell suspension under anaerobic condition. The action of (II) against the bacterium was attributed to (I) formed after the reductive cleavage of the N-oxide bond.

3. (I) and (II) did not inhibit the succinate dehydrogenase according to the experimental evidences as for the succinate oxidase system and succinate-phenazine methosulfate reductase of the bacterium. They also did not inhibit the triosephosphate dehydrogenase. Various reducing reagents (including L-ascorbate and L-cysteine) had not the reverse action against inhibitory action of (I) or (II).

4. In the presence of (I) or (II) and succinate as the substrate, the reduction of cytochrome b_1 in the succinate oxidase system of the bacterium was still observed, however the reduction of cytochrome c and a_1 were suppressed. The apparent respiration observed by manometric or polarographic experiments under the presence of (I) or (II) and succinate as the substrate suggested the operation of the by-pass electron flow from succinate dehydrogenase or cytochrome b_1 to atomospheric oxygen through the redox system; $(I) \rightleftharpoons \text{dihydrophenazine}$.

5. In the presence of (I) or (II) under a limited incubation condition, inhibition against the uptake of ortho-phosphate and the dissimilation of glucose was observed with the slight acceleration of the apparent respiration.

(Received September 7, 1968)

緒 言

著者らはさきにイネ白葉枯病の防除に有効なフェナ

* この報告の一部は昭和40年10月、日本農芸化学会関東支部大会(甲府)および昭和43年6月、日本植物病理学会大会において講演した。

** 明治製菓(株)中央研究所 Research Laboratories, Meiji Seika kaisha, Ltd., Yokohama, Japan.

ジンについてその作用機構を研究し、フェナジンは本病原細菌 *Xanthomonas oryzae* の呼吸系に取り込まれてその電子伝達を抑制する新たな系を形成することにより特異な静菌作用の機構が成り立つのであろうと報告した¹³⁾。またその後のスクリーニングによりフェナジン-5N-モノオキシドがフェナジンよりすぐれた本病防除効力を有することを見出した^{9,10)}。本報告においてはフェナジン-5N-モノオキシドの本菌による

フェナジンへの還元的変換ならびに本菌呼吸系について研究し、その作用機構がほぼ明らかとなったので報告する。

本研究の実施に当たりご援助いただいた当所応徴第二室の各位ならびに菌の培養実験に協力された鍛冶川ヒロ子嬢に感謝する。

実験材料および方法

イネ白葉枯病菌の細胞は H-5809 菌（農技研病理科保存株）を既報のグルタミン酸培地¹⁰⁾に接種し、28°C に2日間振とう培養後、遠心分離により得た。菌体の無細胞抽出液の調製方法は既報¹³⁾のとおりである。

フェナジン-5N-モノオキシドのN-O結合の開裂反応は可視部における吸収曲線の変化を日立製自記分光光度計（EPS-2U）によるか 420m μ のモノクロームによる吸収の減少により測定した。

コハク酸酸化酵素系および phenazine methosulfate reductase によるコハク酸酸化の実験はポーログラフィ法により実施した。すなわち溶存酸素電解還元用の白金電極は島津 COL-1 で、対極はKCl飽和甘汞電極島津 OCL-1 を用い、時間軸に対する電解電流の自記記録は IE 測定用プリボックスを通じ、東亜電波 EPR-2 レコーダーにより行なった。電解電圧は-0.6 V で大容量の鉛バッテリーからポテンシオメーターを通して得た。測定用セルは恒温水灌流ジャケットつき容量 5～10ml のものである。測定温度は通常 28°C とした。

フェナジンまたはフェナジン-5N-モノオキシドによる本菌増殖阻害の解除に関する実験は次の試薬を試した。すなわちリボ酸、アスコルビン酸、グルタチオン、ビタミンA、同 D₂、同 K₁、リボフラビン、ピオチン、 β -メルカプトエタノール、2,3-ジメルカプト-1-プロパノール（BAL）、チオグリコール酸、チオリンゴ酸、システインを含むアミノ酸 21 種、粉末酵母エキス（ディフコ社製）、総合ビタミン剤（パンビタン液）、リボ核酸ナトリウムであり、すべて市販品である。

三炭糖磷酸エステル脱水素酵素の活性阻害実験は、DPNHの生成を 340m μ の吸光度測定により無細胞抽出液を酵素源として行なった¹²⁾。

チトクローム系の分光分析的観測は無細胞抽出液の 100,000 $\times$ g (5°C) 1時間の遠心上清⁷⁾を希釈せずそのまま用いた。差スペクトルは基準セルに酸化型を、試料セルに還元型を入れ日立 EPS-2U 型自記分光光度計により測定した。この分光計によっては本菌電子

伝達系の c タイプチトクロームを明瞭に測定できないので牛心筋チトクローム c を添加した。還元は sodium dithionite またはコハク酸ナトリウムを少量添加密栓して1時間後に観察した。なお本実験の場合、添加したフェナジンはチトクローム還元型を観察する光の波長で吸収を示さない。

培養の方法ならびに濃厚菌懸濁液による方法での糖および磷酸摂取実験においては所定時間振とう培養後の菌液を 0°C に冷却し、13,000 $\times$ g 15分遠心上清について、ブドウ糖の定量はSomogyi-Nelsonの方法¹⁴⁾により、K₂HPO₄の定量は中村の方法⁹⁾によって行なった。

ワールブルグ検圧計による呼吸測定は 30°C において常法により実施し、菌、培地組成、薬物濃度はすべて濃厚菌懸濁液による吸収実験の場合と同様とした。

結果および考察

フェナジン-5N-モノオキシドはフェナジンよりイネ白葉枯病菌に対する作用が *in vitro* および *in vivo* において強い^{9,10)}ので、先ずこの相互関係を知らうとしてフェナジン-5N-モノオキシドのフェナジンへの還元的変換について検討した。緩衝液中でフェナジン-5N-モノオキシドを過当量のL-アスコルビン酸と嫌気下で保温したのち、メタノールで希釈し同溶媒を対照として可視部のスペクトルをみると、80%近い収率でフェナジン-5N-モノオキシドが非酵素的にフェナジンに転換することが示された（第1図）。この転換はL-システインの存在でも起こるが、80%程度の収率でフェナジンを生成するには約 40 時間を要した。

フェナジン-5N-モノオキシドのN-オキシド開裂能がイネ白葉枯病菌洗浄菌体にあることはすでに報告されているが¹⁾、生成するフェナジン量の収支論的記載はないので、本実験ではフェナジン生成量につき観察し、第2図の結果を得た。すなわちフェナジン-5N-モノオキシドの還元的開裂によって生ずるフェナジンの量は、もはや基質による光吸収が示されないにもかかわらず同溶媒中のフェナジンの濃度と吸光度との関係から計算すると約 1/3 程度の存在しか見られない。前報¹³⁾において嫌気下無細胞抽出液によってフェナジンがジヒドロフェナジンに還元された事実とよく対応しフェナジン-5N-モノオキシドはオキシドの還元的開裂を受けフェナジンに変換し、さらにジヒドロフェナジンになることおよびフェナジンの菌体中への吸収が推察される。

この実験からフェナジン-5N-モノオキシドの還元

Fig. 1. The non-biological conversion of phenazine-5N-monooxide to phenazine by L-ascorbate under anaerobic condition.

Reaction mixture contained 68 mg L-ascorbate, 3.9 mg phenazine-5N-monooxide in 100 ml M/10 phosphate buffer containing 1.5% polyethyleneglycol at pH 7.2. L-ascorbate was neutilized by N/10 NaOH prior to filling up. The reaction was initiated under anaerobic condition at 10 mm Hg. Hitachi's recording spectrophotometer (EPS-2U) was used. The recording was taken at 2.5 fold dilution after 6 hours incubation at 28°C. The broken lines showed the absorption curves of phenazine and phenazine-5N-monooxide at $0.8 \times 10^{-4} M$ in the 1.5% polyethyleneglycol aqueous buffer solution at pH 7.2.

の際、酸素原子が菌に対して酸化的阻害を示す可能性が考えられるので、この点につき実験した。本菌の可溶化したコハク酸酸化酵素系 (DHS)⁷⁾ を用い、ポーログラフィ法によりコハク酸の酸化能に対するフェナジン-5N-モノオキシドまたは対照としてのフェナジンの影響を調べたが、いずれも $1.1 \times 10^{-2} \mu\text{mol/ml}$ で 30% 程度の阻害を示した (第 3 図)。その後の繰り返し実験ならびにイネ白葉枯病菌の洗浄菌体を用いて行なった阻害実験においても同様の結果が得られることが多いことから、フェナジン-5N-モノオキシドのコハク酸酸化酵素系に対する酸化的破壊作用は強いとは認めがたい。これを確認するため本菌の phenazine methosulfate oxido-reductase 活性のある分画に対

Fig. 2. The conversion of phenazine-5N-monooxide to phenazine by *X. oryzae* cell suspension.

Reaction mixture contained 800 mg *X. oryzae* starved cells, 3.9mg phenazine-5N-monooxide and 100 mg Na-succinate in 100 ml M/100 phosphate buffer containig 1.5% polyethyleneglycol at pH 7.2. The reaction was initiated at 28°C under anaerobic condition at 10 mm Hg. The reaction mixture minus phenazine-5N-monooxide was used as the reference. Before recording, the cells was removed by centrifugation at $13,000 \times g$. The recording was taken at 1.5 fold dilution. The continuous and dotted lines showed the absorption curves at 3 fold dilution for reaction mixture at 0 minute and 60 minutes incubation at 28°C.

するフェナジン-5-オキシドまたはフェナジンのコハク酸酸化能の阻害を同様に調べた。King⁵⁾によれば phenazine methosulfate はコハク酸脱水素酵素から直接電子を受けるので、phenazine methosulfate 添加による酸素消費が高まることはコハク酸脱水素酵素活性の存在を意味している。しかしながら阻害は認め得なかった (第 4 図)。

酸化的破壊を受けやすいはかの酵素として三炭糖リン酸エステル脱水素酵素があるので、この酵素に対する作用につき実験した。結果は第 5 図のとおりで、フェナジンまたはフェナジン-5N-モノオキシドを $2 \mu\text{g/ml}$ 添加した場合にも DPNH 生成量の減少は認めがたく、

Fig. 3. The effect of phenazine-5N-monooxide upon the oxidation of succinate by the cell free preparation of *X. oryzae*.

X. oryzae was cultured under shaking in the glutamate sucrose medium¹⁵⁾ for 48 hours at 28°C. After centrifugation to collect the cells, the starvation of the cells was performed using pH 7.0 NaCl isotonic M/10 phosphate buffer solution at 28°C for twelve hours under shake culture. The reaction mixture contained 0.5 ml of the cell free extracts (the press-sap from French's press at 15 ton/cm² at 5°C and subsequent centrifugation at around 100,000×g for 60 min.), 0.1 ml of 0.5M Na-succinate, methanol solution of phenazine, phenazine-5N-monooxide or plain methanol filling up with pH 7.2 NaCl isotonic M/10 phosphate buffer solution to 5 ml. The concentration of inhibitor: phenazine = 1.1×10^{-2} μmol/ml or phenazine-5N-monooxide = 1.0×10^{-2} μmol/ml. The reaction was operated at 37°C.

この酵素の活性をも阻害しない。

次に各種試薬添加による、フェナジンまたはフェナジン-5N-モノオキシドのイネ白葉枯病菌増殖阻害の解除作用から本剤の阻害機構の解明を試みた。フェナジンまたはフェナジン-5N-モノオキシドを1μg/mlおよびシスチンを10μg/ml含有する既報の最少培地¹⁶⁾中に1:20モルまたは100μg/mlの濃度に試薬を添加して28°C、48時間振とう培養後のイネ白葉枯病菌の増殖の程度により調べたが、供試の試薬によっては本剤の増殖阻害に対する解除作用は認めがたかった。

以上の実験からフェナジン-5N-モノオキシドが蛋白質のチオール基に依存した酵素活性に対して酸化的

Fig. 5. The effect of phenazine or phenazine-5N-monooxide to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity of the cell free extract of *X. oryzae*.

Reaction mixture contained 0.5 ml of the cell free preparation, 570μg of glyceraldehyde-3-phosphate, 2.42 mg of cysteine, 330 μg of DPN, phenazine or phenazine-5N-monooxide in final concentration of 2 μg/ml as methanol solution or plain methanol, and filling up with arsenate-pyrophosphate buffer solution pH 8.7 to 5 ml.

に破壊作用を示す一般的な可能性は少なく、またフェナジン(母核)よりイネ白葉枯病菌の呼吸に対する影響が強いとは認めがたいので、結局前述のように単にフェナジンとして作用していることと考えられる。第6図はフェナジンおよびフェナジン-5N-モノオキシドの濃度と菌の増殖との関係曲線を示しているが、両曲線は定性的関係において変化はなく、ことにN-オキシド導入によって殺菌性を付与されないにもかかわらず効力の増強が見られることは、N-オキシドの導入が菌細胞または寄主体組織への浸透性など物理化学的性質に関与していることを示唆する。

イネ白葉枯病菌の可溶化したコハク酸酸化酵素系(DHS)⁷⁾の電子伝達におけるチトクローム各成分の還元に対するフェナジンの影響につき調べた結果を第7図に示す。この図においてチトクローム b_L の α および β バンドの吸収増加から還元が認められたが、添加したチトクローム c の α , β および a_1 の α バンドの吸収増加が少ないことから、 c および a_1 成分の還元は

Fig. 4. The effect of phenazine-5N-monooxide upon the oxidation of succinate by the phenazine methosulfate oxidoreductase.

The fresh cells (65 g) cultured by the described method¹⁵⁾ was suspended in equal weight of M/10 phosphate buffer (pH 7.4). The resulted suspension was pressed by French's press (15 ton/cm²) and subsequently centrifuged. Polyethylene sorbitan monolaurate⁵⁾ (Nikkol TL-10) in final concentration of 0.1% and 13.5 mg of Na-succinate was added to the above cell free extract under bubbling of nitrogen gas. The above cell free extract solution was fractionated by 1/6 to 1/2 saturation of ammonium sulfate and dialyzed at 5°C over night for distilled water bubbled with nitrogen gas. The reaction mixture contained 6.5 ml of the enzyme preparation, 13.5 mg of Na-succinate, 525 μg of phenazine methosulfate as methanol solution, phenazine-5N-monooxide in the concentration of $1.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ or $1.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ in methanol solution or plain methanol and filling up with pH 7.4 M/10 phosphate buffer solution to 7 ml. The protein contents of the enzyme preparation was 14.5 mg/ml assayed by nephelometric method employing trichloroacetic acid and bovin albumin as standard.

少ないものと思われ、電子伝達は b_1 より酸化還元電位の高い成分の還元が制約を受けているものと推測された。

前述のように phenazine methosulfate はコハク酸脱水素酵素から直接電子を受けるとされている⁵⁾ のでフェナジンの場合もそれと類似の構造であることから

Fig. 6. The relation between the concentration of phenazine or phenazine-5N-monooxide and the growth per cent of *X. oryzae*.

The medium contained 0.2% of disodium glutamate, 0.5% of sucrose, 0.2% of dipotassium hydrogen phosphate, 0.01% of magnesium chloride $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001% of ferrous sulfate $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% of manganese sulfate $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and 0.2% of polypeptone at pH 7.0. The inoculum was prepared employing the glutamate sucrose medium¹⁵⁾ under shake culture for 17 hours at 28°C. The subsequent washing of the cells before transfer was done twice with M/10 phosphate buffer solution at pH 7.0. The inoculum size transferred was 4% of the fresh medium. The growth per cent was measured by the optical density at 660 m μ after shake culture for 19 hours at 28°C. The growth was expressed on the basis of control run as 100 per cent.

Fig. 7. The effect of phenazine upon the reduction of cytochromes of *X. oryzae*.

The reaction mixture contained cell free extract and 2.3×10^{-3} $\mu\text{mol/ml}$ of cytochrome c from bovin heart muscle. Phenazine was added at concentration of 30 $\mu\text{g/ml}$ by its saturated methanol solution.

同様の電子の受けとり方をする可能性が考えられる。一方、フェナジンの存在する場合に、なおチトクローム b_1 の還元が認められることからコハク酸脱水素酵素からチトクローム b_1 を経由してフェナジンが電子を受けとることも考えられ、フェナジンの作用場所として次の概念図が与えられる。

Postulated scheme on the action mechanism of phenazine against the electron transporting system of *X. oryzae*.

この概念図からイネ白葉枯病菌はフェナジンにより本来の電子伝達を阻害される場合、糖の消費も阻害されるのであわせて検討した。

まず K_2HPO_4 を 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加した培地を用い本菌を試験管により振とう培養し、経時的に試料を採取して K_2HPO_4 およびブドウ糖の定量ならびに菌の増殖の測定を行ない第8図の結果を得た。すなわち 2 $\mu\text{g/ml}$ のフェナジンまたはフェナジン-5N-モノオキシド添加の場合は糖およびリン酸とも 120 時間後においても無添加に比して 30% 程度の吸収に止まり、菌の増殖も不十分となって強い影響が認められた。なお培養開始前の菌懸濁液の濃度は 660 m μ の吸光度約 0.03 であった。またその時のリン酸量が 250 $\mu\text{g/ml}$ 以上となったことは培地中のペプトンおよび無洗浄の種菌の添加によると考える。

次いで濃厚菌懸濁液によるリン酸の摂取について実験した。実験開始前の菌濃度は吸光度 0.82 とし試験管により振とう培養を行なった。 K_2HPO_4 の定量および菌の増殖を測定した結果を第9図に示す。対照の無処理区においては 4 時間後に約 1/3 にリン酸の減少が認められ、また窒素ガス封入および $0.8 \times 10^{-4}\text{M}$ の 2,4-ジニトロフェノール¹⁷⁾ 添加ではリン酸吸収は認められなかった。30 $\mu\text{g/ml}$ のフェナジンまたは 32.6 $\mu\text{g/ml}$ のフェナジン-5N-モノオキシド添加の場合は 55~60% に抑制され、前述の培養の実験と類似する結果となった。菌濃度は薬物処理区では多少減少の傾向が認められた。

第8図および第9図からフェナジンおよびフェナジン-5N-モノオキシドのイネ白葉枯病菌に対する一

の重要な作用は磷酸の摂取阻害であり、その作用性はこれらの 2 者の間に差は見られなかった。さらに呼吸に対する影響を確認するため、ワールブルグ検圧計を用いて調べたところ第 10 図の結果を得た。実験液の組成および薬物濃度は濃厚菌懸濁液による磷酸摂取実験の場合と全く同一である。すなわち対照区では基礎

呼吸に比し顕著な呼吸が見られ、30 $\mu\text{g/ml}$ のフェナジンまたは 32.6 $\mu\text{g/ml}$ のフェナジン-5N-モノオキシドの添加では基質添加無処理と同等か、またはやや高い呼吸が認められ、この現象は数回の実験で認められている。

このワールブルグ検圧計による実験は呼吸と磷酸摂

Fig. 8. The effect of phenazine or phenazine-5N-monooxide upon the uptake of ortho-phosphate, the dissimulation of glucose and the growth of *X. oryzae* in time-course run.

The assay was performed by shake culture at 28°C using modified glutamate sucrose medium (0.2% of disodium glutamate, 0.5% glucose, 0.01% of dipotassium hydrogen phosphate, 0.01% of magnesium chloride $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001% of ferrous sulfate $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% of manganese sulfate $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and 0.1% of polypeptone). The inoculum size transferred was 5% of the fresh medium. Phenazine and phenazine-5N-monooxide was added as methanol solution at final concentration of 2 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 9. The effect of phenazine or phenazine-5N-monooxide upon the uptake of ortho-phosphate and the change of cell concentration in a deep cell suspension.

The cells of *X. oryzae* was prepared employing a medium (glutamate sucrose medium¹⁵⁾ minus dipotassium hydrogen phosphate) under shake culture at 28°C for 16 hours. The subsequent washing of the cells was done once with isotonic tris-hydrogen chloride buffer solution²⁾ (0.01M tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.075M magnesium chloride $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 0.9% of sodium chloride, adjusted to pH 7.0 with hydrogen chloride). Cell suspension adjusted with the modified glutamate sucrose medium to O.D. of 0.80 at 660 $\text{m}\mu$ was shaken in the test tube at 28°C for assays. Phenazine or phenazine-5N-monooxide was respectively added at the final concentration of 30 $\mu\text{g/ml}$ or 33 $\mu\text{g/ml}$ by methanol solution.

取を同時に測定しうる限られた条件で行なったものであるが、対照区において低い値ながら磷酸摂取が認められたのに反し、薬物添加区では全く認められなかった⁴⁾。すなわち見掛け呼吸を阻害することなく、磷酸取り込みを阻害していることがうかがわれる。このことはフェナジンの存在下、本来のチトクローム系での b_1 以降の残余の電子流の存在を仮定すると本剤が酸化磷酸エステル化系に直接阻害作用を有することが示

唆されるが、実験条件により磷酸摂取阻害度が異なることは第 8, 9 および 10 図に示すとおりである。本菌の酸化磷酸エステル化の測定条件についてはなお検討を要する。

ポーラログラフィ法による呼吸測定ではフェナジンの添加により弱い阻害が、またワールブルグ検圧計による呼吸実験では若干の呼吸増加現象を認めたので、この薬物と本菌洗浄菌液の濃度の関係について検討を加えるため、フェナジンの濃度を一定 ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) とし、菌濃度を変えてワールブルグ検圧計により呼吸を測定した。結果は第 11 図のとおりで、菌濃度が吸光度で 0.2, 0.1 および 0.025 の場合にはフェナジン添加は無添加に比し呼吸が若干抑制されるか同等であるのに反し、菌濃度 0.05 の場合は明らかに呼吸の促進が見られた。この場合の菌濃度および薬物濃度は前述のワールブルグ検圧計実験のそれぞれ 1/15 に相当しよく対応している。

論 議

フェナジン-5N-モノオキシドはイネ白葉枯病防除効力が強い^{9,10)}ので、同病病原体 *Xanthomonas oryzae* に対する作用機構を前報によるフェナジン(母核)の作用機構を基礎として調べた。本菌増殖度とフェナジン-5N-モノオキシドの濃度との関係曲線は、本化合物がより少ない濃度で作用することのほか、静菌的作用を示すことにおいて定性的にフェナジンと同様であった。フェナジン-5N-モノオキシドは本菌との接触により還元的に N-オキシドが開裂してフェナジンが生成され、フェナジン-5N-モノオキシドの作用機構は結局フェナジンの作用機構に帰結されと考えられる。その際 N-オキシドの開裂により生ずる酸素原子がコハク酸脱水素酵素あるいは三炭糖磷酸エステル脱水素酵素などの酸化的破壊を受けやすい酵素を酸化的に破壊する実験的証拠は見いだし得なかった。それゆえフェナジンに N-オキシドを導入することによる *in vitro* および *in vivo* における静菌作用増強の意義づけは他に求めねばならない。静菌作用の型が定性的に変化しないのはたとえば菌体内への薬物の浸透性などの物理化学的性質の変化が示唆される。

フェナジンは前報¹⁰⁾のように本菌の電子伝達系と共役する新たな系を形成し、その中間点より電子流を直接に空中酸素へと流すものと見られ、その仮想の中間点は本菌電子伝達系中のチトクローム b_1 かコハク酸脱水素酵素自体のいずれかとしてよいことを分光学的方法により知り得た。

Fig. 10. The effect of phenazine or phenazine-5N-monooxide on the respiration and the uptake of ortho-phosphate by *X.oryzae* cell suspension.

The procedure for respirometry: Main compartment; 2.6 ml of fresh cells suspension diluted to O. D. = 0.80 at $660\text{ m}\mu$ with the solution contained dipotassium hydrogen phosphate, magnesium chloride, ferrous sulfate, manganese sulfate at pH 7.0, side arm; 0.3 ml of the solution contained phenazine or phenazine-5N-monooxide methanol solution or plain methanol, disodium glutamate, glucose and polypeptone at pH 7.0, center well; 0.2 ml of 10 % potassium hydroxide. The final concentration of each compounds in the reaction mixture is equal to that of in Fig. 9. Phenazine or phenazine-5N-monooxide was added as methanol solution at final concentration of $2\mu\text{g}/\text{ml}$. The reaction was operated at 30°C .

このように電子流を本菌電子伝達系より分岐させることは生物エネルギー論をもとにしたフェナジンの生育阻害機構の一つであるが、実験条件によってはフェナジン添加により呼吸の高まりが観察されることおよびそのとき磷酸摂取がよく阻害されることは 2, 4-ジニトロフェノールでみられる現象と同様の現象であり¹¹⁾、薬物添加により酸化的磷酸エステル化系とチトクローム系との共役が解除されることにより電子伝達速度の制御が失われるためと考えられ、電子流の分岐による電子伝達系の活動阻害とともにその共役酸化的磷酸エステル化系への直接阻害についても今後検討していくことが必要であろう。またこれらの量的関係は本研究においては解明できず将来にゆだねられた。最近 *helminthosporal* でミトコンドリアでの呼吸系への阻害とともに酸化的磷酸エステル化系自体への二重の阻害が報告されている¹⁵⁾ことと対比して興味あることである。

摘 要

フェナジン (I) の作用機構に引き続きフェナジン-5N-モノオキシド (II) のイネ白葉枯病菌に対する作用機構を本菌の電子伝達系ならびに酸化的磷酸化反応をとりあげて研究した。

(1) II は嫌気下 L-アスコルビン酸、L-システインまたは本菌との接触により非生物的または生物的に還元され I に変化するもので、II は結局 I に変化して I として菌に作用すると見られる。

(2) コハク酸酸化酵素系およびコハク酸—フェナジンメトサルフェート還元酵素に対する阻害実験から I、II ともコハク酸脱水素酵素自体への阻害はほとんどなく、三炭糖磷酸エステル脱水素酵素阻害作用も認められず、さらに I または II のイネ白葉枯病菌増殖阻害に対する試薬 36 種 (L-アスコルビン酸、L-システインを含む) の阻害解除作用を認めなかったもので、これらの酸化的破壊を受けやすい酵素に対し II の N-オキシドの酸素原子が酸化的に阻害作用を与えているとは考えがたい。

(3) I の添加によりチトクローム b_1 の還元は認められたが、それ以降すなわち c , a_1 については還元の抑制が見られた。したがって電子伝達が制約を受けているものと認められるが、他方ワールブルグ法などによれば見かけ上の呼吸は強くは阻害されないことか

Fig. 11. The relation between the concentration of cells of *X. oryzae* and the respiration in the presence of phenazine.

The experimental procedure is equal to the footnote of Fig. 10. The concentration of phenazine is 2 $\mu\text{g/ml}$.

らチトクローム b_1 またはコハク酸脱水素酵素より I $\rightleftharpoons$ ジヒドロフェナジンの系による空中酸素への電子のバイパス・フローが示唆された。

(4) 菌細胞による磷酸摂取およびそれに伴う糖の消費は I または II の添加により非常な阻害を受けるにもかかわらず呼吸を阻害しないか、あるいは軽い促進が示される。

(5) 以上の実験において I および II の作用性はほとんど差を認めがたく、II は前述のように本菌との接触により還元的に I に変化して作用するものと考えられ、I に関する作用機構の概念図が提出された。

引用文献

1. Bak, T.G. and Yoshioka, I. (1963). *J. Biochem.* 53: 111-116.
2. 萩原文二 (1961). 酵素化学シンポジウム 第 15 集: 312-321.
3. Hunter, F.E. (1951). In *Phosphorous Metabolism* (McElroy, W.D. and Glass, B. eds.). Baltimore. pp. 301.
4. 石川晋次. (1962). *生化学* 34: 1-16.
5. King, T.E. (1963). *J. Biol. Chem.* 238: 4034-4051.
6. Kuboyama, M., Takemori, S. and King, T.E. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9: 534-539.
7. 松中昭一. (1963). *日農化* 37: 658-662.

-
8. 中村道德 (1950). 日農化 24: 1-5.
 9. 小田信, 関沢泰治, 渡辺哲郎 (1965). 日植病報 30: 108.
 10. Oda, M., Sekizawa, Y. and Watanabe, T. (1966). Appl. Microbiol. 14: 365-367.
 11. 奥貫一男, 巖佐耕三 (1955). 続ワールブルグ検
庄計 (関根隆光ほか編). 東京. p. 205.
 12. 奥貫一男, 瀬屑一郎. (1956). 酵素研究法 2 (赤
堀四郎編). 東京. p. 416.
 13. Sekizawa, Y., Watanabe, T. and Oda, M.
(1965). Ann. Phytopath. Soc. Japan 30:
145-152.
 14. Somogyi, M. (1945). J. Biol. Chem. 160:
61-68.
 15. Taniguchi, E. and White, G. A. (1967). Bioch-
em. Biophys. Res. Commun. 28: 879-885.
 16. Watanabe, T., Sekizawa, Y. and Oda, M.
(1965). Ann. Phytopath. Soc. Japan 30: 1-
7.
 17. White, A., Handler, P., Smith, E. L. and
Stetten, D. (1959). Principle of Biochemistry.
New York. p. 374.
-