学会賞受賞論文

(奨励賞)

フサライドのイネいもち病防除機構に関する研究

千田 常明

呉羽化学工業株式会社錦研究所

Studies on Mechanism of Controlling Action of Fthalide against Rice Blast Disease

Tsuneaki CHIDA

*Nishiki Research Laboratories, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.,
Nishiki-machi, Iwaki 974, Japan*

Fthalide specifically blocked appressorial penetration by *Pyricularia oryzae* without affecting conidial germination or appressorial formation. The scanning electron microscopic observation revealed that fthalide affected the fungus prior to appressorial penetration on rice plants. The appressoria of an albino mutant of *P. oryzae* and cerulenin-treated wild type fungus lost the ability to penetrate onion epidermal walls, while they recovered melanization and penetration ability when melanin biosynthetic intermediates were added. Fthalide nullified the recovery with scytalone, a melanin intermediate, but not with 1,8-dihydroxynaphthalene(1,8-DHN). 1,8-DHN alone was not sufficient to recover the penetration ability of wild appressoria treated with 1.0 or 10 $\mu\text{g/ml}$ of fthalide alone, and the presence of cerulenin was required. Our study suggests: Fthalide causes an accumulation of cytotoxic metabolites at higher concentrations. Fthalide blocks NADPH-dependent reductase reactions involved in the conversion of 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene to scytalone and the conversion of 1,3,8-trihydroxynaphthalene to vermeline on the melanin biosynthetic pathway to 1,8-DHN. The melanin biosynthetic pathway is blocked by fthalide in two antipenetrant actions, interference with melanin synthesis and accumulation of inhibitory metabolites. Sensitivity of *P. oryzae* P-2 against fthalide did not change during successive inoculations on rice plants treated with fthalide, suggesting that the lasting effectiveness of fthalide may relate to the aforementioned controlling action.

はじめに

環境に対する安全性の問題から使用が中止された有機水銀剤に代わる、選択性の高いイネいもち病防除剤が求められていた。フサライド (fthalide) は 1887 年に合成が報告された化合物¹⁾であったが、1960 年代後半に呉羽化学において優れた抗いもち病活性が見いだされた²⁾。フサライドはイネいもち病に高い予防的効果と持続的効果を示すこと、またその作用はきわめて選択的であり、作物に対する安全性が高いこと、さらに哺乳類、魚介類などにも毒性が低いことが確認され³⁾、1971 年から散布

剤として実用に供された。フサライドがイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) の感染過程に強い作用を示すことは、1972 年南部により報告されていた³⁾が、その防除機構についてはほとんど解明されていなかった。

イネいもち病菌の侵入を阻害する非殺菌性薬剤として、PCBA を始めとしてフサライド、さらにトリシクラゾールなどが相次いで見いだされた。これらの薬剤がイネいもち病菌感染過程のどの段階で、どのような機構によって活性を発現するのか明らかにするためさまざまな試みがなされてきたが、トリシクラゾールの色素合成に対する作用から pentaketide を経由するメラニン合成

阻害が明らかにされた。これを契機とし、色素合成阻害と付着器侵入阻害の関係の解明において大きな進展が見られた。その過程において、フサライドもイネいもち病菌のメラニン合成に影響していることが示唆された。しかし、イネいもち病菌においてはメラニン合成とイネ表皮侵入との関連について不明な部分が残されており、フサライドの防除機構の解明にはメラニン合成阻害の確認とともに、この点を明らかにすることが必要であった。

一方、高い選択性と安全性が認められていた抗生物質系あるいは有機リン系いもち病防除剤の間で、1970年代に薬剤耐性菌の出現による防除効果の低下⁴⁻⁶⁾という問題が深刻化し、フサライドにも薬剤耐性菌問題が起りうるのかどうか注目された。こうした背景のもとに、フサライドのイネいもち病防除機構について検討するとともに、耐性菌出現の難易について手がかりを得ることを目的とし、本研究に着手した。

本論文では、イネいもち病菌侵入過程における付着器の着色化の意義、またフサライドのイネいもち病菌感染過程およびメラニン合成経路に対する作用について検討した経過を説明する。

形態観察

1. 感染過程における作用

フサライドはイネ体上でのいもち病の発病抑制に卓効を示すが、その作用はきわめて特異的である。イネいもち病菌の菌糸伸長に対する影響は培地上ではほとんど認められず、最小生育阻止濃度は100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。また、ポット試験ではイネいもち病菌接種前に散布された場合に高い効果が認められ、イネいもち病菌接種後の治療の散布においては病斑の伸展をほとんど抑制しなかった³⁾。

葉鞘接種法において、イネいもち病菌胞子は発芽後、暗緑色ないし黒色の付着器を形成し表皮細胞へ侵入したが、フサライド2~10 $\mu\text{g/ml}$ の存在下でも発芽、発芽管の伸長、付着器形成は正常に行なわれ、侵入のみが顕著に阻害された⁷⁾。こうしたイネいもち病菌に対する特異的なフサライドの作用は宿主植物が関与したものなのか、あるいはフサライド自体の抗菌性によるものなのか明らかでなかった。

2. 付着器侵入阻害

イネいもち病菌胞子は、宿主植物上と同様にセロファンフィルム上で着色した付着器を形成し、付着器侵入を起こすことが知られている⁸⁾。セロファンフィルム上に形成された付着器は、イネ葉鞘に接種した場合より付着器の形態や色調の観察が容易であった。フサライドの存

Fig. 1 Scheme of preparation for scanning electron microscopy.

在下では、付着器の形態は無処理区のものとはほとんど変わらなかったが、付着器直下に貫穿糸は形成されなかった。また付着器の細胞内顆粒の形状に薬剤の影響が認められ、フサライドは宿主の関与なしに薬効を発現するものと考えられた。しかし、植物体への付着器侵入は酵素的消化と物理的な力が関与すると考えられており、侵入阻害作用については、さらに植物体上での確認を試みることにした。

付着器底部に形成される貫穿糸の直接的観察には、超薄切片を調製し透過型電子顕微鏡により検鏡することが望まれたが、多数の付着器を観察するには適さなかった。そこで簡便な方法として、植物体上のいもち病菌付着器をレプリカ作成に使用されるトリアセチルセルロース (TAC) フィルムで物理的に引きはがし、走査型電子顕微鏡で観察することを試みた⁷⁾。胞子懸濁液を接種したイネ葉鞘を固定・脱水した後、植物体表面上に TAC フィルムを密着させ、固化を待ってはぎ取った (Fig. 1)。これにより、イネ体上の胞子、発芽管、付着器が取り除かれ、付着器の付着した跡を容易に観察することができた。

TAC 処理によって付着器を完全に取り除いた場合には、貫穿糸によって生じた直径 400 nm ほどの細孔が葉鞘表面に認められた。したがって、付着器侵入が起きているか否かは、宿主表面の細孔の有無で容易に判断できることが確認された。フサライド処理した場合、葉鞘表面には付着器の付いていた跡は明瞭に認められたが、細孔は認められなかった (Fig. 2)。したがって、フサライド

Fig. 2 Scanning electron micrographs showing the base of an appressorium of *Pyricularia oryzae* embedded in triacetylcellulose and deposits of the appressorium on rice leaf sheath.

A: Base of an appressorium embedded in TAC 20 hr after inoculation, B: Base of an appressorium treated with fthalide embedded in TAC 20 hr after inoculation, C: Leaf sheath 40 hr after inoculation, D: Leaf sheath treated with fthalide 40 hr after inoculation. Bar represents 1 μm in each figure.

はいもち病菌に直接作用し、宿主侵入の起きる前の段階で侵入能を阻害していることが明らかとなった。

一方、葉鞘から引きはがした TAC フィルム側には、付着器の一部が残った。これらの付着器は葉鞘表面に密着していた底部の一部がこわれ、内部がむき出しになっていた。侵入の開始される直前にあたる付着器では、底部から貫穿糸の形成に関連すると推察される細胞質の突起が観察された。TAC フィルム側に残ったフサライド処理区の付着器断片には、侵入を示すような変化はまったく認められなかった(Fig. 2)。このように、走査型電子顕微鏡による観察結果はセロファンフィルムでの侵入阻害観察結果とも一致しており、フサライドがイネいもち病菌の付着器形成後、付着器に直接作用して侵入能を阻害していることが裏付けられた。

メラニン合成阻害

1. メラニン合成阻害剤

イネいもち病菌の付着器侵入を特異的に阻害する薬剤としてフサライド、PCBA、トリシクラゾール、ピロキ

Fig. 3 Structure of compounds.

ロン、クロベンチアゾンなど (Fig. 3) が知られているが、これらの薬剤は *in vitro* でほとんど抗菌性を示さないことから非殺菌性病害防除剤と呼ばれていた⁹⁻¹¹⁾。

トリシクラゾールは培地上でもいもち病菌の菌叢の生育をほとんど阻害せず、菌叢および培地の色調を褐色あるいは赤色に変えることが見いだされた。トリシクラゾールの糸状菌色素合成過程に対する作用が注目され、*Verticillium dahliae*¹²⁾、*P. oryzae*¹³⁻¹⁵⁾、*Colletotrichum lagenarium*¹⁶⁾、*C. lindemuthianum*¹⁷⁾ などにおいてその影響が検討された。トリシクラゾールは pentaketide を経由したメラニン生合成を、低濃度で阻害していることが明らかとなった。イネいもち病菌で確認されたメラニン合成経路は、動物におけるインドールメラニン、あるいはカテコールメラニンとは異なり、acetate から pentaketide を経由するものであった。Pentaketide から naphthalene 骨格が形成され、還元と脱水を受けて 1,8-dihydroxynaphthalene (1,8-DHN) を経て黒色のメラニン色素に至ると考えられている (Fig. 4)^{14,16,18)}。Pentaketide を経由するメラニン合成経路には分岐した代謝経路の存在が指摘されている。Flaviolin は 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (1,3,6,8-THN) から、また 2-hydroxyjuglone (2-HJ) は 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-THN) からそれぞれ酸化により容易に生成することが知られている¹⁹⁾。トリシクラゾールの添加によって菌叢あるいは培地に生じた褐色または赤色の色素は、こうした flaviolin や 2-HJ の蓄積に起因していることが示された。一方、フサライドは培地上での菌叢の色調に

は大きな変化を与えないと考えられていたが、シヨ糖硝酸塩培地上でトリシクラゾールと同様にイネいもち病菌菌糸のメラニン色素合成を阻害することが示された。しかも、フサライド、トリシクラゾール、PCBA のメラニン合成阻害濃度は付着器侵入を阻害する濃度と一致しており²⁰⁾、その関連が注目された。さらに、各種の抗いもち剤のメラニン合成経路に及ぼす影響が明らかにされた。フサライド処理されたイネいもち病菌培養液に scytalone の顕著な蓄積が確認され、フサライドもまたメラニン生合成の阻害に関係していることが明らかとなった¹⁵⁾。

2. イネいもち病菌におけるメラニンの役割

糸状菌においてメラニンは環境のストレスからの保護に関与すると考えられていたが、久保らにより^{21,22)}ウリ類炭そ病菌における付着器のメラニン化と侵入能の関係が明らかにされた。ウリ類炭そ病菌アルビノ株およびメラニン合成過程の初期における polyketide 合成を阻害する cerulenin で処理された野生株では、無色の付着器が形成された^{21,22)}。これらの無色の付着器は付着器側部で発芽し宿主侵入能を失っていること、またメラニン中間体 scytalone の添加によって付着器の着色と侵入能が顕著に回復することから、ウリ類炭そ病菌の付着器侵入には着色化が必須であること、またメラニンは能動的役割を果たしていることが明快に示された^{16,22)}。

イネいもち病菌色素合成変異株においても、メラニン合成能の欠損により付着器が侵入能を失うことが示されていた^{14,23)}。しかし、これらの変異株ではウリ類炭そ病

Fig. 4 The melanin biosynthetic pathway in *Verticillium dahliae*, *Pyricularia oryzae* and *Colletotrichum lagenarium*.

1,8-DHN, 1,8-dihydroxynaphthalene; 2-HJ, 2-hydroxyjuglone; 1,3,6,8-THN, 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene; 1,3,8-THN, 1,3,8-trihydroxynaphthalene.

菌のような付着器の側部発芽は報告されておらず、様相を異にしている。これらの株はメラニンの中間体や代謝物を蓄積していると推察され、完全な色素合成能欠損株ではないと考えられた。したがって、メラニンによる着色の意義を理解するにはアルビノ株での確認が必要と考えられた。

イネいもち病菌 O-42 を親株とするアルビノ変異株 CP 412 の菌叢は着色せず白色を呈し、形成された分生胞子は無色であった。CP 412 は野生株と同じように付着器をよく形成したが着色能と侵入能を失っていた²⁴⁾。CP 412 と *V. dahliae* 色素合成変異株 brm-1 との対峙培養において、CP 412 は菌叢の接触部位で親株 O-42 と変わらない正常なメラニン色を形成した。*V. dahliae* brm-1 は scytalone を蓄積する²⁵⁾ことから、CP 412 は少なくとも scytalone 以降のメラニン合成経路を保持していると考えられた。CP 412 胞子懸濁液に scytalone をあらかじめ添加し、玉ネギ表皮に懸滴接種したところ、アルビノ株の付着器にも正常な着色が認められ親株と同等の頻度で付着器侵入が認められた (Table 1)。Cerulein でイネいもち病菌野生株 P-2 を処理した場合には、アルビノ株と同様に無色の付着器が形成され付着器侵入はまったく認められなかった。Scytalone 添加時には、これらの付着器の着色と侵入能は顕著に回復した (Table 2)。これにより、付着器のメラニン化がイネいもち病菌の侵入に欠かせないことが確認された²⁴⁾。

付着器のメラニン化の意義については、侵入時の浸透圧を支えるのに必要であること²⁶⁾、また細胞壁の強度、硬さを保つとともに貫入の方向性を付与していること²⁷⁾が推察されている。しかし、イネいもち病菌アルビノ株および cerulenin 処理野生株では付着器の側部発芽は観察されておらず、さらに検討が必要な点と思われる。

3. メラニン合成阻害

玉ネギ表皮に胞子懸濁液を懸滴接種し、付着器侵入を観察する系において、フサライドは scytalone によるアルビノ株 CP 412 および cerulenin 処理 P-2 株の侵入能の回復を低濃度で阻害し、メラニン合成系に作用して侵入を阻害していることが確認された (Table 1, 2)。フサライドは少なくとも scytalone 以降の代謝経路を阻害していることが明らかとなった²⁴⁾。

1,8-DHN の前駆体である vermeline を、イネいもち病菌付着器の侵入能回復試験に供した。低濃度のフサライドで処理した区に vermeline を添加すると、付着器侵入の回復が認められた。しかし、フサライド高濃度処理区では、vermeline を添加しても侵入能の回復は認められなかった。ところが接種時にフサライドとともに

Table 1 Effect of fthalide on appressorial penetration of onion epidermis by *P. oryzae* O-42 (wild type) or CP 412 (albino strain) treated with scytalone.

Strain	Scytalone ($\mu\text{g/ml}$)	Penetration percentage ^{a)}			
		Fthalide ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	0.01	0.1	1.0
O-42	0	87	84	2	0
CP 412	0	0	— ^{b)}	—	—
	20	60	1	0	0

^{a)} Penetration percentage: number of appressorial penetrations/number of appressoria observed 40 hr after inoculation $\times 100$.

^{b)} Not tested.

Table 2 Effect of fthalide on appressorial penetration of onion epidermis by cerulenin treated *P. oryzae* in the presence of scytalone.

Cerulenin ($\mu\text{g/ml}$)	Scytalone ($\mu\text{g/ml}$)	Penetration percentage ^{a)}			
		Fthalide ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	0.1	1.0	10
0	0	92	58	0	0
0	20	87	6	0	0
1.25	0	0	0	0	0
1.25	20	80	0	0	0

^{a)} Penetration percentage: number of appressorial penetrations/number of appressoria observed 40 hr after inoculation $\times 100$.

Table 3 Recovery of penetration ability by vermeline in fthalide-treated appressoria of *P. oryzae* P-2 in the presence or absence of cerulenin.

Cerulenin ($\mu\text{g/ml}$)	Vermeline ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	Penetration percentage ^{b)}			
		Fthalide ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	0.1	1.0	10
0	0	70	0	0	0
0	1.25	20	16	2	0
1.25	0	0	0	0	0
1.25	1.25	38	21	6	5

^{a)} Vermeline was added to spore suspension 4 hr after inoculation.

^{b)} Penetration percentage: number of appressorial penetrations/number of appressoria observed 40 hr after inoculation $\times 100$.

ceruleninを加えた場合には、フサライド高濃度処理区でも vermeline により低率ながら侵入能の回復が認められた (Table 3)。よって、フサライドが vermeline 以降の過程に作用している可能性は小さいと推察された²⁴⁾。

メラニン後期中間体 1,8-DHN を、イネいもち病菌の侵入能回復試験に供した。1,8-DHN を加えた場合、フサライド低濃度処理区では顕著な付着器侵入の回復が認められた。しかし、フサライド高濃度処理区では 1,8-DHN を添加しても侵入能の回復は認められなかった²⁴⁾。高濃度のフサライド存在下でも cerulenin を併用した場合には 1,8-DHN の添加によって付着器侵入が高い率で起こることが確認された (Table 4)。したがって、フサライドは scytalone から 1,8-DHN に至る代謝経路において、scytalone から 1,3,8-THN を経て vermeline に至る過程のいずれかを阻害しており、vermeline 以降メラニンにいたる反応は阻害していないことが示された。しかし、高濃度のフサライド処理区ではこのようなメラニン生合成阻害作用だけでは説明の困難な点が残されていた。

高濃度のメラニン生合成阻害剤で処理したいもち病菌は、メラニン後期中間体の 1,8-DHN や vermeline を添加しても付着器侵入能の回復が困難なことが知られていた²⁸⁾。トリシクラゾールと類似あるいは同一の作用を示すメラニン生合成阻害剤で処理したイネいもち病菌は、メラニン生合成経路に由来する細胞毒性を示すキノン化合物やフェノール性化合物を蓄積することから、こうした代謝物の蓄積が侵入阻害作用に関係しているものと推定されていた²⁹⁾。これを裏付けるように初期のメラニン生合成過程を cerulenin で阻害し中間体が蓄積しないようにし

た場合に、高濃度のフサライド処理区でも 1,8-DHN により侵入能が回復されることが示された。よって、高濃度のフサライド存在下ではメラニン生合成阻害に加え細胞毒性を有するメラニン生合成経路代謝物の蓄積が、侵入阻害に同時に関与しているとの結論を得た²⁴⁾。

4. メラニン生合成経路における作用点

さらに Wheeler の方法³⁰⁾に従い、無細胞系でフサライドの作用点を検討した。イネいもち病菌 P-2 を液体培養し、わずかに着色が始まった時期に菌糸から無細胞抽出液を調製した。NADPH の存在下に無細胞抽出液によるメラニン中間体の転換試験を行なった。生成物は抽出後薄層クロマトで展開し、各スポットの UV 吸収を測定した。Scytalone を基質とした場合には中間体として、1,3,8-THN, vermeline また 1,8-DHN が生成することが想定されたが、この系では dehydratase 活性が強かったため、vermeline は速やかに 1,8-DHN に代謝されほとんど蓄積されず、1,3,8-THN と 1,8-DHN の生成だけが検出された。フサライドの存在下では、この系の最終生成物である 1,8-DHN はほとんど認められず、中間体 1,3,8-THN が顕著に蓄積した (Table 5)。したがってフサライドは 1,3,8-THN 以降の生合成反応を阻害するものと推察された。

一方、1,3,6,8-THN を基質として加えた場合 scytalone, 1,3,8-THN, vermeline, 1,8-DHN の生成が想定されたが、scytalone と vermeline はおのおの速やかに 1,3,8-THN と 1,8-DHN に代謝され、検出されたのは 1,3,8-THN と 1,8-DHN であった。この系には 1,3,6,8-THN から scytalone, 1,3,8-THN から vermeline の二つの還元反応が関与するが、最初の還元過程に

Table 4 Recovery of penetration ability by 1,8-DHN in fthalide-treated appressoria of *P. oryzae* P-2 in the presence or absence of cerulenin.

Cerule- nin ($\mu\text{g/ml}$)	1,8- DHN ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	Penetration percentage ^{b)}			
		Fthalide ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	0.1	1.0	10
0	0	73	1	0	0
0	1.25	44	38	1	0
1.25	0	0	0	0	0
1.25	1.25	54	29	28	21

^{a)} 1,8-DHN was added to spore suspension 4 hr after inoculation.

^{b)} Penetration percentage: number of appressorial penetrations/number of appressoria observed 40 hr after inoculation $\times$ 100.

Table 5 Conversion of scytalone to 1,3,8-THN and 1,8-DHN by crude enzyme solution from *P. oryzae* P-2 or buff strain P-2 m-1.^{a, b)}

Strain and compound	($\mu\text{g/ml}$)	Products (μmol) ^{c)}	
		1,3,8- THN	1,8- DHN
P-2	0	0.20	0.25
Fthalide	1.0	0.47	0.06
Tricyclazole	1.0	0.31	0.05
P-2 m-1	0	0.23	0.03
Fthalide	1.0	0.40	0.04
Tricyclazole	1.0	0.23	0.03

^{a)} Initial concentration of scytalone: 1 mM.

^{b)} Incubation: 28°C, 120 min.

^{c)} In 5 ml of reaction mixture.

Fig. 5 Effect of fthalide and tricyclazole on the conversion of 1,3,6,8-THN to 1,3,8-THN and 1,8-DHN by using crude enzyme solution obtained from *Pyricularia oryzae* P-2.

1,8-DHN, 1,8-dihydroxynaphthalene; 1,3,6,8-THN, 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene; 1,3,8-THN, 1,3,8-trihydroxynaphthalene.

Fig. 6 Site of inhibition by fthalide on the melanin biosynthetic pathway in *Pyricularia oryzae*.

対するフサライドの影響を生成した 1,3,8-THN と 1,8-DHN の量から推定すると 40% 程度の阻害と考えられた。また、基質とした 1,3,6,8-THN から最終生成物 1,8-DHN に至る過程はフサライドにより 70~90% 阻害された、すなわち、フサライドは 1,3,6,8-THN から 1,8-DHN に至るメラニン合成経路を段階的に阻害していることが明らかとなった³¹⁾(Fig. 5)。さらに付着器の侵入能回復試験結果と合わせ、フサライドの作用点は 1,3,6,8-THN から scytalone と 1,3,8-THN から vermelone に至る二カ所の還元過程であることが明らかとなった(Fig. 6)。

また buff 変異株 P-2 m-1 は無細胞系において、メラニン合成経路の二カ所の還元反応が欠損しているかたいへん弱いことが確認された³¹⁾。P-2 m-1 の付着器侵入能は、1,8-DHN の添加で顕著な回復が認められた。フサライド存在下では 1,8-DHN による侵入能の回復が難しく、侵入率は数パーセント台に低下した。しかし、cerulenin を併用することによって 1,8-DHN の添加後 P-2 m-1 の付着器侵入能は回復され、フサライドの影響はほとんど認められなくなった(Fig. 7)。P-2 m-1 はフサライドの作用点である還元酵素活性が欠失していることから、フサライドは主代謝経路の還元酵素の阻害に加え

Fig. 7 Recovery of penetration ability of appressoria of *Pyricularia oryzae* P-2 m-1(buff strain) by 1,8-dihydroxynaphthalene in the presence or absence of fthalide.

て、側鎖経路に対しても作用しているものと推察された²²⁾。

イネいもち病菌の馴致

フサライドは培地上での抗菌性を示さないことから、耐性を示す変異株を、培地上で馴致あるいは淘汰することが困難であった。そこで耐性問題の検討には、水稻幼苗を用いた馴致を試みた。希釈したフサライド溶液を散布した箱育苗水稻にイネいもち病菌 P-2 胞子懸濁液を接種し、発病が得られる最高濃度を求めた。この濃度を中心に散布区を設け、薬剤処理区の病斑から胞子を採集し、再び接種をくり返した。発病を完全に抑制する最低濃度を指標に、フサライド散布区におけるいもち病菌の感受性の変動に注目したが、20 回の継代接種中に馴致菌の感受性の低下は認められず、フサライドの連用によっても耐性菌は出現しにくいと考えられた³²⁾。フサライドの阻害部位は二次代謝経路であること、また同一代謝経路中の二カ所の反応を阻害していること、さらに薬剤の作用に加え自家中毒的な機構が働いていることが加わり、耐性菌が出現し難いものと考えられる。

オヒシバから分離された *P. grisea* 4091-5-8 株³³⁾、あるいは、4091-5-8 株に由来する黒色変異株 BL-3³⁴⁾ は玉ネギ表皮上で *P. oryzae* P-2 株や O-42 株と同じように付着器侵入を行なった。しかし、4091-5-8 株と BL-3 株のフサライドに対する感受性は低く、高濃度のフサライド存在下でも高い率で付着器侵入が起こった。こうした感受性の違いがメラニン合成経路の薬剤感受性の差によるものか、薬剤の代謝・解毒によるものか、アルビノ株 AL-3 および cerulenin によりメラニン合成が抑制され

Table 6 Effect of fthalide on recovery of appressorial penetration ability by scytalone in *Pyricularia grisea* strain AL-3 (albino) or in strain BL-3 treated with cerulenin.

Strain	Cerule- nin ($\mu\text{g}/$ ml)	Scyta- lone (mm)	Penetration percentage ^{a)}			
			Fthalide ($\mu\text{g/ml}$)			
			0	0.1	1.0	10
AL-3	0	0	2	0	0	2
	0	0.1	52	45	31	27
BL-3	0	0	95	90	72	76
	0	0.1	88	80	74	59
	2.5	0	11	4	3	0
	2.5	0.1	86	87	76	72

a) Penetration percentage: number of appressorial penetrations/number of appressoria observed 40 hr after inoculation $\times$ 100. Each value is based on counts of 300 or more appressoria.

た BL-3 株を用いて検討した。これらの付着器における scytalone のメラニンへの転換は、フサライドに対し感受性が鈍く、BL-3 株はメラニン合成経路自体がフサライドに非感受性であると考えられ (Table 6)、無細胞系においても感受性の低さが確認された³¹⁾。

したがって、イネいもち病菌においては馴致によっても耐性獲得の傾向はまったく認められなかったが、他の糸状菌の中にはメラニン合成阻害剤に対する感受性の異なる経路が存在することが明らかとなり、酵素レベルにおける異同について興味を持たれる。

お わ り に

以上フサライドのイネいもち病防除機構について検討してきたが、フサライドもトリシクラゾールと類似あるいは同一の作用機構を示すメラニン合成阻害剤であることが鮮明となった。二次代謝産物であるメラニンの、イネいもち病菌侵入に際する能動的役割を確認するとともにフサライドは低濃度において色素合成阻害によって、また高濃度において色素合成阻害と同時に、細胞毒性を示す代謝物の蓄積も加わって付着器侵入が抑制されることを明らかにした。こうした濃度による薬剤の作用の違いは、フサライドが同一代謝経路を二カ所にわたって段階的に阻害することから、阻害程度によって蓄積する代謝物の構成が変化すること、また側鎖の代謝経路にも感受性の異なる作用点が存在することに起因していると推察された。イネいもち病菌のメラニン合成経路は、細胞

毒性の強い中間体の代謝・解毒の過程とも考えられ、新農薬のデザインの上で興味あるターゲットとなろう。また、フサライドの標的である還元酵素は糸状菌の間で感受性に差があり、この差異については解明が待たれるところである。今後、酵素学的あるいは遺伝学的に詳細な検討が必要と思われるが、本研究がその一助となれば幸いである。

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました元呉羽化学工業(株)平野喜代人博士、メリーランド大学の Sisler 教授に深く感謝の意を表します。また、貴重なご指導、ご助言を賜りました元農業環境技術研究所上杉康彦博士、理化学研究所山口 勇博士に心よりお礼を申し上げます。そして呉羽化学研究所の諸氏を始めとする共同研究者に感謝いたします。

引用文献

- 1) Graeb: *Liebigs Ann. Chem.* **238**, 330 (1887)
- 2) 青木勝道・内田栄三郎(呉羽化学): 特公昭 44-32592 (1969)
- 3) K. Nambu: *Jpn. Pestic. Inf.* **10**, 73 (1972)
- 4) 三浦春夫・伊藤 弘・木村和夫・高橋昭二: 日植病報 **39**, 239 (1973)
- 5) 片桐政子・上杉康彦・梅原吉広: 日植病報 **44**, 401 (1978)
- 6) 矢尾板恒雄・郷 直俊・青柳和雄・桜井 寿: 日植病報 **44**, 401 (1978)
- 7) 千田常明・上北忠之・平野喜代人・佐竹慶吾・青木勝道・野口達彦: 日植病報 **48**, 58 (1982)
- 8) 奥 八郎・角 博次: 日植病報 **34**, 114 (1968)
- 9) 角 博次: 農薬実験法 2-殺菌剤編, 深見順一・上杉康彦・石塚皓造・富沢長次郎編, ソフトサイエンス社, pp. 258-272, 1981
- 10) C. P. Woloshuk, P. M. Wolkow & H. D. Sisler: *Pestic. Sci.* **12**, 86 (1981)
- 11) S. Inoue, T. Uematsu & T. Kato: *J. Pesticide Sci.* **9**, 689 (1984)
- 12) M. C. Tokousbalides & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **11**, 64 (1979)
- 13) M. C. Tokousbalides & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **8**, 26 (1978)
- 14) C. P. Woloshuk, H. D. Sisler, M. C. Tokousbalides & S. R. Dutky: *Pestic. Biochem. Physiol.* **14**, 256 (1980)
- 15) I. Yamaguchi, S. Sekido & T. Misato: *J. Pesticide Sci.* **7**, 523 (1982)
- 16) Y. Kubo, K. Suzuki, I. Furusawa & M. Yamamoto: *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**, 47 (1985)
- 17) P. M. Wolokow, H. D. Sisler & E. L. Vigil: *Physiol. Plant Pathol.* **22**, 55 (1983)
- 18) R. D. Stipanovic & A. A. Bell: *J. Org. Chem.* **41**, 2468 (1976)
- 19) A. A. Bell, R. D. Stipanovic & J. E. Puhalla: *Tetrahedron* **32**, 1353 (1976)
- 20) C. P. Woloshuk & H. D. Sisler: *J. Pesticide Sci.* **7**, 161 (1982)
- 21) Y. Kubo, K. Suzuki, I. Furusawa, N. Ishida & M. Yamamoto: *Phytopathology* **72**, 498 (1982)
- 22) Y. Kubo, M. Katoh, I. Furusawa & J. Shishiyama: *Exp. Mycol.* **10**, 301 (1986)
- 23) T. Okuno, K. Matsuura & I. Furusawa: *J. Pesticide Sci.* **8**, 357 (1983)
- 24) T. Chida & H. D. Sisler: *J. Pesticide Sci.* **12**, 47 (1987)
- 25) A. A. Bell, J. E. Puhalla, W. J. Tolmsoff & R. D. Stipanovic: *Can. J. Microbiol.* **22**, 787 (1976)
- 26) R. J. Howard: UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology, 15th Ann. Meetings, *J. Cell. Biochem.* **0** (10 part C), 23 (1986)
- 27) C. P. Woloshuk, H. D. Sisler & E. L. Vigil: *Physiol. Plant Pathol.* **22**, 245 (1983)
- 28) I. Yamaguchi, S. Sekido & T. Misato: *J. Pesticide Sci.* **8**, 229 (1983)
- 29) I. Yamaguchi, S. Sekido, H. Seto & T. Misato: *J. Pesticide Sci.* **8**, 545 (1983)
- 30) M. H. Wheeler: *Exp. Mycol.* **6**, 171 (1982)
- 31) T. Chida & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **29**, 244 (1987)
- 32) K. Aoki & M. Yamada: *Jpn. Pestic. Inf.* **36**, 32 (1979)
- 33) B. Valent & F. G. Chumley: "Molecular Strategies for Crop Protection", ed. by C. J. Arntzen & C. Ryan, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 83-93, 1987
- 34) M. Bustamam & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**, 29 (1987)