解 説

殺菌剤の薬理学的研究技法

黄 耿 堂, 山 口 勇

理化学研究所微生物薬理研究室

(昭和54年7月4日受理)

Advanced Methods for Toxicological Research on Agricultural Fungicide

Keido KO and Isamu YAMAGUCHI

The Institute of Physical and Chemical Research,

Wako, Saitama 351, Japan

はじめに

殺菌剤の薬理研究は時代とともに移り変わり、その技法も新しく導入され、改良されてきた。

戦前のボルドー液および石灰硫黄合剤の時代には形態学的観察をおもな技法として研究が進められた。戦後、有機化学の進歩に伴い、有機水銀剤をはじめ数種の重金属を含む有機合成剤の開発が盛んな時代には、開発された薬剤のほとんどの作用中心元素は含有する重金属にあると思われ、エネルギー代謝系に及ぼす影響が注目された。したがって、細胞内の解糖系、TCA 回路、電子伝達系などを調べる一連の技法が盛んに行なわれた。その後、1960年頃から、農業用抗生物質が登場し、呼吸系に作用する薬剤が少なくなり、研究者は生体成分の生合成に対する薬剤の影響に目を向けた。このように、農業用殺菌剤の薬理研究は開発された新しい薬剤に応じて進んできている。

しかしながら、これらの技法のほとんどは生化学および医薬の分野での毒物学の研究技法を模倣し、その技法開発に依存してきた。たとえば、エネルギー代謝系の阻害剤や蛋白合成系の阻害剤などの調べ方は単に農業用殺菌剤を阻害剤として用いるか、あるいは異なった病原菌を材料にして、同じ反応系で実験を進めてきただけである。最近になって、農業用抗生物質ポリオキシンの誕生で、糸状菌特有の細胞壁合成阻害の実験系が試みられてきてから、農業独自の技法がわずかながら感じられるようになった。

今までの薬理研究を振り返って見れば、その研究技法は単純な試験管内の実験系で細胞内の代謝に及ぼす影響と抗菌性を結びつけるだけのもので、生体上での防除薬剤の機構とを結びつけることができるかどうかははなはだ疑問である。その上、これからの生化学的技法の共通する条件として、薬剤は必ず *in vitro* でなんらかの形で抗菌性を示すことが研究を進める上での大前提とされている。

しかるに、近年新しく開発された殺菌剤中には、培地上で抗菌力がなく、植物体上での浸透移行性が高く、生体上で著しく発病を抑制するものが圧倒的に多く見つかった。これら薬剤の作用機構について、一部の報告では、ファイトアレキシン誘発説が出されているが、この問題の解決は薬理研究当面の重要課題の一つとして考えられる。これらの研究課題を進める上で、新しい農業独自の新技法が必然的に考案されなければならない。そこで、筆者らは従来の技法を紹介し、合わせて今後これらの新しい殺菌剤を研究するに当たり、考えうる技法について触れてみたいと思う。

I. 殺菌剤の薬理研究における生化学的技法

殺菌剤の薬理学的研究を進めるに際し、物理化学的性質はもちろんのこと生物学的基礎知見をできる限り詳しく調べる必要がある。その最も重要な点は次のとおりである。

- ① できうる限り詳細な抗菌スペクトルを調べること
供試菌は病原菌、非病原菌を問わず、とくに生化学的

に基礎研究の進んでいる菌種は必ず入れること。さらに、検定培地は1種類だけでなく、天然、半合成、合成などの培地を合わせて検討されるべきである。たとえば、イネいもち病防除薬剤であるオリゼメートは通常のジャガイモ寒天培地では抗菌性を示さないが、ツァベック寒天培地のような合成培地上では明らかに抗菌性を示す例もある。次に、培地のpHを数段階に分けて検定することも重要で、たとえば、カスガマイシンはpH5の培地ではじめて抗菌力を示すなどの例もある。

② 植物病理学的基礎見地をできうる限り詳細に検討する

抗植物ウイルス性物質については省略するが、カビの場合、胞子の発芽、発芽間の伸長、附着器の形成、侵入菌糸の植物体内への侵入、組織内での菌糸の生育状況、さらに、組織中から、分生子梗の形成、胞子形成、胞子の飛散、形成された胞子の病原性などの諸点について、薬剤による作用を調べ、各段階における形態学的変化を詳細に観察する。もちろん薬剤と菌の濃度関係についても重要な事項である。細菌の場合には各種培養条件下で、その増殖を薬剤がどのように、どの程度阻害するかを調べる。とくに、増殖を調べる際には、阻止円法や寒天稀釈法だけでなく、振盪培養した菌体懸濁液を比濁法で調べる必要がある。

③ 実験系の選択について

多くの病原菌の代謝およびその他の生化学的知見については基礎的に研究が行なわれていない上に、実験系の確立されたものは少ない。したがって、生化学的研究を進めるには、生化学的に実験系が確立されたものを選ぶではじめたほうが種々な面で都合がよく、近道と思われる。たとえば、細菌では大腸菌 (*E. coli*)、糸状菌ではアカパンカビ (*Neurospora crassa*) が望ましい。しかしながら、最終的な結論は該当病原菌を用いて立証すべきである。もちろん、薬剤によっては、選択性などの問題で、上記のような菌種を用いることのできない場合もある。

以上述べた3点のほかに、多数注意すべき点があるが、これは本文中で必要に応じて述べたいと思う。

農薬用殺菌剤を大きく分けると、エネルギー代謝系阻害剤、蛋白合成阻害剤、核酸合成阻害剤、細胞壁合成阻害剤および脂質合成阻害剤になる。これらの阻害剤についてのおおの代表例をあげて説明したい。

1) エネルギー代謝系阻害剤

前述のとおり、20年前の殺菌剤は水銀、砒素、錫、銅など重金属を含む有機化合物が大半を占めていた。これらは多くの脱水素酵素を含むSH酵素を阻害し、その作用

はシステイン、グルタチオンなどSH化合物によって拮抗されることが特徴とされている。その後、アンチマイシンA (アンチピリキュリン)、セロサイジン、フェナジン、カルボキシンなどの作用機構が詳しく研究されている。生化学におけるエネルギー代謝系の研究は20年前には盛んに行なわれ、多くの技術に関する解説書、総説書が出版され、これらの成書を参照されたい。主たる代謝経路について、上記の薬剤の実験例、TCA回路にセロサイジン¹⁾、電子伝達系にアンチマイシンA^{2,3)}、カルボキシン⁴⁾、Uncouplerにフェナジン⁵⁾、オリゴマイシン⁶⁾などの報告をモデルにして行なうと便利である。

2) 蛋白合成阻害剤

蛋白合成系に作用する化合物の研究は、1950年の後半から盛んになり、多くの抗生物質は蛋白合成阻害剤として知られている。数多くの研究報告の大半は大腸菌を用い、無細胞系はNirenberg (1961) の実験系に準じて行なわれている⁷⁾。

蛋白合成系の反応系で必要因子として

i) 蛋白合成の場でありリボゾーム: 一般には、 $15,000 \times g$ 冷却遠心での上澄から、 $105,000 \times g$ の沈澱区分を取って用いている。

ii) *m* RNA: 一般に、合成された polynucleotide あるいはファージ、ウイルスなどのRNAを用いる。

iii) アミノアシル RNA: 一般に、超遠心 $105,000 \times g$ の上澄に存在する。

iv) エネルギー生産系: たとえば、phosphoenolpyruvate に pyruvate kinase を加える。

v) Mg^{++} : 適量存在しないと、ポリゾームの形成、 $70S$ リボゾーム $\xrightleftharpoons[Mg^{++} 10^{-4} M]{Mg^{++} 10^2 M}$ $50S$ サブユニット + $30S$ サブユニットの調節が悪くなる。

vi) K^+ あるいは NH_4^+ 。

vii) Initiators である F_1 , F_2 , F_3 , Elongation factors Tu , Ts , G , 解離因子 R_1 , R_2 など。

viii) その他、 K^+ イオンあるいは NH_4^+ イオン、メルカプトエタノール、などがあげられる。

しかしながら、蛋白合成系をはじめられる研究者には、上記の必要因子を念頭に入れて、完全菌体から各段階の無細胞系でアミノ酸の蛋白分画への取りこみ実験を勧めたい。一般に、無細胞系としては、菌体懸濁液を超音波、フレンチプレス、海砂などで細胞をできうる限り、リボゾームに損傷を与えないように破壊し、低速遠心で未破壊細胞や細胞破片を除去し、超遠心 $30,000 \times g$ 30分間のの上澄を $S 30$ 区分として実験に供している。詳しいことはNirenberg, M. W. (1963) の実験方法を参照された

い。なお、蛋白合成の実験で最も重要な過程は、アミノアシル *t* RNA のリボゾームへの結合、ペプチドの転移反応、転位反応および終了反応である。

i) アミノアシル *t* RNA のリボゾームへの結合:

GTP と Tu 因子の結合体はニトロセルローズ・フィルターに吸着するが、この結合体にアミノアシル *t* RNA を加えてできた複合体はフィルターを通過するようになり、この結合反応は容易に測定できる⁹⁾。

ii) ペプチド転移反応: リボゾームの Donor site に結合しているペプチジル *t* RNA と Acceptor site に結合しているアミノアシル *t* RNA がペプチド結合する反応で、ピュロマイシンを作用させることによって、ピュロマイシンとペプチジル *t* RNA が反応し、ペプチジルピュロマイシンを生じ、リボゾームから遊離する。この反応をピュロマイシン反応と称し、ペプチド転移反応の測定に用いられている⁹⁾。

iii) ペプチド転位反応: この反応はペプチジル *t* RNA がリボゾームの Acceptor site から Donor site に転位する反応で、*m* RNA の送りがあり、新しいコードンがA位に展開する。この反応はピュロマイシン反応の応用で、ペプチジル *t* RNA が Acceptor site から Donor site に転移した分だけピュロマイシンとの反応性が増えることによって転位反応を測定する方法である。ほかに、トリペプチド以上のペプチド合成を段階的に測定する方法もある¹⁰⁾。

iv) 蛋白合成終了反応の測定法: 蛋白合成が進行している際に、Acceptor site に *m* RNA の UAA, UAG などナンセンスコードンが現われると蛋白合成が終了し、ペプチドがリボゾームから離脱する。この反応の測定には、Capecchi の方法¹¹⁾ と Caskey の方法¹²⁾ が用いられている。前者はやや複雑であるが、正確性が高い。

前述のとおり、蛋白合成系には多くの因子が関与している。たとえば、開始因子^{13,14)}、伸長因子¹⁵⁾、解離因子¹⁶⁾ などがある。これらはいずれも生体から抽出精製して反応系に加えて実験が行なわれている。それらの取り方についてはおのおの報告を参照されたい。

糸状菌をはじめ各種真菌類を用いた実験系は少ない。医薬関係では *Candida* 属菌、農業関係では *Pyricularia oryzae*¹⁶⁾、*Pellicularia sasakii*¹⁷⁾、*Sclerotium bataticola*¹⁸⁾ を用いた実験例があるが、いずれも粗汁液を用いて、上記の実験系に準じて行なっている。しかしながら、真菌を用いて蛋白合成の実験を行なう場合、下記の点について、とくに注意すべきである。

① 供試菌体は孢子懸濁液を 24~48 時間均一に発芽生育したものをを用いる。

② 細胞破壊には通常フレンチプレスを用いるが、加圧時にはできうる限り低い圧力で小刻みに行ない、リボゾームの損傷を少なくする。

③ 用いる緩衝液は通常トリス塩酸 10^{-2} M 緩衝液であり、細胞破壊時には pH が若干低下するので、微アルカリ性にする。Mg⁺⁺ イオンは 10^{-2} モルを用いる。

その他、細かい操作は報文を参照されたい。

なお、高等植物の実験系については省略させていただきたい。

3) 細胞壁合成阻害剤

細菌の細胞壁は主として、多糖体ペプチドグリカンからなっていて、その構造および生合成の研究はペニシリンの作用機構の研究に伴って著しく進歩し、その報告および総説はかなりの数になる。本文では細菌の細胞壁合成阻害剤についての研究技法を割愛し、糸状菌とくにポリオキシシンについて述べたい。

農業用抗生物質の作用点として、糸状菌の細胞壁中のキチン合成を特異的に阻害することを見つけた最初のヒントは光学顕微鏡下において、ポリオキシシン処理菌体の菌糸先端が異常に膨潤 (swelling) することからである¹⁹⁾。糸状菌は一部の種類を除いて、細胞壁にキチンを主成分としている。キチンはグルコサミンのポリマーで、グリコサミンのラベル体を用いて取りこみ実験を行なえば、普通の条件下で容易に細胞内に取りこまれる。佐々木ら (1968) によれば、50% エタノール 0°C で反応を停止した後、1N KOH および 1N HCl で洗浄した塩酸水溶液不溶区分を 2N HCl で 6 時間加水分解した可溶区分にポリオキシシンの影響が少なく、その不溶区分をさらに 6N HCl で 6 時間加水分解した可溶区分に著しい影響が認められた。このことから、実験を進めるに当たって、各段階における影響の検討が必要である²⁰⁾。次に研究で必要な過程として、無細胞系あるいは酵素系を用いて証明することは必然的である。そこで、遠藤ら (1969) は Glaser *et al.* (1957) の方法に準じて、*Neurospora crassa* からキチンシンセターゼを調整し、ポリオキシシン D の作用点を立証した²¹⁾。同様の方法で太田ら (1970) はイネいもち病原体から同様の酵素を得ることができた²²⁾。これらの実験系を用い、耐性菌機構の解明など詳しく行なわれてきた。

4) ステロール生合成阻害剤

これまで農業用殺菌剤が脂質合成、とくにステロール系物質の生合成を阻害することはあまり研究されていなかったが、近年、麦、果樹、蔬菜類のうどんこ病に特異的に防除効果を示すいくつかの物質がエルゴステロールの生合成を阻害することが明らかにされてきた²³⁻³¹⁾。今

後も同様の作用機構を有する殺菌剤が開発される可能性も高いので、ここではエルゴステロール合成阻害剤を例としてステロール生合成研究の技法について概説する。

i) 適用する微生物

ステロール生合成を阻害する薬剤は糸状菌の分生胞子の発芽よりも菌糸の伸長を抑制し、発芽管の異常分岐、膨化といった形態異状が観察されることが特徴的であるから、薬物実験に先立って病原菌の植物体上での薬剤による影響をよく検討しておくことが肝要である。うどんこ病菌は絶対寄生菌であるので、生化学的な薬理研究の材料としては使用することがむずかしいため、その物質に感受性で、しかも取り扱いがあまり困難でない他の微生物を用いることが多い。たとえばトリアリモールの作用機構の研究には主として *Ustilago maydis* (トウモロコシ黒黒穂病菌) が用いられ²³⁻²⁵⁾、トリホリンの場合には *Neurospora crassa*²⁶⁾、*Aspergillus fumigatus*²⁷⁾ が、またデンマートの場合には *Monilinia fructigena* (モニリア病菌)²⁸⁻²⁹⁾、*Saccharomyces cerevisiae*³⁰⁾ が用いられている。動物の主要なステロールがコレステロールであるのに対し、糸状菌や酵母では炭素原子を1個多くもつエルゴステロールであるが、生合成経路のうち、アセチル CoA からラノステロール生成までの過程は、両系で同じとされている^{32,33)}。糸状菌、酵母相互間でもエルゴステロール生成に至る経路が異なっている³⁴⁾ので、できれば両者を用いることが望ましい。

微生物の培養については個々の場合で異なるから割愛するが、とくに無細胞系で実験を行なおうとする場合は、活性が培養条件によって非常に影響を受けやすいので、成書³⁵⁾を参照されたい。

ii) 標識化合物の取込みと脂質の抽出

ステロールの炭素原子のうち、24位のメチルあるいはエチル基はメチオニンに由来するが他はすべて酢酸よりメバロン酸を経てその骨格が形成される。生菌の場合、メバロン酸は膜の透過性が悪いので通常¹⁴C-酢酸が用いられる。以下に加藤らの実験例²⁹⁾を紹介する。

Vogel 培地 N に酵母エキスを加えた培地で、28°C、18時間振盪した *Monilinia fructigena* の菌糸懸濁液を25 ml の三角フラスコに1.5 ml 分取し、薬液を添加して28°C、1時間前振りする(薬液溶媒のメタノールは1%を越えないようにする)。¹⁴C(U)-Sodium acetate に1.0 μ C 加えて反応を開始し、振盪培養を続ける。経時的にメタノール-クロロホルム(2:1, v/v)を加えることにより反応を停止させる。

脂質の抽出には Folch の分配法³⁶⁾、Bligh-Dyer の方法³⁷⁾とその変法³⁸⁻⁴⁰⁾など種々の方法が用いられる。Sis-

ler らは、反応を終った菌体を蒸留水で洗滌し、凍結乾燥した菌体に Folch らの方法を適用している²³⁻²⁷⁾が、他の方法では湿菌体から脂質を抽出している。以下に微生物からの総脂質の抽出例⁴⁰⁾を示す。

菌体を緩衝液で洗滌後、1溶の水に懸濁し、2.5 溶のメタノール、1.25 溶のクロロホルムをこの順序に加えてミキサーでよく攪拌する。室温に約10分間放置後、1.25 ml のクロロホルムを加えて再びはげしく振盪し、さらに1.25 ml の水を加えて攪拌する。ついで2,000~3,000 rpm、5分間の遠心を行い、下層(クロロホルム層)を注意して回収する。脂質の回収力を良くするために、さらに1 ml のクロロホルムを加えて抽出をくり返す。得られたクロロホルム画分を合わせ、35°C 以下で減圧濃縮する。

iii) 脂質の分画

総脂質から単純脂質(中性脂質:遊離脂肪酸とそのグリセリド、ステロールを含む)と複合脂質(極性脂質:磷脂質を含む)への分離は、磷脂質が冷アセトンに難溶であることを利用して行なうことができる。複合脂質は、少量のクロロホルム脂質分画を大量のアセトンを注いだ後遠心沈澱させる²⁹⁾か、フリーザー(-20°C)に一夜放置して沈澱させる²⁴⁾。上澄を濃縮乾涸した後、アセトン-エタノール(容量比1:1)に溶解して、0.5~1% ジギトニン(50% エタノール溶液)を等量加えて1~2日間冷蔵庫に保存するとステロールはジギトニン付加物として沈澱する⁴¹⁾。沈澱を遠心して集め、アセトンで洗滌した後、ジメチルスルホキシド中で付加物を分解し(沸騰湯浴上、15分)、*n*-ヘキサンで遊離したステロールを抽出する⁴²⁾。

また、より直接的にステロールを抽出する方法としてアセトンで抽出する方法⁴³⁾や、KOH-エタノールでけん化を行なってから石油エーテルで抽出する方法³⁰⁾、トリクロロ酢酸で沈澱させ、沈澱部をメジチルスルホキシドで処理した後、石油エーテルで抽出する方法⁴¹⁾などがある。

総脂質はまた、直接に薄層クロマト(tlc)上で分画することができる。Sherald と Sisler²⁷⁾は、Adsorbosil-1 シリカゲル(Applied Science Lab.)を用いてヘキサンジエチルエーテル-酢酸(容量比80:20:1)の系でtlcを行ない、磷脂質(原点)、4-デスメチルステロール、4-メチルあるいは4,4-ジメチルステロール、遊離脂肪酸、トリグリセリド、ステロールエステルを分離している。またシリカゲル60 F₂₅₄をプリコートしたtlc薄層板(Merk)を用いてヘプタン-イソプロピルエーテル-酢酸(容量比60:40:4)で展開すると、原点に複合脂質、R_f

0.11, 0.14, 0.20, 0.23, 0.50, 0.65 にそれぞれジグリセリド, 4-デスメチルステロール (エルゴステロールを含む), 4- α メチルステロール, 4,4-ジメチルステロール, トリグリセリド, ステロールエステルが分離される²⁸⁾. スポットの検出には, 25~50%硫酸を噴霧する方法⁴⁴⁾がよく用いられるが, スポットのかきとり定量用には, ヨウ素蒸気にさらしたり⁴⁵⁾, 0.02% 2',7'-ジクロロフルオレセインをスプレーする方法が用いられる.

ステロール分画の分離同定, 定量にガスクロマトグラフィが偉力を発揮することはいうまでもないが, その詳しい使用方法については成書⁴⁶⁾を参照されたい. 加藤ら²⁹⁾は, 島津 4BM 型 (FID 付) で, 1.0 m $\times$ 30 mm のカラムに Chromosorb W (60~80 メッシュ) に 3% SE 30 を吸着させたものを充てんし, カラム温度 260°C, He 流速 60 ml/分の条件で分析している. コレステロールが標品に含まれていない場合には, 内部標準として使用すると便利である.

物質の完全な同定や構造決定には, GC-MS, NMR の併用, ラジオガスクロの応用などが必要となるが, 薬理研究の初段階では必須でないと思われるので, ここでは省略する. また無細胞抽出液での実験系については, 文献^{30,41)}および成書³⁵⁾を参考にされたい.

以上各代謝系を作用する防除薬剤を実例としてあげたが, 核酸合成阻害剤についてはその例は少なく, 紙数の関係で省略させていただいた.

II. 殺菌剤の薬理研究と代謝分解

前述のとおり植物病害防除剤の多くは, 直接殺菌作用あるいは少なくとも病原菌の生育抑制力を有しているが, なかには *in vitro* では病原菌に対してほとんど阻止効果を示さないのに, 宿主植物体上 (*in vivo*) では顕著に病害を抑えるものがある. その要因にはいろいろあるが, 大別すると以下のことが考えられる.

イ) 薬剤の面から: 薬剤が, 作用点に到達するまでに, (とくに植物体中で)代謝を受け, 強い抗菌力をもつ代謝物に変換されるか, 植物体成分と共存してはじめて抗菌力を示す.

ロ) 病原菌の面から: 病原菌が感染するのに必要な過程 (たとえばセルラーゼ, ペクチナーゼ等の酵素活性あるいはその生成) を特異的に阻害するか, 病徴の発現に関与する病原体の二次代謝 (たとえば発病毒素の生成) を阻害, または毒素を不活化する.

ハ) 宿主の面から: 植物に作用して宿主抵抗性を増強する.

病害防除の効果発現に植物が関与し, 複雑な感染過程

のいずれかを特異的に阻害するような薬剤は, 直接生理作用の強いものにくらべて安全性の面から危険性が少ないといえよう. したがって今後開発される薬剤には, このようなタイプの化合物が増えることが予想されるが, それらの薬理機構は, これまで他の薬剤に用いられてきた技法をそのまま適用しただけでは解明されないであろう. すなわち単に生化学的な方法のみならず, 代謝分解や植物病理学的な研究とのコンビネーションが必須となると思われる. ここではこれまで開発実用化されている病害防除剤には, このような見方に立って十分に薬理機構が解明された例もほとんどないことから, 関連した研究の例を概説して, 将来の研究の参考に供することにする.

1) ベノミルとチオファネートメチル

代表的なベンズイミダゾール系殺菌剤であるベノミルは, 植物体内に速やかに浸透して強い抗菌力を示す⁴⁷⁻⁴⁹⁾. ベノミルはそのものが広い抗菌スペクトルを有しているが, 植物体内では効率良く殺菌性のある安定な代謝物 MBC (メチル-2-ベンズイミダゾールカーバメート: カルベンダジン) に変換され, 植物体中で実際に移行しているのは大部分 MBC で殺菌作用にも大きく寄与していると考えられている^{50,51)}. チオファネートメチルは, いもち, 炭疽, 紋枯病に *in vivo* で有効で *in vitro* では効果を示さない⁵²⁾が, それはベノミルと同様に宿主体内で MBC に変換される^{53,54)}ためである. MBC は微小管蛋白質と結合することにより紡錘体の形成を阻害して, 有糸核分裂を妨げる⁵⁵⁻⁵⁷⁾. しかしベノミルとチオファネートメチルは, 比較的高濃度では, MBC による有糸核分裂阻害作用のほかに, MBC にはあまりみられない呼吸阻害もあわせて発現する^{56,58)}. このことは, 種々の代謝反応が必ずしもすべて解毒反応でないばかりか, 活性化でありうることに, 直接殺菌力の強い薬剤といえども, とくに植物体中で速やかに代謝されるような場合には, 実際にはその代謝物が病害防除剤として作用している可能性のあることを暗示している. したがって直接殺菌力の強い薬剤に対して *in vitro* で得られた作用機作が副次的な効果を調べたものに過ぎない場合もありえるわけである.

2) ペンタロールベンジナルコール (PCBA)

水銀剤に代わる抗いもち剤として開発された PCBA は, 堆肥中で生成する代謝物⁵⁹⁾ (2,3,5,6-テトラクロル安息香酸, 2,3,6-トリクロル安息香酸等) のウリ類に対する強い薬害のためにその後の使用はされなかったが, いもち病菌に対してほとんど抗菌力を示さず, 侵入菌糸がイネ体内に侵入する過程を特異的に阻害する⁶⁰⁾という

点で作用機構の面から興味深い化合物である。奥と角⁶¹⁾は、その機構を解析するためにセロファン穿孔法を考案し、PCBAが宿主を介した2次元的作用ではなく、直接いもち菌に作用して病原性(侵入力)を失わせしめることを明らかにした。しかしなぜ病原性が失われるかについてその後の追及は十分行なわれていない。

3) オリゼメート

オリゼメート(プロベナゾール)もいもち病防除薬剤であるが、抗菌力はいち強くないにもかかわらず、葉鞘検定を行なうと低濃度(10 ppm)で菌のイネ体内への侵入を阻止した⁶²⁾。³⁵Sで放射能標識したオリゼメートを根部処理すると、放射能は上方移行して葉部に集積し、オリゼメートは代謝されてサッカリン、N-D-グルコピラノシルサッカリンを生成した⁶³⁾。これらの代謝物が菌の侵入阻止に作用していると考えられるが、その機構の詳細はやはり不明である。

4) イソプロチオラン

イソプロチオランは、いもち菌の菌糸の生育も阻害するが(形態異状)、他の過程にくらべて侵入および侵入菌糸の生育を強く阻害した⁶⁴⁾。この実験では、染色を用いたセロファン穿孔法が用いられている。侵入部位は、おそらく酵素によるセロファンの変性で、顕微鏡下染色されずに halo を形成する⁶⁴⁾。

5) トリサイクラゾール

トリサイクラゾール(EL 291)もイネいもち病の防除に顕著な効果を示すが、*in vitro*での活性はきわめて弱い⁶⁵⁾。Tokousbalides と Sisler⁶⁶⁾は、いもち菌の生産する毒素 pyriculol の生成を調べたが、何ら阻害は認められず、メラニン色素の生成に至る他のポリケタイド代謝が著しく阻害されることを見いだした。彼らはこのポリケタイド代謝が病原性に関与していると推定しているが、薬理機構の十分な解明にはまだ至っていない。

以上述べたほかに宿主植物の抵抗性増強と病原性の不活化については成書⁶⁷⁾に詳しいので参照されたい。

おわりに

以上農薬として特色をもった殺菌剤についての研究技法を重点に紹介したが、実用化されている農業用殺菌剤に限っていえることは同一作用点をもつ異なった薬剤のないことである。したがって、今後、薬理研究を進めるに当たって、上述の技法で大筋の作用性は求められても、細かい作用点は研究の進行過程における各段階の細かい現象を見逃がすことなく、創意工夫を活かして行なうことが肝要である。まして、最近の病害防除薬剤の多くは生体上に散布してはじめて薬剤効果を示すことから、植

物体を用いた薬剤、病原菌および宿主三者を用いた総合実験系で研究を進めなければならない。この点から考え、薬理研究は新しい転換期を迎え、われわれ関係研究者の研究意欲を一層奮起させるものである。

引用文献

- 1) 沖本陽一郎・見里朝正: 日植病報 **28**, 250 (1963)
- 2) V. R. Potter & A. E. Reif: *J. Biol. Chem.* **194**, 287 (1952)
- 3) 原田雄二郎・熊部 潔・香川恒雄・佐藤庸夫: 日植病報 **24**, 255 (1959)
- 4) D. E. Manthre: *Phytopathology* **60**, 671 (1970)
- 5) 関沢泰治: 日植病学会病理化学談話会 pp. 79~98, 1969
- 6) H. A. Lardy, J. L. Connelly & D. Johnson: *Biochemistry* **3**, 1961 (1964)
- 7) M. W. Nirenberg: *Methods of Enzymology* **6**, 17 (1963)
- 8) J. M. Ravel, R. L. Shorey & N. Shive: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 68 (1967)
- 9) M. Hierowski: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **53**, 594 (1965)
- 10) A. L. Haenni & J. Lucas-Lenard: *ibid.* **61**, 1363 (1968)
- 11) M. R. Cappecci: *ibid.* **58**, 114 (1967)
- 12) C. T. Caskey, R. Tompkins, E. Scolmick, T. Caryk & M. Nirenberg: *Science* **162**, 135 (1968)
- 13) D. A. Shafritz, D. G. Laycock & W. F. Anderson: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 496 (1971)
- 14) D. A. Shafritz & W. F. Anderson: *J. Biol. Chem.* **245**, 5553 (1970)
- 15) D. A. Shafritz & W. F. Anderson: *Nature*, **227**, 918 (1970)
- 16) K. T. Huang, T. Misato & H. Asuyama: *J. Antibiotics, Ser. A* **17**, 65 (1964)
- 17) K. T. Huang, T. Misato & H. Asuyama: *ibid.* **17**, 71 (1964)
- 18) T. J. O'brig, Jana Cerna & D. Gottlieb: *Phytopathol.* **59**, 187 (1969)
- 19) 江口 潤・赤柴健夫・佐々木茂樹・上山啓夫・鈴木三郎: 日植病報 **32**, 99 (1966)
- 20) 佐々木茂樹・太田農夫也・山口 勇・黒田 節・見里朝正: 農化 **42**, 633 (1968)
- 21) A. Endo, K. Kakiki & T. Misato: *J. Bacteriol.* **104**, 189 (1970)
- 22) N. Ohta, K. Kakiki & T. Misato: *Agric. Biol. Chem.* **34**, 1224 (1968)
- 23) N. N. Ragsdale & H. D. Sisler: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **46**, 2048 (1972)
- 24) N. N. Ragsdale & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 20 (1973)
- 25) N. N. Ragsdale: *Biochem. Biophys. Acta* **380**, 81 (1975)
- 26) J. L. Sherald and, N. N. Ragsdale & H. D. Sisler:

- Pestic. Sci.* **4**, 719 (1973)
- 27) J. L. Sherald and H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**, 477 (1975)
- 28) T. Kato, S. Tanaka, M. Ueda & Y. Kawase: *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2377 (1974)
- 29) T. Kato, S. Tanaka, M. Ueda & Y. Kawase: *ibid.* **39**, 169 (1975)
- 30) T. Kato & Y. Kawase: *ibid.* **40**, 2379 (1976)
- 31) P. Leroux & M. Gredt: *Phytopath. Z.* **86**, 276 (1976)
- 32) G. Popják: "Proceeding of the International Congress of Biochemistry", ed. by G. Popják, Pergamon Press, Oxford, Vol. 7, p. 207, 1963.
- 33) H. Rudney: *ibid.* Vol. 7, p. 254, 1963
- 34) 加藤寿郎: "農業" (山本 出, 深見順一編) ソフトサイエンス社, p. 191 (1979)
- 35) 香月裕彦: "生化学実験講座 9" (日本生化学会編) 東京化学同人, p. 142 (1975)
- 36) J. Folch, M. Lees & G. H. Sloane-Stanley: *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957)
- 37) E. G. Bligh & W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959)
- 38) K. H. Yung & J. B. Mudd: *Plant Physiol.* **41**, 506 (1966)
- 39) M. Kates: "Techniques of Lipidology", North Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 351, 1972
- 40) 赤松 稔: 化学と生物 **10**, 672 (1972)
- 41) D. A. Monner & L. W. Parks: *Anal. Biochem.* **25**, 61 (1968)
- 42) C. H. Issidorides, I. Kitagawa & E. Mosettig: *J. Org. Chem.* **27**, 4693 (1962)
- 43) 竹内 茂・河村 悟・永井 純・香月裕彦: 生化学 **46**, 694 (1974)
- 44) O. S. Privett & M. L. Blank: *J. Am. Oil Chem. Soc.* **39**, 520 (1962)
- 45) P. P. A. Sims & J. A. G. Larose: *ibid.* **39**, 232 (1962)
- 46) 植田伸夫: "生化学実験講座 3" (日本生化学会編) 東京化学同人, p. 61 (1975)
- 47) G. P. Clemons & H. D. Sisler: *Phytopathology* **59**, 705 (1969)
- 48) L. V. Edgington, K. L. Khew & G. L. Barron: *ibid.* **61**, 421 (1971)
- 49) G. J. Bollen: *Neth. J. Plant Pathol.* **78**, 55 (1972)
- 50) C. A. Peterson & L. V. Edgington: *Phytopathology* **61**, 91 (1971)
- 51) G. P. Clemons & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **1**, 32 (1971)
- 52) T. Noguchi, K. Ohmura & S. Kosaka: "Herbicides, Fungicides, Formulation Chemistry", ed. by A. S. Tahori, p. 263, 1972
- 53) Y. Soeda, S. Kosaka & T. Noguchi: *Agric. Biol. Chem.* **36**, 931 (1972)
- 54) A. Fuchs, D. L. Fernandez & F. W. De Vries: *Neth. J. Plant Pathol.* **80**, 7 (1974)
- 55) L. C. Davidse: "Microtubules and Microtubule Inhibitors", ed. by M. Borgers & M. deBrabander, North-Holland publishing Co., Amsterdam, p. 483, 1975
- 56) R. S. Hammerschlag & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 42 (1973)
- 57) D. V. Richmond & A. Phillips: *ibid.* **5**, 367 (1975)
- 58) J. R. Decallonne, M. Genot & J. A. Meyer: *Pestic. Sci.* **6**, 113 (1975)
- 59) M. Ishida: "Environmental Toxicology of Pesticides", ed. by F. Matsumura, G. M. Boush & T. Misato, Academic Press, p. 281, 1972
- 60) 角 博次・高日幸義・近藤泰彦: 日植病報 **30**, 112 (1965)
- 61) 奥 八郎・角 博次: 日植病報 **34**, 250 (1968)
- 62) 渡辺哲郎・五十嵐 治・松本邦臣・関 誠夫・関沢泰治: 日植病報 **37**, 189 (1971)
- 63) M. Uchiyama, H. Abe, R. Sato, M. Shimura & T. Watanabe: *Agric. Biol. Chem.* **37**, 737 (1973)
- 64) F. Araki & Y. Miyagi: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **42**, 401 (1976)
- 65) J. D. Froyd, C. J. Paget, L. R. Guse, B. A. Dreikorn & J. L. Pafford: *Phytopathol.* **66**, 1135 (1976)
- 66) M. C. Tokousbalides & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **8**, 26 (1978)
- 67) 奥 八郎: "農業" (山本 出・深見順一編) ライフサイエンス社, p. 173 (1979)