[農化 第 37 卷, 第 5 号, p. 251~254, 1963]

抗いもち病性抗生物質ブラストサイジン S の 薬害作用に関する研究 (第 2 報)*

ブラストサイジン S 処理酵母細胞の RNA に関する検討

橋 本 研 介 (日本農薬株式会社研究所)

見 里 朝 正 (農林省農業技術研究所)

昭和 37 年 9 月 24 日 受 理

I. 緒 言

著者らは第 1 報⁽¹⁾においてブラストサイジン S (BcS) を薬害を生ぜしめる濃度で、イネ、トマトなどに処理した場合、薬害葉は健全葉にくらべてリボ核酸 (RNA) 並びに 5% トリクロル酢酸 (TCA) 可溶性窒素 (非蛋白質態窒素) 含量が高いことを報告した。これはまた、BcS により増殖が阻害された酵母 (*Saccharomyces sake*) についても見られる現象である。抗生物質が細胞の RNA 含量に変化を与える現象についてはすでに多くの報告がある。すなわち、Gale ら⁽²⁾は *Staphylococcus aureus* にクロランフェニコールを蛋白合成がほぼ完全に阻害される (増殖が抑制される) 濃度で与えた場合、核酸合成はむしろ促進されることを報告しているが、この現象が大腸菌についても認められることを Hahn ら⁽³⁾ も確かめている。また Takeda ら⁽⁴⁾ はピュロマイシンも *Pseudomonas fluorescens* の蛋白合成を阻害する濃度で RNA の合成を阻害しないことを指摘している。さらに Kerridge⁽⁵⁾ もアクチジオンについて *Saccharomyces carlsbergensis* を用いて同様な事実を認めている。これらの報告はすべて抗生物質により細胞の RNA 含量が異常に増加する例を示すものである。一方、増加した RNA に関する検討もまた行なわれている。すなわち、Hahn らは前掲の大腸菌の RNA はクロランフェニコールを含まない培地に戻した際は一旦細胞外に分泌され、その後再び細胞内に取入れられて RNA に合成されるが、この期間細胞の増殖は起らないとのべている。それに反して Takeda らのピュロマイシン処理の RNA は、新培地に戻した際も休止細胞下においても全く安定である。著者らはこれらの諸報告を参考にして、BcS 処理下に蓄積した RNA に関して検討を行なった。本報では取扱いが簡単で、かつ RNA 含量の高い前述の酵母 (*Sacch. sake*) を使用した。

II. 実 験 の 部

1) BcS 処理 RNA の安定性

A) 実験方法

- a) 供試菌株、供試 BcS、培養方法、菌数の決定などはすべて前報に準じて行なった。
- b) 再培養：培養基成分をすべて 2 倍濃度含む培地を調製し、別に洗滌細胞を適当な濃度に無菌水に懸濁したものを作って、それぞれの 50 ml ずつを滅菌坂口フラスコ中で混合し、30° で振とうした。
- c) 休止細胞：洗滌細胞の無菌水懸濁液と pH 6.0, 1/7.5 M 磷酸緩衝液とを 50 ml ずつ滅菌坂口フラスコ中で混合し、30° で振とうした。
- d) 細胞の RNA 含量の測定：振とう培養液を一定量ずつ小遠沈管にとり、細胞を沈澱させ、蒸溜水で 2 度洗滌後 Ogur ら⁽⁶⁾の方法を参考にして第 1 図のような操作で抽出した。微生物細胞から直接この方法によって RNA が定量的に抽出されるかどうかについては Kuroiwa ら⁽⁷⁾ が詳細に検討し、酵母では困難さが伴うことを指摘している。

そこで著者らも、使用している清酒酵母について検討を加え、過塩素酸を 1 N から 1.5 N に上げることによってほぼ目的を達することができた。第 2 図がその結果である。時にはデオキシリボ核酸 (DNA) 区分の吸光比が若干高いこともあったが、標準曲線で換算した RNA と DNA との比は大体 Kuroiwa らの値に近く、DNA が

* Studies on the Phytotoxic Action of an Antiblastic Antibiotic, Blastocidin S. Part II. Observation on the Ribonucleic Acid in Yeast Cells Treated with Blastocidin S.

By Kensuke HASHIMOTO and Tomomasa MISATO* (Research Laboratory of Nihon Noyaku Co., Ltd.; *National Institute of Agricultural Science)

第1図 洗滌酵母細胞より核酸区分の抽出法

* 5° で抽出した。

PCA: 過塩素酸

第3図 BcS 処理細胞の性質 (その1)

BcS を含みぬ新培地にもどしたときの増殖

●—● 対照細胞 ○—○ BcS 処理細胞

第2図 酵母洗滌細胞より核酸区分の抽出法の検討

分析細胞数比: — 対照 1.00, BcS 処理 0.59

処 理	1.5N PCA* 約20時間 (RNA 区分)	0.5N PCA 70°, 20分 (DNA 区分)
オルシン反応	鮮緑色	薄茶色
ディフェニル アミン反応	無 色	藍 色
吸光比対照**	1.00	0.098
BcS 処理	1.00	0.057

* 5° で抽出した。

** RNA 並びに DNA 区分を同容量にした時の吸光値の比を RNA 区分を 1.00 として算出したものである。

第4図 BcS 処理細胞の性質 (その2)

BcS を含みぬ新培地にもどしたときの RNA 含量の変化

●—● 対照細胞 ○—○ BcS 処理細胞

RNA 区分に抽出される可能性は少ないものと判断した。誤差は最大限で5%内外と推定された。また、対照細胞の RNA 並びに DNA 区分の紫外外部吸収スペクトルの形と BcS 処理細胞のそれぞれ両区分の形の間には、ほとんど差が認められなかった。RNA の定量は前報にのべた紫外外部吸収法を使用した。

B) 実験結果 前報に準じて対数増殖期の初期に BcS を終末 1 p.p.m. (増殖をある程度ゆるす段階の濃度を選んだ) になるように加えて、さらに 45 時間培養を続け続けた細胞について RNA の安定性を検討した。今回は単位細胞数の RNA 含量について分析したが、この段階の細胞は対照の細胞の2倍近い RNA 含量を示した (培養の都度処理細胞の RNA 含量には若干の変動がみられるが、大体 1.5 ないし 2 倍近い値となる)。第3図は処理細胞を BcS を含みぬ新培地に移した時の細胞の増殖の状態を示す。処理細胞は対照と同様に直ちに増殖を開始した。この時の単位細胞数当り (10^9 細胞) の RNA 量を示したのが第4図である。細胞が活発な増殖を始める前に、細胞の RNA 量が増加することは広く認められているが、対照細胞は新培地に再懸濁した際に、やはり極端な RNA の増加がみられた。これに反して BcS 処理細胞は全く増加することがなかった。このことから蓄積した RNA はおそらく生育に直ちに利用できるものであろうと推察される。引き続いて処理細胞を磷酸緩衝液に懸濁振とうして、休止細胞時における RNA ならびに蛋白質態窒素の変化を見たが、いずれも第5図に

第 5 図 BcS 処理細胞の性質 (その 3)
休止細胞時 (M/15, pH 6 の磷酸緩衝液に懸濁) の RNA 並びに蛋白質 N 含量の変化

RNA {●—● 対照細胞
○—○ BcS 処理細胞
蛋白質 N {▲—▲ 対照細胞
△—△ BcS 処理細胞

第 6 図 BcS 処理細胞の性質 (その 4)
休止細胞時の細胞外液の紫外部吸収の変化並びに紫外部
吸収スペクトル

●—● 対照細胞 ○—○ BcS 処理細胞

第 1 表 細胞内液の超遠心分離後の RNA の分析結果

	対照細胞	BcS 処理細胞
マイクロゾーム区分*		
RNA	0.63	0.94
同 比	1.00	1.49
上 清 区 分*		
RNA	0.14	0.17
同 比	1.00	1.21
RNA 合 計*	0.77	1.11
同 比	1.00	1.44

* mg/mg 蛋白質 N (未分画時)

したが、著者らの検討した範囲内で BcS 処理下に清酒酵母に蓄積する RNA は、後者に属するようであった。

しかしながら酵母細胞で不安定な RNA を確認している報告はいまだなく、その点さらに検討を加える必要はあるようである。ついで細胞内液を超遠心分離し蓄積した RNA は、マイクロゾーム区分に存在することを認めた。

従って蓄積した RNA は S-RNA にはほとんど関係がないと考えられるが、正常なりボ核蛋白であるかどうかについては現在の段階では不明である。最近細川ら⁽⁸⁾はピュロマイシン処理をうけた大腸菌には正常なりボゾームより低分子な粒子 (puromycin particle) が存在することを報告しているが、BcS 処理下に蓄積する RNA もこのような形で存在する可能性は充分にある。著者らは次報においてさらに BcS 処理 RNA (リボ核蛋白) について、このような点から検討を加えた結果を報告する予定である。

またあわせて休止細胞時に分泌されるスクレオチド様物質の役割をも明らかにしたいと考えている。

示すように、処理 22 時間後まで全く変化がなかった。

したがって処理細胞の RNA は、休止時においても極めて安定なものである。これらの結果は Hahn らがクロランフェニールを使って大腸菌で得た結果と全く異なり、むしろ Takeda らがピュロマイシンで得た結果に類似している。なお休止細胞時に細胞外液の紫外部吸収値 (260 mμ) が経時的に多くなり、しかも BcS 処理細胞の方が著しかったので検討を加えた (この吸収値は RNA に換算すると細胞内の RNA の 10% 以上になる)。時間的な増加の状態並びに紫外部吸収スペクトルを第 6 図に示す。いずれも蒸留水に対する吸光度である。この物質は pH 7.0 の磷酸緩衝液中で 260 mμ 付近に極大吸収があった。細胞内の RNA あるいは蛋白質などに少しの変化もないことから、この吸収物質は細胞内に遊離のヌクレオチド、あるいは有核アミノ酸などによるものと推定されるが、紫外部吸収スペクトルの形から前者である可能性が高い。

2) 細胞抽出液の超遠心分離

A) 実験方法 1 p. p. m. 処理細胞 (植菌 5 時間後 BcS 添加、さらに 45 時間培養したもの)、ならびに対照細胞を洗滌後 0.01 M 磷酸緩衝液 pH 6.8 (0.1 M の食塩と 0.01 M の塩化マグネシウムを含む) に懸濁フレンチプレスで破碎し、細胞破片を除去したのち、超遠心分離 (日立製 40 P, 105400×g 1 時間) により、マイクロゾーム

区分と上清区分とにわけて、それぞれ常法により分析した。

B) 実験結果 第 1 表に分析結果を示す。分画前の抽出液の単位蛋白質 N 当りの RNA 量を比較すると、BcS 処理により蓄積した RNA はほとんどがマイクロゾーム区分に存在する。また上清区分の RNA にも僅かに増加がみとめられた。

III. 考 察

従来抗生物質処理下に細胞に蓄積する RNA には、抗生物質を除去した場合、不安定で直ちに崩壊するもの (クロランフェニール処理をうけた大腸菌)、あるいは安定であるもの (ピュロマイシン処理をうけた緑膿菌) などの報告があることは緒言でも述べ

IV. 要 約

BcS 処理葉害葉中に増加する RNA について検討するに先立ち, BcS 処理下で同様な現象を呈する酵母(*Sacch. sake*) の RNA について検討を加えた.

(1) BcS を培地に終末 1 p. p. m. の濃度で加えて検討した結果, 対数増殖期初期に加え添加後 45 時間に分析したものは, 細胞当りの RNA 含量は対照の 2 倍近い値を示したが, この RNA は BcS をのぞいた再培養でも休止細胞の条件下でも全く安定であり, また増殖に直ちに利用しうる状態にあった. また, BcS 処理細胞は休止細胞時に, 細胞外に分泌される紫外外部吸収物質 (低分子のヌクレオチド様物質) の量も対照細胞にくらべて多かった.

(2) 対照並びに BcS 処理細胞を破碎後, 遠心分画すると BcS 処理下に蓄積した RNA はほとんどミクロゾーム区分 (105400×g 沈澱区分) に存在した.

終りにのぞみ御指導, 御便達をいただいた農林省農業技術研究所農薬科長福永一夫博士, 日本農薬株式会社熊野義夫博士, 種々御助言をいただいた農業技術研究所生理遺伝部松中昭一博士ならびに実験に協力された岡内緑, 片桐美奈子, 小平和彦の諸君に厚く謝意を表する次第である. なお本報告の一部は, 昭和 36 年 9 月, 日本農芸化学会関東東北支部合同大会農薬シンポジウムで講演した.

(1) 橋本研介他 : 本誌, 37, 245 (1963).	(1958).
(2) E. F. Gale, J. P. Folks : <i>Biochem. J.</i> , 53, 493 (1953).	(6) M. Ogur, G. Rosen : <i>Arch. Biochem.</i> , 25, 262 (1950).
(3) F. E. Hahn et al. : <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 23, 162 (1957).	(7) Y. Kuroiwa, Y. Horie : <i>Bull. Agri. Chem. Soc. Jap.</i> , 19, 1, 35 (1955).
(4) Y. Takeda et al. : <i>J. Biochem.</i> , 48, 2, 169 (1960).	(8) 細川桂一, 野村真康 : 生化学, 34, 9, 410 (1962).
(5) D. Kerridge : <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 19, 497	