

殺菌剤グアザチンのナシ黒斑病菌に対する作用機構

誌名	日本農薬学会誌
ISSN	03851559
著者	八倉, 康二 切貫, 武代司 松中, 昭一
巻/号	9巻3号
掲載ページ	p. 425-431
発行年月	1984年8月

報 文

殺菌剤グアザチンのナシ黒斑病菌に対する作用機構*

八倉康二**, 切貫武代司, 松中昭一

神戸大学農学部

**大日本インキ化学工業株式会社バイオ技術1グループ

(昭和58年11月21日受理)

Mode of Action of the Fungicide Guazatine in *Alternaria kikuchiana*

Yasuji YAGURA,** Takeyoshi KIRINUKI and Shooichi MATSUNAKA

Faculty of Agriculture, Kobe University, Nada-ku, Kobe 657, Japan

**Agrochemicals Department, Dainippon Ink and Chemicals Inc.,
Kamisu-machi, Kashima-gun, Ibaraki 314-02, Japan

The effects of an agricultural fungicide, guazatine triacetate [1,1'-iminiodi(octamethylene)-diguandinium triacetate, BEFRAN®] on the biosynthesis of protein, DNA, RNA, cell wall and lipid, and on the respiration of cells were investigated in *Alternaria kikuchiana*. The incorporations of [U-¹⁴C]amino acid mixture, [2-¹⁴C]thymidine, [2-¹⁴C]uridine and [1-¹⁴C]D-glucosamine into protein, DNA, RNA and chitin respectively, were not significantly affected in mycelial cells of *A. kikuchiana*, by the treatment of 10 ppm guazatine triacetate, of which the concentration was ID₅₀ value for mycelial growth. The incorporation of [U-¹⁴C]D-glucose into cell wall was only moderately inhibited by 10 ppm guazatine triacetate after an incubation of 90 min. A similar result was obtained in the case of incorporation of [1-¹⁴C]sodium acetate into cell wall. On the other hand, the incorporations of [U-¹⁴C]D-glucose, [1-¹⁴C]sodium acetate and [methyl-¹⁴C]methionine into total lipid were remarkably inhibited by 10 ppm guazatine triacetate. The inhibitions of incorporation were found in the simple lipid fraction after the separative analysis of both simple and complex lipids. Oxygen uptake by the intact cells of *A. kikuchiana* was hardly inhibited by the fungicide. These data suggest that the primary antifungal action of guazatine triacetate is the inhibition of lipid biosynthesis in *A. kikuchiana*.

緒 言

グアザチンの酢酸塩 [1,1'-iminiodi(octamethylene) diguandinium triacetate, 商品名ベフラン®, Fig. 1] は *in vitro* では糸状菌に対して広範囲な抗菌スペクトルを示すが, 細菌には効果を示さない。 *In vivo* では予防効果にとくに優れ, 柑橘青かび病 (*Penicillium italicum*), 緑かび病 (*P. digitatum*), 黒腐病 (*Alternaria citri*) およびイネごま葉枯病 (*Cochliobolus myabeanus*) などの

植物病害の予防に, また治療的にもリンゴふらん病 (*Valsa mali*) などの用途が開発されつつある殺菌剤である。殺菌剤に対する耐性が問題になっている現今, グアザチンは化学構造上新しいタイプの注目すべき殺菌剤と考えられるので, その作用機構を明らかにして, 施用法の改善を図り, また他薬剤との比較を容易にしようとするものである。

著者らは, ナシ黒斑病菌 (*Alternaria kikuchiana*) を用いて, 菌体構成成分への各種標識化合物の取込みおよび菌体の酸素消費に及ぼすグアザチンの影響を調べたのでその結果を報告する。

* 本報告の概要は日本農薬学会第6回大会 (1981) において発表した。

心分離を行ないその上清をタンパク質分画とした。

^{14}C -チミジンまたは ^{14}C -ウリジンを取り込ませた菌体からの DNA または RNA の抽出は Munro と Fleck²⁾ の方法に従った。 ^{14}C -チミジンを取り込ませた菌体を冷 0.2 N-過塩素酸 (PCA) に懸濁し 10 分間放置後遠心分離する操作を 3 回繰り返した。残渣を 1 N-PCA 1 ml に懸濁し、70°C で 20 分間熱処理後遠心分離を行なった。この操作を再度繰り返して、上清を合わせて DNA 分画とした。一方、 ^{14}C -ウリジンを取り込ませた菌体は、前項同様冷 0.2 N-PCA に懸濁し、10 分間放置後遠心分離する操作を 3 回繰り返した。その残渣に 0.3 N-KOH 1 ml を加えて 37°C で 15 時間処理した。この処理液に 2.5 N-PCA 75 μl を加えて酸性にし、氷冷下で 30 分間保った後遠心分離した。残渣は 0.2 N-PCA 1 ml を用いて洗浄し、先の上清と合わせて RNA 分画とした。

^{14}C -グルコースまたは ^{14}C -グルコサミンを取り込ませた菌体を 2 ml のメタノール-クロロホルム-水 (2:1:0.8 v/v) に懸濁し室温下で 1 時間放置後遠心分離した。同じ操作を 2 度繰り返して、メタノール-クロロホルム-水抽出液を合わせて脂質分画とした。残渣は 1 N-NaOH 液 1 ml に懸濁し、100°C で 20 分間加水分解後、メンブランフィルターで濾過した残渣を細胞壁分画とした。

また、細胞壁キチンへの取込みについては、1 N-NaOH で処理した後の細胞壁分画を 2 N-HCl で 100°C 6 時間加水分解を行なった後、その残渣を洗浄し、さらに 6 N-HCl で 100°C 6 時間加水分解を行ない、遠心分離した上清をキチン分画とした³⁾。

^{14}C -酢酸および [メチル- ^{14}C]メチオニンを取り込ませた菌体からの脂質の抽出は Kates⁴⁾ の方法に従い脂質分画を得た。脂質抽出後の残渣は 1 N-NaOH 1 ml に懸濁し 100°C で 25 分間加水分解を行ない、メンブランフィルター上に濾過し洗浄したものを細胞壁分画とした。

放射能は細胞壁分画についてはトルエンシンチレーター (トルエン 1 l 中に PPO 4 g および POPOP 100 mg) を、その他分画試料は PCS シンチレーター (Amersham 社) を用い、液体シンチレーションスペクトロメーター (Rackbeta LKB Wallic 1215) により測定した。

6. 菌体の酸素消費実験

菌体の酸素消費の測定は、酸素電極 (給水化学研究所、生化学用 DO 測定装置) を用いた。すなわち、25°C で 3.5 ml 容反応液槽にリン酸緩衝液 (0.066 M, pH 6.8) を 3 ml 入れ、十分攪拌後、前述の方法によって得た菌体リン酸緩衝液懸濁液を 0.5 ml 加えた。菌体の酸素消費を記録計のチャート上で確認後、酢酸グアザチンを 10

または 100 ppm となるように 50 μl 加えて、菌体の酸素消費に及ぼす影響を調べた。なお対照薬剤として KCN (最終濃度 10^{-3} M) を用いた。

実験結果および考察

1. 菌体育成に及ぼす影響

各濃度の酢酸グアザチンを添加し、12時間振とう培養した後に、菌体の乾燥重量を測定した結果を Fig. 2 に示す。

菌体の生育に対して酢酸グアザチン 2 ppm では影響がなく、4 ppm 以降濃度の増加に従って阻害が進行し、25 ppm で生育はほぼ完全に阻害された。さらに高濃度の 50 および 100 ppm では、最初の菌体重量 (24.1 mg) に比して減少の傾向を示した。

この結果から酢酸グアザチンの *A. kikuchiana* に対する 50% 菌糸生育阻止濃度は、10.4 ppm と計算された。したがって、以後 ^{14}C -標識化合物の取込み実験においては、菌体リン酸緩衝液懸濁液に加える酢酸グアザチンの処理最終濃度を 10 ppm とした。

2. 菌体構成成分への ^{14}C -標識化合物の取込みに及ぼす影響

A. kikuchiana 菌体のタンパク質および核酸分画への ^{14}C -標識化合物の取込みに及ぼす酢酸グアザチンの影響を調べた。その結果を Fig. 3 に示す。

タンパク質、DNA および RNA 分画への各標識化合物の取込みは、対照薬剤として用いたシクロヘキシミドおよびエチジウムブロマイドによってそれぞれ 90% 以上および完全に阻害されたが、酢酸グアザチン (10 ppm) はほとんど影響がなかった。

細胞壁分画への ^{14}C -グルコースの取込みは、酢酸グア

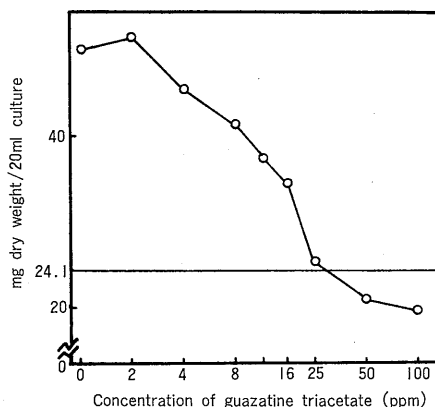


Fig. 2 Effect of guazatine triacetate on the growth of *A. kikuchiana* mycelia. The initial cell weight was 24.1 mg/20 ml.

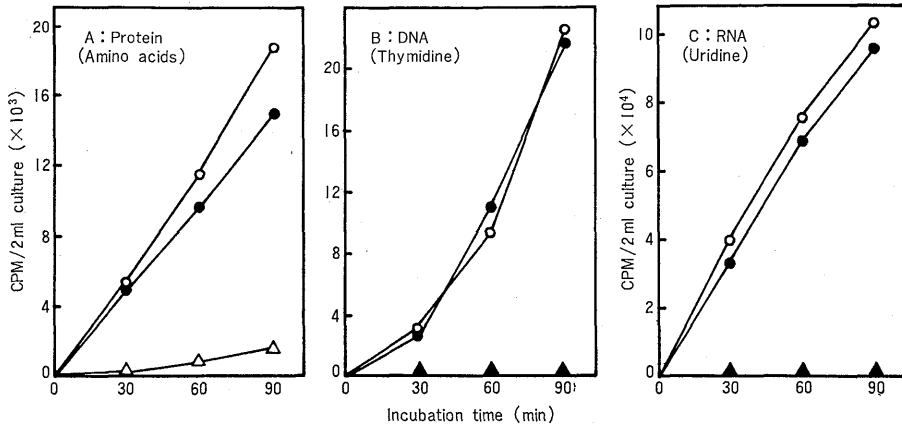


Fig. 3 Effect of guazatine triacetate on the incorporations of radioactive substrates into protein, DNA and RNA in *A. kikuchiana* mycelia.

A: [^{14}C]amino acid mixture ($0.2 \mu\text{Ci}/2 \text{ ml}$) into protein, B: [^{14}C]thymidine ($0.2 \mu\text{Ci}/2 \text{ ml}$) into DNA and C: [^{14}C]uridine ($0.2 \mu\text{Ci}/2 \text{ ml}$) into RNA, O: untreated control, ●: guazatine triacetate-treated at 10 ppm, Δ: cycloheximide at 0.5 ppm, ▲: ethidium bromide at 200 ppm.

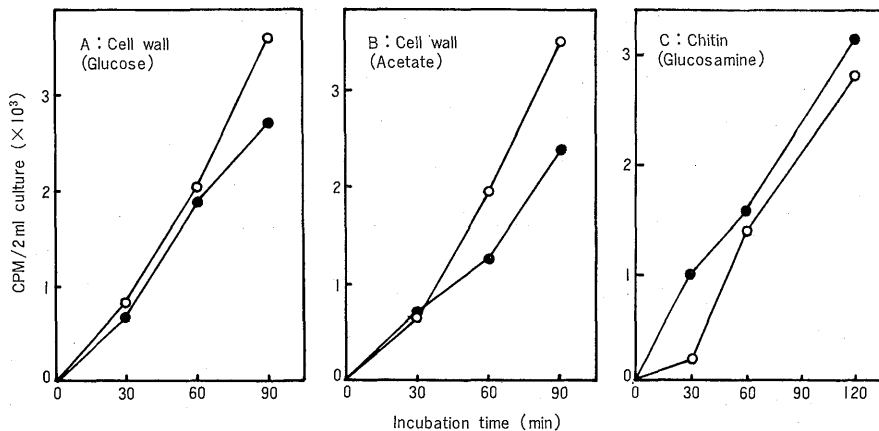


Fig. 4 Effect of guazatine triacetate on the incorporations of radioactive substrates into cell wall and chitin in *A. kikuchiana* mycelia.

A: D- ^{14}C glucose ($0.2 \mu\text{Ci}/2 \text{ ml}$), B: [^{14}C]sodium acetate ($0.4 \mu\text{Ci}/2 \text{ ml}$) into cell wall and C: [^{14}C]D-glucosamine ($0.2 \mu\text{Ci}/2 \text{ ml}$), O: untreated control, ●: guazatine triacetate-treated at 10 ppm.

ザチン処理 60 分後までは無処理と差がなかったが、処理 90 分後には多少阻害傾向が現われ、無処理に比較して 25% の阻害となった (Fig. 4A)。細胞壁分画への ^{14}C -酢酸の取込みについても同様な傾向を示し、酢酸グアザチン処理 60 および 90 分後に多少の阻害傾向が現われた (Fig. 4B)。

キチン分画への ^{14}C -グルコサミンの取込みは、酢酸グアザチンによってまったく阻害を受けず、むしろ助長的

であった (Fig. 4C)。

脂質分画への ^{14}C -グルコースの取込みは、酢酸グアザチン処理 30 分後ではまったく阻害されなかったが、以後著しい阻害傾向を現わし、処理 90 分後には無処理に比べて 61.4% の阻害であり、処理 30 分以降の取込みは 89.5% 阻害された (Fig. 5A)。一方脂質分画への ^{14}C -酢酸の取込みにおいても同様な傾向を示した。すなわち酢酸グアザチン処理 30 分後では 10% 程度しか阻害されな

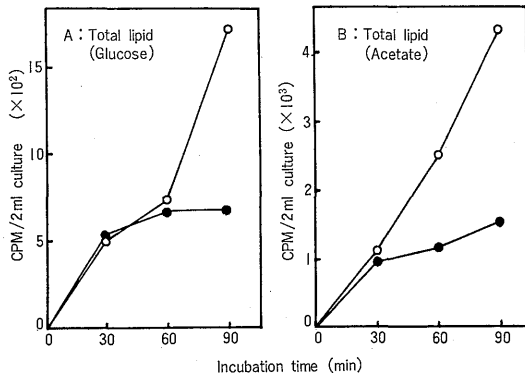


Fig. 5 Effect of guazatine triacetate on the incorporations of radioactive substrates into total lipid in *A. kikuchiana* mycelia.

A: [^{14}C]D-glucose (0.2 $\mu\text{Ci}/2\text{ ml}$) and B: [^{14}C]sodium acetate (0.4 $\mu\text{Ci}/2\text{ ml}$), O: untreated control, ●: guazatine triacetate-treated at 10 ppm.

かったが、以後無処理に比べて処理 60 分後で 51%, 90 分後では 64% 阻害であり、処理 30 分以降の取込み量は処理 60 分後で 85%, 90 分後で 82.7% 阻害された (Fig. 5B).

また、 ^{14}C -酢酸 0.25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ および酢酸グアザチン 10 ppm を含む菌体リン酸緩衝液懸濁液を 120 分間振とう培養した菌体からの脂質分画試料について、TLC プレートシリカゲル 60 F₂₄₅ (Merck), 単純脂質は *n*-ヘプタン-イソプロピルエーテル-酢酸 (60:40:4, v/v), また複合脂質はクロロホルム-メタノール-アンモニア水 (65:35:3, v/v) を用いて展開分離した。放射能部分の検出はオートラジオグラフィ法により X 線フィルムに 8 日間感光させ、感光相当部分をかき取り、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 1 ml で単純脂質の各分画では 5 回、複合脂質各分画では 6 回それぞれ抽出を行なった。各抽出液はトルエンシンチレーターを加えて放射能を測定した。

薄層クロマトグラムおよび各分画放射能 (cpm) の総和から求めた各分画の比率値が Fig. 6 および Table 1 に示される。

単純脂質では原点以外に 8 個以上、複合脂質も同様 8 個以上のスポットが確認された。酢酸グアザチン処理による各スポットの *R_f* 値は無処理に対して変化は認められないが、無処理対比で単純脂質の原点、分画 V および VII が増加の傾向を示し、分画 III および VI は減少している。複合脂質では分画 VIII を除く他は増加の値を示した。また 120 分間処理の脂質分画への ^{14}C -酢

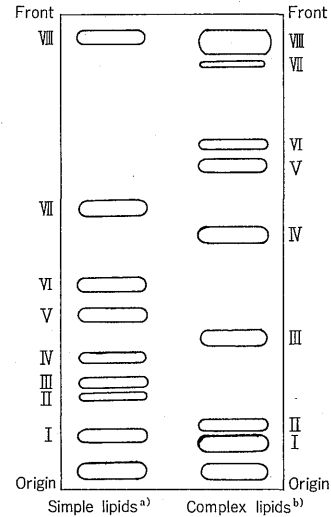


Fig. 6 Thin-layer chromatogram of ^{14}C -labeled lipids in *A. kikuchiana* mycelia.

a) Solvent system: heptane-isopropyl ether-acetic acid (60:40:4, v/v).

b) Solvent system: chloroform-methanol-ammonia water (65:35:3, v/v).

酸の取込み阻害率は 78% であった。

脂質分画への [メチル- ^{14}C]メチオニンの取込みに及ぼす酢酸グアザチン 10 ppm の影響は Table 2 に示される。

酢酸グアザチン処理において、脂質分画への [メチル- ^{14}C]メチオニンの取込みは ^{14}C -酢酸の取込み阻害と同傾向を示し、処理後 30 分で 16%, 処理後 90 分では 44% の阻害を示している。

3. 菌体の酸素消費に及ぼす影響

菌体の酸素消費に及ぼす酢酸グアザチンの影響が Fig. 7 に示される。

菌体懸濁液に対照薬剤 KCN を最終濃度 10^{-8} M となるように添加した場合、酸素消費は著しく阻害されたが、酢酸グアザチン (10 ppm) 添加ではほとんど酸素消費に影響を及ぼさなかった。酢酸グアザチン濃度を 100 ppm に高めると、酸素消費は若干減少傾向を示した。

以上 *A. kikuchiana* の各生合成系に及ぼす酢酸グアザチンの影響と、菌体の酸素消費に及ぼす影響を調べた結果、50% 菌糸生育阻止濃度である酢酸グアザチン 10 ppm 処理において脂質生合成系を除く他の生合成系ならびに酸素消費にほとんど阻害が認められなかった。しかしグルコース、酢酸およびメチオニンの脂質生合成系

Table 1 Effects of guazatine triacetate on the incorporation of ^{14}C -acetate into various lipid fractions of *A. kikuchiana*.

Fraction No.	% to extracted total radioactivity			
	Simple lipid ^{a)}		Complex lipid ^{b)}	
	Guazatine triacetate		Guazatine triacetate	
	Control	10 ppm	Control	10 ppm
Origin	25.69	46.26 (1.8) ^{c)}	1.15	3.83 (3.3)
I	4.20	3.16 (0.8)	2.15	5.98 (2.8)
II	2.29	2.25 (1.0)	1.28	4.72 (3.7)
III	51.44	28.19 (0.6)	5.40	11.74 (2.2)
IV	6.39	7.44 (1.2)	6.18	11.89 (1.9)
V	1.00	2.09 (2.1)	2.23	4.47 (2.0)
VI	1.37	0.85 (0.6)	0.74	1.98 (2.7)
VII	2.81	4.81 (1.7)	3.90	3.31 (0.9)
VIII	4.82	4.94 (1.0)	76.97	52.08 (0.7)
Total lipid	81,493	17,760 (cpm/mg dry weight mycelia)		

a) Solvent system: heptane-isopropyl ether-acetic acid (60:40:4, v/v).

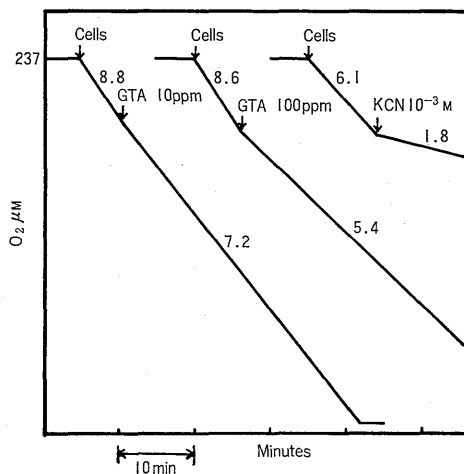
b) Solvent system: chloroform-methanol-ammonia water (65:35:3, v/v).

c) Ratio of treatment to control in parenthesis.

Table 2 Effects of guazatine triacetate on the incorporation of [methyl- ^{14}C]methionine into the total lipid fraction of *A. kikuchiana*.

Time after treatment (min)	Incorporated radioactivity (cpm/mg dry weight mycelia)		
	Control	Guazatine triacetate 10 ppm	Inhibition (%)
0	0	0	0
30	34,713	29,048	16.3
60	46,698	37,253	20.2
90	69,823	38,790	44.4
120	72,488	44,468	38.7

への取込み阻害は同一パターンを示し、薬剤処理 30 分以後顕著な阻害が認められ、120 分間の処理において酢酸では 78%、メチオニンの場合では 40% 程度阻害されている。一方、TLC においては単純脂質分画原点（複合脂質）および複合脂質分画原点から分画 VI までは無処理対比の値が 1.8~3.7 を示し、逆に単純脂質分画 III および複合脂質分画 VIII（単純脂質）は 0.6 および 0.7 値、また表示していないが脂質分画をカラムクロマトグラフィ法により分離した結果、酢酸グアザチン処理は無処理対比で単純脂質 0.6 値、複合脂質 1.6 値を示した。以上の実験結果から本薬剤の第一次作用点が単純脂質生合成系に存在することを示唆する。

Fig. 7 Effect of guazatine triacetate on oxygen uptake of *A. kikuchiana* mycelia.

Numbers along traces are rates expressed as $\mu\text{M}/\text{min}$.

GTA: Guazatine triacetate.

本薬剤の高濃度 (50, 100 ppm) において最初の菌体重量より減少しているのは二次的な作用で細胞膜に異常をきたしたためと推察される。同様の現象については他の研究者によっても報告されている^{5-7,9)}。

一方、殺菌剤でその作用点が脂質生合成系にある数種のもが報告されている⁸⁻¹²⁾。これらの多くの殺菌剤に

共通的特徴として菌体の形態的異常を引き起こすことがあげられている^{10,12,13}。酢酸グアザチンにおける菌体の形態異常については今後の研究課題としたい。

要 約

グアザチン酢酸塩の *A. kikuchiana* におけるタンパク質, DNA, RNA, 細胞壁, キチンおよび脂質の各生合成系と, 菌体の酸素消費に及ぼす影響について検討した。酢酸グアザチンの 50% 菌糸生育阻止濃度である 10 ppm で, タンパク質, DNA, RNA および細胞壁キチンへの, それぞれ [U-¹⁴C] タンパク質加水分解物, [2-¹⁴C]チミジン, [2-¹⁴C]ウリジンおよび [1-¹⁴C]D-グルコサミンの取込みはほとんど阻害されなかった。細胞壁への [U-¹⁴C]D-グルコースおよび [1-¹⁴C]酢酸の取込みは, 酢酸グアザチン 10 ppm 処理 90 分後に若干の阻害を示したにすぎなかった。一方, 脂質分画への [U-¹⁴C]D-グルコース, [1-¹⁴C]酢酸および [メチル-¹⁴C]L-メチオニンの取込みは, 酢酸グアザチン 10 ppm 処理で著しく阻害された。また, TLC による単純脂質および複合脂質各分画の比率値の結果から単純脂質に取込みの阻害が認められた。*A. kikuchiana* 菌体の酸素消費は, 酢酸グアザチン 10 ppm 処理でほとんど阻害されなかった。これらの結果から酢酸グアザチンの *A. kikuchiana* に対する第一次作用点は, 単純脂質生合成系にあると考えられる。

引用文献

- 1) G. P. Clemons & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **1**, 32 (1971)
- 2) H. N. Munro & A. Fleck: "Method, Biochem. Analysis," ed. by D. Glick, Vol. 14, Interscience Publishers, New York, p. 113, 1966
- 3) 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)
- 4) M. Kates: "Techniques of Lipidology," North Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 351, 398, 1972
- 5) T. Nakanishi, Y. Takahi & K. Tomita: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **41**, 321 (1975)
- 6) Y. Hisada & Y. Kawase: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **43**, 151 (1977)
- 7) 柿木和雄・前田泰三・阿部 洋・見里朝正: 農化 **43**, 37 (1969)
- 8) O. Kodama, H. Yamada & T. Akatsuka: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1719 (1979)
- 9) O. Kodama, K. Yamashita & T. Akatsuka: *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1015 (1980)
- 10) N. N. Ragsdale & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 20 (1973)
- 11) J. L. Sherald & H. D. Sisler: *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**, 477 (1975)
- 12) T. Kato, S. Tanaka, M. Ueda & Y. Kawase: *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2377 (1974)
- 13) J. L. Sherald, N. N. Ragsdale & H. D. Sisler: *Pestic. Sci.* **4**, 719 (1973)