

湛水土壌系中における 1-メチルチオセミカルバジドの イネ白葉枯病菌阻害物質への変換

大森 薫, 鈴木利幸, 石田秀式, 見里朝正*

日本化薬株式会社上尾研究所, *理化学研究所
(昭和51年3月8日受理)

Conversion of 1-Methylthiosemicarbazide into Antibacterial Substance to *Xanthomonas oryzae* in the Flooded Soil System

Kaoru OHMORI, Toshiyuki SUZUKI, Shuichi ISHIDA and Tomomasa MISATO*

Ageo Research Laboratory, Nippon Kayaku Co., Ltd., Ageo, Saitama 362, Japan

*The Institute of Physical and Chemical Research, Wako, Saitama 351, Japan

1-Methylthiosemicarbazide was converted in the soil system under flooded conditions into three substances including an antibacterial substance when applied to the paddy water. The antibacterial substance and one of the other substances were taken up by rice plant. Since the antibacterial substance is retained in the rice plant for a fairly long period, it appears that good performance of 1-methylthiosemicarbazide in control of bacterial leaf blight of rice when applied to the paddy water can be attributed to the antibacterial substance. Through extraction of the antibacterial substance from rice plant and its purification, it was identified as 2-amino-1, 3, 4-thiadiazole.

緒 言

1-メチルチオセミカルバジド $\text{CH}_3\text{NHNHCSNH}_2$ は、田面水中施用により良好なイネ白葉枯病防除効果を示すことを報告した¹⁾。しかし、1-メチルチオセミカルバジドを茎葉に散布した場合防除効果は認められず、また寒天培地上でイネ白葉枯病菌に対し抗菌力を示さない¹⁾。このように茎葉散布では無効で抗菌力を示さない 1-メチルチオセミカルバジドが、田面水中施用によりなぜイネ白葉枯病に対し高い防除効果を示すかについて検討を行なったところ、知見を得たので報告する。

実験材料ならびに方法

1. イネ白葉枯病菌

農林省農業技術研究所から分与された *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson H 5809 菌株を用いた。

2. イ ネ

イネ品種は金南風を用いた。1/5000a ワグナーポットにイネ苗を2本植え、温室内で水田状態で栽培し穂ばらみ期のものを試験に用いた。水深は常に約4cmに保ち、とくにポット下部から水を抜いたりしなかった。

3. 供試化合物

1-メチルチオセミカルバジド原体ならびに5%粒剤を用いた。ともに、ペーパークロマトグラム上で他のスポットを認めないものを用いた。

4. 供試土壌

埼玉県戸田市水田の作土層より採取した土壌を風乾し、径2mmの篩で分けたものを用いた。土壌の成因は沖積、土性は埴土である。

5. イネさく汁液の抗菌力検定

1-メチルチオセミカルバジド5%粒剤を、1ポット当たり有効成分として200mg田面水中に施用し、3日後イネを茎部から切断し乳鉢ですりつぶし、ペーパーディ

スク法によりその汁液の抗菌力を検定した。被検菌はイネ白葉枯病菌 H 5809 菌株を用い、培地は脇本培地²⁾を用いた。対照として無処理区のイネ体さく汁液を用いた。

6. イネ体より抗菌性物質の抽出

1-メチルチオセミカルバジド 5% 粒剤を 1 ポット当たり有効成分で 200 mg 田面水中に施用し、所定時間後イネを茎部から切りとり、このイネの生体重 10 g 当たり 100 ml のメタノールを加えミキサーで 5 分間攪拌粉碎したのち、ガーゼで濾過した濾液を 4°C で毎分 12,000 回転、30 分間遠心分離後メタノール可溶分画を採取し減圧濃縮後試料として用いた。

7. 化合物の土壌処理

水田土壌 300 g に蒸留水 300 ml を加え攪拌したのち、1-メチルチオセミカルバジド 5% 粒剤を有効成分で 200 mg 施用した。処理後 27°C に所定時間保ったのち、水田土壌を濾紙で濾過しその濾液を試料として用いた。殺菌土壌による処理の場合には水田土壌を高圧滅菌器で殺菌し、殺菌蒸留水を加え、以後の操作はすべて無菌状態で行なった。

8. 水耕栽培

1/5000a ポット育成の成稲を根部に傷がつかないように注意して土壌を洗いおとし、1-メチルチオセミカルバジド 5% 粒剤を有効成分で 1,000 ppm の濃度になるよう施用した 100 ml の水中に根部を浸し、所定期間栽培した。

9. ペーパークロマトグラフィ

東洋濾紙 No. 527 を用い展開溶媒は、ベンゼン：メタノール=4：1 の混合液を用いた。

10. バイオオートグラフィ

イネ白葉枯病菌 H 5809 菌株を被検菌とし、培地は脇本培地²⁾を用いて検定用寒天平板を作成し、その上にペーパークロマトグラフィで展開した濾紙を風乾後 20 分間はりつけ濾紙をとり除いたのち、27°C の定温室に 36 時間おいて菌の生育阻止帯を観察した。

11. 呈色反応

ペーパークロマトグラフィにより、展開後の濾紙に 0.1 N 硝酸銀と 5 N アンモニア水との混合液³⁾を噴霧し呈色状態を観察し、さらに風乾後 105°C で 10 分間加熱して呈色状態を観察した。

12. 紫外線吸収曲線

試料を水にとかし、自記分光光度計（日立モデル 356）を用いて紫外線吸収曲線を測定した。

13. 抗菌性物質の精製ならびに同定

イネ体より抽出したメタノール濃縮液をシリカゲル薄

層プレート（メルクシリカゲル 60F-254）上クロロホルム：メタノール=10：3 の混合液で展開したのち、活性部分をかきとりメタノールで抽出し、減圧濃縮し析出した結晶をエタノール中で再結させ、これを赤外分光光度計（日立モデル EPI-G3）を用い、臭化カリウム錠剤として赤外線吸収曲線を測定した。

実験結果

1. 1-メチルチオセミカルバジドを田面水中施用したイネ体さく汁液の抗菌力

1-メチルチオセミカルバジドを田面水中に施用したイネ体のさく汁液の抗菌性を検定したところ、直径 30 mm 以上の大きな阻止円を形成し、抗菌力を有する物質の存在が判明した。

2. 1-メチルチオセミカルバジドを田面水中施用したイネ体中より抗菌性物質の抽出

1-メチルチオセミカルバジドならびにイネ体さく汁液中の抗菌性物質は、メタノールに転溶することが判明したのでイネ体中よりメタノールで抽出しペーパークロマトグラフィによる分離を行なった。展開した濾紙を風乾したのちバイオオートグラフィを行なったところ、*R_f* 値 0.3 付近に抗菌力を有する物質の存在が判明した。さらに、その部位の濾紙を切りとりメタノールで抽出後、メタノールを除き水中での紫外線吸収曲線を調べたところ、249 nm に単一の最大吸収を有する吸収曲線を得た。1-メチルチオセミカルバジドは 236 nm に最大吸収を示すことから、抗菌性物質は 1-メチルチオセミカルバジドとは異なるものであることが判明した。

3. 1-メチルチオセミカルバジドと抗菌性物質との識別

1-メチルチオセミカルバジドと抗菌性物質を容易に識別するため、1-メチルチオセミカルバジドのメタノール溶液ならびにイネ体から抽出した抗菌性物質を含むメタノール濃縮液をペーパークロマトグラフィで展開し、風乾した濾紙について各種呈色反応を試験した。その結果、アンモニア性硝酸銀溶液を噴霧すると 1-メチルチオセミカルバジドは *R_f* 値 0.38 で黒褐色を呈し、さらに風乾後 105°C、10 分間加熱すると抗菌性物質は *R_f* 値 0.30 で灰色を呈することが判明した。これらのことから、1-メチルチオセミカルバジドと抗菌性物質（以後本物質を生成物（I）とする）との識別は先のイネ白葉枯病菌に対する抗菌力の有無、紫外線吸収曲線の違いのほかに、本実験のペーパークロマトグラフィによる *R_f* 値ならびに呈色反応の違いにより行なうことができるようになった（Table 1）。

Table 1 Differences between 1-methylthiosemicarbazide and its products.

	1-Methylthiosemicarbazide	Products		
		(I)	(II)	(III)
Antibacterial activity to <i>X. oryzae</i>	—	+	—	+
UV _{max} in H ₂ O	236 nm	249 nm	242 nm	248 nm
R _f value (Benzene:MeOH = 4:1)	0.38	0.30	0.08	0.20
Ammoniac silver nitrate reaction	Dark brown	Grey	Dark brown	Greyish brown

4. 1-メチルチオセミカルバジドを田面水中施用後イネ体中に形成する抗菌性物質の消長

1-メチルチオセミカルバジドを田面水中に施用後 1, 3, 5, 7, 10, 20 日にイネ体をメタノールで抽出し、ペーパークロマトグラフィ、呈色反応ならびにバイオオートグラフィを行なった。形成されたスポットの大きさを肉眼で観察したところ、Fig. 1 に示すように施用 1 日後

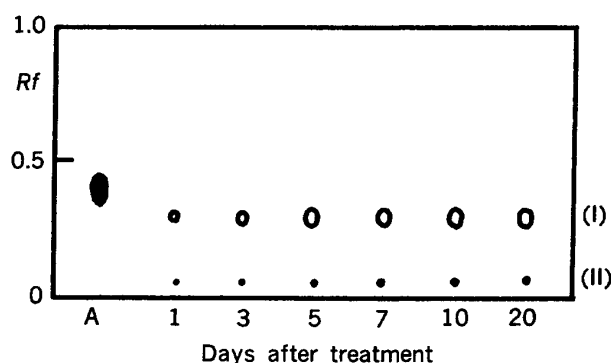


Fig. 1 Paperchromatogram of 1-methylthiosemicarbazide (A) and rice extracts from 1 to 20 days after paddy water treatment of 1-methylthiosemicarbazide.

に生成物 (I) のスポットが出現しその大きさは施用 5 日後まで増大し、施用 20 日後でも 5 日後とほぼ同じ大きさを示した。イネ体からはこの生成物 (I) のほかに生成物 (II) (Table 1) が検出されたが、1-メチルチオセミカルバジドは検出されなかった。

5. 水田土壌中における 1-メチルチオセミカルバジドの変換

1-メチルチオセミカルバジドを水田土壌に施用後 1, 3, 5 日に水田土壌濾過液についてペーパークロマトグラフィ、呈色反応ならびにバイオオートグラフィを行なったところ、Fig. 2 に示すように 1-メチルチオセミカル

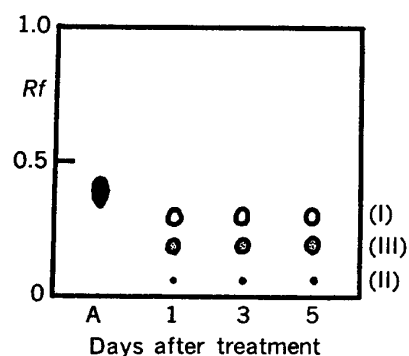


Fig. 2 Paperchromatogram of 1-methylthiosemicarbazide (A) and soil extracts from 1 to 5 days after paddy water treatment of 1-methylthiosemicarbazide.

バジドは検出されず、生成物 (I) ならびに (II) ともう 1 物質生成物 (III) (Table 1) が検出された。生成物 (III) の呈色状態はアンモニア性硝酸銀溶液で褐色となり、加熱により灰色を呈し結果的に灰褐色を呈した。

6. 殺菌土壌中における 1-メチルチオセミカルバジドの変換

1-メチルチオセミカルバジドを殺菌した水田土壌に施用後 1, 3, 5 日に水田土壌濾過液について、無殺菌の水田土壌に施用した場合と同様に、ペーパークロマトグラフィ、呈色反応ならびにバイオオートグラフィを行なったところ、先の無殺菌土壌の場合と同じく生成物 (I), (II), (III) が検出された。肉眼観察によるスポットの大きさは、無殺菌土壌の場合とほぼ同じであった。

7. 1-メチルチオセミカルバジド溶液中で水耕栽培した場合イネ体中に出現する物質の消長

1-メチルチオセミカルバジド溶液中にイネの根を浸し 3, 5, 10 日後イネ体をメタノールで抽出し、ペーパークロマトグラフィ、呈色反応ならびにバイオオートグラフィを行なった。その結果 Fig. 3 に示すように、イネ体中

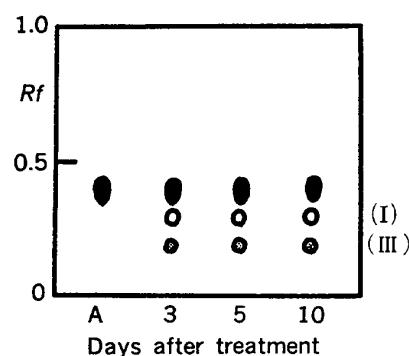


Fig. 3 Paperchromatogram of 1-methylthiosemicarbazide (A) and rice extracts from 3 to 10 days after water treatment of 1-methylthiosemicarbazide in water culture.

から 1-メチルチオセミカルバジドと生成物 (I) のほかに土壤中で検出された生成物 (III) が検出された。

8. 抗菌性物質の精製ならびに同定

1-メチルチオセミカルバジドを田面水中に施用したイネ体よりメタノールで生成物 (I) を抽出し、薄層クロマトグラフィを行なったところ、*R_f* 値 0.56 付近に抗菌性が認められたので、この部分をメタノールで抽出後減圧濃縮し析出した結晶を再結させたのち、紫外線吸収曲線ならびに赤外線吸収曲線を調べたところ、生成物 (I) は 2-アミノ-1,3,4-チアジアゾール (m.p. 197°C) と一致した (Fig. 4)。

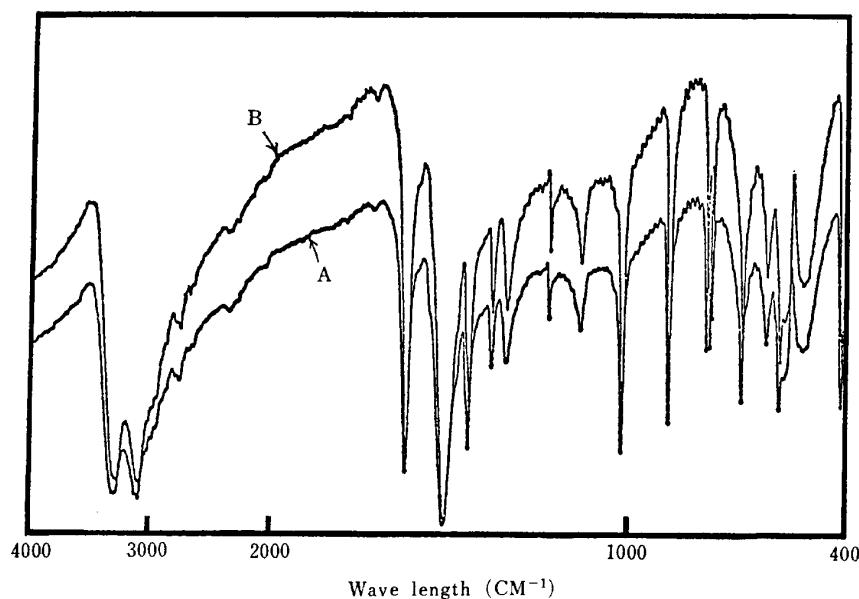


Fig. 4 Infrared spectra of antibacterial substance (A) and 2-amino-1,3,4-thiadiazole (B) in KBr disc.

考 察

本研究により 1-メチルチオセミカルバジドは田面水中に施用されたのち、イネ体に吸収され抗菌性物質に代謝されることも考えられるが、施用後湛水土壤中において抗菌性物質を含む少なくとも三つの化合物に変換してからイネ体内に吸収され、イネ体内に長期にわたり保持されるものと推定される結果を得た。このような理由でイネ白葉枯病菌に対し抗菌力を示さず、また茎葉に散布した場合はまったく防除効果を示さない 1-メチルチオセミカルバジドが田面水中に施用することにより、良好なイネ白葉枯病防除効果を示すものと考えられる。既存の殺菌剤の中には、もともと抗菌力をもっているものが環境において解毒代謝される例は多数知られているが、別の活性化合物に変化するものもある。たとえばベノミル (methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole-

carbamate) はそれ自身抗菌活性を有するが、これを土壤中に施用した場合、植物体からは浸透性ならびに抗菌力を有するカルベンダジム (methyl 2-benzimidazole-carbamate) が検出されている^{4,5)}。またチオファネートメチル (dimethyl 4,4'-O-phenylene bis(3-thioallophanate)) は土壤中に施用した場合、植物体から閉環した形の浸透性ならびに抗菌力を有するカルベンダジムが検出されている⁶⁾。1-フェニルチオセミカルバジドはそれ自身抗菌力を示さないが、植物に散布されたのち抗菌力を有する 1-フェニルアゾチオホルムアミドに化学変化する⁷⁾。しかしながら、1-メチルチオセミカルバジドのように、

まったく抗菌力を示さない化合物が土壤中中で抗菌力の高い化合物に変換してから植物体に吸収され防除効果を示す例は知られていない。1-メチルチオセミカルバジドが変換して生ずる抗菌性物質は、理化学的検討により 2-アミノ-1,3,4-チアジアゾールであることが判ったが、この物質は強い植物浸透性を有し殺菌作用を有することが示されている⁸⁾。1-メチルチオセミカルバジドを田面水中に施用 1 日後には、すでに 2-アミノ-1,3,4-チアジアゾールがイネ体中に現われ 5 日まで増加し、その後 20 日経てもイネ体に残存している。2-アミノ-1,3,4-チアジアゾールは化学的に安全で土壌吸着は比較的少ない物質である⁹⁾ ところから、田面水中に施用された 1-メチルチオセミカルバジドは土壤中で変換が行なわれ、形

成された 2-アミノ-1,3,4-チアジアゾールがイネ体内にとり込まれるものと考えられる。

1-メチルチオセミカルバジド溶液中で水耕栽培した場合、田面水中に施用したときには検出されなかった 1-メチルチオセミカルバジドが、イネ体から検出された。土壌を含む田水に 1-メチルチオセミカルバジドを加えた場合イネ体に検出されないのは、この物質が土壌表面にとどまり、根に到達しない可能性があり、また本物質の土壌吸着が大きいことも考えられ、土壌に吸着されない場合でも、土壌の存在により根からの吸収が妨げられることも考えられる。

水田土壌中での 1-メチルチオセミカルバジドの変換に土壌微生物が関与していることを完全には否定できないが、殺菌土壌中でも同様の変換が行なわれるところから、主として土壌中の物質が関与する化学反応が行なわれるものと推定される。この場合、反応は脱水素反応で

あるので、土壤中に存在する酸化力を有する物質が関与している可能性が大きい。

1-メチルチオセミカルバジドが抗菌性物質である 2-アミノ-1, 3, 4-チアジアゾールに変換する際に形成される他の 2 生成物の化学構造については、現在のところ明らかではない。また、田面水中に施用された 1-メチルチオセミカルバジドの土壤中における変換の機作や形成された物質のイネ体への吸収、移行量やその速度等定量的な検討、さらにイネ体中に長く残存した場合、米粒中への移行の有無についても興味ある課題としてさらに検討を加える予定である。

要 約

1-メチルチオセミカルバジドは田面水中に施用されたのち、湛水土壤中において抗菌性物質を含む三つの化合物に変換し、抗菌性物質と他の 1 成分はイネ体内に吸収された。抗菌性物質はイネ体内で長期にわたり保持されるところから、1-メチルチオセミカルバジドの田面水中施用によるすぐれたイネ白葉枯病防除効果は、本抗菌性物質によるものと考えられる。抗菌性物質をイネ体より抽出精製し同定したところ、2-アミノ-1, 3, 4-チアジ

ゾールであった。

謝 辞

本研究を行なうに当たり、一部携わった日本化薬株式会社上尾研究所中川泰三氏、小池謙吾氏ならびに馬場猛夫氏に深謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) 大森 薫・中川泰三・鈴木利幸・小池謙吾・馬場猛夫・石田秀弐・見里朝正: 日本農薬学会誌 **2**, 95 (1976)
- 2) 日本植物病理学会: 植物病理学実験法, 東京, p. 774, 1962
- 3) S.M. Partridge & R.G. Westall: *Biochem. J.* (London) **42**, 238 (1948)
- 4) G.P. Clemons & H.D. Sisler: *Phytopathology* **59**, 705 (1969)
- 5) J.J. Sims, H. Mee & D.C. Erwin: *Phytopathology* **59**, 1775 (1969)
- 6) Y. Soeda, S. Kosaka & T. Noguchi: *Agr. Biol. Chem.* **36**, 817 (1972)
- 7) A.K. Sijpesteijn, C.W. Pluijgers, A. Verloop & A. Tempel: *Ann. appl. Biol.* **61**, 473 (1968)
- 8) 薬師寺国人・若江 治: 日植病報 **37**, 104 (1971)