

報 文

アルテリシジン処理したナシ黒斑病菌および
トウモロコシ黒穂病菌の走査型電子顕微鏡像*

切 貫 武代司

神戸大学農学部

(昭和60年12月20日受理)

Scanning Electron Microscopic Images of *Alternaria kikuchiana* and
Ustilago maydis Treated with Altericidins*

Takeyoshi KIRINUKI

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

Altericidins (altericidin A, B and C), remarkably inhibited the mycelial growth of *Alternaria kikuchiana* in a liquid medium at low concentrations. The fifty percent inhibitory concentration (EC_{50}) for the mycelial growth varied widely according to the initial mycelial weight. The higher the initial density, the higher the EC_{50} . However, the ratio of EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) to the dry weight inoculum (mg/ml) was 2.8, when the initial mycelial weight ranged from 0.8 to 1.45 mg (dry weight/ml), and increased in proportion to the mycelial weight (dry weight) under the conditions tested. Scanning electron micrographs showed partial swelling, rupture and exfoliation in the outer cell wall layer of conidium of *A. kikuchiana* when treated with various concentrations of altericidins. The conidium bursted when treated at a higher concentration of 40 ppm. When the hyphae were treated with 20 ppm altericidins for 6 hr, some of the cells heavily shrunk, and others became empty and flattened. The leakage of cellular constituents was also observed in sporidium of *Ustilago maydis* treated with 20 ppm altericidins for 3 hr. These results suggest that altericidins act on the cell wall.

緒 言

アルテリシジン複合物 (A, B および C の複合物) は、広範囲の糸状菌および酵母に対し強い活性を示す抗生物質である。本物質がナシ黒斑病菌およびトウモロコシ黒穂病菌に対し、細胞内への物質輸送を低下させること、また、細胞内のさまざまな物質合成を見掛け上非特異的に阻害すること、およびトウモロコシ黒穂病菌の増殖を抑制することはすでに報告した¹⁾。これらの作用性は一般に細胞膜系に作用する阻害剤の惹起する現象²⁾であることから、本物質も膜機能障害を引き起こすことが示唆された。

薬剤で処理された感受性菌の形態変化は、その薬剤の作用機構によって異なり、細胞壁および細胞膜に作用する阻害剤は、形態的にも異常現象を起こさせることが観察されている³⁻⁹⁾。

そこで、本報では、アルテリシジン複合物処理による形態変化を走査型電子顕微鏡観察により確かめ、あわせて菌体量と薬剤濃度との関係について検討した。

実験材料および方法

1. 供試菌および薬剤

ナシ黒斑病菌 (*Alternaria kikuchiana*, 前報¹⁾ と同菌株) を乾杏煎汁寒天培地で 28°C, 10~12 日間シャーレ内で培養して胞子を得た。胞子は殺菌水で懸濁し、三重ガーゼで濾過したのち、低速遠心分離により集めた。胞子は 6.6×10^{-2} M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄した

* アルテリシジンの作用機構 (第2報)
Mode of Action of Altericidins (Part 2). For Part 1, see Ref. 1).

のち、最終孢子濃度が $1.3 \sim 1.4 \times 10^6/\text{ml}$ になるよう同緩衝液、またはジャガイモ-グルコース液体培地 (PGS 培地) で懸濁して、孢子懸濁液とした。

菌体の培養および菌体懸濁液の調製は前報¹⁾に準じて行なった。

トウモロコシ黒穂病菌 (*Ustilago maydis*, 前報¹⁾と同菌株) を栄養培地¹⁰⁾で 30°C 、40~48時間振とう培養した。培養液中の小生子は遠心分離により集め、 $2 \times 10^{-2}\text{M}$ リン酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄した。最終小生子濃度は OD_{450} が 3.2 となるように同緩衝液で懸濁して、小生子懸濁液とした。

アルテリジン複合物 (AC) は前報¹⁾と同力価でジメチルホルムアミド (DMF) 溶液とし、DMF の最終濃度は 0.4% 以下で使用了。

2. 菌体量と薬剤濃度

処理時の菌体量と AC 濃度との関係は、*A. kikuchiana* を用いて前報¹⁾の菌糸生育阻害試験法に準じて検討した。菌体量は乾物重 0.8 から 2.15 mg/ml の範囲で調製し、各 20 ml ずつ分注した。本懸濁液に AC 2, 2.5, 4, 5, 8, 10, 16 および 20 ppm となるように添加して 28°C で 6 時間振とう培養したのち、乾燥菌体重を測定した。

3. 走査型電子顕微鏡による形態観察

1) *A. kikuchiana* 孢子リン酸緩衝懸濁液を 5 ml ずつ分け、所定濃度になるよう AC を添加した。一定時間 28°C で振とう培養したのち胞子を低速遠心分離で集めた。2) 孢子 PGS 培地懸濁液をカバーガラス上で 21 時間培養した。カバーガラス上に生育した菌糸は AC 20 ppm を含むリン酸緩衝液 5 ml で一定時間処理した。3) *U. maydis* 小生子懸濁液を 5 ml ずつ分け、AC 20 ppm となるように添加した。一定時間 30°C で振とう培養したのち小生子を遠心分離で集めた。

処理した孢子、菌糸および小生子はそれぞれのリン酸緩衝液で 2 回洗浄し、2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 24 時間固定した。固定した試料は 1 時間各緩衝液で 3 回洗い、1% オスミウム酸を含む 0.2 M リン酸緩衝液で 4°C 、2 時間再固定した。再固定した試料を 1 時間蒸留水で 3 回洗浄し、アルコール系列および無水アセトンを経過し脱水した。酢酸イソアミルで置換したのち臨界点乾燥装置 (Hitachi HCP-2) により乾燥した。各試料はイオンコーター (Eiko Model 1B-3) で金蒸着したのち、走査型電子顕微鏡 (Hitachi-Akashi MSM 4C-102) により、加速電圧 15 kV で観察した。

結 果

1. 菌体量による EC_{50} 値の変化

A. kikuchiana 菌糸の生育に及ぼす AC の影響を Fig. 1 に示した。処理時の乾燥菌体重 0.9, 1.5 および 2.15 mg/ml に対して、AC の 50% 菌糸生育阻止濃度 (EC_{50}) はそれぞれ 2.5, 4.5 および 8.0 ppm であった。

処理時の菌体量に対する AC の EC_{50} 値をまとめて Table 1 に示した。 EC_{50} 値は処理時の菌体量に影響され、菌体重 0.8~2.15 mg/ml において 2.2~8.0 ppm を

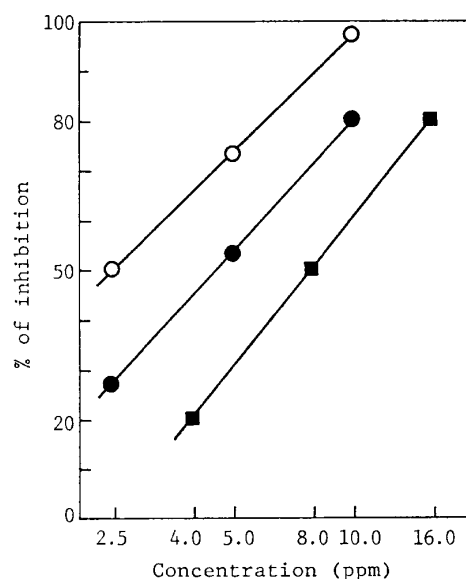


Fig. 1 Effects of altericidins on the mycelial growth of *Alternaria kikuchiana*.

The three experiments differ in the amount of mycelia initially added to 20 ml culture media containing altericidins at different concentrations. ○: 0.9 mg, ●: 1.5 mg, ■: 2.15 mg initial dry wt./ml culture medium.

Table 1 The relationship between EC_{50} of altericidins and the initial mycelial weight of *Alternaria kikuchiana* in the culture medium.

Initial dry mycelial wt. (mg/ml)	EC_{50} of altericidins (ppm)	Ratio of EC_{50} /mg dry mycelial wt.
0.80	2.20	2.8
0.90	2.50	2.8
1.20	3.36	2.8
1.45	4.10	2.8
1.50	4.50	3.0
2.10	7.59	3.6
2.15	8.00	3.7

示した。乾燥菌体重 mg 当り EC_{50} 値比でみると 2.8~3.7 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) の間に入るが、菌体重 0.8~1.45 mg/ml までは 2.8 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) の一定値を示した。

2. 走査型電子顕微鏡観察による形態変化

A. kikuchiana 胞子の形態に及ぼす AC の影響を要約して Table 2 に、電顕像を Fig. 2, 1~8 に示した。AC

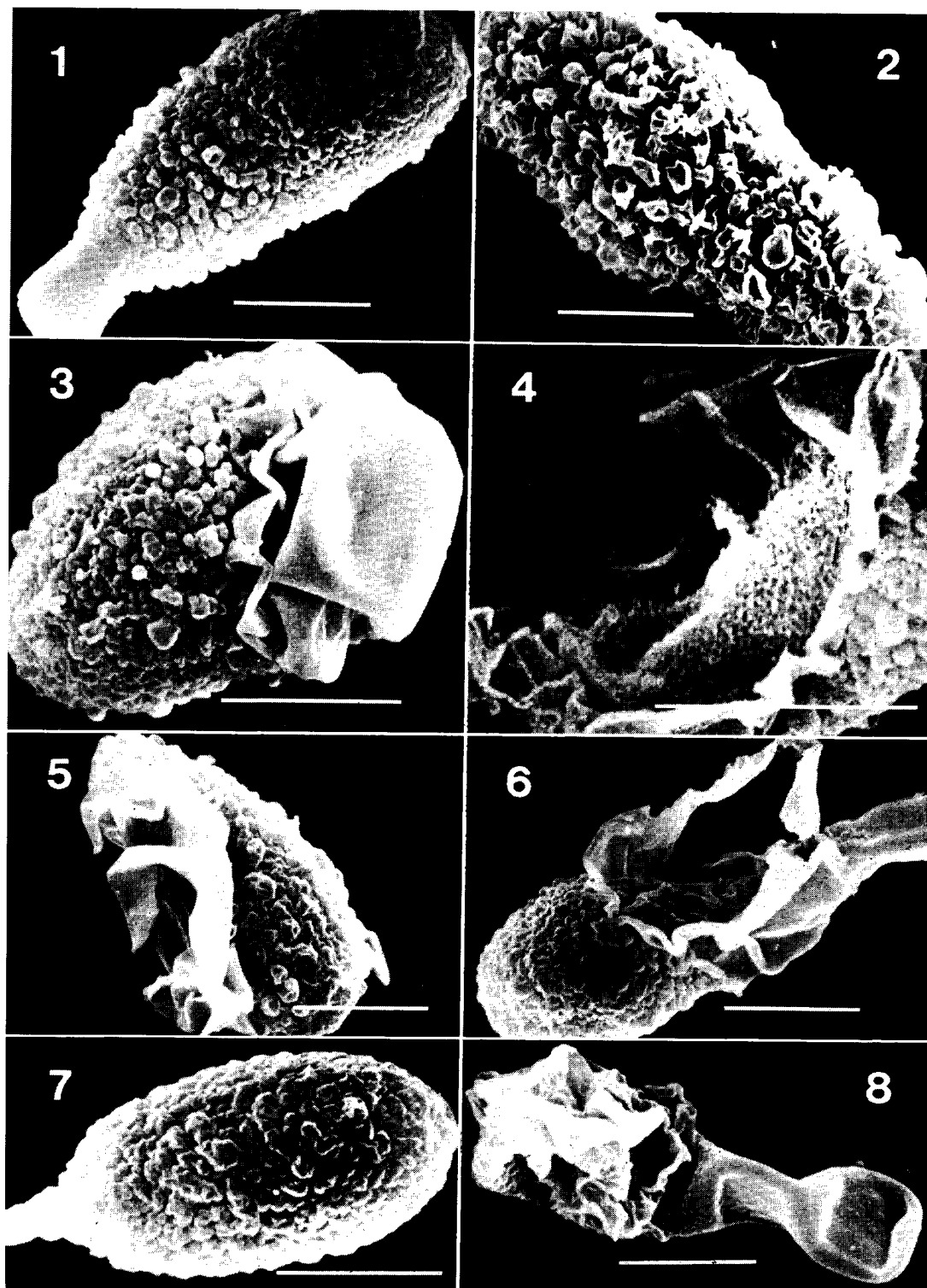


Fig. 2 Scanning electron micrographs of conidium of *Alternaria kikuchiana* treated with altericidins.

1: control (3 hr), 2: 8 ppm (4 hr), 3: 16 ppm (3 hr), 4: 20 ppm (3 hr), 5: 32 ppm (3 hr), 6: 40 ppm (3 hr), 7: control (18 hr), 8: 40 ppm (18 hr) altericidins.

Each bar represents 5 μm .

無添加で3時間振とう処理した対照孢子(無処理, 1)は表面イボ状突起に覆われ正常であった。AC 8 ppm の4時間処理(2)では表面イボ状突起の膨潤, 収縮がみられた。16 ppm の3時間処理(3)および20 ppm の3時間処理(4)では細胞壁外層が部分的に膨張, または損傷, 剥離して絨毛状の下層面を露出していた。32 ppm の3

時間処理(5)および40 ppm の3時間処理(6)では, 細胞壁外層が部分的に損傷, 剥離し, 露出した下層の収縮がみられた。AC 無添加で18時間振とう処理した対照孢子(無処理, 7)の表面構造にはほとんど異常が認められなかった。本処理条件では, 99% が未発芽であった。表示していないが併用したスライドグラス法での発

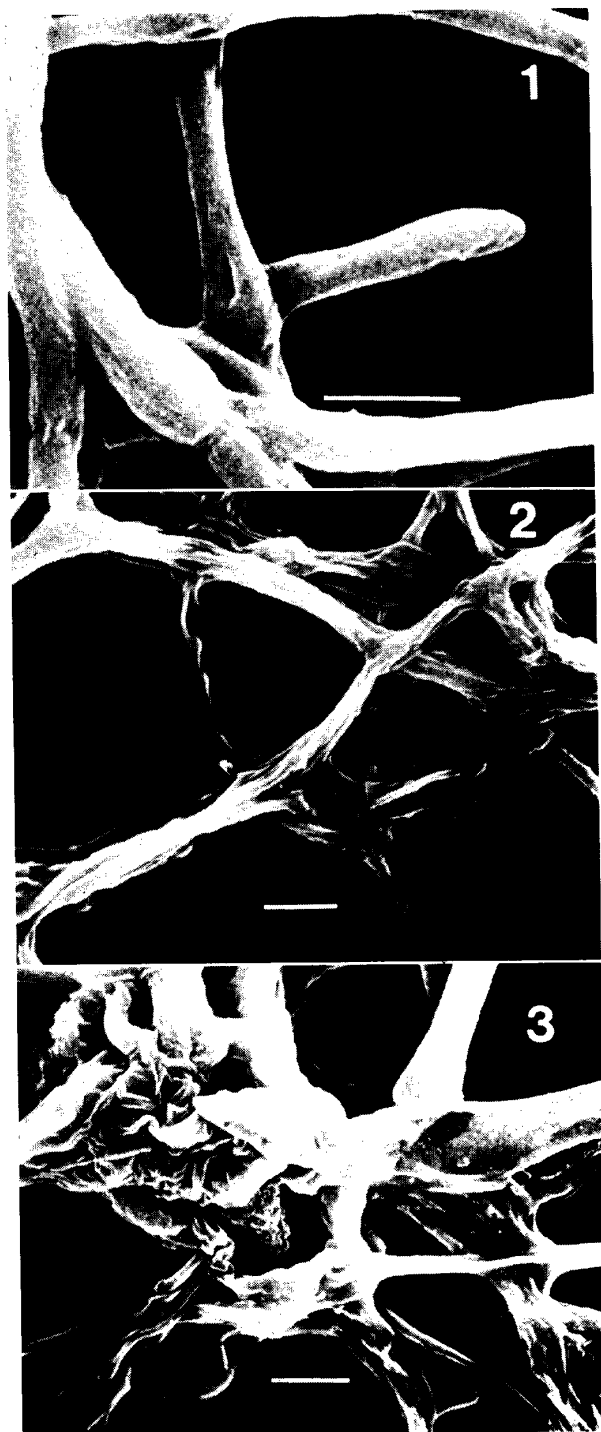


Fig. 3 Scanning electron micrographs of hyphae of *Alternaria kikuchiana* treated with altericidins. 1: control (3 hr), 2: 20 ppm (3 hr), 3: 20 ppm (6 hr) altericidins. Each bar represents 5 μ m.

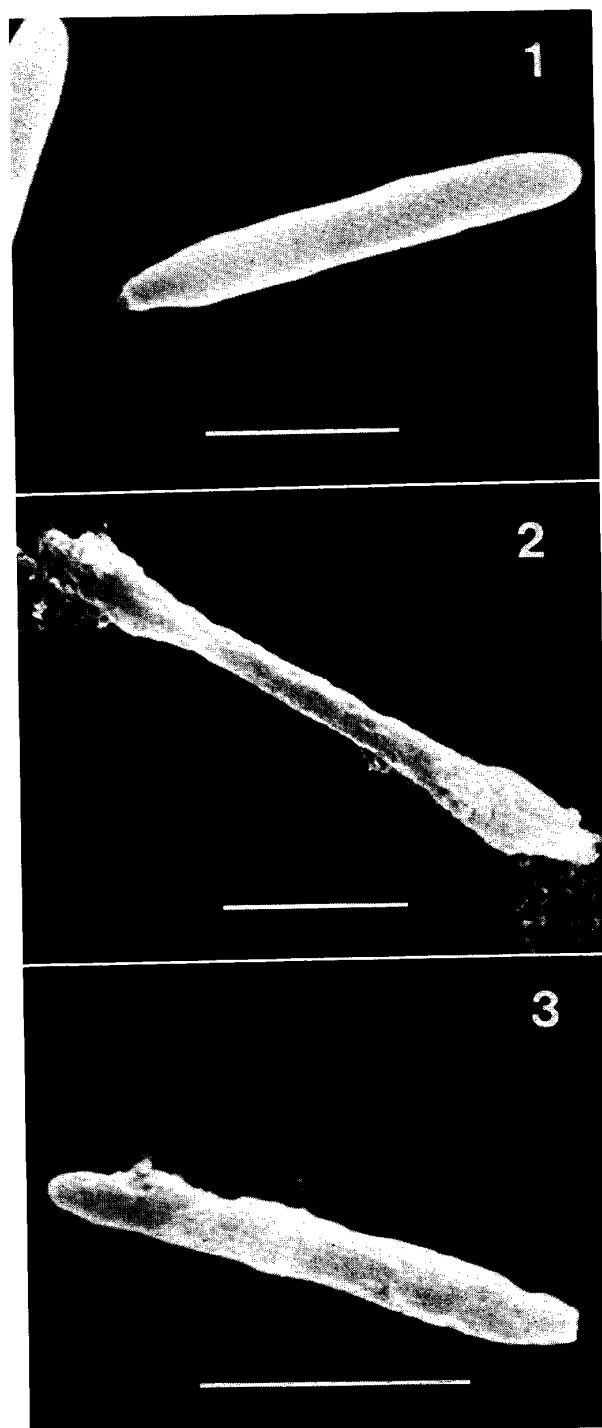


Fig. 4 Scanning electron micrographs of sporidium of *Ustilago maydis* treated with altericidins. 1: control (3 hr), 2 and 3: 20 ppm (3 hr) altericidins. Each bar represents 5 μ m.

Table 2 Change of conidial surface structure of *Alternaria kikuchiana* treated with various concentrations of altericidins.

Treatment		Morphological change	Number on Fig. 2
Concentra- tions (ppm)	Time (hr)		
Control	3	Normal	1
8	4	Swelling and shrinkage of verrucoss projections	2
16	3	Partial swelling of the outer wall layer	3
20	3	Swelling and exfoliation of the outer wall layer	4
32	3	Exfoliation of the outer wall layer and shrinkage of exposed layer	5
40	3	Exfoliation of the outer wall layer and shrinkage of exposed layer	6
Control	18	Nearly normal	7
40	18	Conidial bursting	8

Table 3 Morphological change of *Alternaria kikuchiana* hyphae treated with altericidins.

Treatment		Morphological change	Number on Fig. 3
Concentra- tions (ppm)	Time (hr)		
Control	3	Smooth hyphal surface	1
Altericidins 20	3	Partial shrinkage of hyphae	2
20	6	Shrinkage of all hyphae	3

Table 4 Morphological change of *Ustilago maydis* sporidium treated with altericidins.

Treatment		Morphological change	Number on Fig. 4
Concentra- tions (ppm)	Time (hr)		
Control	3	Smooth surface	1
Altericidins 20	3	Sporidial bursting	2, 3

芽率は 99% で、菌糸を形成していた。40 ppm の 18 時間処理 (8) では、胞子細胞の破壊および収縮が観察された。

菌糸の形態に及ぼす AC の影響を要約して Table 3 および電顕像を Fig. 3, 1~3 に示した。AC 無添加で 3 時

間処理した対照菌糸 (無処理, 1) の表面構造は平滑で丸味を呈した。AC 20 ppm の 3 時間処理 (2) では菌糸の部分的収縮がみられたが、6 時間処理 (3) では菌糸全体が収縮していた。

U. maydis 小生子の形態に及ぼす AC の影響を要約して Table 4 に、電顕像を Fig. 4, 1~3 に示した。対照小生子 (無処理, 1) の表面構造は平滑で丸味を呈したが、AC 20 ppm の 3 時間処理 (2, 3) では、細胞壁の部分的破壊が観察された。

考 察

A. kikuchiana 菌体の生育阻害に及ぼす AC 濃度と処理時の菌体量との関係を検討した結果、所定範囲内の菌体量 (0.8~1.45 mg/ml) では、EC₅₀ 値比が一定値を示した (Table 1)。Hisada ら¹¹⁾ はプロシミドンの *Botrytis cinerea* に対する ED₅₀ 値は、処理時の菌体密度に著しく影響されることを明らかにした。しかし、この場合の菌体乾燥重 1 mg 当り ED₅₀ 値比をみると、菌体密度の低い場合に比が高い。AC はこれと異なることから菌体量に対する絶対薬量が重要であることを意味している。また、所定範囲 (1.50 mg/ml) 以上、菌体量の増加に伴って EC₅₀ 値比が高くなった。このことは菌体量に対する薬液量の関係が示唆され、薬液の不足に起因したものと考えられる。

従来、膜系に直接、間接に作用し、膜透過性の異常を引き起こす阻害剤、たとえば、ポリエン系抗生物質 (*Aspergillus flavus*)⁶⁾、イソプロチオラン (*Pyricularia oryzae*)¹²⁾、プロシミドン (*Botrytis cinerea*)¹¹⁾、また、細胞壁に作用するポリオキシシン (*Alternaria kikuchiana*, *Mucor rouxii*)^{4,5)} などは、形態異常 (菌糸細胞の膨潤、破壊など) を起こすことが光学顕微鏡観察により報告されている。

そこで、*A. kikuchiana* の形態に及ぼす AC の影響を走査型電子顕微鏡により観察した結果、低濃度処理胞子では細胞壁外層の異常現象がみられ、高濃度では胞子細胞の収縮および破壊が観察された (Fig. 2)。一方、菌糸においても収縮がみられた (Fig. 3)。また、*U. maydis* 小生子では細胞壁の部分的破壊が観察された (Fig. 4)。これらのことから、AC による形態変化は細胞壁構造に異常障害を引き起こしたことに起因すると考えられる。

要 約

アルテリシン複合物 (AC) は低濃度でナン黒斑病菌の菌糸生育を液体培養で著しく阻害する。しかし、50% 菌糸生育阻止濃度 (EC₅₀) は処理時の菌体量によ

って異なる。各 EC_{50} 値における薬量/菌体量(乾重)比は、菌体量 0.8 から 1.45 mg/ml までは 2.8 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) の一定値を示したが、それ以後は菌体量に比例して高くなった。

走査型電子顕微鏡観察において、ナシ黒斑病菌胞子では AC 処理濃度の増加に伴い細胞壁外層の部分的膨張、および損傷、剝離を示し、40 ppm の 18 時間処理では胞子細胞の破壊がみられた。菌糸では 20 ppm の 6 時間処理ですべての菌糸が収縮した。トウモロコシ黒穂病菌小生子では 20 ppm の 3 時間処理で細胞壁の部分的破壊が観察された。

以上の結果から、AC は細胞壁に作用していることが示唆された。

本研究を行なうに当たり、適切なご指導と原稿の検討を賜った松中昭一博士、助言を賜った鈴木直治博士、共同研究者深海 浩博士、上野民夫博士および実験に協力いただいた広田(現・金子)章子氏に深く感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 切貫武代司・市場常男・片山 薫: 農薬誌 **9**, 601 (1984)
- 2) 黄 耿堂: 農薬誌 **7**, 61 (1982)
- 3) A. Endo, K. Kakiki & T. Misato: *J. Bacteriol.* **104**, 189 (1970)
- 4) H. Ishizaki, K. Mitsuoka & H. Kunoh: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **40**, 433 (1974)
- 5) S. Bartnicki-Garcia & E. Lippman: *J. Gen. Microbiol.* **71**, 301 (1972)
- 6) D. Gottlieb, H. E. Carter, L.-C. Wu & J. H. Sloneker: *Phytopathology* **50**, 594 (1960)
- 7) D. Gottlieb & P. D. Shaw: *Ann. Rev. Phytopathol.* **8**, 371 (1970)
- 8) 梶川 彰・渡部忠一・阿久津克己・黄 耿堂・見里朝正: 農薬誌 **9**, 709 (1984)
- 9) S. Gunji, K. Arima & T. Beppu: *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2061 (1983)
- 10) B. W. Coursen & H. D. Sisler: *Am. J. Bot.* **47**, 541 (1960)
- 11) Y. Hisada & Y. Kawase: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **43**, 151 (1977)
- 12) K. Kakiki & T. Misato: *J. Pesticide Sci.* **4**, 129 (1979)