

綜 説

Plant Virus Inhibitors. Naoji Suzuki (Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe) *Botyu-Kagaku* 35, 153, 1970.

抗植物ウイルス剤 鈴木直治 (神戸大学農学部 神戸市)

1. はじめに

Bawden (1954) が植物ウイルス阻害剤について、Matthews (1955) が化学療法剤について、総説を書いた頃は1940年代後半から始められた研究が暗中模索的であったにしても、将来を期待したものであったことはまちがいない。しかし、その後20余年を経た現在までに研究は数多く行われたが、実用化されたものは一つもないといってもよい。その理由は主に次の2点にある。(1)選ばれた抗ウイルス剤は同時に宿主の核酸、タンパク質代謝をも阻害する、(2)たとえ薬害を伴わなくてもその効果の持続期間が短かく、それを過ぎるとウイルスの増殖はもとに戻ってしまう。(1)の例は 8-azaguanine, 2-thiouracil, formycin B (laurucin, ohyamycin), cycloheximide などであり、(2)の例は blasticidin S である。このような結果を招来したのは今までの抗ウイルス剤のスクリーニングの方法に欠陥があったためと思われる。それは抗ウイルス効果の検定に重点をおき、宿主の核酸、タンパク質代謝への影響を同時に知るということを怠っていたことである。この意味で現在は抗ウイルス剤開発を志すものにとって重大な反省期であり、今後の研究はたとえ試行錯誤はあるとしても、可能性のある方向を見定めて行うべきであり、そのためのスクリーニングの技法も改められなければならない。ここでは従来の研究を展望した上で今後抗ウイルス剤の開発の可能性はどこにあるかを考えてみたい。

なお今までに抗植物ウイルス剤については Bawden¹⁾, Matthews²⁾, 下村・平井³⁾, 平井⁴⁾, 平井・野口⁵⁾, の総説がある。合成化合物の抗ウイルス作用については由岐⁶⁾, スクレオシド系抗生物質については Fox⁷⁾らを参照されたい。

2. ウイルス感染、増殖の諸過程と対応する阻害剤

植物ウイルスの感染から宿主細胞内で増殖するまでの過程とそれぞれに対応する阻害物質は次のようになる。

(1) 植物表面への吸着 (レセプター仮説) …感染阻害物質

(2) 細胞内へのとりこみ…?

(3) 脱外皮→ウイルス RNA と宿主細胞リボソームによるポリソーム形成…インターフェロン様物質とそ

の誘起物

(4) ウイルス特異的タンパク質(レプリカーゼ, 外皮タンパク質, その他の酵素)…puromycin, blasticidin S, cycloheximide などのタンパク合成阻害剤。

(5) ウイルス RNA の複製…プリン, ピリミジン類似物質, アルキル化剤, 色素など。

(6) ウイルスの成熟…?

以上のうち、研究の歴史からみると(1)がもっとも古く、次いで(5), (4)と進められ、(3)は最近のものである。

3. 感染阻害物質

Bawden¹⁾ によると植物ウイルス阻害剤は大きく(1)感染阻害物質と(2)ウイルス増殖阻害物質に分けられる。両者の区別は検定方法のちがいによるもので、(1)は塗抹接種に際し、ウイルス接種と同時にまたは以前に施して効果を検定する、(2)は接種後に施して効果を検定する、ことによるだけのものである。

a. 高等植物が含む感染阻害物質

ウイルス感染植物の汁液を用いて塗抹接種する際、ある種 A から A へは移しうが、異種 B には感染をおこせない、またはおこしにくい、という現象から、A には B に移すための阻害物質が含まれている、という推論に立脚して研究が進められた。この際 A から A へは移しうるのだから阻害物質はウイルスと直接作用するのではなく、B という宿主を介して阻害する、ということは容易に考えられる。このような研究は古く Allard^{8,9)} から始まった。ヤマゴボウの1種 *Phytolacca decandra* のモザイク症状を示す植物の汁液は同種の健全な植物へは塗抹接種で感染をおこせうるがタバコへは成功しない。Doolittle¹⁰⁾らはキュウリモザイクウイルス (CMV) を *P. decandra* からアブラムシを媒介虫としキュウリに移すことに成功したが塗抹接種ではキュウリへ移しえなかった。Duggar¹¹⁾は *P. decandra* の汁液をタバコモザイクウイルス (TMV) に加えるとタバコへの感染が阻害されることをみた。このほか多くの植物で阻害効果を試みたが *Datura stramonium* が同様な効果を示した。

以上の実験は局部病斑法を採用する以前のものであるから感染の完全阻害の効果しか見出せない (局部病斑数が何%低下したという表現ではない)。

この阻害物質はエタノール沈澱、珪藻土吸着、10% 食塩溶離によって単離された。N 14~15%, 炭水化物

8~12%を含む糖タンパク質であって TMV と *in vitro* で結合し pH7~4 で TMV と反応し紐状のパラクリスタルを作って沈澱させる。その作用はウイルスと直接反応して不活性化させるのではなく、宿主細胞上のなんらかの部位(レセプター)でウイルスと競合することにあるらしい(Kassanisら¹²⁾)。

ホウレンソウの汁液は2種類の感染阻害物質を含み、1種は *Nicotiana glutinosa* 上で TMV の感染を阻害せず cabbage black-ring spot virus のタバコに対する感染を阻害する低分子物質(煮沸、エタノール耐性、セロファン膜透過性)で、他の1種は TMV の *N. glutinosa* への感染を阻害するタンパク質である(70°C; 95%アルコールで失活、pH3.0以下または9.5以上で失活、セロファン膜を透過しない(Kuntzら¹³⁾)。

カーネーションもまたタンパク質の阻害物質をもっている。カーネーション汁液は TMV、タバコえ疽ウイルス(TNV)など14種のウイルスの塗抹接種による感染を阻害する。ウイルスと同時に汁液を施せば感染は全く阻害しない。ウイルスと阻害物質とは試験管内では結合しない。したがって阻害は葉の表面近くにある感染に不可欠な場をふさぐことにある(Ragetli¹⁴⁾)。阻害物質は汁液を66,000×gで2~3時間遠沈した上清をろ過して脂質を除き、0°Cで48時間透析し、内液をCMセルロースカラムからpH勾配(6.1→7.0)次いでリン酸緩衝液pH7.0の濃度勾配(0.02→0.2M)で溶離して精製した(Ragetliら¹⁵⁾)。この物質は14種のアミノ酸を含み(含硫アミノ酸を欠く)、阻害活性はタンパク質のなかのリジンのもつε-アミノグループにあるらしく、TMVの感染の初期段階で吸着に必要な場を競合的に占拠すると考えられる(Ragetliら¹⁶⁾)。

Ragetli¹⁶⁾のこのような仮設は van Kammenら¹⁷⁾によつて支持された。彼らは *N. glutinosa* 上に形成される病斑数と接種した TMV の濃度との関係曲線を阻害物質の存在する場合としない場合とで比較し、その結果が Langmuir の吸着説に基いた理論式によく適合することからレセプターの場合における TMV と阻害物質との競合がおきると説明した。

Chenopodium 属植物も感染阻害物質を含んでいる¹⁸⁾。TMV に感受性な植物8種の汁液を TMV と混ぜて *N. glutinosa* または *N. tabacum* に塗抹接種するとほとんどすべての植物の汁液が感染阻害をおこすがとくに *C. album* の効果が高い(局部病斑数で90%以上阻害)。活性は100°C10分で失活、活性物質はセロファン膜不透過、50%エタノール、硫酸50%飽和で沈澱、TMV との混合物を稀釈すると TMV の感染力は回復する。接種と同時に施すと阻害効果は高いが、接種後1, 3, 5日後に施すと効果は減退する(Yoshizakiら¹⁹⁾)。Sakoら²⁰⁾はシロザ汁液を遠心分離した上清より

アセトン沈澱、透析、硫酸40~50%沈澱、DEAE-, SE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより阻害物質を単離した。糖タンパク質であり、trypsin, pronase P, nagase 処理でも活性は影響されないのが活性は糖部分にあると推定した。接種前48時間、後30分の施用で感染阻害効果は顕著である。阻害効果は *N. glutinosa* 対 TMV で高く、シロザと同属の *Chenopodium amaranticolor* に対しては低い。この結果は従来いわれたように、阻害物質の作用はウイルスには特異性なく、植物に対しては同種(または同じ阻害物質を含んでいる近縁種)には効果が低い、ことを示している。また、アブラムシ接種ではこのような阻害物質は作用する場がない。この場合はアブラムシが吸汁に際して細胞縫合部に口吻を挿入し、その途中で原形質連絡系に接触して感染を起すであろうが、表皮に塗抹接種するときは付傷によりクチクラが破れ ectodesmata が露出し、これがレセプターの場合になり阻害物質がウイルスと競合するであろう、という仮設が提出された(吉井ら²²⁾)。

エクトデスマータははじめ Lambertz²³⁾により表面に連なる原形質連絡と解釈されたが Brants²⁴⁾によりその識別方法が改良され(昇汞を飽和させたアルコール・酢酸・硝酸・ホルムアルデヒド溶液で剥いだ表皮を固定し、硫酸酸性 methylviolet 溶液で染色して暗紫色となる)、Thomasら²⁵⁾により接種葉に生じた局部病斑数とエクトデスマータ数とがよく比例し、植物の抵抗性を低下させるような処理をするとエクトデスマータの数も増加するがもともと罹病性な品種ではこのようなことはおきないことが示された。

タンパク質または糖タンパク質系の植物由来感染阻害物質はこのほかにも多く知られている。例えば *Phytolacca americana*, サボニン反応陽性物質、吉田・須田²⁶⁾; キュウリ, Sillら²⁷⁾; ツルナ, Benda²⁸⁾; トウガラシ, 平井²⁹⁾; McKeen³⁰⁾; イネ, Kahnら³¹⁾; タバコ, Zaitlinら³²⁾; サトウダイコン, Ruppel³³⁾; クロマツ, 田村³⁴⁾, などである。なお化学的性質は不明であるが植物汁液で TMV 感染を阻害するものとしてゲンノショウコ, チャツバキ, イスノキ, ザクロ, ニワトコ, サルスベリ, シマウリカエデ, タラノキ, トチノキ, ハリエンジュ, クロマツなどがあげられている³⁵⁾。

以上を通覧して、植物由来の感染阻害物質はタンパク質または糖タンパク質であり、その効果は異種植物の上でのみ現われ、昆虫媒介では効果を現わす場がなく、その作用は植物表皮上におけるレセプター上でウイルスと競合することにある、といえよう。レセプターがエクトデスマータそのものかどうかはまだ仮説の域を出ない。予防効果としては極めて顕著であり、持

続期間に問題はあるとしても、実用化されないのは不思議であり、実的にはむしろスキムミルクの方が先行しているように見える(後述)。

b. かび類の生産する感阻阻害物質

Gupta ら³⁶⁾ はかび類49種のうち40種の培養濾液が TMV, TNV, および southern bean mosaic virus の感染を阻害したという。そのうち *Trichothecium roseum*, *Neurospora sitophila* の濾液がもっとも強力であった。*T. roseum* の生産する阻害物質は高分子であるがタンパクではないと推定した。Bawden ら³⁷⁾ は *T. roseum* の生産する阻害物質の一つは trichothecin であり、他は 60~70% の還元糖とし 1.1~1.4% の窒素を含む多糖質であり、糖としてはガラクトースが多く、阻害作用の主力を担っているという。この多糖質は TMV の *N. glutinosa* への感染は阻害するが *N. tabacum* への感染は阻害しない (Gendron ら³⁸⁾)。Gupta³⁹⁾ によるとこの物質はウイルスに直接作用するのではなく宿主植物に作用し(若干は滲透するらしい)、その感受性に変化を与えるらしい。

多糖質感染阻害物質は酵母からも (Takahashi⁴⁰⁾)、*Aspergillus oryzae* (Yoshizaki⁴¹⁾) からも得られている。前者は塩酸分解により 85% の、後者は 65% の還元糖を生ずる。TMV と混合して、あるいは TMV 接種直後に施せば効果が高い。TMV と阻害物質との混合物を稀釈すると TMV の感染力は回復するから TMV との直接作用はない。

培養濾液ではないがブクリョ、チョコレイの熱湯浸出物も TMV と混合して *N. glutinosa* への感染を顕著に阻害する(局部病斑数で 99%)。有効成分は水に可溶、エーテル、エタノールに不溶~難溶、タンニン反応陰性であるが化学的諸性質は十分明らかでない(須藤ら⁴²⁾)。

c. 各種のタンパク質

Bawden⁴³⁾ らは TMV 蛋白を接種源に加えると感染を阻害するという。この作用は非特異的であり、添加するタンパク質が高濃度のときに認められる。またウイルスと無関係な牛血清アルブミンでも同じ効果がみられる (Stantilli⁴⁴⁾ ら)。ウイルス・タンパク質や牛血清アルブミンを TMV や TMV-RNA に加えると $10^2 \mu\text{g/ml}$ から感染阻害がおき、 $5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ では完全に阻害する。ただし、TMV タンパクと牛血清アルブミンは $10^2 \mu\text{g/ml}$ 以下の添加では TMV の感染力を増強する。卵白アルブミン、凝集 TMV タンパク質では低濃度で感染力増強効果はない⁴⁵⁾。

Stahmann⁴⁶⁾ のリシンポリペプチドは塩基性の故に TMV の酸性グループと結合し、複合体を作って TMV の感染性を不活化する。Steapsin (lipase), trypsin, RNase など TMV のインゲンに対する感染を阻害

するが酵素活性によるのではなく、タンパク質として競合するためである⁴⁷⁾。

d. 牛 乳

Fulton⁴⁸⁾ は TMV, ジャガイモウイルス X, CMV, タバコ輪点病ウイルスに対して *Phytolacca decandra* 抽出物, トリプシン, ミルク, 牛血清, *Aspergillus niger* 代謝産物が感染を阻害することを報告した。同年と翌年にニュージーランドではミルクやタンニンの散布がタバコ子苗の TMV 感染に予防効果の高いことを報告している⁴⁹⁾。その後スキムミルクやホエー(whey) が *N. glutinosa* 上で TMV による病斑形成を抑制することは多くの人々により報告された^{50), 51), 52)}。また圃場に散布しても TMV 感染を減少させる⁵³⁾。スキムミルク, ホエーは barley stripe virus の圃場での拡大を抑える⁵⁴⁾。牛乳組成のうち, カゼイン, ホエーは阻害力強く, lactoalbumin, α -lactoglobulin, β -lactoglobulin は弱い。牛血清成分中 α -, β -globulin は強く γ -globulin, fibrinogen, albumin は弱い⁵¹⁾。阻害力の弱い成分でも pH 10.0 以上では効果が高い⁵²⁾。牛乳成分の阻害力は新鮮スキムミルク > 新鮮全乳 > 凍結乾燥スキムミルク > ホエー > 加熱乾燥スキムミルクの順となる⁵⁵⁾。barley stripe に対しスキムミルクは低コストで実用的である⁵³⁾。

4. インターフェロン様物質とその誘起物質

インターフェロンは初め Isaacs⁵⁶⁾ により “ほ乳動物の細胞内でウイルス感染に反応して生産される抗ウイルス性物質でタンパク質かポリペプチドである; 感染したウイルスとは抗原性がちがう; 多くのウイルスに対してその増殖に対し抵抗力を与えるように作用する” と定義された。pH 2.0~2.5 で透析してウイルスタンパク質や他のタンパク質は沈澱してもインターフェロンは活性を失わない。亜鉛で沈澱される (Lampson ら⁵⁷⁾)。生きたウイルスのほか不活化したウイルスによっても誘発される。ほ乳動物におけるこのような現象が植物でもおきるかどうかは疑問があるが、Ross, Loebenstein 一派はこれに似た現象があると主張している。

植物がウイルス感染によって獲得免疫を生ずることは多くの報告がある。Weintraub ら^{58), 59)} はカーネーションの二つのクローンが CMV 接種によって局部病斑を生じたが、同じ株の上方の接種しない、まだ病徴がでていない葉に接種しても病徴を生ぜず、その葉からウイルスが分離されなかったと報告した。健全植物・感染無病徴植物・感染病徴発現植物の間で接木して防禦効果の移動を調べ、防禦物質は本体は不明であるが完全に接木が成立すると両者間に移動すると結論した。Ross⁶⁰⁾ も初め局部的な獲得免疫性を見、続いて免

疫性は滲透的に全身にゆきわたると報告した。TMV に過敏性な品種 Samson NN に TMV を接種して生じた局部病斑の周囲 1~2mm の範囲は再接種に対し高度の抵抗性を示した。抵抗性部分の発達は湿度、照明には無関係であるが 30°C 付近では抵抗性は生じない。ジャガイモ X ウイルス (PVX) を接種しても同様である。この抵抗性はウイルスに対する特異性はなく、TMV 感染による局部病斑の周囲は TNV, タバコ輪点ウイルス (TRV), トマト輪点ウイルス (TORV), turnip mosaic virus (TMV) にも抵抗する。このような抵抗性は単に局部だけにとどまらず、滲透的に拡大する。すなわち、Samson NN の半葉に TMV を接種し 7 日後に反対側の半葉に TMV を接種すると病斑数もへり、病斑茎も $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ となる。下葉に接種して 2~3 日後に上葉に接種すると抵抗性の増加が検知され、抵抗性は 7 日目に最高となり、20 日間は持続する。抵抗性増加は接種前後を 20°C に保つと最高で、初めの接種面積を増しても完全な防衛力はえられない。抵抗性は TMV に対してだけではない。

翌 1962 年に Sela ら⁶¹⁾は抵抗性を獲得した植物から抗ウイルス性物質 (antiviral factor, AVF) を分離した。ジャガイモウイルス Y (PVY) と TMV は水和リン酸カルシウムゲル (HCP) に吸着される。PVY 感染 *N. tabacum* var. Samsun の汁液を HCP で処理してウイルス粒子を除くと残った汁液は非感染性で AVF を含む。これを数回くり返して透明な液をうる。この液は TMV, PVY の感染力を低下させる。TMV, PVY の何れを接種しても AVF ができる。できた AVF は施した植物に非特異的に有効である。TMV を *N. glutinosa* に接種して生じた AVF は DEAE セルロースカラムから 0.56~0.58M NaCl で溶離される⁶²⁾。この物質はタンパク質と RNA とを含んでおり、ウイルスと混合して接種すれば (*Datura stramonium* に) 効果が高く、ウイルス接種後に AVF 処理してもウイルス濃度を著しく低下させるから作用は組織内部である。①ウイルス感染により生産され、②抗ウイルス性あり、③細胞から細胞へ拡散し、④ウイルス特異性がない (この点が少しちがう) という点で Isaacs のいうインターフェロンと似ている、と Sela⁶³⁾ はいう。しかし、Sela⁶⁴⁾ の次の報告では AVF はタンパク質部分に活性がなく、RNA に活性があると結論している。しかもその RNA は RNase (4 μ g/ml, 37°C, 2分) 処理で活性を失うという。Isaacs のいうインターフェロンはタンパク質であるから、前報でいったことは誤りであったということであろう。Kimmins⁶⁵⁾ も同様に感染阻害効果は RNA 分画にあり、RNA のなかでも 3S-RNA が他の RNA 分画よりも効果が高いという。

Loebenstein⁶⁶⁾ も *Datura stramonium* に TMV,

Gomphrena globosa に PVX を、葉の下半分に接種し、4, 6, 8 日後に上半分に同じウイルスを後接種すると病斑数が $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ に減少することをみた。D. stramonium の葉の下半分を TMV 接種して上半分から得た汁液から透析、アニオン交換セルローズを用いて部分的に干渉性物質が分離された。これはタンパク質らしく、ウイルス特異性はなく、ウイルスと試験管内では反応しない⁶⁷⁾。この物質は pH2.5 で透析、0.02M 酢酸亜鉛で沈澱、pH2.5 で溶出、pH6.0 で透析、25,000 \times g 遠沈の上清にくる。分子量 30,000 以下のタンパク質らしい、pH2.5 で安定、試験管内でウイルスとは直接反応しない⁶⁸⁾。

Yoshizaki⁶⁹⁾ も同様な現象をみている。彼の用いた TMV の變直系はインゲン (大手亡) の初生葉には明らかな感染は起さない。この系統を TMV 普通系と混合して接種すると普通系の感染を 90% も阻害する。變直系を接種したインゲンの葉 (1, 3, 5 日目) からは感染阻害物質がえられる。いずれの系統でも紫外線照射で不活化したものを接種すると同様な阻害物質が得られる。彼はこれをインターフェロン様物質とっているが物質として検討はしていない。

Sela, Loebenstein は Ross の一門と思われるが、AVF または干渉物質の本体につき前者は RNA といい後者はタンパク質と考えている。さらに Loebenstein⁷⁰⁾ は熱で殺した *Pseudomonas syringae* の細胞をタバコ Samsun NN の細胞間隙に注入して 0~7 日目に接種して病斑数が著しく減少することを報告している。その効果は磨砕物を遠沈した上清よりも破壊した細胞片を含む部分の方が高いという。以上を通覧して、ウイルスまたは不活化したウイルス感染によって全身的な免疫性がおきるのは本来宿主植物が抵抗性である場合に明確であり、それが感染によって誘導され新生された物質によるらしい、その物質は体内を移動できる、ということは確からしい。その物質がほ乳動物でいうインターフェロンと同様であるかはまだ疑わしい。また、インターフェロンそのものを利用する方途は立っていない、むしろ、何がそれを誘発するか、に問題が移ってきたように思われる。

動物ウイルスの領域ではインターフェロンそのものを臨床的に利用することは期待薄なのでむしろそれを誘起する物質 (inducer) に注意が向けられた。Shope⁷¹⁾ によって *Penicillium funiculosum* から抽出された helenine がインターフェロン誘起物質としての性質をもつことから Lampson⁷²⁾ らはこの物質をタンパク質と核酸に分け活性はむしろ核酸にあること、その核酸が 2 本鎖 RNA (ポリ I-C) と、2 本鎖として知られた reovirus RNA が同様な効果をもたらすことから “ウイルス感染で生成される 2 本鎖 RNA、または未感染

細胞に新たに導入された (foreign) 2本鎖の核酸 (RNaseに抵抗性な), がインターフェロン誘起物質として必要な条件である”, と考えた。2本鎖RNAは1本鎖RNA ウイルスの場合でも増殖過程で複製型 (RF) または複製中間型 (RI) として存在することはよく知られており, 実際にTMV, TYMではその核酸の全長がRFの状態で存在することが電顕像で与えられている^{73), 74)}。はじめから2本鎖をもつウイルスとしては reovirus⁷⁵⁾ のほか wound tumor virus,⁷⁶⁾ イネ萎縮病ウイルス⁷⁶⁾, カイコ細胞質多角体病ウイルス⁷⁷⁾, ニワトリ reovirus⁷⁸⁾, などが知られている。これらは本来の宿主以外の生物に施してインターフェロン誘起物質となることは期待できそうである。植物の場合細胞壁を通してどのようにして細胞内に導入するかに関題があるであろう。なお, インターフェロンの作用としては Joklik⁷⁹⁾ はウイルスのメッセンジャーRNAと宿主のリボソームとによるポリソーム形成を阻害すると説明している。誘起物質としてはこのほか極めて多様なものが実験されている。

5. 増殖阻害物質

ここでいう増殖阻害物質は Bawden¹⁾ がいうように, 感染がおきたのちに施してウイルスの増殖を阻害する物質である。前節でのべたインターフェロン様物質もそれがウイルスと同時に施して試験されたためあたかも感染阻害物質のようにみられたが, その作用が細胞内でおきるものであれば増殖阻害物質にいられるべきものである。阻害の機作が不明確である段階では感染一, 増殖阻害物質の区別は便宜的に実験の方法によらざるをえない。

増殖阻害物質の検定はTMVとそれに全身感染性宿主であるタバコ品種との系で行われるのが普通である。多くの研究はタバコの葉にTMVを接種し, 水洗し, それからコルクボーラーでディスク (径12mm) を打ち抜き, それを被検薬剤を入れたシャーレ内の液に浮かべ, 蛍光灯照明下 (多くは連続, 時に明暗交代), 25°C, 5~6日おいてディスク内のTMVを定量し, 対照区におけるTMVの増殖状況と比べて何%阻害されたかを表示する。下村ら⁸⁰⁾ はディスク20枚 (6g) を用い, TMVの定量には Bancroft ら⁸¹⁾ の方法を谷口⁸²⁾ が改良したものをを用いている。なお浮かせたディスク内でのウイルスの増殖と用いた葉 (チオウラシル) の阻害効果は照明下の方が良いと Nichols⁸³⁾ はいうが, Bawden⁸⁴⁾ らは光の効果もあるがそれよりも浮遊液からディスクに栄養を与える効果の方がはるかに大きいという。下村・平井の一連の試験では連続照明, 水浮遊法を用いている。

このほか, 土壌から連日施す方法, 地上部に散布す

る方法, 茎にバンディングする方法などいろいろな方法がとられている。

a. プリンピリミジン類似物質

プリン, ピリミジン類似物質については Matthews ら⁸⁵⁾ が1955年までの研究成果を詳しく総説している。数多くの類似化合物が扱われたが, 特によく研究されたのは 2-thiouracil (2-TU) と 8-azaguanine (8-AG) とである。

Commoner と Mercer^{86), 86)} はタバコ接種葉ディスク浮遊法で2-TUが $43 \times 10^{-6} M$ で完全にTMVの増殖を阻害する, その阻害作用は uracil の添加で一部回復されると報告した。2-thiocytosine, 2-thiothymine, 2, 6-diaminopurine, 8-azaguanine もTMV増殖阻害効果があるが 5-bromouracyl, 6-hydroxyuracil, 6-methyl-2-thiouracil, 6-propyl-2-thiouracil はTMVに効果はない, thiopyrimidine に対して uracil は拮抗するが cytosine, thymine は拮抗しない。したがって thiocytosine, thiothymine は uracil を必要とする代謝過程に阻害的に作用するらしい⁸⁷⁾。TMV に対する 2-TU の阻害作用は uracil により拮抗されるが adenine, cytosine, guanine, には拮抗されない。2-TU の効果は TMV 接種前に施すと大きく, 感染後の施用では効果が低く, 2-TU を除くと増殖は元に戻る⁸⁴⁾。TMV, PVX, PVY, henbane mosaic virus, TNV に阻害的であるが TNV-インゲン, broad bean mottle virus—ソラマメには無効である。lucern mosaic virus—タバコ, 同ウイルス—*N. glutinosa* にもきかない⁸⁸⁾。ディスク浮遊法ではタバコ葉ディスクは黄変する程度であるが植物に散布したり, 根に灌注すると先端生長がとまり, 若い葉の急性萎凋がおきる^{84), 88)}。

施した 2-TU は果して TMV-RNA にとりこまれるだろうか。2-TU をとりこんだウイルスの感染力は低下するか。Jeener ら⁸⁹⁾ は TMV 感染葉ディスクに ³⁵S-2-TU 溶液を吸わせ, それから TMV を抽出した。TMV 収量は対照の50%であった。それから抽出した RNA は感染力をもっていた。その RNA を N-HCl, 100°C, 30分処理で分解し, クロマトグラフィーにかけたら 35S のすべてが thiouridylic acid (uridylic acid より Rf が6%高い) に集っていた。その放射能から計算して TMV-RNA 中の uracil の約20%が 2-TU におきかわっていた。Jeener^{90), 91)} はウラシルの54~18%が2-TUでおきかわったTMVの感染力は正常なTMVとちがわないという。Matthews⁹²⁾ は2-TUを2~3日おきに散布したタバコからTMVをとり出し, その収量は対照の50%であったがそのRNAに2-thiouridylic acidは見つけられなかったという。Francki⁹³⁾ は浮遊法で2-TU処理したタバコ葉からと

った汁液で感染力をみると TMV 粒子の 80% は感染力を失っているように見えるが粒子を純化してみると 2-TU 処理葉からの TMV の感染力は対照と比べて左程低下していないという。同じ方法で 2-TU 処理した葉からとった TMV の RNA 中には 2-TU は 2-thiouridylic acid でのみ存在し、2-thiouridine, 2-thiouridine-3'(2'), 5'-diphosphate) は検出されない。遠心分離上の測定では処理した粒子と正常粒子とでちがいはない、³⁵S-2-TU とりこみ量と感染力の低下とは相関がある⁹⁰⁾。turnip yellow mosaic virus (TYMV) 感染ハクサイの葉を 2-TU で処理すると TYMV-RNA へは検出できるほどの 2-TU はとりこまれていない。ウイルス生産は抑制されるが、できたウイルスの感染力は影響されない。接種 5 日後以降処理するとウイルスの空の殻 (RNA を含まない) が増加し (無処理葉にも空の殻はある)、その無処理葉に比べて過剰な量に相当する遊離の RNA の蓄積はおきていない⁹¹⁾。

2-TU は多くの植物ウイルスの増殖を阻害することはまちがいない。ウイルス RNA にとりこまれるかどうか、とりこんだウイルスが感染力を低下させるかどうか、は確定的にはいえないようである。しかし、葉害を生ずることは確かで、精力的に研究されたにもかかわらずこの理由で実用化は困難である。

8-azaguanine は 0.1% NaHCO₃ 中に 0.01M の濃度で数種ウイルス感染葉に散布すると全身感染微病の発現を著しく、あるいは完全に、阻害する⁹⁰⁾。最も効果のあったのは lucern mosaic virus—*N. glutinosa*, TMV—キョウリ, TMV—*N. glutinosa*, CMV—*N. glutinosa* である。その効果は接種前または接種 2 日後までに施した場合に高いがその後には低い。TYMV—ハクサイでは効果は低い、henbane mosaic virus, PVX-, PVY—タバコ, tomato spotted virus—トマト, pea mosaic virus—エンドウでは効果はない。0.01M では若い葉のねじれ、矮化をおこす⁹⁰⁾。alfalfa mosaic virus, CMV には効果が高い⁹²⁾。0.01M という濃度は 2-TU に比べて著しく高い。

8-AG の阻害作用は adenine, guanine, hypoxanthine およびそれらのリボシド、ヌクレオシドの添加によって一部～完全に消されるが xanthine, 尿酸, uracil, thymine は影響しない。8-AG は処理したタバコの葉からとった TMV には 37% 未満とりこまれており、その量は接種後早く (3 日後) できる TMV には多く、遅く (14 日後) できる TMV には少ない。3 日目の TMV の感染力は 50% に低下しているが 14 日の標品では対照と差がない⁹²⁾。

8-azahypoxanthine は僅かに効果はあるが、8-azaisoguanine, dimethylamino-8-azaguanine は効

果がない。triazole のなかでは 4-(5)-amino-1H-1, 2, 3-triazole-5-(4)-carboxamide だけが効果があった。

6-chloropurine, 8-chloroxanthine, 2-aminopurine, 2, 6, 8-trichloropurine, isoguanine などはいずれもウイルス阻害濃度またはそれ以下で植物に葉害をおこす。6-methylpurine は 0.01mg/l, で 6-mercaptopurine は 10mg/l でウイルス増殖を抑え葉害も少ない⁹³⁾。このほか、2, 6-diaminopurine,⁹⁴⁾ 2-azaadenine, 6-chloropurine, 2-thiocytosine, 6-benzimidazole,¹⁰⁰⁾ 2-amino-4-methyl-6-chloropyrimidine, 2-amino-4-methyl-6-hydroxypyrimidine,¹⁰¹⁾ 2, 6-dimethyl-3-amino-4-hydroxypyrimidine, 2, 4, 6-triamino-5-phenylpyrimidine¹⁰²⁾, 2, 4-dichloro-6-(o-chloro-anilino)-s-triazine¹⁰³⁾ (殺菌剤として常用されるトリアジン) などが試験され、ある程度の効果が認められている。

ハロゲン化ピリミジンのなかでは 5-fluorouracil が 0.1% で約 50% の TMV 阻害効果を示すが同時にタバコに対する葉害も強い¹⁰⁴⁾。

b. 抗生物質

抗生物質の大部分は元来抗ウイルス剤として開発されたものではない。したがって、初期の研究は試行錯誤的であったとしても止むをえない。むしろ、いかに能率的に抗ウイルス性をスクリーニングするかが先ず問題となった。Lebenら¹⁰⁵⁾が案出した方法は cow pea に TNV を接種し、葉を切りとって葉を含んだ寒天上に葉柄を挿し、生ずる局部病斑の生成阻止または数の減少を見るものであった。これによって用いた 9 種の抗生物質から streptothricin (1 ppm) terramycin (1 ppm) と呼吸阻害剤としての KCN (0.65 ppm), NaN₃ (0.65 ppm) が飛び出された。noformycin は *Nocardia formica* の生産する抗生物質としてアメリカのメルクが開発したものであるが swine influenza virus に感染したハツカネズミの寿命をのばす¹⁰⁶⁾と報告されてから Schlegel ら¹⁰⁷⁾により TMV に対し葉ディスク浮遊法で試験され 0.001~0.005% で 73~80% 阻害すると報告された。Gray¹⁰⁸⁾ もまた 125ppm で散布して TMV, southern bean mosaic virus に 2-TU と同じ効果があることを確かめた。効果は接種数日から 1 日後の散布で高い。

cytovirin もまたアメリカのメルク社の開発したもので Gray¹⁰⁹⁾により bean mosaic virus, TMV に対して 0.5~1ppm の散布で局部病斑生成を完全に抑え、トマト、タバコに 100ppm で散布して (接種 2 時間後と 12 日後の 2 回) 全身感染を有効に抑えたと報告された。TMV—*Nicotiana rustica*, Southern bean mosaic virus—Pinto bean, で 0.5ppm, 接種後 1~5 日に散布して効果がある¹¹⁰⁾。圃場でタバコ、トマトに 100,

500ppmで散布して70%は30日後に病徴を示さず、無散布では140日後に100%発病した。タバコに5, 25, 50ppmで散布し、24時間後にウイルスに汚染した手で植物にさわったところ60日目に対照100%に対して5ppmで50%の発病でとどまった¹¹¹⁾。California Wonder pepper に散布してPVYによる感染率が低くなる。効果は塗抹接種で高く、アブラムシ接種で低い。最高の効果の濃度では葉害がある¹¹²⁾。散布時期はTMV接種後1~6時間以内がよく、接種前後24~48時間内に散布したものは無散布とほぼ同様に発病した。すなわち、感染の極く初期の散布が有効で、持続期間が短いことを示している¹¹³⁾。

下村・平井はTMVに対し多くの抗生物質を供試し有効なものとして表1に示すものをあげた。

表1 TMVの増殖阻止力を示す抗生物質 (下村・平井)

抗生物質	濃度 ppm	阻害度 %	葉害
Actidion	5	29	ややあり
Aureomycin-HCl	100	38	なし
Dextromycin sulfate	50	48	なし
Fermicidin	5	57	ややあり
Kanamycin sulfate	50	33	なし
Mitomycin C	50	30	なし
Naramycin	5	52	ややあり
Tetracyclin-HCl	200	29	なし

下村・平井らの研究で特に詳しくなされたのはブラストサイジン S(BS) である。これは抗もち剤として開発されたもので見里ら¹¹⁴⁾によりタンパク質合成阻害作用があると報告された。同じ作用をもつ典型的な抗生物質は puromycin でその構造がアミノ酸シル-s-RNAの末端構造に類似していることから注目されたものである(詳しくは Nathans¹¹⁵⁾をみよ)。puromycin は TMV に対し、ディスク浮遊法で試験して、70 μ g/ml で接種直後に施して99%増殖阻害をもたらす。接種後6時間で施すと50%しか阻害しない。ウイルスと混ぜても効果はない。90%増殖阻害を示したディスクからフェノール法でRNAを抽出しても感染性RNAは検出されない¹¹⁷⁾。

BSはディスク浮遊法でTMVの増殖を50%阻害する濃度は0.05ppmであり、0.1ppmで70%阻害となる。同様にタンパク合成阻害剤として知られた cycloheximide(actidione, naramycin), chloramphenicol, streptomycin などと比べるとBSは低温度で効果が高く、特に葉害がないのが注目される(表2)。それぞれの蛋白合成阻害の機作はちがう(詳しくは Gottliebら¹¹⁸⁾をみよ)が、特に cycloheximide は細菌、葉緑

体のもつ70sリボソームに特異的に作用し、高等植物、動物の80sリボソームには効果は低い。その他の蛋白合成阻害剤となぜこのように効果がちがうかは明らかでない。

表2 タンパク合成阻害抗生物質のTMV阻害度(平井)

抗生物質	濃度 (μ g/ml)	阻害度 (%)	備考
Actidione	5	29	タンパク合成阻害
Naramycin	5	52	"
Chloramphenicol	200	12	" (70sリボソーム上)
Streptomycin	200	6	タンパク合成阻害
Tetracycline	200	29	"
Puromycin	100	28	"
Blasticidin S	0.1	71	"
Mitomycin C	50	30	DNAアルキル化
Actinomycin D		+	DNA依存RNA合成
Formycin B	100	81	

注: 作用機作は Cottlieb, D. et al. eds. Antibiotics, Vol. I (1967) による。+は増殖促進を示す

BSは接種後6時間までの間に施すと効果が高く、その後の施用では効果は急減する¹¹⁹⁾。接種直後にBSを施し、72時間口から6時間³²Pを吸わせ、葉の全RNAを抽出し蔗糖濃度勾配遠沈でRNA分画を分け、各分画への³²PのとりこみをみるとBSはTMV-RNAの合成を著しく阻害したが宿主RNAの合成は阻害しない。TMV-RNA合成の前にTMV-RNAポリメラーゼの合成が必要であり、BSはこの酵素の合成を阻害したものでらしい。なお平井ら¹²¹⁾は1965年までのBSに関する研究をとりまとめている。

Laurucin(formycin B, ohyamycin)もTMV増殖阻害剤として国内で開発され、TMV-RNV, r-RNAの合成を阻害し¹²²⁾アデニンの添加により阻害は消される¹²³⁾ことが報告されたが葉害のため実用化されない。

抗生物質は noformycin, cytovirin 以来植物ウイルス治療剤に期待を与えたが、その後の進展は低迷を続け、BSは低濃度で葉害なく効果をあげたが残効日数が短いため実用にいたらない。最近日高ら¹²⁴⁾も新しい抗生物質を開発したがその成果が期待される。

c. 色素

Takahashi¹²⁵⁾がTMV感染*N. glutinosa*の切りとり葉にマラカイトグリーンを吸わせてTMVの増殖が抑制されたと報告したのは1948年である。Norris¹²⁶⁾はPVXに感染したジャガイモ塊茎から出た芽条を3ppmのマラカイトグリーンを含寒天上で育てたところ16本のうち1本がウイルスのない健全な植物になったとい

う。数が少ないのが欠点であるが臨床的治療例として知られている。その後

マラカイトグリーン, エオシン B, エオシン Y, TMV-キューリ¹²⁷⁾

メチレン青, TMV-*N. glutinosa*¹²⁸⁾

中性赤, TMV-*N. tabacum*,¹²⁹⁾

中性赤, CMV-ササゲ¹²⁹⁾

中性赤, alfalfa mosaic virus-インゲン¹²⁹⁾

などで増殖阻害が報告されている。

trypaflavine (acriflavine) の 0.05% 溶液をタバコに真空浸透させると TMV の増殖が抑えられる。0.001% 溶液は TMV に対する *N. glutinosa* の局部病斑形成を抑制する。trypaflavine は TMV を試験管内で沈澱させるが透析すると TMV の活性は戻る¹³⁰⁾。acriflavine, 5-aminoacridine は TMV にあまり効果はない (ディスク法)¹³¹⁾。

これらはいずれも塩基性色素であり、多くは核酸と結合してメタクロマジンを起し¹³²⁾、アクリジン系のもは蛍光を発する。塩基性色素は通常核内 DNA の周囲の塩基性蛋白の存在により固定しなければ DNA を染色できないがシアミアクリジンは生きた細胞内でも DNA に結合して蛍光を発することができる¹³³⁾。核酸と塩基性色素との結合によって生ずるメタクロマジーンについて Bradley ら¹³⁴⁾ は図 1 のような説明を与えた。図のポリマー (P) は核酸であり ⊖ は核酸のもつ PO⁻を示す。塩基性色素 (D) が P の PO⁻に比べて少いときは色素そのものの吸収帯 (α-band) を示し、P/D 比が 1 に近づくと色素は 2 コ stacking をおこし、短波長側の吸収を生ずる (β-band)。P/D 比が 1 になると色素分子は完全に stacking をおこしてさらに短波長側の吸収を生ずる (γ-band) (図 1, A)

以上は核酸の外側に色素がついた場合であるが、核

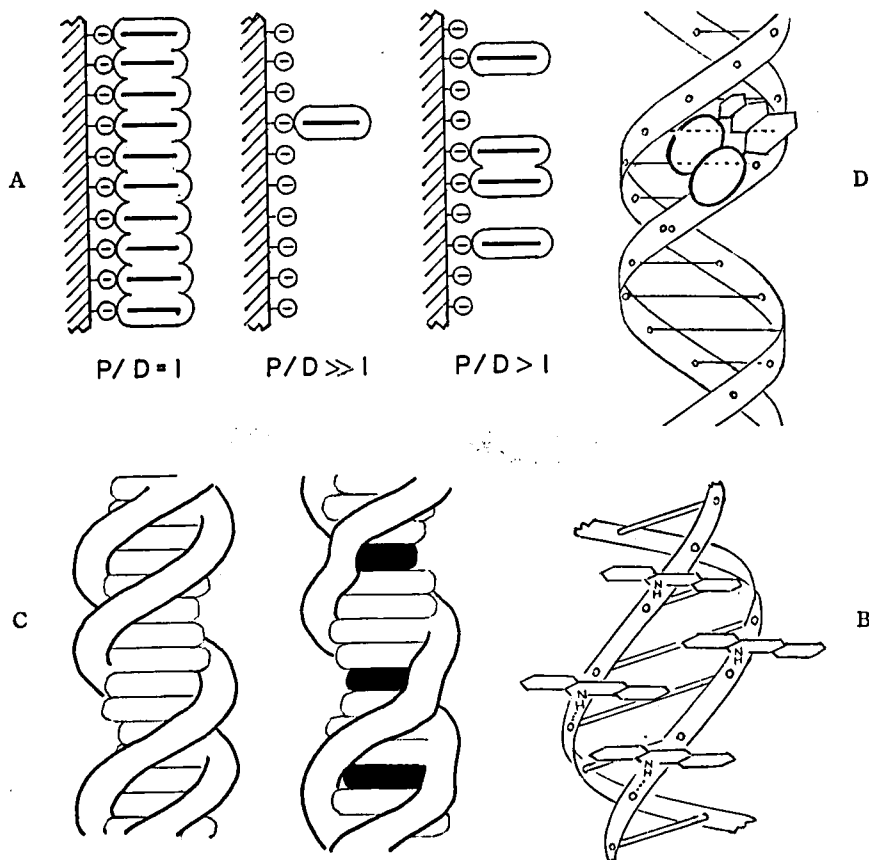


図1 核酸と色素との結合方式

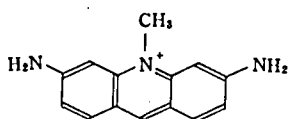
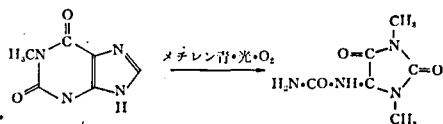
- A: Bradley の提唱した stacking
- B: アクチノマイシン D のグアニン特異的結合
- C: Lerman のいう intercalation
- D: Mason のいう stacking

酸が2本鎖であると上下2コの塩基対の間に色素が挿入される(Lerman)¹³⁵⁾。1本鎖RNAではこのようなことは起きない。このために、acridine orangeで染めるとDNAは黄緑色の、1本鎖RNAは橙赤色の蛍光を発する。reovirusの生ずる封入体がRNAウイルスであるにもかかわらずacridine orangeで黄緑色蛍光を発することから2本鎖RNAであろうとのヒントが与えられ、引火そうであった(Gomatosら¹³⁶⁾)。

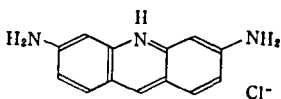
Bradleyのstacking方式は2本鎖核酸の外側につくときは色素分子の平面が完全に上下になるのではなく、やや斜上下になることが明らかにされた(Masonら¹³⁶⁾)。

methylene blueが光によってウイルスを不活化することは古くBurnet¹³⁷⁾(1933)から知られており、

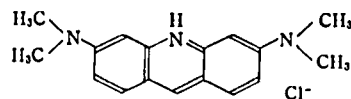
TMV-RNAが光化学的に不活性化されること¹³⁸⁾、サケDNAがアクリジンオレンジと光とによって二次構造を破壊されることも知られている¹³⁹⁾。Simonら¹⁴⁰⁾はメチレン青の核酸に対する光化学効果は光とO₂の存在が必要であり、とくにDNAのguanineを破壊する、DNAは部分的に変性する、methylene blue処理したDNAを熱変性すると1本鎖になったものが切断されていることがわかる、ことを報告した。次いで¹⁴¹⁾DNA中の塩基のうちguanineが特異的に攻撃され、guanine 1分子にO₂ 1分子が必要であり、



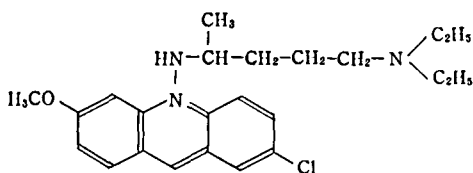
1



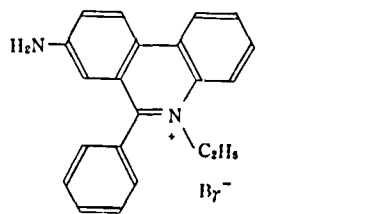
2



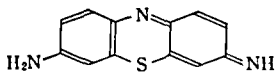
3



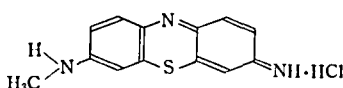
4



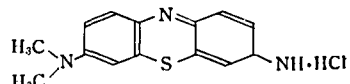
5



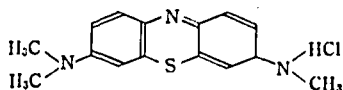
6



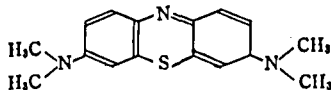
7



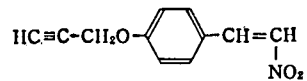
8



9



10



11

- 1 acriflavine 2 proflavine 3 acridine orange 4 quinacrine bromide 5 ethidium bromide
 6 thionine 7 azure C 8 azure A 9 azure B
 10 4-(2-propinyloxy)-β-nitrostyrene

guanosine 誘導体のうちではアニオン型の方が中性型の25倍も反応しやすいことを示した。guanine に似た theophylline を同様に処理して1,3-dimethylallantoin を得ている。

Sastry ら¹⁴²⁾は acridine orange が TMV-RNA の guanosine の光分解を触媒すると報告した。Singer ら¹⁴³⁾は TMV-RNA に対する thiopyronine (methylene blue の環内 N を CH で代えたもの) と proflavine の光化学反応を調べた。TMV-RNA 内の塩基は A 1.0, G 0.88, U 0.98, C 0.63 の比である。thiopyronine/G=0.8:1, pH7, 12時間照明で G は 0.88 から 0.52 に低下する。プロフラビンでは色素/G 比=800:1 で 0.56 となるから thiopyronine の 1/1000 の効果しかない。thiopyronine/G=8:1, 12時間照明で G は 0.14 となる。G が損失するだけで他の塩基は減少しない。RNA および感染葉を色素存在下で照明すると突然変異のおきる頻度を高める。

Ito ら¹⁴⁴⁾も acridine orange 存在下で TMV-RNA

の不活性化をみた。

2本鎖核酸である DNA に対して、その機能に影響を与える医薬の DNA との作用方式については Waring¹⁴⁵⁾が三つにまとめた。(1)塩基間に挿入されるもの (intercalation) (ethidium bromide, proflavine), (2)2本の鎖を結びつけるもの (アルキル化剤, nitrogen mustard, mitromycin C など), (3)guanine に特異的に結合して RNA ポリメラーゼを阻害するもの (actinomycin D), である。塩基間挿入をおこすものとしてプロフラビン, 2-aminoacridine と DNA との結合様式は Gersch ら¹⁴⁶⁾により, ethidium bromide については Waring¹⁴⁷⁾により, ethidium bromide と DNA との複合物の生ずる螢光については LePecq¹⁴⁸⁾により報告された。抗マラリア剤である chloroquine (無色), quinacline もまた塩基間に挿入される性質がある。DNA ポリメラーゼ活性を阻害するが DNA 依存 RNA ポリメラーゼに対する活性はそれほど強くないと報告された¹⁴⁹⁾。

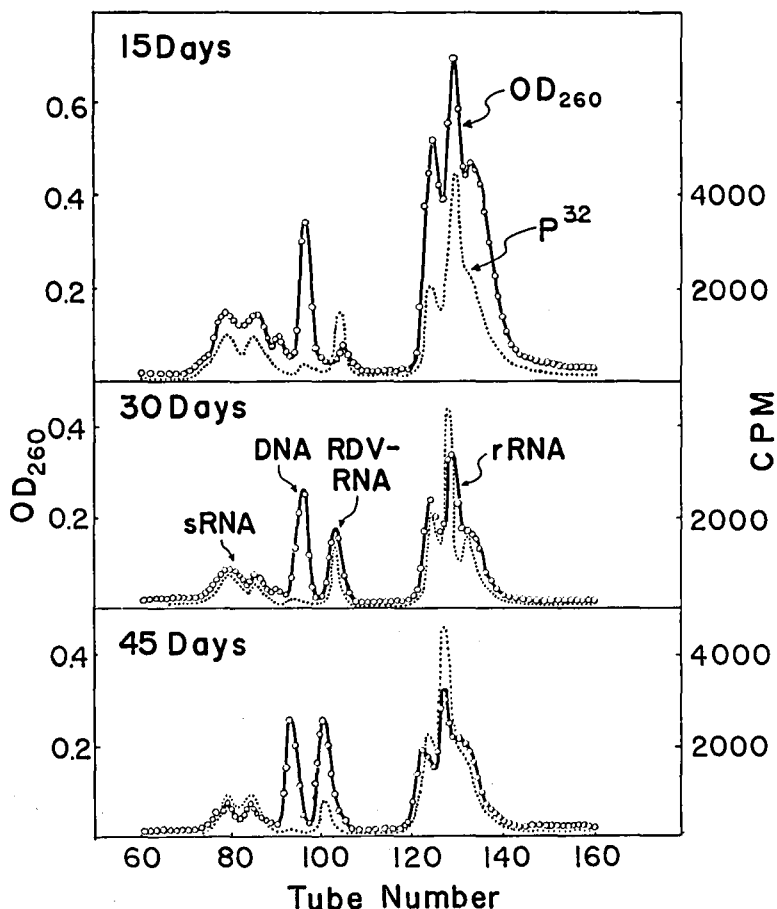


図2 イネ萎縮病罹病イネから分離した核酸の MAK カラムクロマトグラフィーによる分画 (児玉ら¹⁵⁴⁾)

2本鎖RNAの場合はアクチノマイシンDは作用しない¹⁵⁰⁾。塩基間挿入物質、アルキル化剤はなんらかの作用をもつであろう。

6. スクリーニング法：イネ萎縮病を例として

従来抗ウイルス剤は主にTMVを対象としてディスク浮遊法で行われてきた。この方法では葉液に浮かばせたディスク内でウイルスの増殖が対照に比べてどれだけ阻害されたかが明らかにされる。6日の間ディス

クは生存を続け葉害は黄変の程度で推察される。しかし、Matthews⁹²⁾がいうように、これを植物に散布すると激しい葉害を生ずる。最近安田ら¹⁵¹⁾はこの方法で citrinin の TMV に対する増殖阻害効果を証明したが、MAK カラムクロマトグラフィー法で 28S-リボソーム RNA への ¹⁴C-uridine のとりこみが阻害されることをも合わせてみている。ポリアクリルアミド電気泳動法を用いて TMV-RNA と宿主 RNA とを分け、それぞれへの ¹⁴C-uridine のとりこみを調べ、

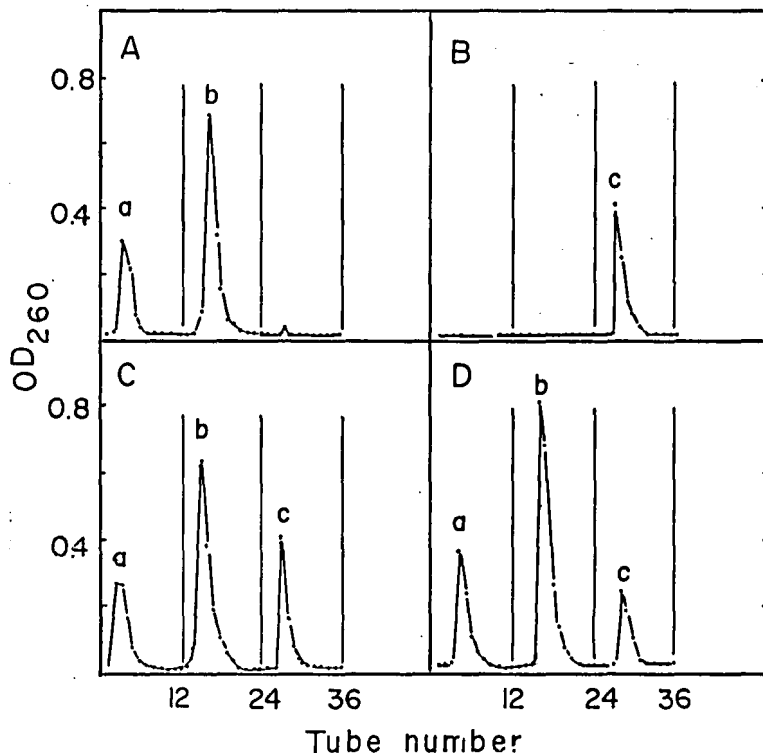


図3 イネ萎縮病罹病イネから抽出した核酸のセルロースカラムクロマトグラフィーによる分画 (児玉ら, 1969)
A 健全イネ; B ウィルス RNA; C A, B の混合; D 罹病イネ; a 35% アルコール, b 15% アルコール, c アルコールなしの緩衝液による溶出分画

表3 Blasticidin S のリボソーム RNA, RDV-RNA への ³²P とりこみにおよぼす効果

濃度	水分吸収 ml/24hr/1g	BS 吸収 μg/24hr/1g	cpm/ 全核酸	cpm/OD ₂₆₀	
				リボソーム RNA	RDV-RNA
0	1.18	0	23.080 (100)	1120 (1 : 0.52)	585
2	1.28	3.3	36.980 (160)	1510 (945)	600 (375)
4	1.75	8.6	52.230 (227)	2200 (970)	580 (256)
8	1.53	10.5	53.990 (233)	2050 (850)	740 (315)

citrinin の処理により両種 RNA へのとりこみが阻害されているという。この方法はウイルスだけでなく、宿主核酸への影響を同時に調べた点に進歩がある。Hiraiら¹²⁰⁾も蔗糖濃度勾配遠心法で TMV-RNA と宿主 RNA とを分けているが、24,000rpmで16時間を要している。

イネ萎縮ウイルス (RDV) は2本鎖 RNA であるために MAK カラムクロマトグラフィーで宿主 RNA と明確に分離され、定量される¹⁵²⁾(図2)。また、Franklin¹⁵³⁾のセルローズカラム法でリボソーム RNA と RDV-RNA とが分画される¹⁵⁴⁾。罹病イネの頂葉と第2葉とを切りとり、4~5本合せて 2g とし、薬剤を ³²P-リン酸を含む溶液に24時間浸けておき、RNA を抽出し、セルロースカラムクロマトグラフィーでリボソーム RNA (r-RNA) と RDV-RNA とを分け、それぞれの OD₂₆₀ と ³²P の放射能を測定し、cpm/OD₂₆₀ を算出し、“³²P の r-RNA へのとりこみは阻害せず、RDV-RNA へのとりこみを阻害する”ような薬剤を扱ひ出せば、薬害がなく、ウイルス増殖を阻害するようなものを扱ひ出す可能性が高い。さらに、これを水耕した罹病イネに吸わせて少くとも病徴の一部が回復される(例えば伸長成長の正常化)ことを試す(方法の詳細は鈴木¹⁵⁸⁾を参照されたい)。この方法でタンパク質合成阻害物質として知られた blasticidin S, cycloheximide, kasugamycin, 塩基間挿入をする色素(予め生体染色で封入体を染めるが核を染めないことを確かめる)として azure B, ethidium bromide (核染色性)などを試験した例を表3, 4に示す¹⁵⁷⁾。

orange, acriflavine も効果はあるが核を染色するから突然変異をおこす危険性を含む。

表4で示されるように、cycloheximide は RDV-RNA 合成阻害は顕著であるが平行して r-RNA の合

表4 各種薬剤の r-RNA, RDV-RNA への ³²P とりこみにおよぼす効果

薬 剤	濃 度 ppm	cpm/OD ₂₆₀	
		r-RNA	RDV-RNA
Cycloheximide	0	1326 (1:0.53)	705
	1	536 (1:0.72)	389
	2	438 (1:0.51)	226
	4	435 (1:0.52)	225
Kasugamycin	0	1590 (1:1.03)	1640
	80	1400 (1:0.77)	1080
	160	940 (1:0.38)	360
Azure B	0	1540 (1:0.81)	1250
	20	1651 (1:0.61)	1000
	40	1662 (1:0.48)	800
	80	1817 (1:0.34)	672
	160	1254 (1:0.47)	595
Ethidium bromide	0	2730 (1:0.61)	1810
	10	2800 (1:0.42)	1200
	20	2260 (1:0.42)	940
	40	1770 (1:0.48)	860
Actinomycin D	0	1350 (1:0.61)	830
		1480 (1:0.73)	1090
	10	1675 (1:0.54)	909
		1970 (1:0.49)	910
	20	1103 (1:0.80)	910



図4 萎縮病罹病イネ水耕液にアズール B を加えたときの伸長促進 (鈴木, 未発表)
左より無添加, アズール B 3ppm, 同 6ppm, 同 12ppm.

成も阻害する。実際に水耕液に加えると 2ppm では 24 時間で枯死する。1ppm では外部形態の上では効果はみられない。

blasticidin S は生長促進効果はない。kasugamycin は 40ppm で水耕液に施して根の生長を著しく促進するが地上部の伸長には効果を示さない。azure B は 3, 6ppm で根から吸収させると伸長生長を著しく促進する(図 4)。感染初期に 6ppm で 3 週間処理すると低率ではあるが全く無病になることがある。azure B 30ppm は根の生長を著しく害するがこれに kasugamycin 40ppm を添加すると阻害はなくなる。

azure B と近縁な化合物のうち、thionine, azure C はイネの生長を阻害する。azure A, methylene blue はイネの生長は阻害せず、むしろやや促進的であるがウイルス核酸阻害効果は azure B に劣る。構造上の僅かのちがいが効果の上で大きなちがいをもたらすことは興味深い。

azure B が封入体を赤—紫—青と鮮やかなメタクロマジーを示して染色し、これがウイルス RNA との stacking—intercalation によることは鈴木ら¹⁵⁹⁾により報告された。この色素は生体染色では封入体を染めるが核は染めない。

イネ萎縮病を用いる場合はこのようにしてウイルスの RNA 合成阻害の効果を見ると同時に宿主の DNA 依存 RNA 合成に阻害があるか、ないか、を見ることができ。

7. おわりに

抗植物ウイルス剤の研究は古い。それはある罹病植物の汁液をちがった種類の植物に塗抹接種すると感染がおきないという現象からヒントを得て、初めの植物の汁液中にはなんらかの阻害物質が含まれるであろうと想像したことから始まった。その結果、ウイルス接種と同時に施せば感染を阻害する物質が知られ、多くは蛋白質または糖蛋白質でウイルス感染時にレセプター上で競合するものと理解された。このような物質はそれが由来する植物には効果がなく異種植物に対して効果をもち、試験された限りでは効果は極めて高いが何故か実用化されず、実用化されやすいものとしてスキムミルクやアブラムシ伝播に対して軽油などがあげられてきた。

抗生物質は元来細菌、糸状菌を対象として開発されたものであるが、核酸、タンパク質代謝の機作が明らかになるにしたがって抗生物質の作用点も明らかになり、その知識にもとづいて抗ウイルス剤として核酸、タンパク質合成阻害剤が供試されるようになったが、植物ウイルスに関しては actinomycin D, chloramphenicol が阻害するような代謝行程はウイルス増殖

とは無関係なことが先ず明らかにされ、次いで核酸、タンパク代謝阻害剤は宿主に代しても阻害的であることが明らかとなった。

今後は先ず[A]宿主の核酸、タンパク質代謝は阻害せずウイルスの核酸、タンパク合成を阻害するような物質を探し出す可能性を考え、次いで[B]そのスクリーニングの方法として単に抗ウイルス性を検定するだけでなく宿主の核酸、タンパク質合成を阻害しないことを同時に検定することを目標にしなければならない。

A については(1)ウイルス特異的レプリカーゼの生産を阻害する(例えば感染 6 時間までの blasticidin S)、(2)ウイルス RNA に対する宿主リボソームの認識能を変える(インターフェロンの作用)、(3)レプリカーゼを特異的に阻害するの、三点が考えられる。

以上のうち、(1)は持続性の故に大きな期待がもてない。(2)はインターフェロン自身よりもそれを誘起される物質に期待がかけられる。例えばは乳動物での 2 本鎖 RNA の効果のように、(3)については既に Q β フェージに対してプロパルギル化合物(4-(2-propionyloxy)- β -nitrostyrene)が提出されている(渡辺ら¹⁵⁹⁾。これは Q β の核酸に特異的に結合してレプリカーゼの作用を阻害するが宿主の DNA 依存 RNA ポリメラーゼは阻害しない。

B についてはイネ萎縮病の例があげられる。この場合はウイルス核酸が容易に宿主の s-RNA, DNA, r-RNA と分離定量され、罹病イネに葉とともに定時間 ³²P または ¹⁴C-uracil をとりこませれば、ウイルス核酸へのとりこみは阻害するが r-RNA へのとりこみは阻害しないようなものを振り出せる。TMV でもそのような方法は講ぜられる。

イネ萎縮病の場合、2 本鎖 RNA ウィルスという特殊な例ではあるが、生体染色でウイルスを包含する封入体は染めるが核は染めないものを先ず振ってみた。azure B はその例であり、ウイルス核酸への ³²P のとりこみは阻害し、r-RNA へのとりこみは阻害しない。ethidium bromide は封入体も核も染めるが、³²P のとりこみ阻害はウイルス RNA にも r-RNA にも起きる。azure B は明らかに罹病イネの伸長を促進する。この意味では期待に沿うものであった。

いずれの場合でも宿主の核酸、タンパク合成とウイルスのそれとの間の僅かな間隙をぬって行わせるものであるから相当困難なことにはちがいはないが、その可能性は十分にあるものといえよう。

追記 ここでは宿主のもつフェノール、タンニンとそれらを酸化する系については触れなかった。それはそれだけで別に論ずるだけの内容があるからである。

引用文献

- 1) Bawden, F. C.: *Advances in Virus Res* 2, 31 (1954).
- 2) Matthews, R. E. F., Smith, J. D.: *ibid.* 3, 51 (1955).
- 3) 下村 徹, 平井篤造: ウィルス 17, 1 (1967).
- 4) 平井篤造: 化学の領域, 22, 48 (1968).
- 5) 平井篤造, 野口照久: 新農薬創製法(南江堂)245 (1965).
- 6) 由岐英剛: 化学の領域 22, 452 (1968).
- 7) Fox, J. J., Watanabe, K. A., Bloch, A.: *Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.* 5, 251 (1966).
- 8) Allard, H. A.: *U. S. Dept. Agr. Bull.* 40, 1 (1914).
- 9) Allard, H. A.: *Phytopathology* 8, 51 (1915).
- 10) Doolittle, S. P., Walker, M. N.: *J. Agr. Res.* 31, 1 (1925).
- 11) Duggar, B. M., Armstrong, J. K.: *Ann. Missouri Bot. Garden* 12, 359 (1925).
- 12) Kassanis, B., Kleczkowski, A.: *J. Gen. Microbiol.* 2, 143 (1948).
- 13) Kuntz, J. E., Walker, J. C.: *Phytopathology* 37, 561 (1947).
- 14) Ragetli, H. W. J.: *Tijdschr. Plantenziekt.* 63, 247 (1958).
- 15) Ragetli, H. W. J., Weintraub, M.: *Virology* 18, 232 (1962a).
- 16) Ragetli, H. W. J., Weintraub, M.: *ibid.* 18, 241 (1962b).
- 17) van Kammen, A., Noordam, D., and Tung, T. H.: *ibid.* 14, 100 (1961).
- 18) Blaszcak, W. et al. *Phytopathology* 49, 784. (1959).
- 19) Yoshizaki, T., Murayama, D.: *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 32, 267 (1966).
- 20) Sako, N., Hidaka, Z.: *Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury. Phytopath. Soc. Japan.* 115 (1968).
- 21) 佐古直道, 日高醇: 日植病報, 35, 126. (1969).
- 22) 吉井甫, 佐古直道: 日植病報, 33, 244 (1967).
- 23) Lambertz, P.: *Planta* 44, 147 (1954).
- 24) Brantz, D. H.: *Virology* 23, 588; 26, 554 (1964).
- 25) Thomas, P. E., Fulton, R. W.: *Virology* 34, 459 (1968).
- 26) 吉田豊二, 須田省三: 科学, 17, 58 (1947).
- 27) Sill, W. H., Walker, J. C.: *Phytopathology* 42, 349 (1952).
- 28) Benda, G. T. A.: *Virology* 2, 438 (1950).
- 29) 平井篤造: 科学, 19, 233 (1949).
- 30) MacKeen, C. D. *Canad. J. Bot.* 34, 891 (1956).
- 31) Kahn, R. P., et al. *Phytopathology* 50, 847 (1960).
- 32) Zaitlin, M., Siegel, A. *ibid.* 53, 224 (1963).
- 33) Ruppel, E. G.: *ibid.* 57, 1077 (1967).
- 34) 田村 実: 日植病報, 35, 260 (1969).
- 35) 吉井 甫, 富永義一, 森岡恒三: 日植病報, 19, 25 (1954).
- 36) Gupta, B. M., Price, W. C.: *Phytopathology* 40, 642 (1950).
- 37) Bawden, F. C., Freeman, G. G.: *J. Gen. Microbiol.* 7, 154 (1952).
- 38) Gendron, Y., Kassanis, B.: *Ann. Appl. Biol.* 41, 188 (1954).
- 39) Gupta, B. M., Price, W. C.: *Phytopathology* 42, 45 (1952).
- 40) Takahashi, W. N.: *Science* 104, 377 (1946).
- 41) Yoshizaki, T.: *J. Hokkaido Gakugei Univ.* II-B, 1 (1965).
- 42) 須藤恵美子, 吉田豊二, 須田省三: 科学, 19, 377 (1949).
- 43) Bawden, F. C., Pirie, N. W.: *J. Gen. Microbiol.* 17, 80 (1957).
- 44) Stantilli, V. et al. *Virology* 14, 109 (1961).
- 45) Burger, W. C., Stahmann, M. A.: *J. Biol. Chem.* 193, 13 (1951).
- 46) Stahmann, M. A., and Gothoskar, S. S. *Phytopathology* 48, 362 (1958).
- 47) Nene, Y. L., and Thornberry, H. H. *Phytopath. Z.* 67, 337 (1970).
- 48) Fulton, R. W.: *ibid.* 33, 674 (1943).
- 49) Annual Report, Cawthron Inst. Nelson, New Zealand, 1943-4, 1944-5.
- 50) Crowley, N. C.: *J. Aust. Inst. Agr. Sci.* 24, 261 (1958).
- 51) Lucas, G. B., Hare, W. W.: *Phytopathology* 49, 544 (1959).
- 52) Hare, W. W., and Lucas, G. B.: *ibid.* 50, 638 (1960).
- 53) Denby, L. G., and Wilks, J. M.: *Canad. J. Pl. Sci.* 43, 457 (1963).
- 54) Hagborg, W. A. F., and Chelack, G. S.: *Canad. J. Bot.* 38, 111 (1960).
- 55) Jaeger, S.: *Phytopath. Z.* 56, 340 (1966).
- 56) Isaacs, A.: *Advances in Virus Res.* 10, 1

- (1963).
- 57) Lampson, G. P., Tyttell, A. A., Nemes, M. M., and Hilleman, M. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 112, 648 (1963).
 - 58) Gilpatrick, J. D., and Weintraub, M.: *Science* 115, 701 (1952).
 - 59) Weintraub, M., and Kemp, W. G.: *Virology* 13, 256 (1961).
 - 60) Ross, A. F.: *Virology* 14, 329; 340 (1961).
 - 61) Sela, I., and Applebaum, S. W.: *ibid.* 17, 543 (1962).
 - 62) Sela, I., Harpaz, I., and Birk, Y.: *ibid.* 22, 446 (1964).
 - 63) Sela, I., Harpaz, I., and Birk, Y.: *ibid.* 25, 80 (1965).
 - 64) Sela, I., Harpaz, I., and Birk, Y.: *ibid.* 28, 71 (1966).
 - 65) Kimmins, W. C.: *Canad. J. Bot.* 47, 1879 (1969).
 - 66) Loebenstein, G.: *Phytopathology* 53, 306 (1963).
 - 67) Loebenstein, G. and Ross, A. F.: *Virology* 20, 507 (1963).
 - 68) Loebenstein, G. and Praagh, T. van Kiraly, Z. et al eds. *Host-Parasite Relations in Plant Pathology* (Budapest) 53 (1964).
 - 69) Yoshizaki, T.: *Japan J. Microbiol.* 10, 85 (1966).
 - 70) Loebenstein, G., and Lovrekovich, L.: *Virology* 30, 587 (1966).
 - 71) Shope, R. E.: *J. Exp. Med.* 123, 213 (1966).
 - 72) Lampson, G. P., Tyttell, A. A., Field, A. K., Nemes, M. M., and Hilleman, M. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58, 782; 1004; 1719 (1967).
 - 73) Bockstahler, L. E.: *Molec. Gen. Genetics* 100, 337 (1967).
 - 74) Wolstenholme, D. R.: *ibid.* 100, 349 (1967).
 - 75) Gomatos, P. J., and Tamm, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 49, 707 (1963).
 - 76) Miura, K., Kimura, I., and Suzuki, N.: *Virology* 28, 571 (1966).
 - 77) Miura, K., Fujii, I., Sakaki, T., Fuke, M., and Kawase, S.: *J. Virol.* 2, 9 (1968).
 - 78) Koide, F., Suzuka, I., Sekiguchi, K.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30, 95 (1968).
 - 79) Joklik, W. K., Merigan, T. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56, 558 (1966).
 - 80) 下村徹, 西川陽之助, 今泉照男: 日植病報, 23, 65 (1958).
 - 81) Bancroft, J. B., Curtis, R. W.: *Phytopathology* 47, 79 (1965).
 - 82) Taniguchi, T.: *Nature* 194, 708 (1962).
 - 83) Nichols, C. W.: *Phytopathology* 43, 555 (1953).
 - 84) Bawden, F. C., Kassanis, B.: *J. Gen. Microbiol.* 10, 160 (1954).
 - 85) Commoner, B., Mercer, F.: *Nature* 168, 113 (1951).
 - 86) Commoner, B., Mercer, F.: *Arch. Biochim. and Biophys.* 35, 278 (1952).
 - 87) Mercer, F., Lindhost, T. E., Commoner, B.: *Science* 117, 558 (1953).
 - 88) Matthews, R. E. F.: *J. Gen. Microbiol.* 8, 277 (1953).
 - 89) Jeener, R., Rosseels, J.: *Biochim. Biophys. Acta* 11, 438 (1953).
 - 90) Jeener, R.: *ibid.* 13, 148 (1954).
 - 91) Jeener, R.: *ibid.* 23, 351 (1957).
 - 92) Matthews, R. E. F.: *J. Gen. Microbiol.* 10, 521 (1954).
 - 93) Francki, R. I. B.: *Virology* 17, 9 (1962).
 - 94) Francki, R. I. B., Matthews, R. E. F.: *ibid.* 17, 22 (1962).
 - 95) Francki, R. I. B., Matthews, R. E. F.: *ibid.* 17, 367 (1962).
 - 96) Matthews, R. E. F.: *Nature* 171, 1065 (1953).
 - 97) Lindner, R. C. et al. *Phytopathology* 50, 884 (1960).
 - 98) Kurtzman, R. H. et al. *Virology* 10, 432 (1960).
 - 99) Wu, J. H., Hildebrants, A. C., Riker, A. J.: *Phytopathology* 50, 587 (1960).
 - 100) Chiu, R. J., Sill, W. H.: *ibid.* 52, 432 (1962).
 - 101) Ulrychová-Zelinková, M.: *Biol. Plant Praha* 3, 240 (1960).
 - 102) Shimomura, T., Hirai, T.: *Phytopathology* 50, 344 (1960).
 - 103) 野口照久 日本特許願. 昭38~50527 (1963).
 - 104) Staehelin, M. M., Gordon, M. P.: *Biochim. et Biophys. Acta* 38, 307 (1960).
 - 105) Leben, C., Fulton, R. W.: *Phytopathology* 42, 331 (1952).
 - 106) Woodruff, H. B.: *Proc. 6th Intern. Congr. Microbiol.*, Rome. (1953).
 - 107) Schlegel, D. E., Rawlins, T. E.: *Phytopathology* 44, 328 (1954).
 - 108) Gray, R. A.: *Phytopathology* 45, 281 (1955).

- 109) Gray, R. A.: *Plant Disease Repr.* 41, 576 (1957).
- 110) Gray, R. A. *Phytopathology* 47, 522 (1957).
- 111) Lucas, G. B., Winstead, N. N.: *Phytopathology* 48, 344 (1958).
- 112) Simons, J. N.: *ibid.* 50, 109 (1960).
- 113) Wittmann, H. G.: *Phytopath. Z.* 34, 221 (1958).
- 114) 下村徹, 平井篤造: 日植病報, 24, 93 (1959).
- 115) Misato, T. et al. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 26, 25 (1961).
- 116) Nathans, D.: *Antibiotics Vol. 1* (Gottlieb, D. et al. eds) 259 (1967).
- 117) Langenberg, W. G., Schlegel, D. E.: *Phytopathology* 55, 1065 (1965).
- 118) Gottlieb, D., Shaw, P. D.: eds *Antibiotics, Vol. 1*, Springer, Berlin (1967).
- 119) Hirai, T., Hirashima, A., Itoh, T., Takahashi, T., Shimomura, T., and Hayashi, Y.: *Phytopathology* 56, 1236 (1966).
- 120) Hirai, A., Wildman, S. G., Hirai, T.: *Virology* 36, 646 (1968).
- 121) 平井篤造, 下村徹, 平嶋昭和, 林幸正: 植物生理, 5, 1 (1965).
- 122) 黄耿堂, 明日山秀文, 片桐政子, 見里朝正: 日植病報 32, 99 (1966).
- 123) 平井篤造, 手塚信夫, 牧頭夫: 日植病報 32, 94 (1966).
- 124) 前田孚敏, 日高醇: 日植病報 36, 183 (1970).
- 125) Takahashi, W. N.: *Science* 107, 226 (1948).
- 126) Norris, D. *Nature* 172, 816 (1953).
- 127) Lindner, R. C., Kirkpatrick, H. C., Weeks, T. E.: *Phytopathology* 49, 802 (1959).
- 128) Bobyr, A. D. *Ex Microbiol. Sil. Hosp. ta Med.* 16, Kiev Acad, Nauk Ukr, R. S. R. (1962).
- 129) Orlob, G. B.: *Virology* 21, 291 (1963).
- 130) Richkov, V. L., Smirnova, V. A.: *Microbiologiya* 17, 267 (1948).
- 131) Schlegel, D. E., Rawlins, T. E.: *J. Bacteriol.* 67, 103 (1954).
- 132) Schubert, M., Hamerman, D.: *J. Histochem. Cytochem.* 4, 159 (1956).
- 133) De Bruyn, P. P. H., Farr, R. S., Banks, H., and Morthland, F. W.: *Exptl. Cell Research* 4, 174 (1953).
- 134) Bradley, D. F., Wolf, M. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. S. S.* 45, 944 (1959).
- 135) Lerman, L. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 49, 94. (1963).
- 136) Mason, S. F., McCaffery, A. J.: *Nature* 204, 468 (1964).
- 137) Burnet, F. M.: *J. Path. Bact.* 37, 179 (1933).
- 138) Chessin, M. *Science* 132, 1840 (1960).
- 139) Freifelder, D., Davidson, P. F., Geideschek, E. P.: *Biophys. J.* 1, 389 (1961).
- 140) Simon, M. I. Van Bunakis, H.: *J. Mol. Biol.* 4, 488 (1962).
- 141) Simon, M. I. Van Buuakis, H.: *Arch. Biochem. and Biophys.* 105, 197 (1964).
- 142) Sastry, K. S., Gordon, M. P.: *Biochim. Biophys. Acta* 129, 32 (1966).
- 143) Singer, B., Fraenkel-Conrat, H.: *Biochemistry* 5, 2446 (1966).
- 144) Ito, T., Shiroya, T., Kubo, S., Tomaru, K., Amagasa, J.: *Currents in Modern Biology*, North-Holland Pub. Co. Amsterdam, 192. (1967).
- 145) Waring, M. J. *Nature* 219, 1320 (1968).
- 146) Gersch, N. F. Jordan, D. O.: *J. Mol. Biol.* 13, 138 (1965).
- 147) Waring, M. J.: *J. Mol. Biol.* 13, 269 (1965).
- 148) LePecq, J. B., Paoletti, C.: *J. Mol. Biol.* 27, 87 (1967).
- 149) O'Brien, R. L., Olenick, J. G., Hahn, F. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 1511. (1966).
- 150) Kudo, H., Graham, A. F.: *J. Bacteriol.* 90, 936 (1965).
- 151) Yasuda, Y., Kataoka, M., Hosotsuji, T., Noguchi, T. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* (in press) (1970).
- 152) Kodama, T., Kimura, I., Suzuki, N.: *Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury*. *Phytopath. Soc. Japan.* 59 (1968).
- 153) Franklin, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 55. 1504 (1966).
- 154) 児玉忠士, 鈴木直治: 日植病報 35, 360 (1969).
- 155) 鈴木直治, 木村郁夫, 児玉忠士: 坂本教授還暦記念論文集, 175 (1955).
- 156) 渡辺 格, 春名一郎, 山田雄二郎, 長岡行蔵, 関 誠夫: 第16回日本ウイルス学会総会講演, (43. 10. 9.) (1968).
- 157) 鈴木直治, 木村郁夫, 児玉忠士: 日植病報, 35, 129 (1969).
- 158) 鈴木直治: 化学物質による生体制御, その植物保護への活用, 日植病病理化学談話会53(1969).