

## イモチ病に関する生化学的研究

玉利勤次郎

(新潟大学農学部)

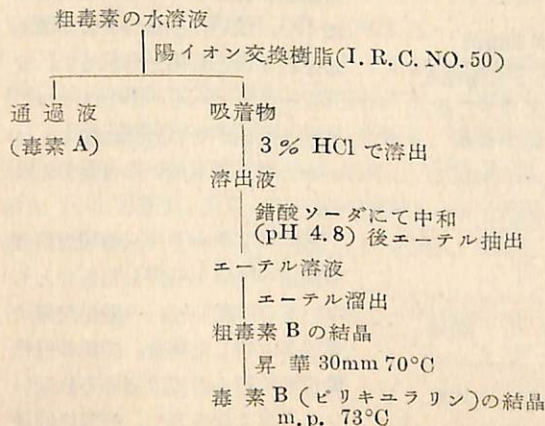
私共が今研究の焦点としているのは、水稻のイモチ病抵抗性の本質的なものの追求と、毒素の構造の決定ということである。この研究を始めた動機は、イモチ病に侵されたイネは根がひどく胃されるということから何かイモチ病菌が毒素を分泌するのではないかと考えたことに始まる。

最初のうちは、培養基として柄内氏の培養基を修正したものにイネ煎汁を加えて使っていたが、現在では corn steep liquor, 大豆粉, ヌカ等を加えて行っている。培養したイモチ病菌からの毒素の分離は、28°Cで約1ヶ月間培養してから行うのである。こうするとはじめは10lの培養から10mg程度はとれたのであるが、現在ではそれ程とれなくなってきた。この原因は菌が変わったのかどうかは判明しない。

イモチ病菌から培養後何日位で毒素が生産されるかということは、北大の大谷さんのところで、五日後にすでに分離できたというところをみると、相当早いものと思われる。

分離はまず培養濾液を醋酸酸性 (pH 3.5) にして2%活性炭に吸着させ、NH<sub>3</sub>性メタノールで浸出後、メタノールを追い出し、塩基性醋酸鉛で沈澱させたものを、さらにH<sub>2</sub>Sで分解し、エーテルで抽出して行いが、こゝで得られた抽出物を熱ベンゾールとリグロインから再結晶して毒素Aが分離され、さらに再結晶液から毒素Bが第1表のような順序で分離される。

第1表 毒素B (ピリキュラリン) の分離



毒素Aはアルファ・ピコリン酸 ( $\alpha$ -Picolin 酸) であつて、パカナエ病菌の分泌する毒素であるフザリン酸と同じく呼吸阻害作用をもっている。この作用機構はチトクローム系の呼吸酵素に含まれるヘミン鉄とChelationをなし、その機能を阻害するものである。両者の作用機構は全く同じであるが、アルファ・ピコリン酸の場合はフザリン酸よりChelationの力が稍々弱い。

第1表のようにアルファ・ピコリン酸をとつた残りの母液からピリキュラリン (Piricularin) が分離されるわけであるが、ピリキュラリンは酸性物質なので常識では陰イオン交換樹脂に吸着される筈であるが、そうではなくて陽イオン交換樹脂に吸着される。このことはピリキュラリンの分子の1部に強いプラス(+)の荷電を持った部分があると考えねばならない。(窒素の中少くとも1つが第4級の形態を持つことに起因すると考える。)

かくして得られたピリキュラリンは50万倍で籾の発芽生育 (特に根) に非常に強い毒性を示すが、160万倍では遂に促進効果をあらわしてくる。アルファ・ピコリン酸は10~15万倍以内で毒性を示す。

このピリキュラリンの構造を検討した結果、C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>の分子式を得た。この物質は紫外部では3080Åと2400Åの2個所に極大吸収を示す。又赤外部の吸収スペクトルでみた結果ケトン基を持つていることがわかつた。結局Nメチル基 (>N-CH<sub>3</sub>) 1個、フェノール性OH 2個、ケトン基 (>C=O) 1個が存在する。しかも重曹アルカリ性でエーテルへ移行しないので、フェノールの近くにケトン基があると考えられる。接触還元では酸化白金触媒で4分子の水素を、又水酸化パラジウム触媒では2分子の水素を吸収する。この様にピリキュラリンは分子からみて炭素に比し水素が少く且つ接触還元で水素の吸収の少い事から、飽和度の高い多環芳香族の構造を有するものと推定される。ペーパークラマトでは展開剤にn-ブタノール:水酢酸:水=4:1:1を使つてRF値は0.85~0.88であり、呈色はDiazo反応が一番鋭敏である。

こゝでイネは品種によつてイモチ病に対する抵抗性に強弱があるが、これが毒素に対する反応と関連が



あるか否かという考えで多くの品種を使つてやつてみた。この結果、非常に弱く、とされている品種即ち蒙古稻、新石白、農林8号などでは両毒素に弱く、又強くとされている品種即ち観音仙、テテツブ、大畑、いもちしらずでは両毒素に対しても強いことがわかつた。(ピリキュラリンは10万倍、アルファ-ピコリン酸は2万倍液を使用、メルクマールとして呼吸阻害をワールブルグで測定)

しかし160万倍位に薄めて作用させると、呼吸が逆に高まるようになったが、この反応は毒素に強い品種がかえつて敏感であつた。一方アルファ-ピコリン酸では全然促進作用が認められなかつた。

ピリキュラリンの2万倍程度の液を莖に注射すると、いもち病の病斑と同様の褐変現象(メラニン色素系)を起すので、何かクロロゲン酸と関係があるのでないかと考えたのが始まりで、クロロゲン酸との関係を種々試験してみた。ピリキュラリンにクロロゲン酸を等モル加えると毒性が全然無くなり、根の発育が非常に良くなる。しかしクロロゲン酸だけでは稲に何の反応も起らないので、これはピリキュラリンとクロロゲン酸が結合して濃度が薄くなり、その刺戟作用で根の発育が良くなると推定してピリキュラリンの稀薄溶液による刺戟作用という面を研究する事になつた。なお、Cysteine 添加による拮抗現象は認められないからSH酵素阻害作用はないものと考えられる。

ピリキュラリンの刺戟作用による籾(農林1号)の発芽生育促進作用は160万倍に一番強い点があり、呼吸が高まるが、このときのポリフェノール(Polyphenol)の増加をみると、第2表のようであつて、抵抗性品種ではピリキュラリンの刺戟作用に対しポリフェノール成分の増加、呼吸の増加が顕著である。(チャルナツクなどでは尙顕著に見られる。)

第2表 ピリキュラリンの刺戟作用による稲苗中のポリフェノール成分の増加

(播種後18日目の根を160万倍のピリキュラリン溶液に3日間浸漬)

稲苗生育 日 数	品 種	ポリフェノール 成分含量(1g当)		刺戟による増加% (ポリフェノール)	
		莖	葉 根	莖	葉 根
30日	いもちしらず { 対 照 処 理	2.73 mg		16%	
	農林21号 { //	2.93		12%	
60日	いもちしらず { //	2.89	1.98 mg	18%	20%
	農林21号 { //	2.70	2.05	11%	10%
		3.18	2.38		
		3.29	2.26		
		3.42			
		3.00			

これ等を考察して、抵抗性品種のイモチ病抵抗性の機構の1つには、イモチ病菌がイネ体に侵入しピリキュラリンを分泌すると、それ等の刺戟作用に応じて、細胞組織がすみやかに反応してクロロゲン酸を主体とするポリフェノール成分の形成増加が行われ、これがピリキュラリンと結合して無毒化されることが考えられる。

クロロゲン酸は1000倍でイモチ病菌の発育を非常に阻害するが、ピリキュラリンの刺戟作用を受けたイネ生体中の ortho-diphenol の含量は、1000倍を越しているのに、こゝにも1つの抵抗機構があるのでなからうか？(イモチ菌の侵害によるイネ生体中のポリフェノール成分の増加はピリキュラリンの刺戟作用のみに帰すべきでないことは勿論であるが、品種間差異による組織の反応性を調べる1つの手段としてピリキュラリンの刺戟作用を利用しているわけである。)

ピリキュラリンの呼吸作用に及ぼす作用を考察すると、もしも稲の組織中でクロロゲン酸が呼吸に関与しているならば、ピリキュラリンがクロロゲン酸と結合する性質から考えて、おそらくポリフェノール系呼吸を阻害するに違いない。従つてイネ体中でクロロゲン酸が呼吸に関与しているかどうかが問題となる。これについては、先ず真空浸漬法で稲苗の組織にクロロゲン酸を浸透せしめると呼吸が高まる。また一酸化炭素によつてポリフェノール系呼吸とチトクローム系呼吸の両方が阻害されるが、光をあてるとチトクローム系呼吸は恢復する。これを利用して稲幼苗について試験してみると、ポリフェノール系呼吸がかなり関係していることがわかるが、品種間にはあまり差がない。

今日高等植物の葉について終末酸化酵素としてポリフェノール・オキシダーゼ(Polyphenol oxidase)は未だ確認されていない。しかしそれはこの酵素が存在

しないということではなく、むしろ細胞膜成分と結合して抽出されにくい、或いは極めて不安定であるということも考えられるし、又パーオキシダーゼ(Peroxidase)の如き酵素がその酸化に関与していると考へても良いのでなからうか。

次にピリキュラリンの10万倍液で稲苗の呼吸を阻害したものとし、ないものに就いて、一酸化炭素で呼吸を阻害した場合、両者の呼吸量の間に殆んど差は認められないし、又更に光を当て、呼吸の回復



を試みた場合、両者の呼吸回復率の間に有意な差は認め難い。

以上述べたことからイネ苗（根を含めて）の呼吸にポリフェノール系呼吸が関与していること、そしてピリキュラリンの呼吸阻害がこのポリフェノール系呼吸の阻害に主な要素があると現在考えているが、なお検討の余地はあると思う。

ピリキュラリンの刺戟作用は酵素活性に対する作用についても見られる。即ちピリキュラリンはパーオキシダーゼ、カタラーゼ (Catalase) 等の活性を著しく阻害するが、160万倍稀釈液を作用せしめた場合は、これ等の活性が非常に高まつてくる。ここでピリキュラリンの刺戟作用によつて、イネ生体中でポリフェノール成分が増加し、呼吸が高まる機序を考えてみると、先ずその刺戟作用によつて酸化酵素の活性が高まり、これがフォスフォフラクトキナーゼ (Phosphofructokinase) の酸化因子となり、従来よく知られている Embden-Meyerhof の解糖 system 中、果糖-6-リン酸から、果糖-1,6-2リン酸に移る過程が阻害される為、解糖系が Warburg-Dickens-Horecker の系 (Direct oxidative pathway) へ傾く。そして葡萄糖-6-リン酸からリブローゼ (Ribulose), セドヘプタローゼ (Sedoheptulose), 5-de-hydrokinic acid 等を経てポリフェノール成分が形成される。一方酸化酵素の活性も高まつているので、呼吸は高まると解されるのであるが、その1つの証明を試みるためイネ苗を暗室に2日間入れて還元糖を消費させ、同時に、ピリキュラリンの刺戟作用を与え、同じく暗室内で真空浸漬法により Cori-ester (葡萄糖-1-リン酸), ビルビン酸塩, 酢酸塩を吸収させてポリフェノール成分の形成量を調べると、Cori-ester の場合に特に多く形成されることがわかつた。即ちポリフェノール成分はテルペン類の場合と異り糖代謝において Embden-Meyerhof の system を経ないで、上に述べた如く、W. D. H. の系を経て形成されることを裏書きするものである。

ピリキュラリンの刺戟作用によるイネの生育促進作用について圃場試験を行つた結果は次のようであつた。即ち普通苗代に育苗した北陸58号を、田植時に160万倍液に2日間浸漬してから挿秧し、収穫期に各株について分蘖数と粒数を調べて F 検定にかけた結果は、危険率5%で有意な差が見られ、3割近く分蘖が

増し、粒数は約2割5分の増加を示した。今後厳密な試験を行つて検討を加える必要があると思うが、要するにピリキュラリンの刺戟作用による呼吸増加は正常な呼吸の増加であると見てよいのではないかと思う。

ズリコミを起しかけたイネ体中のピリキュラリンの含量をポーラログラフにより定量した結果、生体116g中に2.5mgあり、稲体の水分を80%とすると、大体1/37,000という大雑把な計算になる。これはイネ体全部を一樣と考えてあり、部分的には更に高いと考えられる。ピリキュラリンに就いて極めて興味ある事實は、320万倍の稀釈度で、いもち菌の分生胞子の発芽生育は完全に阻止され、640万倍で約5%阻害される。はじめ北陸農試の小野技官がこの現象を見出されたが、我々もこれを追試確認した。我々はこの現象を利用して Cup 法によるピリキュラリンの微量検定を行つている。(今では試験菌として *Asp. niger* を用いている。) 又イモチ菌の菌体及び培養濾液の中には、ピリキュラリンと結合して菌に対して無毒化する特殊の水溶性蛋白がある。その本体は小笠原教授の調べたところでは、硫酸60%飽和で大部分が沈澱し、等電点は pH 4.0 附近である。なお人血清や卵アルブミンには結合能力はない。しかしてこの水溶性蛋白と結合したピリキュラリンは菌には無毒であるが、イネに対してはピリキュラリンと同等の阻害作用を示す。又クロロゲン酸と結合したピリキュラリンはイネには無害であるが、菌にはピリキュラリン同等の阻害作用を示す。イネに菌が侵入した際組織細胞が壊死する過程において、この水溶性蛋白が分解されるとしたならば、菌は恐らく自己の生産したピリキュラリンによつて生育が全く阻止されることが考えられる。又ピリキュラリンの阻害作用として原形質の機能蛋白に結合してその代謝活性を弱めるということも充分考えられることである。牛の肝臓より分離した結晶カタラーゼにピリキュラリンを加えてベックマンのスペクトルフォトメーターで調べた結果では、その吸収スペクトルに何の変化も見られないのであつて、その阻害作用は蛋白部分への結合と考えられる。

今後原形質の機能蛋白とピリキュラリンの結合という問題を少し掘り下げて研究して行きたいと考えている次第である。