稻熱病斑の組織化學的研究 II

ジアゾ試薬により赤變する葉の細胞膜中の物質について

鈴木直治・土居養二・豊田 榮*

Histochemical studies on the lesions of rice blast caused by *Piricularia oryzae* Cav. II. On the substance in the cell-membrane of rice reacting red in color with diazo reagent.

Naoji Suzuki, Yoji Doi and Sakae Toyoda.

稻熱病病斑の褐變が進行するに従つて病斑上における孢子形成勢力は減退し、褐變が速に起り褐點型病斑を生ずる場合はその上で孢子の形成が起らないことから、病變に伴う組織の褐變が病原菌の組織内における生育、蔓延に不良影響を與え、それが組織の抵抗と關連を持つのではないかと推測される¹⁾。從來の知見に従えば褐色色素の原因となる物質としてはトリプトファン、チロシンの如きアミノ酸とフェノール化合物とが考えられるが、本報においては、褐變の原因物質として何れが最も可能性が大であるかを檢し、最後にフェノール化合物としてクロロゲン酸の存在を檢出するに至つた経過を報告する。

クロロゲン酸、コヒー酸の標品は東京大學農學部農藝化學科瓜谷郁三氏より分與された。こゝに同氏の御好意に對し厚く謝意を表する。

1. 材料と方法

(a) 葉に含まれるアミノ酸の檢出。

1) N施用量を異にした水稻の葉に含まれる游離アミノ酸の比較:—水稻農林3號を1/5ワグネルボットに2本植とし、基肥に大豆粕3.3g、硫酸1g、過磷酸石灰2.2g、鹽化カリ0.7gを、追肥として硫酸2.0gを與えたものを標準とし、N多量區には硫酸追肥4g、N少量區には基肥に大豆粕1.6g、硫酸0.5g、追肥に硫酸1.0gを施した。

2) 遮光による游離アミノ酸の變化:—N標準量を施したものを出穂初めに達した時2重に張つた藁簾下に2日、4日間おいた。

3) 晩播多肥栽培:—水稻農林1號を用いた。

4) 葉の蛋白分解物中のアミノ酸の檢出:—埼玉稻10號(千葉縣浦安町の農家水田で稻熱病大發生したもの)の健全葉のみを用いた。

5) 葉イモチ病斑内及び健全全部に含まれる游離アミ

ノ酸の比較:—上と同じ標本の病斑部を切り抜き、健全全部と分け、兩者に含まれる游離アミノ酸を比較した。

上記の如く處理した水稻の生葉3gを70%アルコール30ml中で磨碎し、こしわけ、濾液を45~50°Cの湯煎上で1mlに濃縮し、その0.01mlをとつてペーパークロマトグラフィーにかけた。蛋白分解物中のアミノ酸の檢出には葉を80°Cで乾し、その100gをとりパンクレアチン3gを加え、炭酸ソーダ100gを加えてpHを8.1にし、37°Cに6日間保ち、濾液を50倍にうすめ、その0.01mlをとつてペーパークロマトグラフィーにかけた。展開劑は1次に石炭酸2、次にブタノール、酢酸、水(4:1:5)の混合液を用いた。

(b) フェノール化合物の檢出。

上記3品種の健、病葉を生ものまゝ15μの切片とし、これにジアゾ試薬(ジアゾベンゼンスルホン酸の炭酸ソーダ溶液²⁾)を加えて檢査した。甘藷紫紋羽病感染部位についてフェノール化合物の1種であるクロロゲン酸の檢出に用いた試薬³⁾を併せ用いたが、それは次の如きものである。10%アンモニヤ水、10%鹽化鐵溶液、Liebermann氏ニトロソ反應⁴⁾、Heopfer氏クロロゲン酸—コヒー酸判別反應、フログルシン鹽酸、ベンチデン鹽酸、Payen氏反應⁵⁾、Mäule氏反應⁶⁾、濃硫酸(3,4-ジオキシシステレンの反應⁷⁾)。

(c) ペーパークロマトグラフィーによるクロロゲン酸の檢出:—葉の乾物50gを粉末とし50%メタノールで3回抽出、抽出液に10%酢酸鉛を加え、生じた沈澱をこしわけ、硫酸で鉛を除き、濾液をpH2.2に合せ酢酸エチルで抽出、抽出液より溶媒を追つて黄褐色油狀物を得た。これをアルコールに溶かして試料とし、ペーパークロマトグラフィーにかけた。展開劑はブタノール酢酸、發色にはLiebermann氏反應を用い、同じRfの場所を切り抜いて上記の全呈色反應により呈色を調べた。

* 農林省農業技術研究所

2. 葉イモチ病斑褐變部の解剖的觀察

供試病斑は感受性品種に現われる典型的なものである。第1報第2圖で示した3の段階になつて褐變は顯著となるのであるが、第1圖は3型病斑の褐變が葉脈に沿つて延びた部分を横斷して見たものである。

第1圖 褐變した病變 (l) を (s) の場所で切つた切片の褐變状況

- c: 厚膜組織細胞内に褐色充填物あり、細胞膜褐變
 x: 木部の細胞内部及び細胞膜の褐變
 si: 篩部細胞内の黒色—褐色充填物、膜は褐變
 my: 菌糸
 mo: 機動細胞; 膜は褐變
 y: 同化組織、黄變

この場合、菌糸は導管内を縦に伸び、同化組織内には侵入していない。變色は次の場所に見られる。

- 1) 黒色ないし褐色の細胞内充填物質:—
 維管束篩部 黒色充填物
 維管束木部 少數細胞内に黒—褐色。
 厚膜組織 褐色
- 2) 細胞膜の褐變:—
 導管及びその周囲の細胞膜
 厚膜組織
 機動細胞 (圖の左方)
- 3) 同化組織の變色 (黄變):—
 綠色細胞内黄色顆粒の生成と葉綠粒の黄變

最後の黄色顆粒は吉井¹⁰⁾のブドウ状顆粒と同じものと思われるが Ehrlich 氏アルデヒド試薬、ピロール又はインドール検出用試薬により陽性反應を與える。

第2圖においては褐變が維管束に沿つて縦に進むと同時に横に→の方向に進み、同化組織では初め黄變し

ていた部分が褐變の段階に入り、褐變は特に維管束の

第2圖 葉の同化組織及び表皮の褐變状況

→ 病斑の中心より周辺に向う方向

m 菌糸の存在

c 綠色を呈する部分厚膜組織の細胞内に褐色凝固物質存在

その他、細胞膜の褐變状況は省略した

菌糸存在部の周邊に著しく、表皮の細胞膜も強く褐變している。要するに3型病斑においては菌糸は先づ維管束内を伸長し、この際褐變は篩部に最も速かに、顯著に起り、次いで木部、厚膜組織に擴がり、同化組織は初め黄變し、次いで褐變して行くものと思われる。同化組織は黄變すると健全な場合と異なる反應として、ヂアゾ試薬により全面的に呈色が起り (従つて細胞内か膜か判定困難である)、細胞内には Ehrlich 氏アルデヒド試薬に陽性反應を示す黄色顆粒が現われる (この顆粒は初めからあつたもので健全な部分は硝酸銀アンモニヤで褐色となり、容易に識別される)。

3. 葉に含まれるアミノ酸の檢出

ペーパークロマトグラフィーにより水稻の葉に含まれるアミノ酸を檢出した結果を要約すると第1表のようになる。

接種試験の結果は遮光區に典型的な灰綠色浸潤型病斑を生じ、N多施區では發期に反し浸潤型病斑を生じなかつた。遮光區では葉中に游離アミノ酸アミドが増加し、それに伴つてチロシンが出現してくるが、病斑の褐變は著しく遅延するから、チロシンが褐變の主要な原因物質とは考えられない。

次にトリプトファンについて見ると游離状態では何れの場合も檢出できず、葉のパンクレアチン分解物中に漸く檢出されるだけである。又病斑内には前記の如く Ehrlich 氏アルデヒド試薬に陽性の色顆粒が存在

第1表 水稻の葉に含まれる游離アミノ酸及び葉の蛋白分解物中のアミノ酸

品 種		遊 離 ア ミ ノ 酸								パンクレア チン分解物 中のアミノ 酸、埼玉糯 10 號	
		農 林 3 號					農 1 林 號	埼 玉 糯 10 號			
		遮 光 處 理			N-施用量		晚 播 多 肥	健全部	病 斑 内		
標準	2 日	4 日	多	少	5-4	3-2					
處 アミノ 酸	シ ス チ ン	—	—	—	—	—	—	—	—	?	—
	アスパラギン酸	—	±	±	±	—	卅	+	+	+	++
	グルタミン酸	++	卅	卅	++	++	卅	卅	卅	卅	++
	ゼ リ ン	—	++	++	+	—	+	卅	卅	卅	++
	トレオニン	—	+	+	—	—	—	—	—	+	+
	アラニン	卅	卅	卅	卅	++	卅	卅	++	卅	卅
	チロシン	—	++	++	—	—	—	—	—	—	+
	バ リ ン	++	卅	卅	+	+	++	++	++	++	+
	トリプトファン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	ロ イ シ ン (イソロイシン)	+	卅	卅	+	+	++	++	++	卅	卅
	アスパラギン	—	+	卅	—	—	卅	—	—	—	—
	グルタミン	—	±	±	±	—	卅	—	卅?	卅?	—
未 定 1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	
未 定 2	—	—	—	—	—	—	—	?	?	卅	

備考：未定1はプロリンと思はれるが純品がなかつた爲對照できなかった。未定2はアルギニンと思はれるがグルタミンと？とはつきり區別されなかつた。

するにも拘わらずトリプトファンは検出されない。従つて黄色顆粒の示すインドール又はピロール様の反應もトリプトファンに由來するとは考えられない。

【4. 葉の細胞膜のジアゾ試薬により呈色する成分とクロゲン酸との異同

健全葉の横斷切片にジアゾ試薬を加えると第3圖 a に示す様に特定の組織の細胞膜に強く發色する。即ち

- 1) 維管束節部細胞膜：特に強く鮮紅色に發色し、中葉 (Middlelamella) に著しい。この呈色物質は速に溶脱し、時間が経つと見迷ふことがある。
- 2) 維管束とその周囲の細胞の膜：古い葉では維管束鞘の細胞膜まで發色する。
- 3) 橙赤色厚膜組織細胞膜：橙赤色。
- 4) 表皮：機動細胞では呈色が著しく薄いか又は鮮紅色に呈色して直ちに溶脱する。その他の表皮細胞では外側の膜に強く呈色する。橙赤色。
- 5) 綠色細胞では呈色が認められない。

以上の呈色部位は第1圖の褐變部位とよく一致する。病變組織及び生理的に黃變した葉では以上の呈色部位以下綠色細胞にも呈色が起る。この場合呈色は細胞内と膜とを區別することが困難である。

以上により水稻の葉の特定組織の細胞膜には健全狀態でも常時フェノール化合物が含有され、病變した場

第3圖 水稻の葉の細胞膜の呈色反應
a) デアゾ試薬による呈色部位同部位がLiebermann氏反應、Payen氏反應、Mäule氏反應陽性である
b) フロログルシン鹽酸による呈色部位
r: 赤色一赤紫色; y: 黄色

合には全ての組織の細胞膜、及びおそらくは細胞内に、フェーノル化合物が出現するものと想像される。著者の1人鈴木⁷⁾は甘藷の病變組織について同じ試薬による呈色を認め、それがクロロゲン酸及びコヒー酸

によるものであることを指摘したが、甘藷のクロロゲン酸及びコヒー豆より得たそれを標準として上記細胞膜の呈色反應を比較してみた。結果は第2表に示す。

第2表により、葉の細胞膜のデアゾ試薬による呈色

第2表 健全葉のデアゾ試薬により呈色する細胞膜の呈色反應とクロロゲン酸の呈色反應との比較

試薬或は反應	オイゲノール	ワニリン	コヒー酸	クロロゲン酸	水稻の葉の細胞膜				
					表 皮		厚膜組織	維管束	
					機動細胞	その他細胞		木部	節部
デアゾ試薬	—	—	赤	赤	淡赤*	橙赤	橙赤	橙赤	濃赤?
Liebermann 酸性	—	—	赤	黄	—*	黄	黄	黄	濃赤?
ニトロ反應 碱性	—	—	赤	赤	淡赤	橙赤	橙赤	橙赤	濃赤
Hoepfner 酸性	—	—	赤	黄	—*	黄	黄	黄	?
反應 碱性	—	—	赤	赤	淡赤	橙赤	橙赤	橙赤	濃赤
Payen クロール水	褐	赤	綠	綠	—	綠	綠	綠	—
反應 アンモニア	黄	黄	褐	褐	—	褐	褐	褐	—
フログルシン鹽酸	赤	赤紫	赤紫	黄	—	黄	黄	黄, 橙, 赤**	—
ベンザデン鹽酸	黄褐	黄褐	—	黄	—	—	—	黄褐**	—
アンモニア水	黄綠	黄綠	黄綠	黄綠	—	黄	黄	黄	—
鹽 化 鐵	黄綠	灰綠	綠	綠	—	淡綠	淡綠	淡綠	—
濃 硫 酸	赤→紫	褐	赤→紫***	赤→紫***	?	赤→紫***	赤→紫***	赤→紫***	?

備考: * 時に呈色しない。 ** 呈色場所は第3圖 b 参照。 *** 3, 4-デオキシステレンの呈色反應, クロロゲン酸, コヒー酸は CO₂ を發生する。組織では氣泡を發生する。

部位の色々な試薬による呈色反應はクロロゲン酸のそれとよく一致する。コヒー酸とは Liebermann 氏反應, Hoepfner 氏反應, フログルシン鹽酸反應で異なる。リグニンの反應としてはフログルシン鹽酸, ベンザデン鹽酸では陰性であるが, Payen 氏反應と Maule 氏反應では陽性である。従來の知見⁹⁾によつても兩反應の原因物質は異なるとされており, 水稻の場合, 上の反應がリグニンの反應であるか否かは論外とし, クロロゲン酸の呈する反應とすれば問題はないであろう。

篩部と機動細胞に現われるデアゾ試薬による呈色は直ちにクロロゲン酸によるものとは云えないが, 木部厚膜組織, 表皮には常成分としてクロロゲン酸が含まれているものと思われる。又クロロゲン酸は酢酸エチル易溶であるが, 切片を酢酸エチルに浸漬して數日保存した後も上の呈色反應は残るからクロロゲン酸は遊離の状態ではなく, 細胞膜質, 特に中葉の成分と結合して存在するものと思われる。上と同様な呈色反應は稈, 葉鞘においては上記の組織に相當する場所だけでなく, 柔組織の細胞膜にも認められる。

5. ペーパークロマトグラフィーによるクロロゲン酸の檢出

前述の方法によつて得た葉の抽出物につきペーパークロマトグラフィーによりクロロゲン酸を檢出した。

第4圖 水稻の葉の抽出物及びクロロゲン酸のペーパークロマトグラフ

1. カテコール
2. コヒー酸
3. クロロゲン酸
4. 試料 (水稻の葉)
5. ヒドロキノン
6. レゾルシン

たところ全てクロロゲン酸の呈色反應と一致した。

6. 考 察

病斑の褐變帶を圍む黄變部の細胞内には黄色顆粒が存在し Ehrlich 氏アルデヒド試薬により赤色を呈する。この試薬は通常インドール檢出に用いられるものであるがそれに特異的なものではなくキヌレン, アントラニール酸, フログルシン, ピロール, イボメ

結果は第4圖に示す。發色には酢酸で酸性とした上で亜硝酸ソーダを噴霧したがコヒー酸は橙赤色, クロロゲン酸は黄色, 試料も同じ, カテコールは黄褐色, ヒドロキノンは黒紫, レゾルシンは黒褐色であつた。Rf はクロロゲン酸は 5.2, 試料は 5.1 であつた。別の濾紙で試料の展開位置を切りとり, 他の呈色反應を試み

マアロン等にも呈色する。顆粒の反應が事實インドールによるものとすればチロシン、トリプトファンより褐色素を生成する行程が考えられるが、これらを期待して葉を分析した結果は全て陰性であつた。従つて兩アミノ酸は褐變の主要な原因物質とは考えられない。また顆粒の反應をインドールによるものとも速断出来ない。別にフェノール化合物を探索した結果クロロゲン酸が葉の特定組織の細胞膜に常成分として存在することが明かにされた。水稻にクロロゲン酸の存在することは Gortner¹⁾ に示唆されているがその存在部位については明示されていない。Politis⁴⁾ は *Compositae* の 95 属の植物についてこの物質が表皮及び葉脈周囲の細胞に多く存在することを認めているが、水稻における存在部位も Politis の所見とよく一致する。病變による細胞膜の褐變はこの物質に関連づけることは容易であり、第 1 圖の褐變部位と第 3 圖の本物質存在部位とが符合することもよくこれを説明している。しかし膜の成分であるクロロゲン酸が細胞内容の褐變を起すとは直ちに言い切れないその爲には、1) 膜に含まれるクロロゲン酸が病變により原形質連絡を通過して細胞内に浸透する、2) 細胞内で常時クロロゲン酸が生成され、細胞外に排出されていて、病變により排出が妨げられ細胞内に集積する、3) 病變によりクロロゲン酸の生成が促進される。等の何れか、又はその組合せが起る必要がある。又クロロゲン酸が存在するとしても、それが褐變する爲にはオキシダーゼ(カテコラーゼ、又は過酸化物の存在下でパーオキシダーゼ)により酸化されるか、又は Fe, Mn, Cu 等と結合して沈澱(むしろ黒變)することが起らなくてはならない。これらの可能性については後報に詳論することとし、本報ではクロロゲン酸が褐變の原因物質として最も可能性が大であり、その他恐らくは篩部に存在すると思われる未決定のフェノール化合物もその

原因となるであろうことを強調するに留める。

7. 要 約

- (1) 水稻の稻熱病感受性品種を供試し、病斑褐變の原因物質を追求した。
- (2) チロシン、トリプトファンは褐變の主要な原因物質とは考えられない。
- (3) フェノール化合物を検出する目的でジアゾ試薬を切片に加えたところ健全組織では特定組織の細胞膜(第 3 圖 a 参照)に、病斑組織や生理的に黄變した組織では全面的に呈色が見出された。
- (4) ディアゾ試薬により呈色を起す細胞膜の物質は他の試薬による反應からクロロゲン酸であろうと推定した。但し篩部細胞膜の呈色は直ちにクロロゲン酸とは言い切れない。
- (5) 葉に含まれるクロロゲン酸はペーパークロマトグラフィーでも検出された。
- (6) 病斑組織の細胞膜の褐變についてはクロロゲン酸が原因となることは容易に考えられるが、細胞内容の褐變については更に検討を要する。(昭和 27 年 9 月 22 日受理)

引用文献

- 1) Gortner: Cited from Bomer, A. et al.: Handb. Lebensmittelchemie I. Allgemeine Bestandteile der Lebensmittel. (1933) p. 555.
- 2) Hoeyfner, W.: Chemiker Zeitung 56: 991 (1952)
- 3) 百瀬勉: 有機定性分析 (1950) p. 60.
- 4) Pauly, H. & Neukam, K.: Ber. Deutsch. Chem. Feselsch 40: 3488 (1907)
- 5) Politis, J.: Comp. rend. 288: 265 (1949)
- 6) Saunders, K.H.: The aromatic diazo-compounds and their technical application. (1949) p. 10.
- 7) 鈴木直治: 農業技術 7: 200 (1952)
- 8) 豊田榮, 鈴木直治: 日植病報, 17: 未発表(1952)
- 9) 八濱義和, 上代昌: リグニンの化学(1947) p. 48.
- 10) 吉井甫: 日植病報. 6: 289 (1937)

Résumé

In the previous paper, it was suggested that the browning phenomena of lesions might take part in the resistance of leaf tissues of rice to the blast disease, caused by *Piricularia oryzae*.

This paper deals with the constituent of rice plant which may probably give rise to the brown coloration. Results of analysis of amino acids showed that tryptophane and tyrosine could not be considered as the main causes of the brown coloration, despite granules turning red with Ehrlich's aldehyde reagent were usually observed in affected cells of assimilating tissue, suggesting probably the presence of some indole derivatives. The cell membranes of vascular bundle, collenchym, and epidermis turn red to orange with diazo reagent. By means of staining methods using Liebermann's nitroso reaction or Hopfner's reac-

tion, phloroglucinol-HCl, benzidine-HCl, Payen's reaction, ammonium solution, FeCl₃ solution, and conc. H₂SO₄ revealed that these membranes reacted quite similar to chlorogenic acid. In addition chlorogenic acid was detected in the crude extract of leave by means of paper chromatography.

Chlorogenic acid appears to exist usually in a form not free but combined with a certain constituent of cell membrane. The presence of chlorogenic acid in the cell membrane may account for the browning of cell membranes of the affected tissues which usually precedes the browning of cell content. Moreover, results of further observations suggest that there exists a possibility that chlorogenic acid is produced and accumulates in affected cells and causes the browning of cell contents.