稲熱病斑の組織化学的研究

III. 病斑周辺の呼吸について

豊田 栄・鈴木直治*

Sakae TOYODA and Naoji SUZUKI : Histochemical studies on the lesions of rice blast caused by *Piricularia oryzae* CAV. II. Changes in the respiration of infected tissues.

I. 緒 言

著者らは第I報で病斑の褐変が組織の抵抗と関係をもつこと、第II報で組織の褐変が稲の含有するクロロゲン酸を主とするポリフェノールの不可逆的酸化によることを指摘した。しかしながら、クロロゲン酸或はその酸化生成物はイモチ病菌の生長を阻害し得ない²³⁾ことから見て、組織の褐変を単にポリフェノールの不可逆的酸化と考えるならばそれだけでは組織の抵抗を説明し得ない。高橋¹⁶⁾も指摘しているように、葉鞘裏面接種の成績では高度に抵抗している細胞では褐変は起らないから、褐変は抵抗の結果の表現かも知れない。

褐変の原因物質として一応ポリフェノールがあげられたが、これを不可逆的に酸化する機作についてはまだ不明の点が多い。豊田²²⁾は健全な稲の葉にはポリフェノールを直接酸化する酵素の存在がみとめられず、 H_2O_2 存在下で酸化の起ることから、ポリフェノールを酸化するのは peroxidase ではないかと推論した。しかしながら、 H_2O_2 の存在、その生成機作については明らかでない。このような行程はおそらく組織の呼吸と関連をもつであろう。

鈴木、富沢、豊田¹⁵⁾は甘藷紫紋羽病感染組織を材料として呼吸率の増加—バスツール効果—磷酸の行動の間に見られる一連の関係を見出し、それと抵抗との関連について考察を与えた。その後鈴木、豊田¹⁴⁾は同じ材料について、抵抗の弱るに従い呼吸率は異常に増加し、バスツール効果を失い磷酸化中間生成物が無機磷酸を放出するにいたる過程でその呼吸の終末酸化酵素が金属酵素から非金属酵素に変ることを見出し、そのような呼吸はATP生産という点からは能率の低いものであらうと推論した。

玉利ら¹⁸⁾はイモチ病菌の産生する毒素として α -ピコリン酸とピリクラリンを証明しており、これらは金属酵素の活性を阻害することが容易に考えられるのでイモチ病感染組織においても甘藷紫紋羽病感染組織と同様なことが起きている可能性が強い。そして感染組織で非金属酸化酵素としてフラビン蛋白が働いていれば、それによつて H_2O_2 の生成されることも推定される。

このような観点から稲の葉のイモチ病感染に伴う呼吸率の増加、バスツール効果の減少、終末酸化酵素の変化の間の関連、そのような変化と抵抗との関連について検討を加えた成績を報告する。

この研究を進めるに当り有益な助言を頂いた生理科松中昭一技官、貴重なイモチ菌毒素を分譲された新潟大学玉利教授に深く感謝する。

2. 材料と方法

供試稲品種は愛知旭、関東53号、植木鉢ガラス室栽培の本葉5～6葉のもの及び呼吸阻害試験には $1/5$ ワグネルポット栽培の分けつ最盛期のものを使用した。病斑は総て人工接種により得たもので測定の前直前に既報²¹⁾に従つて病斑型を類別記載した。供試部位は第1図に示す如く、罹病の影響を最も受けていると思われる病斑外接の組織を3mmの巾に切り取り、“病斑周辺組織”として測定に供した。呼吸の測定は総てワールブルグ検圧計を用い、25°C暗黒下で行つた。

3. 結 果

a 病斑型による呼吸率の変化と $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ 値の変化

各病斑型の病斑周辺組織をワールブルグ容器主室内に保ち、0.05mlの水を注加して湿度を飽和状態に保つた。また対照として同一条件下で栽培した稲の同一部位の無接種葉組織を同様に測定した。解糖率は容器

* 農林省農業技術研究所

第1図 呼吸測定に用いた病斑の型と供試組織のとり方

Fig. 1. A. The central necrotic area (C) of the lesion is removed, and the marginal zone (M) is used for the respiration measurements. B. Types of lesions used for the measurement of respiration rate. 5: lesions on susceptible tissue, 3: lesion on resistant tissue and 4: lesions on moderately susceptible tissue.

内ガスを N_2 で置換し、無酸素下での CO_2 排出率で表わした。結果は第1表に示す。

第1表 病斑型を異にする病斑周辺組織の呼吸率と解糖率

	5~4型		4型		4~3型		3型	
	周辺組織	対照	周辺組織	対照	周辺組織	対照	周辺組織	対照
Q_{O_2}	6.10	1.17	5.00	1.45	5.20	1.82	3.51	2.61
$Q_{N_2CO_2}$	0.63	0.64	1.60	1.30	2.40	1.33	2.65	2.04
$Q_{air}^*/Q_{N_2CO_2}$	8.2	1.6	2.6	1.0	1.8	1.2	1.1	1.1

註: * 空気中でのRQを0.85として算出した Q_{CO_2} を示す

表で見る如く病斑が進行型である程呼吸の増加が大きく、5~4型では対照の約5倍に達している。

$Q_{air}^*/Q_{N_2CO_2}$ について見ると停滞型の3型病斑では

第2表 感染組織のRQ (5~4型病斑)

	病斑周辺組織	隣接組織*対照(無接種)
Q_{O_2}	6.50	4.50
Q_{CO_2}	5.65	3.50
RQ	0.87	0.78

註: Q_{CO_2} は直接法により測定, * 周辺組織より0~2.0 cm間の葉組織

対照と同一の1.1を示しているが進行型ではその値が大きく、5~4型では理論限界値^{13, 24)}の3を越え8.2に達して居り、パスツール効果の低下している事が推察される。

次に罹病に伴うRQの変化について見ると、第2表に示す如く感染によって幾分増加するのが見られるがその程度は余り大きくない。

b. 病斑部よりの距離と呼吸率

罹病による呼吸増加の拡がりを知るため病斑部より距る距離と呼吸について調べた。結果は第3表の如くで病斑部より距ると呼吸の増加率は急激に低下し、6~9 cm離れた部分ではほぼ正常の呼吸率を保っているのが見られる。

c. 各病斑型の病斑周辺組織の呼吸に及ぼす呼吸阻害剤の影響

植物の呼吸系を調べる場合、各種阻害剤による呼吸阻害の状態を見るのが時と

して有効な方法となり得る。呼吸系酵素に対する各種阻害剤の影響についてはSlater¹²⁾による詳細な研究があり、宇佐美²⁰⁾はこれらの阻害剤による試験から麦の幼植物における呼吸系の変化につき報告している。

イモチ病斑周辺の呼吸が異常に増加している事は先

第3表 病斑部よりの距離と呼吸率 (4型病斑)

	病斑周辺組織	対照	隣接部*対照	遠隔部**対照
Q_{O_2}	3.9	2.2	2.6	2.2
			2.1	2.1

註: * 周辺組織より0~2.0 cmの部分, ** 周辺組織より6~9 cmの部分

に述べたが、呼吸系の上にも何らかの変化のあろう事が予想される。この点を知るため次の如き実験を行った。前記の如くして得た病斑周辺組織をさらに幅1 mm以下の細片とし、pH5.8のM/10 磷酸緩衝液中に浮遊せしめ、ワールブルグ容器の主室に保つ。側室には所定濃度の阻害剤溶液を入れ、測定0時にこれを主室内に注加する。初めの1時間を除いて次の2時間における O_2 の呼吸量から Q_{O_2} を算出した。結果は第4表の如くである。

第4表の結果から見ると、健全葉組織では8オキシキノリシ、サリチールアルドキシムで約30%、アジ化ソーダで約40%の阻害が認められるのに反して、5~4型病斑周辺組織では全く阻害が認められない。

第4表 異なる病斑型の病斑周辺組織の呼吸に及ぼす各種阻害剤の影響

阻 害 剤	5～4型		4型		3型		健全組織	
	QO ₂	(率)	QO ₂	(率)	QO ₂	(率)	QO ₂	(率)
H ₂ O	8.7	(100)	5.5	(100)	3.8	(100)	4.0	(100)
8-オキシキノリン	8.8	(101)	5.8	(106)	3.3	(87)	2.9	(72)
サリチルアルドキシム	8.8	(101)	5.7	(104)	3.4	(89)	2.9	(72)
アジ化ソーダ	10.2	(117)	4.3	(78)	2.8	(74)	2.5	(62)
p-ニトロフェノール	11.5	(132)	9.7	(176)	6.0	(158)	5.6	(140)

註：阻害剤は総て最終濃度 10⁻⁴ Mを使用した。

4型ではアジ化ソーダのみに阻害が認められ、3型では8-オキシキノリン、サリチルアルドキシム、アジ化ソーダ共に阻害を認めるが、その程度は健全の場合よりも低く、病変に伴い呼吸系に大きな変化の起る事が推測される。p-ニトロフェノールでは健、病共に呼吸の増加が認められ、その程度は抵抗反応の起り始める4型病斑の場合に最大であった。Bonner²⁾はp-ニトロフェノールをphenol oxidase系呼吸の特異的な阻害剤として述べているが、Simon¹¹⁾は酵母について2,4ジニトロフェノールと同様に呼吸増加の効果を現わす事を報じている。吾々の得た結果は後者に一致するものと思はれるが、これがuncoupler効果によるものであるが否かは尚今後の研究にまちたい。

次に病斑周辺組織でのアジ化ソーダによる阻害喪失をさらに確かめるため、アジ化ソーダ添加による呼吸商の変化について見ると第5表の如くで、健全組織ではアジ化ソーダの添加によつて呼吸量が低下し、呼吸商が増加する。即ちアジ化ソーダによつて有気呼吸系における金属酵素が阻害を受け、これに対応して無気呼吸が働き始めた事を意味するものと思われるが、病斑周辺組織では呼吸量、呼吸商共に大きな変化は見

第5表 アジ化ソーダ添加による呼吸商の変化

	5～4型病斑周辺組織		健全組織	
	N ₂ 添加	無添加	N ₂ 添加	無添加
QO ₂	4.85	5.00	1.75	3.30
QCO ₂	4.35	4.55	2.45	2.40
RQ	0.89	0.91	1.40	0.73

註：N₂の濃度は最終で 10⁻⁴ M, RQ値は直接法により測定

られず、アジ化ソーダに対して全く影響を受けない呼吸系即ちフラビン酵素系が働いているものと思はれる。

次にα-ピコリン酸による呼吸阻害を調べた。α-ピコリン酸は玉利ら¹⁸⁾によつてイモチ病菌の分泌する毒素の一つとして挙げられ、その作用

はキレート化合物生成による金属酵素の阻害として知られている¹⁷⁾。これらの点から見ると、病斑周辺組織の呼吸酵素に対して何らかの影響をもつことが予想される。結果は第6表の如くで、他の金属酵素阻害剤の場合と類似した傾向が認められるが、その作用は他の阻害剤程大きくない。

次にモノ沃度醋酸による呼吸阻害の状況を調べた。本剤はphosphofructokinase, triosephosphate dehydrogenaseを阻害してフラクトース-6-リン酸以下の解糖行程(Embden-Meyerhof-Parnas経路の)を阻害する事が知られて居り⁴⁾、本剤の呼吸阻害の程度からこれら以前の呼吸系、即ちHexose monophosphate shunt系の呼吸の増減を推察することができる⁷⁾。結果は第7表に示す如くで、病斑周辺組織では阻害率が低下しており、この系の呼吸が増加して来て

第6表 α-ピコリン酸による呼吸阻害

	最終濃度10 ⁻² M 添加			最終濃度10 ⁻² M 添加		
	無添加	阻害%		無添加	阻害%	
4型病斑周辺組織	5.30	6.65	20%	5.00	5.30	6%
対照(健全組織)	2.20	3.25	33%	2.42	3.35	28%

註：数値は QO₂ を示す

第7表 モノ沃度醋酸による呼吸阻害

	最終濃度10 ⁻³ M 添加			最終濃度10 ⁻⁴ M 添加		
	無添加	阻害%		無添加	阻害%	
4～3型病斑周辺組織	4.60	6.60	30%	5.95	6.25	5%
対照(健全組織)	1.98	3.18	38%	3.10	4.00	23%

註：数値は QO₂ を示す

いる事が推測される。玉利ら¹⁹⁾はピリクラリンの刺激によつて稲の糖代謝が同系に傾くらしい事を報じている。

4. 要約ならびに考察

以上の結果を要約すると次のようになる。(1)イモチ病斑周辺組織では呼吸が増加しており、増加の程度は組織の抵抗力が弱い程大きい、(2)抵抗力が弱い組織の

場合呼吸率が高まり、その呼吸はバスター効果で失い、(3)その終末酸化酵素としては金属酵素に代つてフラビン酵素が主導的となる、(4) G-6-P の酸化的通路による呼吸の割合が増加している。

このような現象は Sempio¹⁰⁾ の小麦ウドンコ病、鈴木、富沢、豊田¹⁵⁾ 及び鈴木、豊田¹⁴⁾ の甘藷紫紋羽病に関する研究成績と極めてよく一致している。要するに、感染組織の呼吸増加と抵抗するために必要なエネルギーを供給する目的としてみるとチトクローム系による呼吸が最も能率的であり、銅酵素系(アスコルビン酸オキシダーゼ系)、フラビン酵素系と移行するにしたがつてその能率が低下して行くものといえよう。

呼吸増加の原因については Allen¹⁾ は Johnson⁸⁾ の研究を引用し、酸化的磷酸化の低下による P-受容体の増加がその主因であろうとしている。フラビン酵素による呼吸は少くともチトクローム系列を通らない部分だけは ATP 生産が行われないと考えられるのでチトクローム系による呼吸に比べてそれだけ ATP 生産能率が低下しており、それによつて ADP の増加することは想像できる。このようなことが感受性組織における呼吸の異常増加の原因ではなからうか。逆に抵抗力の強い組織では呼吸率が 1.5—2.0 倍までしか増していない点から、金属酵素による呼吸が持続している間は抵抗するために必要なエネルギーの供給はこの範囲の呼吸増加で十分まかなえるといえよう。この点も甘藷紫紋羽病¹⁵⁾ の場合とよく一致している。

金属酵素の活性が感染の進行に伴つて失われる原因については、病原菌の産生する毒素(α -ピコリン酸、ピリクラリン、玉利ら^{17,20)})の作用が考えられる。しかしながら Gäumann 一派^{9,27)} はフザリウム酸が単に鉄、銅とキレート結合するだけでなく、原形質の凝固、透過性の増加をも起すことを指摘しており、他方チトクローム系を含む Cyclophorasis が構造に結合していることも知られている (Green⁶⁾) ので、原形質の変質によるチトクロームオキシダーゼの失活ということも当然考慮しなくてはならない。銅酵素は原形質の可溶性部分で働くといわれるが、原形質の変質まで到達すれば必ずしも安全とはいえないであろう。この点は今後の研究に譲ることとしたい。

$Q_{\text{CO}_2}^{\text{air}} / Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ 値は無酸素下のアルコール醗酵に比べて酸素呼吸でどれだけピルビン酸の消費が節約されるかを示すにすぎない。呼吸により糖の消費が節約され、一定の糖消費量に対する生長量が増加することはバスター効果として知られその原因については色々

な説がなされている^{5,24)}。しかし、呼吸により生産量が増し、TCA 回路からのアミノ酸、蛋白の合成が容易になることが主な原因であると見て大過はないであろう。ここで、たとえ呼吸が行われる場合でもそれが ATP 生産能率の低いものであれば当然糖の節約は起り得ない。

抵抗力の弱い組織における呼吸の異常増加とバスター効果の低下は瓜谷²⁵⁾ のような uncoupler 的物質の作用に帰するより、著者らは上述のような終末酸化酵素が感染に伴い金属酵素よりフラビン酵素に移行することに基因するものと思う。

感染に伴いブドウ糖磷酸の酸化的通路による酸化が増加することは甘藷紫紋羽病¹⁴⁾、ペニバナの銹病¹⁾について見られており、イモチ病斑についても同様で、おそらく組織腐変の原因物質であるポリフェノールの増加と関連をもつものと思はれる。

以上により感染組織でフラビン酵素が呼吸の終末酵素として活性化されることを知り得たので、今後これによつて生ずる H_2O_2 とパーオキシダーゼ、これらと関連をもつ代謝系についての研究を進めるつもりである。(1957年11月9日受理)

引用文献

- 1) Allen, P. J. : *Phytopath.*, 43 : 221—229. (1953).
- 2) Bonner, J. : *Plant Biochemistry*. New York. (1950). P.201.
- 3) Daly, J. M. & Sayre, R. M. : *Phytopath.*, 47 : 163—168. (1957).
- 4) Dickens, F. : 3^e éme congrès international de biochimie Rapports, P.126—135. (1955).
- 5) ——— : *The Enzymes*. vol.2. (1952). P. 624—683.
- 6) Green, D. E. : 生化学, 29 (2) : 1—7. (1957).
- 7) 本田幸一郎・小田圭昭・山口健郎 : 第30回日生化総会シンポジウム : 28 (1957).
- 8) Johnson, M. J. : *Science*, 200—202. (1941).
- 9) Linskens, H. F. : *Phytopath.*, 49 : 89—106. (1955).
- 10) Sempio, C. : *Phytopath.*, 40 : 1—23. (1950).
- 11) Simon, E. W. : *J. exper. Bot.*, 4 : 377. (1953).
- 12) Slater, E. C. : *Bioch. J.*, 45 : 8—13, 14—30. (1950). *ibid.*, 46 : 484—499, 499—503. (1950).
- 13) 鈴木直治 : 農業技術, 10 (11) : 1—6. (1955).
- 14) ———・豊田栄 : 農研報告, C-8. (印刷中).
- 15) ———・富沢長次郎・豊田栄 : 日植病報, 21

- (4):175~180. (1956).
- 16) 高橋喜夫：山形大学紀要, 2 (2): 37~44. (1956).
- 17) 玉利勤治郎・加治順：日農化誌, 26:298~303, 345~349. (1952).
- 18) ————：日農化誌, 28:254. (1954).
- 19) ————：日農化誌, 31:538~544. (1957).
- 20) ————：日農化誌, 31:383~387. (1957).
- 21) 豊田 栄・鈴木直治：日植病報, 17:1~4. (1952).
- 22) ————：日植病報, 18:76. (1953).
- 23) ————・土居養二・後藤和夫：日植病報, 18:162. (1954).
- 24) Turner, J.S.: Ann. Rev. Plant. Physiol., 2:145~168. (1951).
- 25) 瓜谷郁三・赤沢堯・瓜谷美代子：Nature, 174:1060. (1954).
- 26) 宇佐美正一郎：自然, 9 (11): 46~53. (1954).
- 27) Zähler, H.: Phytopath. Z., 23: 49~88. (1955).

Summary

This paper deals with the changes in the respiration of leaf tissues infected by *Piricularia oryzae*. Rice varieties, Aiti-asahi (susceptible) and Kanto 53 (resistant) were used. Leaf lesions occurring on these varieties were classified into 5 types as shown diagrammatically in Fig. 1. Lesions of the types 3, 4 and 5 were used for the experiments. Types 4 and 5 represent the lesions on the susceptible variety and type 3 represents the lesion on the resistant variety. From each lesion, the central necrotic area is removed and a marginal zone of about 3 mm width was taken as the material for measurement of the respiration rate.

If the tissue is resistant, the respiration is stimulated to some extent, not exceeding over two times as that of non-infected tissue, while if the tissue is susceptible, the respiration is stimulated up to 4 to 5 times. The RQ gives usually 0.8 in the healthy, and 0.9 in the infected tissues.

The diminution of Pasteur effect (shown by

$Q_{\text{Co}_2}^{\text{air}}/Q_{\text{Co}_2}^{\text{N}_2}$) is remarkable in the susceptible tissue, but in the resistant tissue it is not affected.

The respiration of resistant tissue is inhibited by 10-25 per cent by such metal enzyme inhibitors as NaN_3 , 8-hydroxyquinoline, and salicylaldehyde, while, that of susceptible tissue is not affected, suggesting that flavoprotein enzyme works as terminal oxidase in the infected tissue, in place of metal protein enzymes.

The above mentioned change of terminal oxidase system in the infected tissue is probable because it is already known that *P. oryzae* produces two toxins, α -picolinic acid and piricularin and that these are inhibitory to metal enzymes (Tamari et al.¹⁷⁻²⁰).

The writers consider that the main cause of unusual stimulation of respiration and the diminution of Pasteur effect in susceptible tissue is the change of terminal oxidase, from metal protein to flavoprotein.

(Nat. Inst. Agr. Sci.)

文 献 紹 介

くろさび病及びうどんこ病の感染をうけた小麦の呼吸

Farkas, G. L. and Király, Z.: Studies on the Respiration of Wheat Infected with Stem Rust and Powdery Mildew. *Physiologia Plantarum*, 8: 877—887. (1955).

罹病性品種の小麦幼植物にくろさび病菌及びうどんこ病菌を接種して罹病に伴う呼吸率の変化を調べると、前者では健全葉の3倍、後者では約2倍の呼吸率増加が認められるが、機械的に傷害を与えた場合には6%の増加に過ぎない。この場合罹病葉では菌自身の呼吸も同時に測定されるがその比率は極めて少ないものと考えられる。種々の呼吸阻害剤を葉組織に真空浸透させて阻害効果を見ると、 10^{-3}M 沃度酢酸では66%、 10^{-2}M NaFで約40%、 10^{-3}M Na N_3

では約85%の阻害を示し、その程度は健全葉、くろさび罹病葉共に大差なく、解糖系、終末酸化酵素系には大きな変化はないと思われる。ただし 10^{-3}M のKCNでは、罹病葉が36%の阻害を示したのに反して、健全葉では全く阻害が認められなかった。次に 10^{-2}M マロン酸による阻害を見ると健全葉では70%阻害されるのに比して、くろさび病葉では、35%、うどんこ病葉では40%の阻害に止まり、malachite greenによる阻害も罹病葉で低下している点から、罹病に伴い解糖系と終末酸化酵素系の間に働くTCA回路に大きな変化の起ることが推察される。以上に示した呼吸の変化は菌の代謝する毒素に起因するものと思われるが、その分離には成功しなかった。(豊田栄)