Pellicularia filamentosa の代謝毒素の分離*

西村正陽**・佐々木睦男**

Syoyo NISHIMURA and Mutsuo SASAKI: Isolation of the phytotoxic metabolites of *Pellicularia filamentosa*.

I. 緒言

Pellicularia filamentosa Rogers は多くの植物に寄生して立枯れ、根腐れあるいは葉腐れなどを起こす多犯性菌として知られている。本菌の代謝毒素に関しては、組織崩壊を起こさせるペクチン質分解酵素あるいはセルラーゼなどの酵素的物質^{3,4)}と、組織の壊死あるいは芽生えの生育抑制を起こさせる非酵素的物質^{2,3,4,6,7,9)}の存在とがこれまで諸氏によつて報告されてきた。

著者らは今回後者の毒性物質の分離を試み、それが酸性物質であることを確認した。そして本菌の培養液の酸性分画から8物質をそれぞれ結晶として単離し、それらの植物に対する毒性を検定した結果、それらのうち4物質が著るしい毒作用を有することを認めた。ついでそれらの理化学的性質を検討して、フェニル酢酸（以下PAA）、パラ・ハイドロオキシ・フェニル酢酸（以下 *p*-OH-PAA）、メタ・ハイドロオキシ・フェニル酢酸（以下 *m*-OH-PAA）および未確認酸であることを知った。

本報告の一部はすでに昭和37年4月6日の日本育種学会で発表した⁹⁾。本研究を行なうにあたり種々御指導を賜つた本学広江勇教授、初田勇一教授、浜崎敏講師、*o*-, *m*- および *p*-OH-PAA の標品を分与戴いた武田薬品磯野正雄氏、元素分析の労を願つた日本曹達、理化学研究所の方々および供試菌の分与を願つた北陸農試斎藤正氏の各位に厚く感謝の意を表する。なお本研究は科研費による総合研究（種属間交雑による牧草の育種に関する基礎的研究）の一端として行なわれたものである。

II. 実験材料および方法

供試菌とその培養法：ラジノクロウバーの葉腐病菌として分離した菌株を主として用いた。培養ろ液から

の毒性物質の抽出分離には、あらかじめショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地に28°C、1週間培養しておいた本菌を接種源として、0.5%ペプトン含有Richards氏液（500 mlの三角フラスコに150 mlずつ分注）で28°C、約40日間静置培養した。なお本菌の培養ろ液の毒性は40日培養頃が最も強くなるようであるが、その頃から急激に培養液が褐色化するので培養の終点の大体の目安になる。

毒性の検定方法：培養ろ液の抽出分画や単離された物質の毒性の検定にはつぎの2通りを併用した。1つはラジノクロウバーの葉の表皮を針で軽く傷をつけ、その上に検定すべき液を毛细管で滴下し、湿室にしたシャーレ内に入れ、28°C 48時間後の黒褐色壊死斑の出現の有無により検定する方法である。他はラジノクロウバーの種子の発芽阻害およびその後の芽生えの生育抑制の有無を置床（ろ紙をしいたシャーレ）後28°C-72時間で検定する方法である。

III. 実験結果

1. 培養ろ液からの毒性物質の分離、精製

第1図 培養日数と培養ろ液の毒性との関係

* 農作物病害の病理化学的研究（邦文編）第XXIV報（鳥取大植病）

** 鳥取大学農学部

本菌の培養ろ液の毒性は第1図のように、培養40日目頃が最高であつた。かかる培養ろ液10lをHClでpH 3.0に補正後、1%活性炭を添加すると毒性物質はすべて吸着された。ついでその吸着炭はアンモニア性メタノールで数回溶出された。得られた暗褐色のメタノール溶液は減圧下で濃縮乾固された。この乾固物は強い壊死、芽生えの生育抑制の両毒性を示した。またこの抽出物は多くの酸性物質を含んでいることが考えられるので、ペーパークロマトグラフィー〔東洋ろ紙No. 51, 展開剤ベンゼン・酢酸(5:1), 上昇法〕を行ない、BPBエタノール溶液で発色すると、第2図のように、こ

れは少なくとも8コの酸性物質の混合物であることが認められた。なお8コのスポットのうちRf0.28と0.22部とはジアゾ試薬の噴霧でフェノール性水酸基特有の呈色を示し、またRf 0.39部は1%KMnO₄水溶液の噴霧で不飽和結合を有する物質特有の黄色の褪色斑を示した。

上記の乾固物を熱水に溶解後、HClでpH 3.2とし、ベンゼンでくりかえし抽出した。得られたベンゼン溶液はベンゼンを留去し、その残渣を熱ヘキサンから反復結晶させるとm.p. 74°Cの結晶が得られた(物質I)。収量約25 mg。この物質Iはペーパークロマトグラフィーによつて、第1図のRf 0.98の物質に相当することを知つた。

ベンゼンで抽出されない水層はつぎに酢酸エチルでくりかえし抽出すると、毒性物質はすべて酢酸エチル

層に移行した。したがつてこの中には少なくとも7コの酸性物質が混在していることになる。それらをそれぞれ単離するためにはペーパークロマトグラム切り取り抽出法が便利であつた。すなわち50×45 cmの東洋ろ紙No. 51の下端から6 cmのところに上記の酢酸エチル溶液の濃厚濃縮液を帯状に塗布し、これをペーパークロマトグラフィーにかけた(展開方法は前記に同じ)。こうして得られた数枚のろ紙をよく風乾するとともに、各物質の展開位置を確かめたのち、各ろ紙から目的とするRf帯を切り取り、つぎのようにしてそれぞれの物質の単離を行なつた。

Rf 0.82部: 切り取りろ紙をアセトンで抽出し、ついでアセトンを留去後、その残渣を熱ベンゼンから再結をくりかえしてm.p. 176°Cの結晶を得た(物質II)。収量約8 mg。

Rf 0.39部: 前同様切り取りろ紙をアセトンで抽出し、ついでアセトンを留去後の残渣をベンゼン・石油エーテル混液から結晶させ、最後に熱ベンゼンから再結をくりかえして、m.p. 142°C (130°C 附近で一部昇華)の結晶を得た(物質III)。収量約18 mg。

Rf 0.28, 0.22 および 0.18部: 3者のRf値が接近しているのでそれぞれの単離がかなり困難であつた。そこで最初3者の展開部位を一緒にして同時にアセトン抽出し、これを再び新しいろ紙でペーパークロマトグラフィーを行ない、風乾後再び同一溶媒で展開を行なういわゆる多重展開法を試みた。そしてその後それぞれのRf相当部をアセトンで抽出し、のち熱ベンゼンから再結をくりかえした。その結果それぞれm.p. 129°C(物質IV, Rf 0.28), m.p. 148°C(物質V, Rf 0.22) および m.p. 185°C(物質VI, Rf 0.18)の結晶を得た。収量はそれぞれ約5 mg, 13 mg および 22 mgであつた。

Rf 0.09部: この部の物質は結晶化できず、液状物質と考えられた(物質VII)。収量はごく少量。

Rf 0.02部: 切り取りろ紙をアセトンでくりかえし抽出し、アセトン留去後の残渣をエーテルから結晶させると、昇華性のある結晶が得られた(物質VIII)。収量はごく少量。

2. 各物質の毒性

上記の諸方法によつて得られた物質IからVIIIまでの8物質を用いて、ラジノクローバーに対する毒性を調べた。

第1表は葉に対する壊死毒性、第3図は芽生えに対する生育抑制毒性の検定の結果である。ともに物質I, III, IVおよびVが著しい毒効果を示すことが認め

第2図 培養ろ液の酸性成分のペーパークロマトグラフィー
展開剤: ベンゼン・酢酸(5:1)
発色剤: BPB エタノール溶液

第3図 培養ろ液から単離された各物質のラジノクロバールの芽生えの生育におよぼす影響

第1表 培養ろ液から単離された各物質のラジノクロームの葉に対する壊死毒性の比較^a

	毒 性
物質 I	卅
／ II	士
／ III	卅
／ IV	卅
／ V	卅
／ VI	一
／ VII	一
／ VIII	十

^a それぞれ 1,000 倍稀釈液で比較

られた。

3. 各物質の理化学的性質

物質 I：本物質は m. p. 74°C の特有のにおいを有する光沢ある無色板状結晶である。熱水、アルコール、アセトン、エーテルおよびベンゼンに易溶、石油

エーテルに難溶である。元素分析、紫外線 ($\lambda_{\max} = 260 \text{ m}\mu$) および赤外線吸収スペクトル (第4図) 測定の結果は PAA に一致する。なお PAA と混融して融点降下しない。

物質 II：本物質は m. p. 176°C の淡黄色針状結晶である。水、アルコール、アセトンおよびエーテルに易溶、ベンゼンに難溶、石油エーテルに不溶である。いまだ物質の同定までには至らないが、紫外線吸収スペクトルは 350 $\text{m}\mu$ に極大吸収があり、赤外線吸収スペクトルの測定の結果は第5図のようであつた。

物質 III：本物質は m. p. 142°C (130°C 附近で一部昇華) の無色柱状結晶である。熱水、アルコール、アセトンおよびエーテルに易溶、ベンゼンに難溶、石油エーテルに不溶である。紫外部には特定の吸収はなく、また赤外線吸収スペクトル測定の結果は第6図のようであつた。いまだ物質の同定までには至らないが、二重結合を有する脂肪酸カルボン酸であるらしい。

第4図 物質 I の赤外線吸収スペクトル (Nujol)

第5図 物質 II の赤外線吸収スペクトル (Nujol)

第6図 物質Ⅲの赤外線吸収スペクトル (Nujol)

第7図 物質Ⅳの赤外線吸収スペクトル (Nujol)

第8図 物質Ⅴの赤外線吸収スペクトル (Nujol)

物質 IV：本物質は m. p. 129°C の無色柱状結晶である。溶媒に対する溶解性は物質 III とほとんど同じである。ジアゾ試薬で橙黄色を呈する。元素分析、紫外線 ($\lambda_{\max}=275\text{m}\mu$) および赤外線吸収スペクトル (第 7 図) 測定の結果は *m*-OH-PAA に一致する。なお *m*-OH-PAA と混融して融点降下しない。

物質 V：本物質は m. p. 148°C の無色針状結晶である。溶媒に対する溶解性は物質 III あるいは IV とほとんど同じである。ジアゾ試薬で黄紅色を呈する。元素分析、紫外線 ($\lambda_{\max}=275\text{m}\mu$) および赤外線吸収スペクトル (第 8 図) 測定の結果は *p*-OH-PAA に一致する。なお *p*-OH-PAA と混融して融点降下しない。

物質 VI：本物質は m. p. 185°C の無色柱状結晶である。溶媒に対する溶解性は物質 III、IV あるいは V とほとんど同じである。種々の性質はコハク酸に一致し、コハク酸と混融して融点降下しない。

物質 VII：本物質は水、アルコール、アセトンおよびエーテルに易溶、ベンゼンにやや難溶である。液体であり、その Rf 値などがよく乳酸に一致する。

物質 VIII：本物質は水、アルコールおよびアセトンに易溶、エーテルにやや難溶である。収量が少ないので種々の性質が調べられなかつたが、その Rf 値 [ベンゼン・酢酸 (5 : 1) で 0.02, ブタノール・酢酸・水 (4 : 1 : 1) で 0.63 (tailing する)] がよくシュウ酸と一致した。

IV. 考 察

Pellicularia filamentosa は多犯性かつ腐生度合いの高い病原菌である。したがってその病原性のなかに占める侵略力は弱く、反対に発病力はきわめて高いことが想像される。このような病原菌では当然代謝毒素の存在の重要性は無視できないものと思われる。

この実験に供試した *P. filamentosa* は少なくとも 8 コの酸性物質を代謝し、そのうち 4 コすなわち PAA, *p*-OH-PAA, *m*-OH-PAA および未確認酸 I コがクローバーに著しい毒性を示すことが認められた。実際にはこれらが混在して同時に毒性を示すものであろう。なお青木¹⁾の私信によれば、氏もテンサイの根ぐされ病菌として分離された *P. filamentosa* から PAA と *m*-OH-PAA との代謝が証明された由である。とくに記してその御通知に感謝の意を表する。なお同じ *Pellicularia* 属である *P. sasakii* からは以前 Chen¹⁰⁾ によつて *p*-OH-PAA の産生が報告されている。したがって *Pellicularia* 属菌全般にわたつて、PAA あるいはその OH 誘導体が代謝されているの

ではないかとも考えられる。この点については目下多数の同属菌株を用いて比較実験中であり、後報の予定である。

なお本供試菌の場合 PAA とともに、そのパラ位およびメタ位の両 OH 誘導体を代謝しているが、両 OH 誘導体は PAA を経て代謝されるのではないかと予想されるのでこの点を少し実験してみた。すなわち磯野⁵⁾の方法に準じて、まず 0.5% ペプトン含有 Richards 氏液体培地で本菌を 28°C, 15 日間静置培養して菌蓋を形成せしめたのち、その培養液を PAA 3 g をリン酸緩衝液 (pH 6.8) 1 l にとかした溶液と取りかえて、さらに 15 日間培養を続行した。その後前記の毒性物質を単離した時と同じ抽出操作を試みたところ、多量の *m*-OH-PAA が単離できた。したがって両 OH 誘導体のうち *m*-OH-PAA は PAA を経て生成されることになる。

なお本研究はその目的をクローバー類の葉腐れ病菌の毒素自体の性状を明らかにするとともに、さらに本病に対するその耐病性品種の育種において、病害抵抗性の度合いを毒素に対する寄主の感受度で定量的にかつ早期に判定することの可能性を調べる点においている。後者の実験結果については別に報ずる予定である。

V. 摘 要

Pellicularia filamentosa (ラジノクローバーの葉腐れ病菌株) の培養ろ液から葉に黒色壊死を起こさす毒性物質の分離を行ない、その有毒な酸性分画に 8 コの物質が混在することを認め (物質 I ~ 物質 VIII), それらをそれぞれ結晶として単離した。

それらのラジノクローバーに対する葉の壊死毒性と種子の発芽阻害ならびにその後の芽生えの生育抑制毒性を調べた結果、物質 I, III, IV および V が著しい毒効果を示した。

それら 8 コの物質の理化学的性質を検討して、それぞれ物質 I はフェニル酢酸、物質 IV はメタ・ヒドロオキシ・フェニル酢酸、物質 V はパラ・ヒドロオキシ・フェニル酢酸、物質 VII はコハク酸、物質 VIII は乳酸および物質 VIII はシュウ酸であることを確認した。なお物質 II (m. p. 176°C) および物質 III (m. p. 142°C) は未確認酸である。

なおメタ・ヒドロオキシ・フェニル酢酸はフェニル酢酸を経て代謝されることを知つた。

(1963. 1. 14 受理)

引用文献

1. 青木博夫 (1962). 私信による.
2. Boosalis, M. G. (1950). *Phytopath.* 40 : 820-831.
3. Deshpande, K. B. (1960). *Biol. Plant Acad. Sci. Bohemoslov* 2 : 139-151 (Chem. Abstr.).
4. Huber, J. (1956). *Phytopath. Z.* 27 : 73-82.
5. 磯野正雄 (1956). *日農化誌* 30 : 802-806.
6. Kerr, A. (1956). *Australian J. Biol. Sci.* 9 : 45-52.
7. Newton, W. and Mayers, N. (1935). *Sci. Agr.* 15 : 399-401.
8. 佐々木睦男・西村正暘 (1962). *育種雑* 12 : 199.
9. Sherwood, R. T. and Lindberg, C. G. (1962). *Phytopath.* 52 : 586-587.
10. Chen, Yu-Shin (1958). *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* 22 : 136-142.

Summary

The present paper deals with the isolation and purification of phytotoxic metabolites produced by *Pellicularia filamentosa* causing leaf blight of Ladino clover. By using two methods of assay for necrotic effect upon the leaves and inhibitory effect upon the seedling growth of Ladino clover, it was found that the acidic fraction of the filtrate from Richards' media containing 0.5 % peptone, on which the fungus had been grown for about 40 days at 28°C, was highly toxic to the host plant.

Eight acidic substances (Substance I~VIII) have been detected so far in the acidic fraction by paper chromatography as shown in Fig. 2, and each of these substances was further purified.

The results of tests for toxicity showed that Substance I, III, IV and V had a marked toxicity to Ladino clover, as shown in Fig. 3 and Table 1.

Judging from some physical and chemical properties, Substance I (m. p. 74°C), IV (m. p. 129°C), V (m. p. 148°C), VI (m. p. 185°C), VII and VIII were identified as phenylacetic acid, *m*-hydroxy-phenylacetic acid, *p*-hydroxy-phenylacetic acid, succinic acid, lactic acid and oxalic acid, respectively. Substances II (m. p. 176°C) and III (m. p. 142°C) remain yet to be identified.

(Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori, Japan)

文 献 紹 介

葉巻病に感染したジャガイモ葉汁液の Dische diphenylamine 試薬による反応

D. A. Govier: The reaction of the Dische diphenylamine reagent with sap from potato plants infected with Potato leaf-roll virus. *Virology* 19: 561-564, 1963.

Brandenburg は罹病 ジャガイモ葉をフェノールで抽出し、さらに RNase で処理して汁液接種を行なうと葉巻病が伝染し (4~25 %), DNase 処理を行なうと伝染が減少する (0~7%) ことから葉巻病ウイルスには DNA が存在するものと考え、この検出に Dische diphenylamine 試薬 (DDR) を用いテストしたところ健全汁液は青緑色を、病葉汁液は青色を示し健病間に差があることを見出した (*Phytopath. Z.* 43 : 420-424, 1962)。著者はこれらの実験を追試した。接種実験では同じ方法 (フェノール抽出と RNase 処理、一部は RNase 非処理) で処理した接

種源を同じ方法 (紙やすり法) とカーボランダム法で汁液接種を行なつたが感染が認められなかつた。DDR による試験では病葉汁液は青色で健全汁液は緑色を示したが、XウイルスやYウイルスに罹病した植物でもしばしば陽性 (青色) の反応を示した。そして健全汁液に 1/2~1% の果糖を含めると通常病葉汁液が示すと同じ程度の青色を示した。ペーパークロマトグラフィーで糖の検出を行なつたところほとんどの病株で果糖、ショ糖、ブドウ糖の存在が認められ、DDR による反応の程度からは果糖が 1/2~1%, ショ糖が <1/2% 程度含まれていることを示した。また DNA が沈殿する過塩素酸処理と遠沈処理、あるいはエタノール処理を行なつても DNA の沈殿はみられなかつた。これらのことから Brandenburg が報告した葉巻病の DDR による病葉汁液の青色は罹病によつて蓄積した果糖とショ糖による呈色である。
(榊原比呂志)