植物病理化学の前進

平井篤造*・富山宏平**・鈴木直治***

Tokuzo Hirai, Kohei Tomiyama, and Naoji Suzuki: Recent progress in plant pathological biochemistry in Japan.

第1回植物病理化学ゼミナールは昭和40年8月18~20日の3日間、北海道の定山溪で開かれた。このゼミナールの目的は、戦後にわが国で急速に発展した植物病理学の生化学的側面の最近の業績を要約し、あわせて研究者が3日間寝食を共にすることによって、相互の連繫を密にすることであつた。

1. 講演

まず本年度幹事の代表として平井が立つて、植物病理化学は植物病理学の異なる一派ではなく、植物病理学に十分に同化されたものであることを強調した。つまり現象から背後（メカニズム）への研究が進展するにしたがつて、必然的に物質の化学的行動——最終的には分子生物学——が問題とならざるをえなく、そのためには病理化学が生化学者だけではなく、病理学者自身によつても追求されねばならないのである。

第1日（8月18日）

には5つの講演が持たれた。まず奥八郎（三共）は「病原菌の生理化学的性質とイネごま葉枯病」について述べた（司会者 大谷吉雄）。本病菌の培養液中からはすでに ophiobolin という抗生物質が分離されている。これは健全なイネの葉には存在しない vivo-toxin である。Ophiobolin によつてイネの葉に胡麻葉枯病類似の斑点ができるが、その周囲の組織中にはポリフェノール成分が増加している。それを酸化するポリフェノール酸化酵素はイネの葉中には存在しないが、胡麻葉枯病菌はこれを産生する。菌のこの酵素はそれぞれ基質特異性を異にする数種のものからなり、ジャガイモのポリフェノール酸化酵素とは性質が違っている。すなわちごま葉枯病菌の酵素は安定で、しかも酸化しながら酸化生成物を重合させる作用が強い。本病菌は種々のポリフェノールの存在下で生育が阻害

されるが、それは菌のポリフェノール酸化酵素によつて生じた低重合度の酸化生成物によるものであろう。以上のことから、本病の特徴のある病斑の形成には、菌の以上の生理的諸性質が関係していることを推論した。

次に谷利一（香川大）が「カキ炭そ病の病態生理学的研究、とくに罹病果実の病徴発現にあずかるペクチン質分解酵素の役割」について講演した（司会者 鈴木直治）。本病菌の培養液中には、exo-polygalacturonase (exo-PG), endo-polygalacturonase (endo-PG), などのペクチン質分解酵素が認められる。カキの罹病性品種富有（病斑が拡大型）、抵抗性品種基盤（病斑が止まり型）とも、果肉の構成多糖類は同種のモノマーからなり、かつ両品種のペクチン、ホロセルロースには酵素基質としての本質的な差異がない。ところが抵抗性品種の細胞膜にはこの菌の多糖質分解酵素の活性を阻害する物質が高濃度に存在している。この阻害物質は4区分に分けることができるが、いずれも高分子のポリフェノール酸化縮合物と考えられる。以上は病斑が乾腐期のときに現われる現象であるが、一方、果肉が軟腐期に入ると、たとえば富有罹病果では、軟化の進行につれて汁液中のマセレーション (maceration) の作用が強くなる。このように果実自身の汁液中から2種のマセレーション酵素を分離することができた。軟化は宿主由来のマセレーション酵素によるもので、菌由来のペクチン酵素はこれに関係しない。

第1日の午後は西村正暢・Scheffer・Nelson（鳥取大・Michigan State University）の「*Helminthosporium* 属菌の victoxinine 代謝」ではじまつた（司会者 平井篤造）。本病菌の培養液は、本病に感受性のビクトリア系統の品種の芽生えの根の生育を約25万倍希釈でも阻害するが、一方、抵抗性品種では液は毒性を示さない。精製した毒素は非常に不安定で、速かに分解して base (victoxinine と命名, $C_{17}H_{29}$

* 名古屋大学農学部

** 農林省北海道農業試験場

*** 農林省農業技術研究所

NO) とペプチド (Asp, Glu, Gly, Leu, Val よりなる) に分かれる。分解物の victoxinine は毒性が弱く、かつ毒素それ自体のような寄主選択性がない。すなわち毒素分子中の ペプチド 部分は寄主選択性を、victoxinine 部分は毒性を示すものと考えられる。本病菌は培養をくりかえすうちに、病原性の異なる系統(異種)間の交配によつて、病原性を異にするいろいろな子孫を生ずる。そのうち病原性のないものは、victoxinine とペプチドを結合させる能力が消失したためと思われる。事実、両者の混合物に、病原性のある菌株の発芽胞子の磨砕液を加えると、毒素の生成が短時間のうちに起こる。以上のことから本病菌の病原性の発現機構については、victoxinine とペプチドを結合させる酵素(?)の存在を想定しなければならないのではないかと結論した。

次に大塚一止(新潟大教育)は「いもち菌のレースに関する生化学的研究」について述べた(司会者 大内成志)。いもち病菌には各種のレース(系統)があるが、いま 47 菌株について、そのレースのイネの品種に対する病原性の分化と対比させながら、菌の生化学的諸性質を研究した結果は次のようである。いもち病菌はチアミン、ビオチンの要求性の差異、チアミン欠ニコチン酸添加培地での生育の良否、硝酸還元性の有無、亜硝酸ソーダ、イヌリン、ソルボース、トリプトファンなどの利用度の差異などから、生化学的に 13 の型に類別できる。この類別を農技研で検定されたレースの区分と比較したところ、両者間に若干の例外はあるが、かなり密接な関連性があることが認められた。以上のほかいもち病菌の酵素系、とくに末端酸化酵素系についても、病原性の強弱と酵素活性について一定の関係があるようである。

図 第1回植物病理化学ゼミナールの参加者(北海道定山溪において)

— 横山竜夫撮影 —

第1日目の最後は、富山宏平・酒井隆太郎・佐久間勉・竹森俊彦(北海道農試)の「抵抗病斑隣接組織のフェノール化合物関連代謝とその抵抗性における意義」の講演に当てられた(司会者 山本昌木)。現在までに生体内部にあるフェノール化合物が、抵抗性の発現にどれほどの意義を持つているかについて、多くの疑問が提出されている。本報告はこの疑問に答えようとしたものである。いま R_1 -遺伝子を持つジャガイモ塊茎を薄片スライスにして、その一側面に非親和性レース(race 0)の濃厚胞子を接種すると、厚さが10~15細胞層以下では、その本来の抵抗性が失われる。この原因は、厚い組織でみられるような、隣接組織で生産されたフェノール化合物が被害部に供給されることが、薄いスライスではみられないからである。被害部におけるフェノールの濃度は、隣接の2層までの細胞を立体的に考えると、隣接細胞数は74となり、そこからフェノールの転流を考えると、菌の進展を阻止できるほど高いものと考えてよい。もう一つの注意すべき点は、侵害細胞から健全細胞へ滲透したフェノールによる隣接部での代謝転換である。すなわち塊茎スライスをクロロゲン酸とアスコルビン酸の混合物で処理すると、ペントース・リン酸回路の活性と o -ジフェノールの生産が増加する。以上のように「フェノール化合物の動的働きかけ」という立場をとることによつて、抵抗性という広範な現象の一部が説明されるであろう。

第2日(8月19日)

最初の講演は、故 豊田栄・鈴木直治(農技研)の「黒斑病菌の糖代謝経路と本菌に対する銅剤の作用機作」に当てられた(司会者 奥八郎)。ナシ黒斑病菌はグルコースを無酸素下でエムデン・マイエルホッフ経路を経て分解する能力がない。本菌は主として酸素の存在下で、ペントース・リン酸回路によつてグルコースを分解する。ところがこの経路上にあるグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素は銅イオンに極めて敏感である。例えば $10^{-4}M$ で80%の阻害があり、それは水銀剤より強力である。このことが銅剤が本菌に対して選択的な毒性を示す、一つの原因となるであろう。銅剤のなかではオキシ銅(8-キノリノール)が最も効力が高い。その理由はオキシ銅が Cu^{++} を細胞膜を通して原形質内に持ちこむ作用をするためと考えられる。もう一つのオキシ銅の有効な点は次の理由による。植物体表面に分泌されるアミノ酸や有機酸は、銅の作用を緩和する。これに対してオキシ銅は銅をキレートしてそれを保護し、その結果銅の安定性を増すのであ

る。

午前の第2の講演は、旭正・Verleur・本田有司・瓜谷郁三(名大農生化・Free University, Amsterdam)の「傷害および罹病植物のミトコンドリアに関する生化学的研究」であつた(司会者 富山宏平)。一般に植物組織が切断傷害や病菌の侵入を受けると、その隣接組織で呼吸が増大するが、この現象の機構がミトコンドリア(Mw)レベルで解析された。まず健全、傷害、および黒斑病罹病のパレイシヨ塊茎から、自己調節能をもつ(ADPの添加で呼吸が増加する)ミトコンドリアが得られた。切断傷害および黒斑病罹病カンシヨの塊根組織からもミトコンドリアが得られる。切断・罹病の両区とも表面から4.0 mmにいたる組織まで、健全と比べて酸不溶性のN化合物の量が増加し、またチトクロム酸化酵素の活性が大である。このことは該部でミトコンドリアの数の増加があることを示している。以上のことから切断および罹病植物での呼吸増加の機構は次のように考えられる。感染組織の隣接部ではフェノール類やタンパク質などの生合成によるエネルギー消費系が活性化するため、ADP量が増加する。またミトコンドリアの数の絶対的な増加が起り、この両者によつて呼吸が増大する。それは明らかにミトコンドリアの自己調節機能の消失によつて起こつた呼吸増加とは異なるものである。

第2日の午後は付近の公園のエキスカンションに費され、参加者が1人1人たがいに交情を温めあつた。

第3日(8月20日)

午前、まず大内成志・獅山慈孝・赤井重恭(京大)の「紫外線によるウイルスの不活化機構」の講演が行なわれた(司会者 瓜谷郁三)。タバコモザイクウイルス(TMV)の紫外線照射による感染性の低下はsingle hitの曲線に従い、かつintact TMVでは光による再活性化(photoreactivation)が認められない。TMV-RNAでは光再活性化が存在するから、両者の不活化機構は異なるものである。TMVに紫外線を照射すると、240~280 m μ における吸収が増大するが、TMV-RNAでは250~270 m μ の波長で特異的に吸光度が消失する。照射によるhypochromic effectは尿素処理で完全には回復せず、またホルムアルデヒドによるhyperchromic shiftも減少する。このことからTMV-RNAのピリミジンのdydrationおよびinterdimer or intradimerの形成が、紫外線によるTMV-RNAの不活化の機構と考えられる。これはまた蛋白および核酸合成の鋳型機能にも影響するものである。

午前の第2の話題として、高橋壮・平井篤造(名大)の「TMV感染タバコ葉のmitochondrial activity, Viral pathogenesis からみた呼吸エネルギー生成系活性化の発現を中心として」が提出された(司会者 児玉忠士)。タバコの葉の裏面にTMVを接種し、その表皮をはぎとると、接種直後から2日目までに、健全(カーボランダムのみで摩擦)表皮に比較して呼吸の増加が見られる。このときTMV量は表皮ではほとんど増加していない。呼吸増加の内容として、表皮のミトコンドリア分画のコハク酸酸化酵素、チトクロム酸化酵素の活性が考えられ、これらは呼吸と同じような時間的経過で増加し、また健全表皮のそれらより、呼吸量と同程度に増加する。感染表皮の呼吸はTCA回路を通り、チトクロム系で末端酸素につながる。その様相は健全表皮のそれと同じであり、ただ量的に感染区では2~3割酸素吸収量が増加する。感染表皮の呼吸はまたリン酸化と有効に共役しており、そのことも健全表皮の呼吸と同一である。いま表皮だけでなく、葉全体をとり、接種48時間前にactinomycin D(DNA依存のRNA合成を阻害する抗生物質)25 μ gを1葉あたり与えると、接種後20時間で健全葉に比較して呼吸の増加が見られる。葉全体からミトコンドリアをとり出し、そのチトクロム酸化酵素の活性をみると、呼吸の増加の時間的経過と一致して増加する。ところが呼吸増加が認められるより約10時間前に、ミトコンドリア分画への¹⁴C-アミノ酸のとりこみが増大する。このとりこみはin vitroの系でもエネルギー源を与えることによって認められる。DNaseやactinomycin Dはこのとりこみの増加を抑制する。以上のことから感染葉では、ミトコンドリア内でのなんらかのとりこみの増加が起り、次いで呼吸酵素系が活性化するものと考えられた。なおミトコンドリアの数の増加は見られなかつた。

2. 討 論

各講演の後では20~30分の活発な討論がかわされた。また第3日の午後は総合討論に当てられた。これらを参照して、討論の要旨を整理すると次のようである。

1. 毒素および酵素

感染には発病を伴なわない、いわゆる潜在感染もあるが、毒素は発病に関与する化学的物質である。毒素の研究で重要なことは、1) 植物の器官や組織に対する特異性があるかどうか、2) 宿主特異性があるかどうか、3) 植物の病気に対する抵抗性と毒素に対する

抵抗性の相関、4) 菌の毒素生産力と病原性との相関、5) 毒素がどこで働いているか、などの検討であろう。*Helminthosporium victoriae* の生産する毒素は、宿主選択性を有するという点で特異的にまれな例である。他の多くの毒素ではこうした特異性は存在しないが、ジベレリンを例にとつても、特異性がないということだけでその重要性を捨てることはできない。宿主特異性があるということは、対宿主（品種）の問題で、そこに宿主側のメカニズム（例えば毒素に対する receptor など）を考える必要がある（以上鈴木）。酵素においても、菌の分泌する酵素以外に、谷が報告したように、カキの果肉の軟化を基因する、菌の刺激によつて宿主自体が生産する酵素がある。いもち病におけるクマリン系物質も同様であり、病徴に対して菌の毒素だけが原因であるとはいいきれない。このように考えると、毒素、酵素、フィトアレキシンを通じて、それらの菌側の要因が宿主体内でどのような行動をし、またどのような作用を現わすかが、今後追求されなければならない問題である。

谷の報告したマセレーション酵素は健全なカキ果にはないが、2,4-D 処理やアルコール処理でもできる以上、それは菌の感染のみによつて起こる特異的なものではなく、菌によつてもこの酵素を induce するメカニズムが働いたと考えねばならない(奥)。この現象は bound された酵素類が、自己消化で活性化される現象に似ている。すなわちこれらの酵素は、細胞内では細胞内構造と結合して、感染前から存在していると考えてよいのではなからうか(児玉)。

ここに毒素や酵素は、すべての病気に普遍的に考えられるかどうかの問題がある。ジャガイモの疫病菌では多糖類と考えられる毒物質を生産するが、厳密な意味での低分子の毒物質はあつても非常に小量である(富山)。サツマイモの黒斑病菌でも、重要な働きをしている毒物質はないように思われる(瓜谷)。ウイルス病の例では、カブの黄化モザイク病(TYMV)で、ポリアミンが生ずるという実験があるが、これは宿主体内でできた毒物質類似のものと考えられないこともない(児玉)。一般に腐生菌～条件的寄生菌～絶対的寄生菌への推移にしたがつて毒性は弱くなり、逆に感染力は強くなる傾向がある。したがつて各人は自分のとり扱う対象菌がどのような位置にあるかをみて、毒素の意義を主張する必要がある(鈴木)。

西村はその講演のなかで、菌の病原性を支配するものが、one gene (または one cistron) — one enzyme の説でとり扱われうる可能性を示唆したが、そ

れを確認するためには、子嚢中のすべての子嚢胞子を取り出して、その病原性を調べる必要がある(大内)。しかしいづれにしても、ウイルス病におけるウイルス RNA の情報伝達や、蛋白質を抗原とした抗原抗体反応の研究の進歩からみて、生物学の諸問題が gene for gene interaction のレベルで検討できるような段階にきているように思われる(鈴木)。

2. フェノール

古くからフェノール化合物の抵抗性における意義が問題となつていたが、富山らは「フェノール化合物の動的働きかけ」の立場から、この問題についてかなり明快な解答を与えた。しかしフェノール化合物やフィトアレキシンの過敏感現象への関与は、むしろ結果を見ているのであり、過敏感現象の根本的究明は、フェノール化合物が増加するよりも、もつと以前にさかのぼつて検討する必要がある(山本)。

フェノール化合物の研究で重要なことは、どのような経路で生体内でフェノールができるかということである。そのためにはペントース・リン酸回路が活性化することは常識となつているが、どのような機作でそれが活性化し、またどのような経路でどのようなフェノール類がどれほど生産されるかなど、今後多くの現象を正確に知る必要がある。

フェノールに関連して、フェノール酸化酵素が問題となる。まずその分画に関しては、セファデックス以外に CMC カラムがよさそうである(谷、奥)。奥は胡麻葉枯病菌のポリフェノール酸化酵素に、それぞれの基質に応ずるものがあることを述べたが、多少とも特異性の異なる、いくつかの酵素群があることは興味のある点である(瓜谷)。またこの酵素と菌の病原性の関係はどうか(西村)など、今後に残された問題は大きい。谷の実験では、抵抗性のカキ果に生ずる多糖類分解酵素の阻害物質は、ポリフェノールの酸化重合物であるという。そこで、それらの阻害物質の正確な同定が、今後さらに重要となるであろう(旭)。

3. ミトコンドリア

旭らはジャガイモやサツマイモの塊茎・塊根からとつたミトコンドリアについて、詳細な研究を発表し、また平井らはタバコ葉のミトコンドリアの酸化能力について述べた。富山らも本年の春の学会のシンポジウムで、ジャガイモ塊茎のミトコンドリアが過敏感死に関係のあることを触れた。このようにミトコンドリアの植物病理における役割は最近とくに注目を引くようになってきた。

旭らは菌侵害隣接部でのミトコンドリアの数の増加

を見たが、それはミトコンドリアの分裂によるものか、あるいはプロミトコンドリアの生長によるのか(大谷)などの疑問が起こる。またミトコンドリア分画でのNの増加は、ミトコンドリアの数の増加に基づくもの以外に、ミトコンドリア内部でのNの増加は考えられないだろうか(平井)。平井らの実験では、ウイルス感染のタバコ葉でミトコンドリアの数の増加はなく、酸化能力の上昇が見られたが、この点についても実験方法その他について建設的な意見が出された(旭)。塊茎では切断によって組織内部のミトコンドリアは空気と接触して、**repressor** が除かれる。したがってミトコンドリアの呼吸増加が、真の呼吸増加を示すものか、あるいは **repressor** の除去に基づくものかの問題が出てくるが、この両者を考える必要があらう(富山)。平井らはミトコンドリア分画で、 ^{14}C -アミノ酸のとりこみの増加を見たが、この点については意見が集中され、グラナの破片やリボソームの混在、または細菌の **contamination** がないかどうか、慎重に再検討する必要があることが忠告された(児玉・大内その他)。また外部からのアミノ酸のとりこみには、細胞内でのアミノ酸のプールが関係するから、この点もチェックしておくことが大切である(旭)。いずれにしてもミトコンドリアの問題は、今後 **host-parasite interaction** の場における、ATP 産生という点に焦点をしばつて、さらに検討をつづける必要がある(鈴木)。

3. 夜間ゼミナール

この会合の一つの特徴は、参会者が3日間起居を共にすることによつて、夜間ゼミナールを持ち、フランクに話し合いをする機会を持ったことであつた。第1日目の夜は「今後の植物病理学の姿」について、また第2日目の夜は「今後の植物病理化学談話会の運営と方向」について、それぞれ真剣な意見がくみかわされた。

まず前者では、鈴木が植物病理学の歴史をふりかえりながら、その将来の像として、植物の生理や病理現象など一切に対して、分子レベルでの制御 (**molecular control**) が行なわれうる可能性について述べたの

が注目を引いた。鈴木の見解によると、最終的には宿主植物と寄生物との関係は **gene for gene interaction** として捉えられるであろうし、また現在、それが可能になる基盤が徐々にできつつあるというのである。瓜谷は境界領域に立つものの見方として、植物病理学が将来どういう意図を持つて研究を開拓してゆくのか。つまり寒害や冷害などの生理的な害や、大気汚染や薬害などの人工的被害などについても、植物病理学は積極的にそして精力的に研究をおし進める意図があるのかどうか、と質問を展開した。これらに対して、植物病理学の研究面での詳細な将来計画が作られる必要のあることが痛感された。しかし若い研究者の間では、今にわかに植物病理学の将来像を画くことは困難なようにも思われ、議論はそれ以上進展しなかつた。しかしわれわれには将来像は不必要なのではなく、未来は若い研究者の双肩にある以上、植物病理学の将来は是非とも若い人が主唱者となつて築き上げてゆくべきであろう。これに対して樋浦が立ち上つて、植物病理学と農業との関連、農民の利益となるような学問の発展について、蘊蓄をかたむけられたのは傾聴に価した。

今後のこの会合の運営については、植物病理学会所属の談話会として継続することを確認した上、次の意見が出された。今回は宿舎の関係もあり、参加者はかなり限られた人数であつたが、もつと多数の人を目標とした、また生化学の実験技術の開拓を企図した、講習会のようなものを開いてほしい。この線に沿つて、来年の夏には「夏の学校」を開くことでは意見が一致した。そこでは新しい生化学的あるいは病理化学的実験技術の解説に主眼がおかれるが、かならずしも実験方法にだけ限定するものでないことが申し合わされた。またその準備について幹事が任命された。しかし病理化学談話会の任務は、やはり研究者の研究のためにあるべきことが強調され、そのために来年あるいはその翌年に、本年と同じような規模でのゼミナールが開かれるであろう。そのためにの準備の幹事も指名された。このようにして、第1回植物病理化学ゼミナールは、開催地である北海道の大学・農業試験場の全面的な協力のもとに成功裡に終了したのである。

(1965. 9. 14 受理)

Summary

A biochemical plant pathology seminar was held at Zyozankei, Hokkaido on August 18-20, 1965. The following progress reports were presented at this meeting.

1. Oku, H. (Sankyo Pharmacological Institute, Shinagawa, Tokyo): The physiological and

chemical properties of the pathogen and their contribution to the formation of *Helminthosporium* leaf spot of rice.

2. Tani, T. (Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki, Kagawa): Studies on the pathological physiology of anthracnose of Japanese persimmon, with special reference to the role of pectic enzymes to the symptom development of the fruit.

3. Nishimura, S., Scheffer, R.P., and Nelson, R.R. (Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori; Michigan State University, East Lansing; North Carolina State College, Raleigh): The metabolism of victoxinine produced by the genus of *Helminthosporium*.

4. Otsuka, K. (Faculty of Education, Niigata University, Niigata): Biochemical studies on the physiological races of *Piricularia oryzae*.

5. Tomiyama, K., Sakai, R., Sakuma, T., and Takemori, T. (Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Sapporo): The metabolism of phenolic compounds found in the tissues adjacent to the resistant lesions and their role in the resistance.

6. Toyoda, S. (the late) and Suzuki, N. (National Institute of Agricultural Science, Tokyo): The carbon metabolism of black spot fungus of pear and the mode of action of copper fungicides against the fungus.

7. Asahi, T., Verleur, J.D., Honda, A., and Uritani, I. (Faculty of Agriculture, Nagoya University, Anjo; Free University, Amsterdam): Biochemical studies on the mitochondria obtained from injured and diseased plant tissues.

8. Ouchi, S., Shishiyama, Z., and Akai, S. (Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto): The mechanism of inactivation of plant virus by ultraviolet ray.

9. Takahashi, T. and Hirai, T. (Faculty of Agriculture, Nagoya University, Anjo): Mitochondrial activity of tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus.

The discussion was mainly focused on the toxic and enzymatic substances produced by fungi and their action within host plant tissues and on the phenolic compounds and polyphenol oxidases which are found around the infected tissues. Special mention was also made on the mitochondria in potato tubers and sweet potato roots as well as in tobacco leaves, with reference to the oxidative activities.