2. Phytoalexin

植 原 一 雄*

Kazuo UEHARA: Phytoalexin

Müller はジャガイモ疫病の研究において、病原力の弱い疫病菌の系統をジャガイモ塊茎に接種した後、病原力の強い系統を再び接種すると、その塊茎は病原力の強い系統に対しても抵抗性を示すようになることを認めた。そして塊茎のこの獲得された抵抗性は最初の感染の結果生じたものであり、その作用の本質はある種の物質であろうと考え、このものを phytoalexin (PA と略す) と名づけた。Müller¹⁰⁾ はその後この PA 説を証明するためにインゲンを用いて実験を行ない、インゲンの莢に接種した *Monilinia fructicola* の孢子浮遊液中に本菌孢子の発芽を抑制する作用が現われることを認め、これは前に推論した PA と同一のものであると考えた。水上⁸⁾ もまた Müller とほとんど同時に独自の立場からオオムギの葉を用いて全く同様な現象を認めた。

Müller の PA についての概念をごく簡単にいえば、病原菌の関与によつて寄主組織が能動的に生成するところの菌生育阻害物質であるといふことができる。このような考え方からすれば、黒斑病菌の侵入によつてサツマイモ塊根が生成する *ipomeamarone*²²⁾ や *Rhizoctonia repens* の感染を受けた *Orchis militaris* が生成する *orchinol*¹⁹⁾、あるいは *Ceratocystis fimbriata* を接種したニンジン根において生成される *isocoumarin*¹⁾ なども当然 PA の範疇に入ることになるが、ここでは Müller および水上に端を発した一連の研究について、しかもそれらの中で PA の生物学的な作用機作に関する問題を中心に話を進めたいと思う。

(1) 実験法

研究者により、また同じ研究者でも研究の目的や時期により実験法が異なるが、PA についての一連の研究の共通的な特色は、寄主組織上に孢子浮遊液の水滴をおき、一定時間後にそれを集めて PA 滲出液を得るところのいわゆる水滴接種法にある。

PA 滲出液の採取 葉の傷痕部あるいは莢の子室などに病原菌孢子浮遊液の水滴をおき、湿室に 24~

48時間おいたのち、その水滴を集め、遠心沈殿を行なつて上澄 (PA 滲出液) を得る^{8,10)}。

PA の抽出 必要に応じて PA 滲出液あるいは寄主組織より PA を抽出する。すなわち PA 滲出液に等量の石油エーテルを加えて 3~4 回の振出を繰り返し、溶媒を除去した後、振出留分に 3~5% のエタノールを加えて発芽試験を行なうか、あるいは振出留分に純エタノールを加えて紫外線吸収スペクトルを測定する。また寄主組織よりの抽出は、供試組織に 50% エタノールを加えて磨碎し、遠心沈殿を行なつて上澄を得、その上澄中のエタノールを除去した後、PA 滲出液の場合と同様に石油エーテルで PA を抽出する。この石油エーテルによる抽出は、Müller がその可能性を示し、Cruickshank⁴⁾ によつて実用化されたものである。

PA の検定 生物学的検定は次のようにして行なわれる。すなわち供試 PA 滲出液あるいは PA の 3% エタノール溶液を湿室中のスライドガラス上に 1 滴おき、病原菌孢子を浮遊せしめた寒天片をその中に入れ、所定時間後に孢子の発芽率あるいは発芽管長を測定して PA 活性を検定する^{8,10,18)}。また光学的検定法は次のごとくである。すなわち PA のエタノール溶液を光電分光光度計にかけ、その紫外線吸収スペクトルを測定する。特にエンドウの PA (pisatin) の場合には 309 mμ における吸光度を測定することによつて PA を定量することが可能になつた^{2,17)}。

(2) PA の生成

PA 研究の最初の段階では、各種の植物と病原菌との組み合わせについて PA が生成されるかどうかを調べることが必要であつた。多数の実験が行なわれた結果、多くの植物において PA の生成が認められ、またその植物に寄生性を有するかと否とにかかわらず、あるいはまたその病原菌が寄生菌であると殺生菌であるとを問わず、多種多様の病原菌が PA の生成に関与していることが示された^{8,10,18)}。また自然状態のエンドウの病斑部組織には多量の PA が存在することが示された^{2,18)}。そしてさらに葉、莖、莢などの地上部の組織

* 広島農業短期大学

に限らず、根、塊茎、鱗茎などの地下部の組織においても PA の生成が認められた^{5,18)}。これらの結果から PA は寄主と病原菌との争いの場一般に広く存在するものと考えられる。

(3) 寄主組織の状態が PA の生成に及ぼす影響

PA は病原菌の侵入に際して寄主組織が能動的に生成するものであるから、感染時における寄主組織の生理的活性が PA の生成に大きく影響するであろうことは当然考えられることである。どのような場合に PA の生成が少ないかを調べるために色々な状態の寄主組織を用いて多くの実験が行なわれた^{4,7~14)}。老熟、萎凋、窒素過多、麻酔処理、熱処理、低温などはいずれも PA の生成を減少せしめることが認められた。これらの処理はすべて植物組織の生理的機能を低下せしめ、ひいてはその病害抵抗力をも低下せしめることが知られている。したがって病害抵抗力の低下と PA 生成の減少とはよく一致すること、および PA の生成は寄主組織の代謝活性と密接に結びついていることが明らかにされた。

抵抗性の状態にある寄主組織では、感染後間もなく顕著な呼吸の増加がみられるが、Jerome ら¹⁹⁾はこの呼吸の増加と PA の生成との関連を詳細に調べ、両者の間に相関関係の存在することを示した。また Cruickshank⁴⁾は無酸素の状態ではエンドウの莢は PA を生成しないことを明らかにし、PA の生成が呼吸に結びついていることを示した。

(4) PA の生成を誘発する因子

既に述べたように植物はある特定の寄生菌だけでなく、他の多くの非寄生性の菌の関与によつても PA を生成するが、この場合生きた菌の存在することが不可欠の条件なのであろうか。ダイズの莢を用いた実験¹⁴⁾では、100°C、10 分間熱した孢子浮遊液あるいは磨砕した孢子の滲出液によつては PA の生成が認められなかった。しかし調製後 24 時間経過した孢子浮遊液の遠心上澄あるいは病原菌の培養液を接種すると PA の生成が認められた。このことは PA の生成が病原菌の侵入に伴う機械的刺激によつて誘発されるのではなく、病原菌の代謝産物の化学的な刺激によつて誘発されることを示すものであろう。このことは、簡単な無機金属塩や種々の有機薬剤あるいはある種の殺菌剤などによつても多量の PA が生成されることが認められた^{4,19)} ことによつて、さらに確かなものになった。こ

第 1 表 金属塩による PA の生成

金 属	陰 イ オ ン		
	NO ₃	Cl	SO ₄
Pb	+		
Hg		≡	
Ag	≡		
Zn	≡	≡	+
Cu		≡	≡
Ni		±	
Co	±	≡	
Fe	≡	+	+
Mn			±
Cr	+	≡	
Ca	—	±	
K		±	
Mg		±	
Na	±	—	

れらのことから、PA の生成にはある特定の物質が関与することは必ずしも必要ではなく、植物組織に何らかの意味での刺激を与える物質が存在すればよいのではなかろうか。植物組織は種々の化学薬剤の処理によつて呼吸が増加し、感染初期と同じような変化を生ずる。この変化が感染による変化と全く同一のものであるかどうかは別として、いずれの場合にも同じように PA の生成が認められるのは興味深いことである。特に水銀（有機水銀殺菌剤を含む）と銅の化合物において PA の生成が顕著に認められたことは、この両金属が現在殺菌剤として広く使用されていることとあわせて考える時、非常に重要な意味をもつているように思われる。すなわち殺菌剤としての銅剤あるいは水銀剤はその直接的殺菌効果の他に、その PA 生成誘発作用による間接的な効果をも有するのではなかろうか。薬剤散布によつて植物が抵抗性を獲得する場合のあることが知られているが、この現象に PA が関与している可能性は十分に考えられる。今後十分に検討されるべき問題であらう。

(5) PA の寄主特異性

植物と病原菌との異なる組み合わせによつて生成される各種の PA がすべて共通の化学物質であるか、あるいはその生成に関与する植物または病原菌の種類によつて特異的なものであるかということを調べるために、いくつかの PA についてその紫外線吸収スペクトルが測定され、その異同が検討された。植原²⁰⁾はエン

ドウの莢に *Ascochyta pisi*, *Glomerella cingulata* および *Gibberella zeae* などの病原菌や、種々の化学薬剤をつけた場合に生成される PA はすべて同一の紫外線吸収スペクトルを示すことを認めた。一方各種の植物から得た PA を比較したところ、エンドウ、ソラマメ、ダイズ、ナタネ、タマネギなどの PA はそれぞれ異なる吸収曲線を示すことが認められた。さらに Cruickshank⁵⁾ はエンドウの PA である pisatin, ソラマメの PA である viciatin, インゲンの PA である phaseolin を単離し、それぞれが別の化学物質であることを示した。また ipomeamarone, orcinol, isocoumarin あるいは trifolirhizin もそれぞれ別の化学物質であることが知られている。これらのことから、PA はその生成される植物の種類によつて特異なものであり、その生成に関与する病原菌や薬剤の種類によつては影響されないように思われる。

(6) 病原菌の寄主特異性と PA との関係

PA が各種の菌類に及ぼす害作用に差異が存在するかどうかということは、PA 研究上の一つの重要な課題として強い関心がもたれ、いくつかの実験が行なわれたが、その結果は各研究者によつて必ずしも一致しなかつた^{8,10,16,18)}。その後 PA を滲出液から比較的純粋な形で抽出することが可能になつたので、この抽出された PA を培地に加え、これに各種の菌類を培養し、菌叢の生育を比較することによつて、この特異性の問題が再び検討された。

植原²¹⁾はエンドウおよびソラマメの PA をそれぞれ添加した培地にいく種類の菌類を植えて菌叢の生育を比較した。結果は第1図に示す通りである。まずエンドウの PA は、エンドウの寄生菌である *Ascochyta pisi* および *Fusarium oxysporum* に対しては比較的弱

第1図 エンドウの PA を添加した培地上での各種菌類の生育

第2図 ソラマメの PA を添加した培地上での各種菌類の生育

い発育阻害作用を示すにすぎないが、普通の状態では寄生性を有しないと思われる *A. fabae*, *Gibberella zeae*, *Piricularia oryzae* などに対しては非常に強い害作用を示し、特に *P. oryzae* や *Botrytis fabae* に対しては殺菌の効果を示し、またエンドウの重要寄生菌ではないが寄生性は有すると思われる *Glomerella cingulata* や *Pellicularia filamentosa* などに対しては前二者の中間的な害作用を示すことが認められた。またソラマメの PA の場合においても全く同じ傾向が認められた(第2図)。エンドウとソラマメの両 PA の場合について、それぞれにおける *A. pisi* と *A. fabae* との生育を比較すると、エンドウの場合には *A. fabae* は *A. pisi* よりもはるかに強い害作用をうけるのに対し、ソラマメの場合には両者の位置が全く逆になつている。さらに植原²¹⁾はナタネの PA について、また野中(未発表)は ipomeamarone について、全く同じ傾向の結果を得た。また Cruickshank³⁾ は pisatin について大がかりな実験を行ない、50 種の供試菌の中でエンドウに寄生性を有する 6 種の菌だけがその生育を阻害されなかつたことを報告した。

これらの結果から、一般にある植物に寄生性を示さない菌類は、その植物の PA によつて非常に強い生育阻害作用をうけるが、寄生菌はそうのように強い害作用はうけないものと考えてよいであろう。このことは PA 作用の最も重要な一面として、PA が寄主-寄生菌間の特異性を支配する要因であることを強く示すも

第2表 エンドウのPAを添加した培地の菌叢の周辺に生じた透明斑の直径 (mm)

培地のPA濃度 供試菌	1	1/2	1/4
<i>Ascochyta pisi</i>	12	15	25
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	10	17
<i>Pellicularia filamentosa</i>	0	5	13

のと思われる。

エンドウのPAを添加すると培地は白濁し、不透明となるが、このような培地に培養した *A. pisi*, *F. oxysporum* など数種の菌においては、その菌叢の周辺に円形の透明な部分（透明斑）が認められる²¹⁾。この透明斑は、培地での生育が良好な菌ほど、また培地のPA濃度が低いほど、その直径が大きいたことが観察された（第2表）。この透明な部分よりPAを抽出、定量したところ、明らかにPA濃度の低下がみられた。したがってエンドウに寄生性を有する菌は、エンドウのPAを無毒化する能力を有しているものと考えられる。逆にいえば、エンドウのPAを無毒化する能力を有しているからこそ、エンドウに寄生することができるのではなからうか。

(7) PA 生成反応の速度

Müller¹⁰⁾ はインゲンの莢と *M. fructicola* とを用いて、接種後の経過時間とPA生成量との関係を調べ、14時間を経過した孢子浮遊液中にはPAが存在することを認めたが、このPA滲出液を濃縮すると、10時間目にしてすでにPAが認められることを示した。植原¹⁸⁾はエンドウと *A. pisi* との組み合わせにおいて、接種後6時間目の孢子浮遊液中にPAが存在することを光学的検定法により認めた。また Cruickshank⁴⁾によれば、エンドウに病原菌をつけた場合、6～8時間の休止期間の後30時間目位までは直線的にその濃度が増加し、さらに若干の休止期間において、また濃度が増大するという。そして非寄生性の菌を接種した時の方が、寄生性の菌を接種した時よりも第1段階におけるPA生成量が多く、その次に来る休止期間も短いという。また植原（未発表）は抵抗性の状態にあるイネは、罹病性の状態にあるイネよりもPA生成反応の速度が早いことを認めた。

PAの生成反応は非常に短時間に開始されるので、植物が示す能動的な抵抗反応としては最も早い部類に属するものであろう。しかしかなり古い病斑部においても多量のPAが存在する¹⁸⁾ことからして、PAの

作用は初期反応だけでなく、その後も続いて抵抗反応に関与しているものと推察される。

(8) あとがき

研究の進展とともに、最初に Müller が考えた PA に対する概念は、いくらか改める必要が生じてきた。例えば、Müller¹⁰⁾ は寄主細胞の過敏感死との関連においてPAを理解しようとしたが、Cruickshank⁵⁾ は、PAは細胞の過敏感死とは無関係に生ずるものであり、またPAは寄主細胞の過敏感死の原因にもなりえないことを示した。また寄主と病原菌との相互反応によつてのみ生成されると考えられたPAが、病原菌の存在しない場合にも生成されることが認められた。さらにまた、Müller は病原菌に対する害作用に特異性は存在しないと考えたが、現在ではこの作用上の特異性こそPAの最も重要な機能と考えられるようになった。このようにPAに対する概念は次第に変つてきたが、現在までに得られた知見をもとにして、PAの見地だけから病原性あるいは抵抗性の問題について一応の説明を加えようとするならば、おおよそ次のような想定を下すことができるのではなからうか。

ある病原菌がある植物には寄生しうるのに、ある植物には寄生し得ない理由は、両植物の生成するPAの質的な差異にその原因を求めねばならない。もしこの両方の植物をとともに犯す病原菌があるとすれば、その病原菌はこの質的に異なる二つのPAをとともに無毒化する機能をもっているであろう。このような考え方からすれば一種類のPAしか無毒化することができないのが単犯性の菌であり、多種類のPAを無毒化しうるのが多犯性の菌であるということになるであろう。また植物の品種間の抵抗性の差異、あるいは環境による抵抗力の変化は、生成されるPAの量的差異によるものと考えられる。そしてまた、病原菌の系統による病原性の差異は、菌のもっているPA無毒化能の強弱によつて説明することが可能であろう。

これらの想定は、今後のPA研究の進め方を検討する場合の一つの指標になるかも知れない。

主要参考文献

1. Condon, P. and Kuć, J. (1960). *Phytopath.* 50 : 267-270.
2. Cruickshank, I. A. M. and D. R. Perrin (1961). *Aust. Jour. Biol. Sci.* 14 : 336-348.
3. Cruickshank, I. A. M. (1962). *Ibid.* 15 : 147-159.

4. Cruickshank, I. A. M. and D. R. Perrin (1963).
Ibid, 16: 111-128.
5. Cruickshank, I. A. M. (1963). Ann. Rev.
Phytopath. 1: 351-374.
6. Gäumann, E., Braun, R. and Bazzigher, G.
(1950). Phytopath. Z. 17: 36-62.
7. Jerome, S. M. R. and Müller, K. O. (1958).
Aust. Jour. Biol. Sci. 11: 301-314.
8. 水上武幸 (1953). 日植病報. 17: 57~60.
9. 水上武幸 (1953). 同上 17: 141~143.
10. Müller, K. O. (1954). Phytopath. Z. 27: 237
-254.
11. 植原一雄 (1958). 日植病報 23: 127~130.
12. 植原一雄 (1958). 同上 23: 225~229.
13. 植原一雄 (1953). 同上 23: 230~234.
14. 植原一雄 (1959). 同上 24: 224~228.
15. 植原一雄 (1960). 同上 25: 85~91.
16. 植原一雄 (1960). 広島農短大研究報告. 1: 7~
10.
17. 植原一雄 (1962). 同上 2: 1~7.
18. 植原一雄 (1962). 広島農短大植病研究室特別報
告1号. 1-87.
19. 植原一雄 (1963). 広島農短大研究報告. 2: 41
~43.
20. 植原一雄 (1964). 日植病報. 29: 1~5.
21. 植原一雄 (1964). 同上. 29: 103~110.
22. 樋浦 誠 (1943). 岐阜農専学術報告. 50: 1~5.

討 論

Discussion

座 長 平 井 篤 造

Chairman: Tokuzo HIRAI

平井 (名大農): ファイトアレキシンの特色と考えられるのは、今のところ4ないし5つの事項である。ところでファイトアレキシンと考えるべき範囲にどういふものまで加えられるのか。すなわち定義は。

野中 (佐賀大農): 寄主の特異性がファイトアレキシンの定義の point と思う。生産部位は一応考えずに、刺激により生産される物はファイトアレキシンと定義してよい。

植原 (広島農短大): 予め定義を定める要はなく、なお多くの研究結果が自然に枠を作り出すと思う。

平井: ファイトアレキシンが host-parasite interaction の場における役割、すなわち菌の侵入阻害の点で関与すると考えられるし、また組織内部で生産される ipomeamaron の役割をも考えて定義を論じて見たい。

意見—Müller は, host の過敏性による菌の死を host の生産する毒素によるとしているの、彼はファイトアレキシンの中に組織内部での反応生産物をも含めている。

平井: イポメアマロンのようなものも含めているのか。

意見—もちろん含めている。菌の伸長を阻止し、これを殺滅する毒素も含めている。

平井 第2の議論として特異性の問題に入りたい。host が同じなら、菌が異なっても同様な物質が生産されるというが、そのような特異性の少い物質が、host-parasite interaction という極めて特異性がなくてはならぬような現象をどこまで説明し得るのか。寄生菌と非寄生菌とではファイトアレキシンに対する反応が違うというが、race 間にも差があるのか。