Fusarinic Acid の植物生育阻害作用の機構に関する研究 (第1報) 水稻種子の発芽生育に及ぼす Fusarinic Acid の阻害作用の観察

玉利 勤治郎, 加 治 順 (新潟大学農学部)

昭和26年10月30日受理

Studies on the Mechanism of Injurious Action of Fusarinic acid on Plant Growth. Part. 1.
Observation of the Injurious Action of Fusarinic Acid on Sprouting of Rice Seed.

By K. TAMARI and J. KAJI (Dept. of Agric., Niigata Univ.)

Fusarinic acid は恩師藪田博士が1934年稲馬鹿苗病菌 *Gibberella Fujikuroi* (Winel) の代謝生産物の一つとして無色板状の結晶 (m. p. 109°) に分離されてその化学構造を 5-*n*-butylpyridine-2-carboxylic acid なりとされた⁽¹⁾ものである。但し側鎖の構造は尙確証を必要としたので、曩に研究者の一人玉利はその側鎖の構造を確かめるため、fusarinic acid を脱炭酸して得られる fusarinin を合成して側鎖が *n*-butyl 基なる事を確証したが、その後 fusarinic acid が如何なる機構の下に植物に対して發育阻害作用を及ぼすかと言う問題を取り上げて生化学的研究を試みた。

Fusarinic acid を作用せしめた場合に植物生育の初期の状態を観察すると、その最も特徴とする所は発芽並びに幼芽の生育は阻害されないが、之に反して、発根並びに幼根の生育を著しく阻害されるという現象である。かかる現象は水稻を水中で酸素欠乏状態に於て、発芽せしめた場合に知られている。著者等は図に示す如くガラス鐘の中の空気を可及的に酸素を除いた空気で置換して(ガラス鐘を予め真空とし之に酸素を除去せる空気を送る操作を3回繰返す)、この中でガラスポットを用いて、水稻(農林1号)を発芽せしめた場合、写真の如く fusarinic acid の 0.02% 溶液の作用の下に発芽せしめた水稻と殆んど同じ生育状態を示す事を観察した。かかる事実から fusarinic acid の植物生育阻害作用の本質は呼吸阻害にある事が推察される。而して事実、WARBURG 検圧計を用いて、呼吸量の測定を行つた結果は実験の部に示す如く、fusarinic acid の作用に依つて著しい呼吸の阻害が見られる。即ち fusarinic acid の作用に依り、呼吸酵素系が著しく阻害されると考えられる。

さて fusarinic acid の化学構造を考察すると、pyridine 核の lone pair を持つたN原子に隣れるC原子に carboxyl 基が結合している。従つてその金属塩に於て、金属原子は、lone pair を持つたN原子と配位結合し

Fig. 1

Photo 1.

Rice seedling Norin No. 1, cultured on wet cotton wool in a small glass pot at 30°C for 4 days.

- A.....Control
- B.....Rice seedling, cultured in the air free from oxygen.
- C.....Rice seedling, cultured on cotton wool, which absorbed 0.02% solution of fusarinic acid.

て分子内錯塩の形態をとり、安定な五角環の chelate ring (鉄状環) を形成する能力を持っている。なお、遷移元素としての金属元素の性格を考慮すると、此の環は共鳴状態に於て恰も芳香族環に類する如き安定性を持つものと想像される。一般に chelate ring はよく発色するが、fusarinic acid に於て銅塩は青紫色に、又鉄塩は濃黄色に発色する。

Fusarinic acid の Chelation

以上の如き考察に基づいて著者等は、fusarinic acid の植物生育阻害作用の要因中少くとも一つは次の機構に存するものと考えた。即ち、fusarinic acid に依り植物体中で微量の鉄及び銅* イオンの如きが強力に捕捉される結果、catalase, peroxidase, cytochrome 等、鉄ポルフィリン系呼吸酵素（その他その形成に金属イオンが関与する酵素）の形成並びに作用が著しく阻害されて、結局植物体の組織に呼吸障害を来すものであろう。事実、実験を試みると fusarinic acid を作用せしめる時は、発芽中の catalase, peroxidase の形成に著しい阻害作用が見られる。又第 5 報に述べる所であるが調製された此等の酵素液に、fusarinic acid を作用せしめた場合も同様である**。然かも、WARBURG による呼吸の阻害度と catalase 或は peroxidase の阻害度との間の相関係数を相関分析法によつて検定すれば、極めて高い標本相関係数を以て、相関関係が成立する。従つて、呼吸の阻害が、catalase, peroxidase 等鉄ポルフィリン系酵素の阻害に起因している事は明らかである。然かも呼吸阻害試験、或は、catalase, peroxidase の酵素力阻害試験に於て観察される試験成績と水稻の発芽生育試験に於て観察される試験成績とは極めてよく一致する。かかる事実は、fusarinic acid の植物生育阻害作用の本質が、catalase, peroxidase 等の呼吸酵素の阻害作用に存している事を示しているものと考ええる。尙 chelation の形成に関して fusarinic acid とその基本構造を同じくする α -picolinic acid にも全く類似の阻害作用が見られる。

* 銅イオンは鉄ポルフィリン系酵素の形成に必要とされている所であるが水稻に於ては鉄と共に根部に最も多く含有されている（志方益三，館 勇：農化，10，368）。

** Fusarinic acid には植物体中で鉄ポルフィリン系酵素の形成を阻害する面と作用自体を阻害する面とがあるが、鉄ポルフィリン系酵素がその作用を著しく阻害される事に関してはその鉄の部分に fusarinic acid が配位結合でもするか、如何なる機構に依るかは吸収曲線を調べる等の方法に依つて今後究明したいと思う。

Table 1. Experiment on the Respiration of Rice Grain (Norin-No. 1), which is cultured under the injurious effect of Fusarinic Acid at 30°C.

The respiration of rice grain was measured by the Warburg-manometric method.

Temperature of water bath : 30°C

Shaking time : 30 minutes

The gas in the vessel : air

Number of rice grains : 10

Volume of 10% KOH solution in the vessel : 0.5 cc

Volume (c. cm)	Control		Fusarinic acid		α -Picolinic acid	
	V.F	V.G	V.F	V.G	V.F	V.G
	=0.5	=21.5	=0.5	=20.9	=0.5	=21.7
Vessel constant	KO ₂ =1.97		KO ₂ =1.92		KO ₂ =1.99	
Cultured for 4 days	Absorbed volume of O ₂ gas. (c. mm)		Absorbed volume of O ₂ gas. (c. mm)		Absorbed volume of O ₂ gas. (c. mm)	

124.5 127.0
130.5 130.0

0.0025 {	115.0	121.5	124.0	123.3
	117.3	128.5	119.0	133.2
0.005 {	93.1	98.5	111.2	114.0
	101.0	104.5	116.5	119.5
0.0075 {	80.0	81.0	88.8	92.0
	86.3	89.1	90.1	97.1
0.01 {	52.5	60.4	29.8	65.5
	62.7	64.3	69.2	77.0
0.02 {	51.9	55.0	51.5	57.7
	54.3	57.7	60.0	62.4

Cultured rfo 5 days

{ 150.1 154.5
156.5 159.0

0.0025 {	140.2	146.3	149.4	152.0
	151.0	154.8	156.8	149.6
0.005 {	120.2	116.7	125.5	128.3
	121.0	126.7	138.8	127.8
0.0075 {	89.8	97.6	108.1	108.0
	99.5	105.8	99.5	116.5
0.01 {	66.1	71.2	70.4	75.2
	70.5	72.0	77.7	81.3
0.02 {	60.3	59.5	65.6	62.3
	66.2	69.6	70.4	69.4

Fusarinic acid and α -picolinic acid both proved to have analogically notably injurious action on the respiration of rice grain.

実験の部

総て薬液の濃度は fusarinic acid の 0.001%.

0.0025%, 0.005%, 0.0075%, 0.01%, 0.02% に相当するモル濃度即ち 0.000056, 0.00014, 0.00028, 0.00042, 0.00056, 0.00112 mole を基準として用いた。濃度表示には便宜上%濃度を使用したが高密にはモル濃度を一致せしめた。

(1) 呼吸作用に及ぼす薬液の阻害試験 試験方法は径 4.5 cm, 深さ 3.0 cm のガラスポットに脱脂綿を 0.5 cm の厚さに敷き, それぞれの濃度の薬液 20 cc を注加して, 之に試験粒 (塩水選, 洗滌, 乾燥せるもの) 20 粒を浸して毎日 20 cc の目盛汽蒸発せる水分を補いつつ 30° に保つた。又薬液の pH は総て 5.5~5.8 に調製した。

試験はその 10 粒宛をとつて WARBURG の検圧計に依り吸収酸素量を測定した。即ち Fig. 2 の如き容器の底部に 10% KOH 0.5 cc を入れ, 金網を置いてその上に発芽粒をのせ, 圧力計に挿入して 30° の水槽中に 30 分間振盪後検圧計の読みに零点及び熱圧計の読みを加減し, それに容器恒数を乗じて酸素吸収量 I_R を表わした。結果は Table 1 に示す如くである。

10% KOH 0.5 cc

Fig. 2

(2) Catalase 作用の阻害試験 呼吸作用阻害試験と同様に粒 (農林 1 号) を fusarinic acid, α -picolinic acid の 0.0025%...0.02% 迄の濃度の液を浸せる脱脂綿上に 30° にて 4 日間乃至 5 日間生育せしめ, その 10 粒宛をとつて試験に供した。

試験は HENNICH'S の方法に依つた。即ち粒を剥皮して磨碎し, 之に $M/15 K_2HPO_4$ (pH 7.2) 25 cc を混じて 15 分間放置後遠心分離し上澄液 10 cc をとり之に $M/15 K_2HPO_4$

Table 2. Test of the Injurious Effect of Fusarinic Acid and α -Picolinic Acid on Catalase Formation in Rice Seedling.

Rice grains (Norin No. 1) are cultured at 30°C for 4~5 days on cotton wool, which absorbs fusarinic acid solution or α -picolinic acid solution. Catalase power was measured by HENNICH'S method. I_C ...N/20 $KMnO_4$ value (cc), equivalent to the H_2O_2 , which is decomposed by catalase

Cultured for 4 days.				Cultured for 5 day			
Fusarinic acid	I_C	α -Picolinic acid	I_C	Fusarinic acid	I	α -Picolinic acid	I_C
0.0025%	5.59	0.0025%	5.85	0.0025%	6.47	0.0025%	6.63
0.005	4.78	0.005	4.50	0.005	5.76	0.005	5.83
0.0075	4.49	0.0075	4.69	0.0075	5.38	0.0075	5.56
0.01	3.48	0.01	3.53	0.01	3.60	0.01	3.95
0.02	3.01	0.02	3.24	0.02	3.10	0.02	3.29
control	5.95	control	5.95	control	6.93	cont	6.93

10 cc, 0.02 N H_2O_2 10 cc 及び再蒸溜水 50 cc を加える。30 分間放置後 2% H_2SO_4 10 cc を加えて酵素作用を止め, 直ちにこれを N/20 $KMnO_4$ にて滴定してその cc 数を x とする。一方 blank test の滴定 cc 数を y とすれば $I_C = y - x$ は catalase に依て分解された H_2O_2 に相当する N/20 $KMnO_4$ の cc 数にして catalase 力を示す値である。実験は総て parallel に 3 つ宛試みてその平均値を求めた。(Table 2)

Table 3. Test of the Injurious Effect of Fusarinic Acid and α -Picolinic Acid on Peroxidase Formation in Rice Seedling.

Rice grains (Norin No. 1) are cultured at 30°C for 4 days on cotton wool, which absorbs fusarinic acid solution or α -picolinic acid solution. Peroxidase power was measured by BACH-ZUBCOWA'S method. I_P ...Guaiacol value (mg), which is oxidized by peroxidase.

Fusarinic acid	I_P	α -Picolinic acid	I_P
0.0025%	1.95	0.0025%	2.27
0.005	1.75	0.005	1.97
0.0075	1.38	0.0075	1.66
0.01	1.05	0.01	1.35
0.02	0.64	0.02	0.88
control	3.17	control	3.17

Test rice seed is cultured for 4 days.

(3) Peroxidase 作用の阻害試験 呼吸作用阻害試験と同様に粒 (農林 1 号) を fusarinic acid, α -picolinic acid の 0.0025%...0.02% 迄の濃度の液に浸せる脱脂綿上に 30° にて 3 日間生育せしめてその 10 粒宛をとつて試験に供した。

試験は BACH-ZUBCOWA の方法に依つた。即ち粒を剥皮し海砂 2 g を加えて磨碎し之に $M/15 KH_2PO_4$ (pH 5.5) 15 cc を混じて 15 分間放置後遠心分離し, 上澄液 6 cc* を大きさの一定なる試験管にとり, 之に 0.1% guaiacol 1 cc, $M/15 KH_2PO_4$ (pH 5.5) 2 cc, 0.02 N H_2O_2 1 cc を加えてよく混合し, 30° の恒温水槽中にて 30 分間保つた後直ちに標準色**と比較した。

* 1 又は 2 日間生育の場合は peroxidase 力が弱い為 6 cc をとつたが, 3 又は 4 日間生育の時は 1 cc をとつて得られた値を 6 倍して peroxidase 力を求めた。その時は再蒸溜水 5 cc を加えて 6 cc とする。

** 液化せる guaiacol の液は不安定なる為, 5% $K_2Cr_2O_7$ 液 1.2 cc を 10% $Co(NO_3)_2$ 液 50 cc に加えたる溶液を用いる。この標準液を稀釈して最低濃度の管が 10 cc 中に酸化せる guaiacol 0.05 mg を含有しているものに相当しているようにする。

即ち種々の濃度の標準液 10 cc 宛を密閉管に入れたる色と比較して酸化せる guaiacol の mg 数を求めて peroxidase 力を表わした。実験は総て parallel に 3 つ宛試みてその平均値を求めた。

(4) 呼吸阻害と Catalase 力阻害 或は Peroxidase 力阻害との相関関係 或る濃度に於て fusarinic acid, α -picolinic acid を作用させて生育せしめた籾の呼吸量, catalase 力及び peroxidase 力をそれぞれ l_R, l_C, l_P とし対照実験のそれを夫々 L_R, L_C, L_P とすれば $H_R = 1 - l_R/L_R$; $H_C = 1 - l_C/L_C$; $H_P = 1 - l_P/L_P$ はそれぞれの阻害度を示す値である。今呼吸阻害度 H_R (平均値) 及び catalase 阻害度 H_C , peroxidase 阻害度 H_P よりそれぞれ求められる $\log H_C/(1-H_C)$, $\log H_P/(1-H_P)$ 値を各濃度に就て Table 1, 2, 3 より求めて纏めて表示すれば Table 4 の如くである。

然して Table 4 依り H_R と $\log H_C/(1-H_C)$ 或は H_R と $\log H_P/(1-H_P)$ の間の相関関係を相関分析法に依つて検定すればその間には極めて高い相関係数を以て相関関係が成立する。

Table 4. H_R , $\log H_C/(1-H_C)$, $\log H_P/(1-H_P)$ value of Fusarinic Acid and α -Picolinic Acid.

H_R	Coefficient of respiration hindrance.									
H_C	"	"	catalase power hindrance.							
H_P	"	"	peroxidase power hindrance.							
Test sample is rice seedling, cultured in various concentrations of these substances for 4 days and 5 days at 30°C.										
Test rice seed is cultured for 4 days.										
						Cultured for 5 days.				
H_R			$\log H_C/(1-H_C)$		$\log H_P/(1-H_P)$		H^R		$\log H_C/(1-H)$	
Fusarinic acid			Fus.		α -Pico		Fus.		α -Pico	
α -Picolinic acid			Fus.		α -Pico		Fus.		α -Pico	
0.0025%	0.063	0.024	-1.450	-1.882	-0.181	-0.398	0.045	0.020	-1.190	-1.280
0.005	0.175	0.102	-0.825	-1.030	-0.068	-0.201	0.219	0.161	-0.890	-0.922
0.0075	0.344	0.281	-0.495	-0.781	+0.130	-0.039	0.368	0.303	-0.441	-0.781
0.01	0.532	0.469	-0.211	-0.289	+0.334	+0.129	0.549	0.510	-0.104	-0.126
0.02	0.580	0.547	-0.082	-0.153	+0.605	+0.427	0.587	0.568	+0.015	+0.045

Regression equation

Fusarinic acid (Test rice seed is cultured for 4 days.)

$$\log \frac{H_C}{1-H_C} = 2.365 H_R - 1.414 \quad r=0.96 \quad P < 0.05$$

$$\log \frac{H_P}{1-H_P} = 1.369 H_R - 0.300 \quad r=0.97 \quad P < 0.05$$

cultured for 5 days

$$\log \frac{H_C}{1-H_C} = 2.252 H_R - 0.275 \quad r=0.99 \quad P < 0.05$$

α -Picolinic acid (Test rice seed is cultured for 4 days.)

$$\log \frac{H_C}{1-H_C} = 2.882 H_R - 1.651 \quad r=0.95 \quad P < 0.05$$

$$\log \frac{H_P}{1-H_P} = 1.353 H_R - 0.402 \quad r=0.89 \quad P < 0.05$$

cultured for 5 days.

$$\log \frac{H_C}{1-H_C} = 2.144 H_R - 1.282 \quad r=0.92 \quad P < 0.05$$

要 約

Fusarinic acid の植物生育阻害作用の本質が呼吸阻害にある事を明かにした。而かもその要因が主として catalase, peroxidase 等の鉄ポルフィリン系酵素其の他 (その形成に金属イオンが関与する各酵素) の作用阻害にある事、然してその阻害機構としては此の物質の chelation の形成に依つて植物体中の微量の鉄、銅、マンガが捕捉される結果としてこれ等の酵素の形成が阻害されるとの推定を与えた。

本研究を遂行するに当つて種々御指導を頂いた恩師東大名誉教授森田貞治郎博士、東大教授住木諭介博士、又助言を頂いた名大教授森健志博士及び試験籾を分与して頂いた新潟県長岡農事試験場の各位に厚く謝意を表する。

とともにその研究費の大部分を文部省自然科学研究費に仰いだ事を附記して茲に深く感謝する次第である。

- (1) 藪田貞治郎, 故神戸勝二, 林 武: 農化, 10, 1059 (1934).
- (2) 玉利勤治郎: 同 22, 16 (1948) 抄録.
- (3) 玉利勤治郎: 新潟農林専門学校学術報告 原報.

Summary

The injurious action of fusarinic acid on plant growth is proved to be essentially ascribable to the check of plant's respiration, which is caused by the hindrance of formation of catalase and peroxidase etc. in plant tissue. The mechanism of this phenomenon is concluded principally to consist in the chelate-ring formation of fusarinic acid with metal ions, namely, in plant tissue a slight amount of metal ions (Fe, Cu, etc.) is caught with fusarinic acid chelation and then the check of formation of Fe-porphyrin oxidase (catalase, peroxidase, cytochrome etc.) results.

多糖類の集成機構に関する研究 (第 16 報) 馬鈴薯 phosphorylase の primer に就て (其の 2)

井上吉之, 小野寺幸之進, 木咲 弘, 米田 耕司 (京都大学農学部農芸化学教室)

昭和 26 年 12 月 25 日 受理

Studies on the Mechanism of the Formation of Polysaccharides. Part 16.

On the Primer of Starch Synthesis by Potato Phosphorylase.

By Yoshiyuki INOUE, Kōnoshin ONODERA, Hiromu KISAKI and Koji YONEDA.

(Biochemical Laboratory, Dept. of Agr. Chem., College of Agriculture, Kyoto Univ.)

澱粉の加磷酸分解によつて glucose-1-phosphate を酵素的に調製した場合に, 微量のデキストリンが夾雑して精製が困難な事が報告されている。例えば D. E. GREEN, P. K. STUMPF⁽¹⁾ は天然物から調製した glucose-1-phosphate には触媒的に作用する痕跡量のデキストリンが不可避免的に存在し, これは再結をくり返しても除去が不可能で, したがつて馬鈴薯 phosphorylase による glucose-1-phosphate からの澱粉合成作用における添加多糖類の影響をしらべるときの基質としては適当でないと述べている。また M. A. SWANSON⁽²⁾ は酵素的に調製した glucose-1-phosphate は, 馬鈴薯 phosphorylase に対して常に本質的な賦活作用を示すので, primer の影響をしらべる実験には合成 glucose-1-phosphate を使用したことを報告している。このように phosphorylase の澱粉合成作用におよぼす primer としての多糖類の効力をしらべる場合に, 使用する glucose-1-phosphate の調製法の差異による影響は無視できないように思われるので, われわれはこの点を明かにするため, 合成および酵素的に調製した glucose-1-phosphate を用いて, 馬鈴薯 phosphorylase による澱粉合成作用の比較実験を行つて酵素的調製 glucose-1-phosphate はどの程度の精製によつて実験に使用しうるかをしらべた。

馬鈴薯 phosphorylase の澱粉合成作用に対する多糖類添加の効果については多くの研究が報告されているが, この primer と生成澱粉との関係については, CORI 等⁽³⁾ の説として, 両者の間には関係がなくて, 生成多糖類は phosphorylase の種類によつてのみ規定されるという見解と, 一方 SUMNER 等⁽⁴⁾ の, 植物 phosphorylase によつて合成される最終生産物の性質は, 添加する priming agent の種類と量によつて左右されるという見解がある。また HIDY, DAY⁽⁵⁾ は馬鈴薯 phosphorylase によつて合成される多糖類のヨード呈色反応は, 初めの数分間は priming agent として用いた多糖類のそれと常に同一であるが, 多糖類合成作用が進行した後に生ずる生成物は, priming agent の性質とは無関係なヨード呈色反応を示すと報告している。しかし上に述べたような実験結果を, 相反する結果がえられたものと見做しえないのは勿論のことであり, これらは相当異なる条件下で別の現象を観察していることもありうるわけである。しかしながらたとえ条件が異つていても, SUMNER 等⁽⁴⁾ の認めた実験事実は誤ではないと思われ, したがつてどのような条件の下で SUMNER 等の報告するような現象が起るかということが問題であると思われる。

この報文は上にのべた二つの事項について行つた実験の報告である。えられた実験結果によつてわれわれは,