[農化 第 35 卷, 第 14 号 p.1412~1416, 1961]

稲熱病に関する生化学的研究 (第 20 報)*

いもち菌胞子の発芽機構 (その 2)

いもち菌胞子中のピコリン酸について

小笠原長宏, 玉利勤治郎, 菅 正倫 (新潟大学農学部農芸化学科)

昭和 36 年 6 月 9 日 受理

いもち菌胞子が稲葉上で発芽する場合、葉上の水滴中の胞子のみが発芽をし得るのであって、飽和湿度のみでは完全に発芽し得ないことは、多くの植物病理学者により強く指摘されており、in vitro でも同様な結果が得られている^(1~3)。また洗滌胞子は未洗滌の胞子よりもその発芽が良好になることが認められた。かかることから、いもち菌胞子の発芽に水滴が必要である要因の一つとして、我々は胞子内に発芽を抑制している物質が存在しており発芽に際してその抑制物質が水滴中に放出されるのではないかと推察した。このような現象については、細菌胞子とその発芽期にジピコリン酸を⁽⁴⁾、またある植物種子の発芽はその種子に含まれている発芽抑制物質を雨により種子外に放出してから起る⁽⁵⁾等が見られている。前報⁽⁶⁾で明らかにしたようにいもち菌胞子の発芽はいもち菌自身の代謝産物であるピリクラーリン (以下 Pir と略す) の 1 p.p.m. 及びピコリン酸 (以下 PA と略す) の 400 p.p.m. ではほぼ完全に抑制されるので、もしいもち菌胞子内に発芽抑制物質が存在すれば、それは Pir または PA ではなからうかと考えて実験を行った結果、いもち菌胞子中には乾物量の約 0.1% の PA が含有されており、しかも胞子発芽に際しては PA が殆んど完全に水滴中に放出されることを確認した。胞子内の PA が発芽に際して胞子外へ放出されることは、やはり PA が胞子の発芽機構と関連しているものであって、いもち菌胞子の発芽に水滴の必要な要因の一つになっているものと考察される。なお Pir は PA よりも微量代謝産物⁽⁷⁾であるので、胞子量が少いために確認できなかったとも考えられるので、さらに実験を行う予定である。

実験方法及び結果

実験に使用したいもち菌は農業技術研究所で分離され、その後当教室に保存してある P₂ (農技研番号) を使用した。

1. 胞子発芽に対する洗滌の影響 P₂ を見里培地 (可溶性澱粉 1%, 酵母エキスを末 0.2%, 寒天 1.5%) で 28° で 10 日間培養して、その斜面から再蒸溜水を用いて胞子懸濁液をつくる。これを 2,500 r.p.m., 2 分間の遠心により 3 回再蒸溜水で洗滌する。この洗滌胞子と未洗滌胞子を用いて、通常の小滴培養法によって発芽試験を行い、発芽率を 28°, 12 時間後に調べた。1 例を第 1 表に示したが胞子濃度が高い場合には洗滌胞子の発芽率は未洗滌胞子のそれより高いことが認められると共に他面胞子数が多いと先に得られている知見の如く発芽率が

第 1 表 胞子の洗滌と発芽との関係

(28°, 12 時間)

未洗滌胞子		洗 滌 胞 子	
胞子濃度	発芽率 (%)	胞子濃度	発芽率 (%)
2×10 ⁵ /ml	96	10×10 ⁵ /ml	99
38×10 ⁵ "	72	38×10 ⁵ "	84
60×10 ⁵ "	7	60×10 ⁵ "	36

悪くなる傾向が見られるが、この場合でも洗滌した方が一般に発芽率は良い。この結果と先に述べた植物病理学分野での知見とから胞子中にはその発芽を抑制している物質が存在しており、これが洗滌することにより容易に水中に放出されるので洗滌により胞子発芽が良くなるのではないかと推察された。このことは胞子発芽の必須条件として水滴が必要であるとの事実を説

明する一つの糸口と考えられる。そこで我々は先に報告した如く⁽⁶⁾、いもち菌の産生するピリクラーリン及びピコリン酸は発芽阻害作用をもつので、胞子中の発芽抑制物質もこれらの物質であろうと考えて次の実験を行った結果、ピコリン酸が胞子中に存在することを確認した。

* Biochemical Studies on the Blast Disease of Rice Plant. Part XX. Mechanism on the Germination of Spores of *Piricularia oryzae*. (2) Presence in Spores of Picolinic Acid and the Changes Occurring During the Spore Germination.
By Nagahiro OGASAWARA, Kinjiro TAMARI and Masamichi SUGA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University)

2. 分生孢子の大量採取の培養及び孢子採取法

(1) 培養法：前記見里培地を 600ml 容ルーフラスコに 150ml 分注し 110°, 10 分正確に殺菌後寒天平板を作り, *Pir. oryzae* の斜面培養の孢子を白金耳を用い, 前記寒天平板の全面に塗布し, 26~27° で 10 日間培養を行った。稲熱病菌孢子は麴菌等と異り孢子形成が非常に悪いので, 孢子を大量に採取するには一回の培養はルーフラスコ 50 本を使用するが, 得られる孢子量は乾物量として 70mg 前後である。

(2) 孢子採取法：培養したルーフラスコに蒸留水を加えて白金耳で表面を静かにこすり, 孢子懸濁液をつくり, まずガーゼ 4 枚で次にガーゼ 2 枚または薄い脱脂綿を用いて濾過を行う。この操作により, 懸濁液中に混在する菌糸は殆んど除去される。この濾液を 3,000 r. p. m, 15 分遠心分離して孢子を集める。この操作までに孢子が 30 分以上懸濁液中に存在しないように充分注意をし, 止むを得ないときは氷室に置くようにして操作を行った。かくして得られた孢子を遠心分離により数回蒸留水で洗滌して洗滌孢子を得る。

3. ビコリン酸の分離及び確認

(1) 孢子から PA の抽出・分離法：柳田⁽⁸⁾は *Aspergillus. niger* の孢子のアミノ酸, 核酸等の分析のためガラスビーズを加えて, 50~60 サイクル/秒, 10 分の振盪で完全に孢子を破壊しており, また T. T. Perry⁽⁹⁾, F. W. Janssen⁽¹⁰⁾は *Bacillus* 属の孢子の破壊が 3N-H₂SO₄ 中で 15 分煮沸または 120°, 15 分加熱で完全に行われることを報告している。いもち菌孢子は 2N-HCl で 120°, 30 分加熱しても全く孢子は分解されないため, 酸化アルミナによる磨砕を行った。この磨砕でいもち菌孢子は完全に破壊されることを検鏡で確認した。この孢子磨砕物から数回蒸留水で抽出し, この抽出液を pH 3 とし, 96 時間エーテル抽出を行った。前報⁽¹¹⁾で報告した如く PA はこの条件で殆んど抽出される。エーテルを除去後真空デシケーター中で乾燥させる。この乾燥試料を極く少量のメタノールまたは蒸留水に溶かし濾紙クロマトグラフィーにより分離させ抽出を行った。濾紙クロマトグラフィーはブタノール・酢酸・水 (4:1:5) を展開剤として上昇法により温度 20~21° で行った。使用濾紙はメタノール, 1.2N 酢酸等量混合溶液及び蒸留水で充分洗滌, 乾燥した東洋濾紙 No. 51 (10×40 cm) で, これにガイドスポットとして PA, di-PA, 及び Pir を, またこれらの位置から充分分離した位置に試料をつけた。展開後風乾しガイドスポットの濾紙片を切り取り, 前二者は 0.2% BCP (水飽和ブタノール液), 後者はジアゾ試薬の噴霧によりその位置を判定し, 試料展開濾紙片のそれぞれのガイドスポットの位置に対応する場所を切り取り PA 及び Pir の部分はメタノール, di-PA の部分は熱水で抽出した。PA, di-PA 及び Pir の R_F 値はそれぞれ 0.42, 0.74 及び 0.82 であった。

(2) PA の確認

a) 紫外外部吸収スペクトルによる確認：再度濾紙クロマトグラフィーにより分別してその濾紙クロマトグラムからの抽出溶液について島津製分光光度計 QB-50 型により紫外外部吸収スペクトルを求めた。Blank 溶液は試料をつけない濾紙を同一溶媒で展開して, 各ガイドスポットの位置に対応する濾紙片から前記と同一操作でそれぞれ抽出した溶液を用いた。その結果, PA 部分は 264 m μ に極大吸収を有する吸収スペクトルを示しこのスペクトルは標準 PA のそれと全く一致する (第 1 図) ことが明らかになり孢子中に PA の存在することが明らかになった。これに対し di-PA 及び Pir の各部分からはそれぞれ特有のスペクトルは得られなかった。

b) スポットテストによる確認⁽¹²⁾：PA 部分のメタノール抽出液を真空デシケーター中で乾燥させると白色の粉末を極少量得る。これを 0.2ml の蒸留水に溶かし, その一部をとり硫酸第一鉄の 1% 酢酸溶液による呈色反応を行うと淡黄色を示し, はば同一濃度の PA の呈色と同一色調を示す。なお a) における Blank 溶液を同一処理し, これについて同じ反応を行っても呈色はしない。

c) 濾紙クロマトグラフィーによるビコリン酸銅塩としての確認⁽¹¹⁾：上記実験に使用した試料溶液の残りを全部東洋濾紙 No. 51

第 1 図 いもち菌孢子から分離したピコリン酸の紫外外部吸収スペクトルによる確認

—●—●— : 孢子から分離したピコリン酸
 -○-○- : 標準ピコリン酸
 溶 媒 : メタノール

につけ、乾燥後そのスポットの上にさらに 0.5% CuSO_4 溶液を 5 μl つける。対照としては標準 PA に CuSO_4 をつけたもの、 CuSO_4 のみ及びピコリン酸銅塩の三つのスポットをつけた。濾紙クロマトグラフィーの条件は前と同様で、乾燥後銅の呈色試薬である 0.05% ルベアン酸のアセトン溶液を噴霧し更にアンモニアガスにさらす。その結果は写真 1 に示すようにピコリン酸銅塩は R_F 0.64 を示し、試料も同位置に灰緑色の呈色帯を示すので試料は PA なることが確認された。

4. 胞子中に含まれている PA の定量 : 上記の実験結果からいもち菌胞子中には PA が含有されていることが確認されたので胞子中の PA の含有量を求めるべく実験を行った。胞子は前記と同様の方法で採取し乾物量として、67.2mg を得た。この胞子から同一操作で PA を抽出して、ペーパークロマトグラフィーにより PA を分離し、PA を含む濾紙片から 10ml のメタノールで溶出して、メタノールを除去、乾燥後再度濾紙クロマトグラフィーを行って分離し再び 5ml のメタノールで溶出する。このメタノール溶液について分光光度計による PA の定量を行った。このメタノール溶液の紫外外部吸収スペクトルは第 2 図の通りで、前実験結果と同様標準ピコリン酸のそれと全く一致する。しかしてこのスペクトルの 264 $m\mu$ における極大吸収の吸光度は 0.294 を示し、これは PA の 9.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に相当するので試料全体の PA は 48 μg となる。これが胞子 67.2mg (乾物量) の PA 含有量であり、含有率は約 0.07% になる。本法は、80% 前後の回収率⁽¹¹⁾のため実際量はこれより多い。

5. 胞子発芽時における PA の放出 : いもち菌胞子は乾物量の 0.07% の PA を含有していることが明らかとなったが、この PA が胞子中で如何なる役割を演じているか非常に興味のある点である。即ちいもち菌胞子の発芽が水滴中においてのみ可能であることは、PA が胞子発芽を抑制して、水滴中に PA を胞子から放出することによりはじめて胞子は発芽し得る状態、即ち活性状態におかれるものと推定して実験を行った結果、胞子が発芽管の形成を行う前に含有する PA を全部放出することを確認した。前実験法と同様にして洗滌胞子 (乾物量 62.6mg) を調製して、これに 50ml 蒸留水を加え、この胞子を殺菌した 200ml 三角フラスコに入れ、27° 3 時間放置した。3 時間後における胞子の発芽率は 8% を示し、発芽管が微かに判別できる程度であった。この

↓ 銅-ピコリン酸塩

写真 1 銅-ピコリン酸塩として濾紙クロマトによる確認

1. CuSO_4
2. サンプル+ CuSO_4
3. ピコリン酸+ CuSO_4
4. 銅-ピコレート

第2図 胞子のピコリン酸含有量定量のための紫外外部吸収スペクトル

- : 胞子から分離したピコリン酸
- : 標準ピコリン酸
- 溶媒 : メタノール

第3図 いもち菌胞子からのピコリン酸の放出

- : 胞子から放出されたピコリン酸
- : ピコリン酸放出後の胞子のピコリン酸区分
- 溶媒 : メタノール

懸濁液から遠心分離により上澄液をとり, pH 3.0 として 96 時間連続エーテル抽出後エーテルを除去し, 抽出物を真空デシケーターで乾燥して PA 確認の試料とした. また遠心沈殿した胞子は前記胞子処理法と同一操作により処理を行い, エーテル抽出して乾燥試料を得た. PA の確認法は前記方法と同一に行い, 紫外部吸収曲線を求め, 264 m μ の極大吸収より PA 量を測定した. この結果第 3 図に示す如く, 27° 3 時間で胞子中の PA は殆んど認められず, 胞子外液中に PA が存在することを確認した. しかし胞子外液中の全 PA 量は 56 μ g であり, これは胞子含有量に換算すると約 0.09% に相当する. この事実は胞子中の PA が発芽管形成前において殆んど全て胞子外液中に胞子から放出されることを示すと共に, 前回の実験と併せて胞子中には PA が約 0.1% 含有されていることが確認された.

考 察

いもち菌胞子の発芽に際しては充分量の水滴の存在することが必要であることは, 植物病理学分野で現象論的にも確認されており, いもち発病には稲葉上の露の存在が絶対に必要とされている. 我々はいもち菌胞子中に約 0.1% の PA が含有されており, これが胞子の発芽管形成前において殆んど完全に胞子外液に放出されることを明らかにした. また PA は先に報告したように 400 p. p. m 以上の水滴中では胞子の発芽が完全に抑制されることも確認している. これらの事実から考察すると, いもち菌胞子が発芽に際して充分量の水滴を絶対に必要とする要因の一つは胞子中の PA を放出するためであると考えられる. なお細菌胞子に含有されている di-PA の存在は認められず, このことは柳田も, *Asp. niger*⁽¹³⁾ の胞子に同酸の存在を認められないことを報告している. しかしいもち菌胞子においても胞子の発芽管形成前に胞子中の PA が外液に放出されるということは, 細菌胞子に見られる現象とよく似ているが, 両者の胞子はその性質が全く異っているため, いもち菌胞子内の PA の役割が細菌胞子と同様であるとは考えられないが, いずれも α 位にカルボキシル基をもつピリジンカルボン酸を含有しており, 共に発芽に際してそれを放出する点は極めて興味深いものがある. なおいもち菌胞子はその発芽に水滴を絶対に必要とし, しかも蒸留水中で完全な発芽を行い得るので, カビ胞子の中でも特別のグループに属するものと考えられ, その発芽形式は多くのカビの発芽形式とはいささか趣きを異にするものと推察される. また PA の生成経路については最近糖尿病のラットの尿中に多量の PA の生成することが確認されて, PA がトリプトファンの分解生産物であり, ニコチン酸の前駆物質として知られている 3-OH アンストラニール酸から生成されることが A. H. Mehler^(17,18), O. Hayaishi^(19,20), により報告されている. しかし微生物の代謝生産物として PA を生成するものは, いもち菌以外に報告⁽⁷⁾はなく, また既に報告した如く, いもち菌はニコチン酸を生成する⁽²¹⁾ので, いもち菌胞子の発芽過程における PA の重要性と共にいもち菌代謝過程における PA 及びニコチン酸の生成経路 (動物の場合と同一であるか否か問題である) の追求は水稻の稲熱病生理と相俟って極めて興味深いものがあり, 目下追求中である.

要 約

いもち菌の胞子は約 0.1% のピコリン酸を含有しており, その胞子が発芽する際には胞子内のピコリン酸を全部水滴中に放出することを明らかにした. このことはいもち菌胞子とその発芽に際して水滴を必要とする一つの要因であると推察した.

終りに臨み種々御助言を賜った新潟大学農学部平田幸治教授, 東京大学農学部農芸化学天羽幹夫氏 (現在アサヒビール東京研究所), 千葉大学腐敗研究所柳田友道教授に厚く感謝の意を表します. また実験に終始熱心に協力された青木玄喜, 佐伯美外の諸兄にも深く謝意を表します. (なお本実験の 1 部は昭和 34 年 3 月 日農化大会, 日植病大会で講演した.)

(1) 安部卓爾: 植病研, 2, 98(昭 8).	(8) T. Yanagita: <i>Arch. Mikrobiol.</i> , 26, 329 (1957).
(2) 安部卓爾: 日植病報, 5, 206(昭 10).	(9) J. J. Perry, J. W. Foster: <i>J. Bact.</i> , 72, 295 (1956).
(3) 逸見武雄: 病害誌, 25, 1 (昭 13).	(10) H. H. Martin, J. W. Foster: <i>ibid.</i> , 76, 167 (1958).
(4) J. F. Powell, R. E. Strange: <i>Biochem. J.</i> , 54, 205(1953).	(11) 小笠原長宏, 玉利勤治郎, 菅 正倫: 本誌, 35, 1312 (1961).
(5) 牧野岩男, 宮本隆夫: 育種誌, 4, 158(1954).	(12) F. Feigl (野村祐太郎訳): 有機ハニ点分析,
(6) 小笠原長宏, 玉利勤治郎, 菅正倫, 富樫邦彦; 本誌, 35, 1315 (1961).	
(7) 玉利勤次郎, 加治順: 本誌, 28, 254(1954).	

- 共立出版, p. 285(昭 33)).
- (13) 柳田友道: 日農化学会シンポジウム, 講演要旨, p. 143(昭 33).
- (14) G. R. Mandels: *J. Bact.*, 65, 16(1953).
- (15) 照井堯造, 望月務: 醸工誌, 35, 157(1957).
- (16) 天羽幹夫: 本誌, 32, A 135 (1958).
- (17) A. H. Mehler: *J. Biol. Chem.*, 218, 241 (1956).
- (18) A. H. Mehler: *ibid.*, 223, 449 (1956).
- (19) O. Hayaishi: *Int. Synp. Enz. Chem. (Tokyo)* p. 233(1957).
- (20) 早石修: 蛋白質 核酸 酵素, 3, 3(1958).
- (21) 大塚一止, 玉利勤治郎, 小笠原長宏: 本誌, 32, 893(1958).

[農化 第 35 卷, 第 14 号, p. 1416~1424, 1961]

稲熱病に関する生化学的研究(第 21 報)*

いもち菌胞子の発芽機構(その 3)

いもち菌胞子内の発芽基質について

小笠原長宏, 玉利勤治郎, 菅 正倫, 富樫邦彦 (新潟大学農学部農芸化学科)

(昭和 36 年 6 月 9 日 受理)

いもち菌胞子が蒸留水中でのみ発芽することは植物病理学の分野において確認されており, また洗滌胞子の方が蒸留水中で未洗滌胞子よりも発芽が良くなることも前報⁽¹⁾に報告した。かようにいもち菌胞子はその発芽に際して外的栄養に依存することなく, 明らかに内的栄養, 即ち胞子内に貯蔵している基質によって発芽を行う性質を持つものである。これは一般的に多くの糸状菌胞子が外的栄養を必要とする発芽形式をとることとは異った特殊の発芽といえる。而して外的栄養を必要とする胞子の発芽に関する必要因子については多くの研究がなされている⁽²⁻⁴⁾が, いもち菌胞子のように内的栄養にのみ依存している胞子の発芽基質については報告が少いようである。

我々は先に報告した胞子中のピコリン酸の実験において, その試料中に相当量の有機酸が存在することを知ったので, まず胞子内の有機酸を分析し, 乳酸をはじめとして数種の有機酸を確認すると共に乳酸は他の有機酸にくらべてその量も多く, 発芽と密接に関連のあることを見出した。さらに胞子は微量のグルコース, アラニンをはじめ数種の遊離アミノ酸を含有していることも確認して, これらの含有成分と発芽との関係についても知見を得たので報告する。

実験及び結果

I. 胞子成分の抽出法 実験に用いる大量の胞子を採取する培養法は前報⁽¹⁾と同様であって, ルーフラスコを用いて見里培地に 28° で 12 日間培養したものである。採取した胞子は良く蒸留水で洗滌後酸化アルミナ(不活性)を等量加えて乳鉢で良く磨砕してから蒸留水を加えて 2 時間攪拌抽出を行う。この磨砕抽出液を 8,000~10,000 r. p. m. で 10 分間遠沈して破砕胞子残滓と酸化アルミナを除く。なおこの沈澱は少量の蒸留水により前と同一条件の遠沈で洗滌して洗滌液は最初の抽出液と合せて胞子抽出液を得る。この胞子抽出液から有機酸を分離する場合には硫酸で pH 2.0 とした胞子抽出液を 4~5 日間連続エーテル抽出を行って, 得られるエーテル層からエーテルを除去してエーテル可溶の有機酸区分を得る。これを真空デシケーターで乾燥した後極少量の水を加えて加温し蒸留水可溶部分を取り, 確認実験の試料とする一方エーテル不溶の有機酸確認のためには胞子抽出液を直ちに凍結乾燥した試料を用いた。また糖並びに遊離アミノ酸の分離には, 胞子抽出液をまず凍結乾燥して, 得られた乾燥物に 2 ml 位の蒸留水を加えて, これをさらに塩酸で酸性(pH 2~3)として熱水中にて 5 分間加温後冷却した液を 10,000~12,000 r. p. m. 10 分の遠沈を行って溶液の除蛋白を行った。この除蛋白液を中和後脱

* Biochemical Studies on the Blast Disease of Rice Plant. Part XXI. Mechanism on the Germination of Spores of *Piricularia oryzae*. (3) Relationships of the Spore Germination with the Substances Contained in the Spore.

By Nagahiro OGASAWARA, Kinjiro TAMARI, Masamichi SUGA and Kunihiro TOGASHI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University)