罹病植物におけるファイトアレキシン生成・ 蓄積機構の酵素学的研究†

(昭和 56 年度農芸化学奨励賞受賞)

大 羽 和 子

(名古屋大学農学部)

植物が病菌の侵入を受けると、健全組織にはほとんど検出されない二次代謝産物が、被害部位や、そのごく隣接した健全部位に生成・蓄積されてくる。これらの物質が病菌に対して抗菌性を示すことから、1940 年に Müller と Börger によってファイトアレキシン (phytoalexin) と命名された⁽¹⁾。ファイトアレキシンという言葉はギリシャ語の phyton (植物) と alexin (防御物質) とからなっている。ここ数十年の間にファイトアレキシン (PhA) の化学的、病理学的研究は著しく進んだ。最近までに数十種の異なった PhA が単離され、化学構造が明らかにされた。これらのうち代表的なものに、サツマイモのイボメアマロン、ジャガイモのリシチン、エンドウのピサチン、インゲンのファゼオリン、大豆のグリセオリン、ワタのゴシポール、トウガラシのカブシジオールやエンバクのアベナルミンなどがある。いずれの PhA も生産する宿主の種によって決まっており、同一植物に検出される PhA は 1 種類ではなく数種類の関連化合物である場合が普通である (図 8 参照)。これらのことから、病菌の侵入によって、植物のある代謝経路が活発化され、その経路上あるいは側路の化合物が PhA として蓄積したものと考えられる。しかし PhA の生成・蓄積機構に関する研究は化学的・病理学的研究の進展に比べて著しく遅れている。とくに酵素学的研究は非常に少ない。

本総説においては、サツマイモ塊根組織が黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata*) の侵入や、昇汞などの化学物質の処理を受けると、その被害部位に著量のフラン環含

有セスキテルペン類 (主成分はイボメアマロン, Ip, $C_{15}H_{22}O_3$) を PhA として生成・蓄積することに着目し、酵素を中心にしておいて研究を進めた、サツマイモ PhA の生成・蓄積機構に関する筆者らの研究を中心に紹介する。

I. ファイトアレキシンの生成誘導機構

1. サツマイモファイトアレキシンの生合成経路

サツマイモファイトアレキシンの主要成分は Ip であるが、それはセスキテルペンの構造 ($C_{15}H_{22}O_3$) をもつことから、酢酸→メバロン酸 (MVA)→イソブレン骨格 (C_5) がつくられ、それが 3 分子縮合して生合成されるものと推定された。このことは以下に示す、組織および無細胞標品を用いたトレーサー実験により証明された (図 1)。すなわち黒斑病菌接種後 24~48 時間インキュベートした組織より、感染部位と隣接健全部位とをともに含む切片 (厚さ 2 mm) を調製し、 ^{14}C でラベルした酢酸、MVA やファルネソール (FOH) を与え 30°C で一定時間インキュベートすると、 ^{14}C が Ip に取り込まれることがわかった^(2,3)。また、酢酸-2- ^{14}C が MVA、ゲラニオールや FOH に取り込まれるし、非放射性のゲラニオールや FOH を切片に与えると対照区に比べて酢酸-2- ^{14}C のラベルの Ip への取り込みが減少した^(2,3)。

次に黒斑病罹病サツマイモの感染部位を除いた隣接健全部位 (厚さ 1~2 mm) より磨砕抽出液を調製した。この際、還元剤とポリクラル AT (ポリビニルピロリドンの高重合物で水不溶) の存在下で磨砕し、さらにセファデックス G-25 のカラムを通して、組織に存在するポリフェノール類を除去した。磨砕抽出液にアセチル-2- ^{14}C -CoA を加えると、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル (HMG) 誘導体 (おそらく HMG-CoA) が生成した⁽⁴⁾。その場合、まずアセチル CoA がアセチルチオラーゼの

† Enzymatic Studies on the Mechanism of Production and Accumulation of Phytoalexins in Diseased Plants.

Kazuko ÔBA (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusaku, Nagoya 464)

図 1 サツマイモファイトアレキシンの生合成経路
と関与酵素の細胞内局在性

↓: 罹病組織で活性が増大した酵素, 番号を付した
ステップは酵素が取り出され証明されたステップ。

作用で, アセトアセチル CoA になり, 次に HMG-CoA
シンセターゼの働きで HMG-CoA が生成したものと考え
られる。また, 磨砕抽出液のミクロソーム (Ms) 画分
に HMG-3-¹⁴C-CoA と NADPH を加えてインキュベ
ートすると, その ¹⁴C が MVA に取り込まれた⁽⁵⁾。すなわ
ち, 罹病組織の隣接健全部位に HMG-CoA レダクター
ゼが存在することが示された。さらに磨砕抽出液の上清
画分を MVA-2-¹⁴C, ATP と KF の存在下でインキュ
ベートすると, ¹⁴C が 5-ホスホメバロン酸 (MVAP) に,
ついでピロホスホメバロン酸 (MVAPP) に, さらにイ
ソペンテニルピロリン酸 (IPP) へと移行した⁽⁵⁾。したが
って, MVA キナーゼ, MVAP キナーゼおよび MVAPP
デカルボキシラーゼの存在が証明されたわけである。

次に IPP が IPP イソメラーゼの作用でジメチルアリ
ルピロリン酸になり, さらにプレニルトランスフェラー
ゼの作用でゲラニルピロリン酸やファルネシルピロリン
酸 (FPP) が生成されるものと考えられるが, 罹病サツマ
イモ抽出液では, これらの酵素の存在はまだ証明されて

いない。

FPP 以降の反応は, 酸素添加, 還元, 脱水素, アセ
タールないしケタール形成による閉環を含むものと推定
されるが, 現在, FPP から Ip にいたる生合成経路は完
全には明らかになっていない。しかし, 最近になって,
Ip 以外のセスキテルペン類のいくつかの構造が決めら
れたし, 無細胞標品を用いても, セスキテルペン類の変
換が証明されたので, 後に詳しくふれる。

2. ファイトアレキシン生合成経路酵素群の形成

これまでに存在が証明されたセスキテルペン類の生合
成経路上の酵素群は, 健全組織中にはあっても少量であ
り, 病菌の感染によって, その隣接健全部位で著しく活
性が増大した。MVA キナーゼ, MVAP キナーゼやセス
キテルペン類の脱水素, 還元, 酸素添加に関与する酵素
(II を参照) は, 切断傷害のみによっても活性がかなり
増大した。しかし, アセチル CoA から HMG 誘導体に
いたる酵素系, HMG-CoA レダクターゼやピロホスホ
メバロネートデカルボキシラーゼ (MVAPP-DCase) の活
性は健全組織にはほとんど存在しないし, 切断傷害のみ
を与えインキュベートした組織でもほとんど増大しない
が, 病菌接種後 1 日間で著しく増大した。なかでも HMG-
CoA レダクターゼは律速段階の酵素であり, 活性の変
動は最も顕著で, 菌接種後 2 日目で最大となり, のち減
少した (図 2)⁽⁵⁾。セスキテルペン類は約 1 日間の lag
期の後に 2 日目に多量に生成・蓄積されるが, それ以後
その生成は弱まった (図 2)。したがって, 病菌感染に
よって, PhA の生合成経路上の酵素群 (とくに律速段
階の酵素) が多量に形成され, 生合成経路の太いパイプ

図 2 病傷害組織における HMG-CoA レダクター
ゼ活性およびテルペン含量の変動
○, 酵素活性; ●, テルペン含量; —, 病菌感染組
織; ---, 切断組織

が完成し、多量の PhA が生成されるものとする。

上述の酵素群の活性増加がタンパク合成を伴った新たな酵素形成の結果かどうかを知るために、昇汞をセスキテルペン類生成誘導因子とし、タンパク合成阻害剤を用いて一連の研究を行った。すなわち、切断後約 1 日間

図 3 HMG-CoA レダクターゼ活性の変動に及ぼす CHI 処理の影響

Exp. 1, Exp. 2: 切片調製直後, 18 時間インキュベート後に CHI (---●---) や H₂O (—○—) を真空浸透。

図 4 昇汞処理後のテルペン類の生成・蓄積に及ぼす CHI 処理の影響

Exp. 1, Exp. 2: 切片調製直後, 18 時間インキュベート後 CHI (Hg·CHI) や H₂O (Hg·H₂O) を真空浸透。

30°C でインキュベートした切片に、0.1% 昇汞を塗布し、さらに一定時間 30°C でインキュベートした後、隣接健全組織を磨砕し、Ms 画分や上清画分を得て、HMG-CoA レダクターゼや MVAPP-DCase の活性の変動を調べた。その結果、HMG-CoA レダクターゼ活性は昇汞塗布後約 2 時間の lag 期の後に急速に増大し、4~6 時間後に最大となり、後減少した⁽⁷⁾。また、MVAPP-DCase 活性もセスキテルペン類の生成に先立ち増大した⁽⁸⁾。切片調製直後にシクロヘキシミド (CHI) 処理すると、昇汞塗布後の両酵素活性の増大は抑えられ、セスキテルペン類の生成・蓄積も抑えられた (図 3, 4, Exp. 1)。

一方、切片調製後十数時間 30°C でインキュベートした切片を CHI 処理し、その後昇汞を塗布すると、昇汞塗布後の酵素活性の増大も顕著には抑えられず、テルペン類の生成・蓄積もほとんど抑えられず、後期にはむしろ増大した (図 3, 4, Exp. 2)。しかし、同様な処理で *de novo* に生合成されることが知られているパーオキシダーゼ活性の増大が抑えられるし、¹⁴C-ロイシンのタンパクへの取り込みも抑制されることから、タンパク合成の多くは CHI で抑制されたと考える。

以上の結果から、筆者らは切断傷害ではセスキテルペン類の生成はほとんど起きないが、その生合成経路の律速段階の酵素、HMG-CoA レダクターゼのタンパクが不活性型ではあるが *de novo* に合成され、昇汞処理により活性型となり、生合成経路が太くなり、セスキテルペン類の生合成が誘導されるという考えを提示した^(7,8)。

3. 切断傷害による転写、翻訳の活性化

上述の実験から、PhA 生合成経路の酵素が形成されることがわかったので、切断傷害や昇汞処理に伴う転写・翻訳活性の変動を調べた。まず、³H-ウリジンを切片に与え、RNA への取り込み速度を調べてみると、切断傷害後 6~12 時間に取り込み速度が最大となり、後減少した。RNA 合成速度がほぼ一定になる 24 時間インキュベートした切片に昇汞を塗布し、6 時間後に ³H-ウリジンの RNA への取り込み速度を調べてみると、昇汞処理によって RNA 合成速度は変化しなかった (図 5)⁽⁹⁾。また、ポリ U-セファロースカラムを用いて mRNA を分離し、その合成速度の変化を調べてみた。その結果、切断傷害後約 6 時間に mRNA の合成速度が最大となり、12 時間まで減少し以後一定となった。また、24 時間インキュベートした切片に昇汞処理をしても mRNA の合成速度は変化しなかった⁽¹⁰⁾。そこで、健全組織や切

断傷害組織よりクロマチン画分を単離し、RNA ポリメラーゼ活性を調べたところ、切断傷害後4～6時間に著しく活性が増大した⁽¹¹⁾。α-アミニチン処理により、RNA ポリメラーゼⅡとⅠ+Ⅲの活性の比率を調べると、RNA ポリメラーゼⅡの活性は常に全酵素活性の5～15%であった。この切断傷害に伴うクロマチン結合RNA ポリメラーゼの活性の増大はタンパク合成阻害剤の処理で抑制されるので、新たなタンパク合成を伴って起るものと考ええる。この活性増大は cAMP, 2,4-D や GA_3 で促進され、エチレンで抑制された。

次に ^{14}C -ロイシンを切片に与え、タンパク画分への取り込み速度を調べると、切断傷害後数時間で最大となり、後減少し一定の値となった。合成速度が一定となっ

図5 RNA 合成速度の変動
—●—, 切断組織; ---○---, 昇汞処理組織

図6 タンパク合成速度の変動
テルペン類は昇汞処理後23時間インキュベートした組織の被害部位より抽出された。Cut, 切断組織; $Hg \cdot H_2O$, 昇汞処理組織; $Hg \cdot CHI$, 昇汞+CHI 処理組織。

た、24時間インキュベートした切片に、昇汞を塗布しても、タンパク合成の速度は変化しなかった(図6)⁽¹²⁾。そこで健全組織および切断傷害組織よりポリソームを調製し、遊離型および膜結合型ポリソームの量的変動を蔗糖密度勾配遠心で調べたところ、切断傷害後直ちにポリソーム形成が始まり6時間後まで重合度の高いポリソームが増加して後減少した⁽¹³⁾。

以上の結果は、切断傷害により転写、翻訳が増大することと、切断傷害後昇汞処理をしても転写、翻訳はほとんど増大しないことを示した。

4. ファイトアレキシン生合成部位への基質の供給機構

高等動植物では酵素レベルの調節のみならず、細胞内区画化による調節が関与する。したがって、PhA の生成の場合にも生合成経路酵素群の有機的な局在と、細胞内生合成部位への基質供給の調節があると考えられる。事実、アセチル CoA から HMG-誘導体にいる過程の酵素は可溶性画分あるいは一部 Ms 画分に存在し、HMG-CoA レダクターゼは主に Ms 画分に、MVA から IPP にいる過程の酵素は可溶性画分に存在することが示された⁽⁴⁻⁶⁾。また、IPP より FPP を経て FOH にいる過程の酵素も可溶性画分に存在すると考えられる。デヒドロ-Ip レダクターゼや Ip-15-ヒドロキシラーゼが Ms 画分に存在することから考えて(Ⅱ参照)、FOH 以降のセスキテルペン類の生成、相互転換に関する酵素は Ms 画分に局在すると考えられる(図1)。

サツマイモ PhA 生合成の初発物質はアセチル CoA である。アセチル CoA は貯蔵デンプンが分解し、解糖系を経て生成されるビルビン酸からできる。ビルビン酸のある部分は、Mt 内に局在するビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の作用で、アセチル CoA となり、TCA 回路と電子伝達系の働きで、完全酸化され ATP が生成される。しかし、多量にセスキテルペン類が生成される場合には、アセチル CoA のかなりの量がテルペン類の生合成に使われるはずである。Mt 内のアセチル CoA が何らかの形で Mt 外に運ばれるのか、ビルビン酸が Mt 外でアセチル CoA になり、セスキテルペン類の生合成に使われるのかは興味あるところである。そこで黒斑病罹病組織を用いて炭水化物代謝中間体である酢酸、ビルビン酸、クエン酸の Ip への変換を調べると、組織内に入ったラベル化合物のうち、酢酸が最も早く、次にビルビン酸、クエン酸の順に Ip に変換された⁽¹⁴⁾。また ATP-ク

図7 黒斑病罹病サツマイモにおけるミトコンドリア外アセチル CoA の供給様式

- ① ピルビン酸デカルボキシラーゼ
- ② アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ
- ③ アセチル CoA シンセターゼ
- ④ ATP-クエン酸リアーゼ
- ⑤ 乳酸脱水素酵素

エン酸リアーゼの阻害剤であるヒドロキシクエン酸で前処理すると、酢酸-2- ^{14}C の Ip への取り込みは阻害されないが、ピルビン酸-3- ^{14}C の取り込みは約 30% 阻害され、クエン酸-1, 5- ^{14}C の取り込みは 90% 以上阻害された⁽¹⁵⁾。

以上の結果とアセチル CoA はミトコンドリア膜を通過しにくいことを考えあわせると、ピルビン酸が Mt 外でアセチル CoA に変換される経路が黒斑病罹病サツマイモで活性化されることが推測される。そこで、ピルビン酸デカルボキシラーゼの活性ならびにその性質を調べた。本酵素は健全組織にもかなり存在するが、罹病に伴ってさらに増大した。精製酵素は4つのサブユニットからなり、アロステリックな性質を示した。したがって、筆者らは、ピルビン酸が Mt 外でアセトアルデヒドに変換されるか、Mt 内に入りアセチル CoA に変換されるかを本酵素が調節している可能性を指摘した⁽¹⁶⁾。また、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼとアセチル CoA シンセターゼが Mt 外に存在すること、罹病に伴ってこれらの活性が増大することがわかり、部分精製し性質が調べられた^(17, 18)。さらに、被害部隣接健全組織の 10×10^4 上清画分をピルビン酸、ATP、CoA とともにインキュベートするとアセチル CoA が生成することがわかった⁽¹⁹⁾。

これらの結果は、Mt 外でピルビン酸からアセチル CoA になる経路が罹病組織で活性化され、セスキテル

ペン類合成のためのある量のアセチル CoA を供給していることを示した。しかし、最近、罹病組織に ATP-クエン酸リアーゼが検出されたので⁽²⁰⁾、Mt 内のアセチル CoA の一部はクエン酸となり、クエン酸が Mt 膜を通過して、Mt 外の ATP-クエン酸リアーゼの作用でアセチル CoA に変換されるものと思われる。なお、Mt 内のアセチル CoA の一部がアセチル CoA デアチラーゼにより酢酸となり、酢酸が Mt 膜を通過する可能性もある。したがって、図7に示すように、罹病サツマイモでは、1つの経路のみでなく、いくつかの経路で、アセチル CoA が効率よく、Mt 外のテルペン類合成部位へ供給されるものと思われる。

罹病サツマイモでは、呼吸やテルペン類の合成が盛んになるので、細胞質で解糖系が活発に作動し、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを介して、多量の NAD^+ が還元される。一方、Mt 膜は NADH や NAD^+ を透過しにくいので多量の糖類が分解されるためには何らかの形で細胞質の NADH が酸化されなければならない。筆者らはサツマイモに L(+)-乳酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムが存在することを見出した。各アイソザイムを部分精製し、その性質を調べると、ピルビン酸に高い親和性を示し、高濃度のピルビン酸で阻害されるが、ATP などのヌクレオチドで調節を受けにくいアイソザイムの活性が罹病組織で増大することがわかった⁽²¹⁾。したがって、この乳酸デヒドロゲナーゼが細胞質の NADH の再酸化に関与し、ピルビン酸の生成を調節している一酵素であることが示唆された。

II. ファイトアレキシンの転換、分解的代謝

1. セスキテルペン類の転換

サツマイモの数種のセスキテルペン類のうち、Ip⁽²²⁾、イボメアマロノール (IpOH)⁽²³⁾、デヒドロイボメアマロン (DHIp)⁽²⁴⁾、4-ヒドロキシマイオボロン (4-OH-My)⁽²⁵⁾、4-ヒドロキシデヒドロマイオボロン (4-OH-DHMy)⁽²⁶⁾、 A_1 成分および A_2 成分⁽²⁷⁾の構造が決められた。そこで、これらの ^{14}C -ラベル化合物を生合成で調製して、トレーサー実験により、生合成経路上の相互の関係が調べられた。その結果、 ^{14}C -DHIp を感染部位と隣接健全部位をともに含む切片に与えインキュベートすると、 ^{14}C が効率よく Ip⁽²⁴⁾、IpOH と A_1 成分⁽²⁷⁾に取り込まれた。 ^{14}C - A_2 成分を切片に与えると ^{14}C は非常に早く DHIp、Ip、IpOH と A_1 成分に取り込まれた⁽²⁷⁾。ま

図 8 推定されるセスキテルペン類の転換経路
 →, 1つの酵素反応; →, 複数の酵素反応
 ①フラノセスキテルペンレダクターゼ, ②イボメア
 マロン 15-ヒドロキシラーゼ

た ^{14}C -4-OH-DHMy は効率よく 4-OH-My に変換されたが、他の既知の化合物には転換されなかった⁽²⁸⁾。実験データはないが A_2 成分は構造から考えて、4-OH-DHMy に変換されると思われるし、 A_2 成分は IpOH からよりは DHIp から別の経路で生成されると思われる。

最近、無細胞標品を用いて FOH-2- ^{14}C がファルネサルに変換されることがみつかった⁽²⁹⁾。この酵素は NADP 依存であり、可溶性画分に存在した。精製酵素はトランス-トランス FOH にとくに高い親和性があり、2つのサブユニットからなっている。セスキテルペン類の蓄積時に先立って活性が上昇することから、フラン環が形成される際にファルネサルを経る可能性が指摘された⁽²⁹⁾。また、DHIp から Ip および 4-OH-DHMy から 4-OH-My の反応を触媒する酵素が Ms 画分に存在することが証明された⁽³⁸⁾。DHIp の Ip への変換は 4-OH-DHMy の添加により阻害されるので、同一の NADPH-依存レダクターゼ、フラノセスキテルペンレダクターゼによって、両反応が触媒されていると思われる (図 8)。

2. イボメアマロンの分解的代謝

病菌感染被害部位に蓄積されるセスキテルペン類の総量は、菌接種後 2 日目に急速に増大し、3~4 日後まで

徐々に増大する。しかし、病菌接種後 24 時間と 36 時間インキュベートした組織に酢酸-2- ^{14}C を与え、 ^{14}C の Ip への取り込みを経時的に調べると、いったん Ip に取り込まれた ^{14}C が後期に減少した⁽²⁾。また、切断傷害後 18 時間インキュベートした切片に昇汞を塗布すると、昇汞塗布後速やかにセスキテルペン類の蓄積が起り、後減少した (図 3)。これらの結果は病傷害組織にテルペン類を分解代謝する活性が存在することを示唆した。そこで蓄積されるセスキテルペン類の主成分である Ip の ^{14}C ラベル化合物を生合成で調製し、その代謝を調べた。すなわち、切断組織の表面約 0.5 mm を除いた切片や、昇汞処理組織の被害部位を除去した切片に、 ^{14}C -Ip を与え 30°C でインキュベートすると、脂質画分のラベルは時間とともに減少し、水溶性画分や揮発性画分のラベルが増加した。そこで、組織の Ip の代謝能を 1 時間当りに減少する ^{14}C -Ip 量で表わすと、健全組織では Ip の代謝能は非常にわずかであったが、切断後数時間で急速に増大した⁽³⁰⁾。また切断直後に CHI 処理すると、この増大は抑制されることから、切断傷害後誘導されてくる Ip 代謝能はタンパク合成を伴って起るものと考え、切断傷害組織に昇汞を塗布すると、その隣接健全部位の Ip 代謝能が減少するが、Ip の代謝に関与する酵素 (群) の活性が昇汞で阻害されるためと考える。黒斑病罹病組織では菌接種後十数時間で Ip 代謝能が最大となり後減少した。

3. イボメアマロンからイボメアマロノールへの変換

^{14}C -Ip の代謝物を同定するために、脂質画分物質を TLC で分析したところ、主にイボメアマロノール (IpOH, $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$) の位置に、少量 4-OH-My の位置に、ラベルが検出された。そこで、IpOH の位置のラベル、化合物を TLC プレートから溶出し、高速液体クロマトグラフィを行い、マススペクトロメーターで分析し、IpOH と同定した⁽³⁰⁾。切断傷害組織を用いて ^{14}C -Ip の IpOH への変換を経時的に追ってみると、 ^{14}C -Ip の減少とともに ^{14}C -IpOH が増加し、その後 ^{14}C -IpOH も減少した。したがって、Ip が IpOH に変換され、さらに他の物質へと代謝されていくものと思われる。

次に、切断組織や罹病組織から Ms 画分を調製し、 ^{14}C -Ip の IpOH への変換が証明された⁽³¹⁾。この変換に関与する酵素は Ms 画分に局在しており、分子状酸素と NADPH を必要とし、CO で強く阻害されるが光によって回復した。これらの結果から、本酵素はチトクロ

ム P-450 関与のオキシゲナーゼであると考え、Ip-15-ヒドロキシラーゼと命名された。

本酵素活性は健全組織では検出されず、切断組織や罹病組織で著しく増大し、後減少した。最大活性は罹病組織のほうが切断組織より数倍高かった。また、本酵素の基質特異性については十分検討されていないが、DHIp や 4-OH-My のような他のセスキテルペン類を水酸化することが考えられる。しかし、Ms 画分に局在するケイ皮酸-4-ヒドロキシラーゼ活性が Ip 添加によって阻害されないし、Ip-15-ヒドロキシラーゼ活性がケイ皮酸添加で阻害されないの両者は異なる酵素のようである。

以上の結果をまとめ、FOH 以降のセスキテルペン類の相互の関係を図 8 に示す。これはセスキテルペン類が網目状に相互転換することを示すが、比較的特異性の広い酸化、還元、酸素添加酵素などの作用の結果であろうと考える⁽³²⁾。セスキテルペン類の転換に関係すると思われる FOH デヒドロゲナーゼ、DHIp レダクターゼ、4-OH-DH-My レダクターゼや Ip-15-ヒドロキシラーゼなどの活性が切断傷害のみによって誘導されるのに対し、テルペン類合成の律速段階の酵素である HMG-CoA レダクターゼの活性は、切断傷害のみではほとんど誘導されないことを再度強調しておく。

III. サツマイモ培養細胞によるセスキテルペン類の生成

サツマイモ塊根の柔組織からカルスを誘導した。カルス中にはセスキテルペン類はほとんど生成されないし、カルスに病菌を接種したり、昇汞で処理をしても、褐変死が起りテルペン類は生成されない。しかし、カルスを酵母抽出物を含む液体培地に移し、振盪培養することによって、テルペン類を生成することに成功した⁽³³⁾。カルスを液体振盪培養すると、約 1 日後にテルペン類が生成され、主に培地に蓄積した。その後、培地のテルペン類が減少し、細胞の増殖が始まった。また、テルペン類の生成に先立ち、HMG-CoA レダクターゼ活性が増大し、後減少した。このテルペン類の生成誘導には培地中の酵母抽出物が必須であり、黒斑病菌や昇汞を添加するとその生成は抑えられた。培養細胞で生成されるセスキテルペン類を TLC で分析すると、罹病組織や昇汞処理組織でつくられるテルペン類と同じ組成であったが、個々のテルペン類の量比は異なっていた。これらの結果は PhA の生成、分解、膜透過の問題を細胞レベルで研究しうる

基礎を与えたと思う。

以上の研究によって、植物が病菌の侵入を受けたり、傷害を受けると PhA の生合成経路の酵素群、とくに律速段階の酵素の *de novo* の合成と活性化により、PhA の生成が誘導されることが明らかとなった。また菌糸の細胞壁に PhA の生成を誘導する物質があることもいくつか報告されている^(34,35)。しかし、それらが宿主細胞にどのように作用し、どのようにして酵素が形成されるかは不明のままである。まず律速段階の酵素を精製し、免疫化学的手法を用いて、その酵素の誘導のメカニズムを明らかにしなければならない。また、いったん生成・蓄積された PhA は隣接健全組織で代謝されることを述べたが、ジャガイモのリンチン⁽³⁶⁾やトウガラシのカプシオール⁽³⁷⁾も OH 化されて代謝されることが報告されている。しかし、どの PhA についても分解的代謝経路は不明である。これらの代謝経路を明らかにし、関与する酵素の誘導のメカニズムが明らかにされなければならない。PhA は病傷害組織の被害部や培養細胞の培地中に集積されるので、PhA は細胞内合成部位から細胞外へ、さらに死細胞へと移行すると思われる。PhA の膜透過、移行はどのようにして起るのだろうか？これらの課題は生化学的、分子生物学的、細胞生物学的手法および有機化学的手法を駆使した研究によって初めて解決されるように思う。

本研究を行うにあたり、終始ご指導を賜わった、名古屋大学瓜谷郁三教授に深く感謝いたします。また本研究にご協力いただいた協同研究者の方々にお礼申し上げます。

- (1) K. O. Müller and H. Börger : *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstwirtschaft. (Berlin)*, **23**, 189 (1940).
- (2) K. Oshima and I. Uritani : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1146 (1968).
- (3) I. Oguni, K. Ôba, H. Imaseki and I. Uritani : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 50 (1969).
- (4) K. Oshima and I. Uritani : *J. Biochem.*, **63**, 617 (1968).
- (5) H. Suzuki, K. Ôba and I. Uritani : *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 265 (1975).
- (6) K. Oshima-Ôba and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **10**, 827 (1969).
- (7) R. Ito, K. Ôba and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **20**, 867 (1979).

- (8) K. Ôba, H. Tatematsu, K. Yamashita and I. Uritani : *Plant Physiol.*, **58**, 51 (1976).
- (9) K. Ôba, K. Furuse and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **19**, 741 (1978).
- (10) 古瀬加代子, 大羽和子, 瓜谷郁三 : 生化学, **49**, 912 (1977).
- (11) G. Kahl, 大羽和子, 瓜谷郁三 : 生化学, **50**, 919 (1978).
- (12) K. Ôba and I. Uritani : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1635 (1981).
- (13) 大羽和子, 榎本直子, 服部束穂, 瓜谷郁三 : 昭和 55 年度日本農芸化学会中部支部講演要旨, 1980.
- (14) K. Ôba, H. Shibata and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **11**, 507 (1970).
- (15) I. Oguni and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **15**, 179 (1974).
- (16) K. Ôba and I. Uritani : *J. Biochem.*, **77**, 1205 (1975).
- (17) A. Takeuchi, K. Ôba and I. Uritani : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1141 (1977).
- (18) A. Takeuchi and I. Uritani : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1753 (1981).
- (19) A. Takeuchi, K. J. Scott, K. Ôba and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **21**, 917 (1980).
- (20) A. Takeuchi, M. Yamaguchi and I. Uritani : *Phytochemistry*, **20**, 1235 (1981).
- (21) K. Ôba, S. Murakami and I. Uritani : *J. Biochem.*, **81**, 1193 (1977).
- (22) 久保田尚志, 松浦輝男 : 日本化学雑誌, **74**, 248 (1953).
- (23) N. Kato, H. Imaseki, N. Nakashima and I. Uritani : *Tet. Lett.*, **13**, 843 (1971).
- (24) I. Oguni and I. Uritani : *Plant Physiol.*, **53**, 649 (1974).
- (25) L. T. Burka, L. Kuhnert and B. J. Wilson : *Tet. Lett.*, **46**, 4017 (1974).
- (26) H. Inoue, N. Kato and I. Uritani : *Phytochemistry*, **16**, 1063 (1977).
- (27) 伊藤 功 : 名古屋大学農学部修士論文 682 号 (1979).
- (28) H. Inoue and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **20**, 1307 (1979).
- (29) 井上博雅 : 名古屋大学博士論文, 175 号 (1980).
- (30) 大羽和子, 大賀久美子, 永井邦和, 瓜谷郁三 : 昭和 54 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1979, p. 90.
- (31) M. Fujita, K. Ôba and I. Uritani : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1911 (1981).
- (32) I. Uritani, K. Ôba, A. Takeuchi, K. Sato, H. Inoue, R. Ito and I. Ito : "Antinutrients and Natural Toxicants in Foods," ed. by R. L. Ory, Food & Nutrition Press, Westport, 1980, p. 1.
- (33) K. Ôba and I. Uritani : *Plant Cell Physiol.*, **20**, 819 (1979).
- (34) I. A. M. Cruickshank and D. R. Perrin : *Life Sci.*, **7**, 449 (1968).
- (35) A. J. Anderson-Prouty and P. Albersheim : *Plant Physiol.*, **56**, 286 (1975).
- (36) Y. Ishiguri, K. Tomiyama, N. Doke, A. Murai, N. Katsui, F. Yagihashi and T. Masamune : *Phytopathology*, **68**, 720 (1978).
- (37) E. W. B. Ward, A. Stoessl and J. B. Stothers : *Phytochemistry*, **16**, 2024 (1977).
- (38) H. Inoue and I. Uritani : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2245 (1980).