

白絹病菌によるイポメアマロンの不活性化

植原 一雄・禧久 保

Inactivation of Ipomeamarone by *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi

Kazuo UEHARA and Tamotsu KIKU

(Laboratory of Plant Pathology)

I. 緒 言

フィトアレキシンの概念で植物の病害抵抗性を捉えようとする場合、フィトアレキシンの抗菌的な作用を、量的な面と質的な面の二つに分けて考えることが必要である。品種や栽培条件の違いによって生ずる抵抗性の差異は、植物の生成するフィトアレキシンの量的な相違の問題として理解することができる^{5)11)17~19)}。しかし一つの植物に対して、ある菌は寄生し、ある菌は寄生し得ないということや、一つの菌がある植物には寄生し、ある植物には寄生し得ないということなどは、量的な考え方では説明できず、フィトアレキシンはその生成される植物の種類によってそれぞれ異なるものであり⁵⁾²¹⁾²³⁾、また同じフィトアレキシンでも菌の種類によってその害作用に違いがある⁴⁾¹²⁾²²⁾という、フィトアレキシンの作用上の質的相違の問題としてとり扱わねば理解することができない。すなわちある植物の病原菌は、その植物の生成するフィトアレキシンによっては余り強い害作用をうけないのに対し、非寄生性の菌は非常に強い害作用をうけ、場合によっては致死的な影響をもうけるが、フィトアレキシンのこの撰択的害作用が、寄生性を左右する一つの要因であるとする考え方である⁷⁾²³⁾。

では、あるフィトアレキシンに対して特定の菌のみがなぜ害作用をうけ難いのであろうか。筆者の一人植原²²⁾は *pisatin*³⁾ (エンドウの生成するフィトアレキシン) を添加した白濁培地に各種の菌類をうえて、菌叢の生育を比較したところ、*Ascochyta pisi*, *Fusarium oxysporum* など生育の良好な数種の菌においては、その菌叢の周囲に円形の透明な部分が現われることを認めた。これは *pisatin* が、病原菌によって変質をうけたためではないかと考え、その部分の *pisatin* を定量したところ、明らかにその濃度が低下し、生物的活性も非常に弱くなっていることが認められたことから、これらの菌が、*pisatin* 添加培地中でも良好な

生育を示すのは、その *pisatin* 不活性化能によるためではないかと考えた。CRUICKSHANK⁶⁾ はこの実験を追試し、透明斑部の *pisatin* 濃度が低下するのは菌体内に *pisatin* がとり込まれるためであると報告した。この点について筆者ら (未発表) はその後も再三実験を繰り返したが、最初の報告と同じ結果を得た。さらに野中¹³⁾ は同じ問題について詳細な実験を行ない、筆者らの見解を支持する結果を報告した。

病原菌によるフィトアレキシンの不活性化の問題は、寄生性を解明するために非常に興味深い問題であると思われるが、以上述べたようにこの分野に関する研究は非常に乏しく、今後に残された問題点が多い。このような見地から、筆者らは各種のフィトアレキシンについてこの不活性化の問題を検討中であるが、今までにイポメアマロンについていくつかの興味ある事実を認めることができたので、ここではその一部として、イポメアマロンと白絹病菌とを用いて行なった実験の結果を報告する。イポメアマロンはサツマイモが黒斑病菌によって犯された時に生成する苦味の成分で、樋浦⁹⁾ によって報告され、その後瓜谷ら²⁴⁾²⁵⁾ によって抵抗反応の一つのモデルとして、病態生化学的に詳細な研究が続けられているところの抗菌性物質で、フィトアレキシンの一種と考えられている^{12)14~15)} ものである。

本実験を行なうに当り有益な御助言と御指導を賜わった九州大学吉井甫名誉教授と当教室権藤道夫教授、純イポメアマロンの分譲を賜わり、多くの御指導を戴いた名古屋大学農学部瓜谷郁三教授、兵藤宏氏ならびに有益な御助言を戴いた本学農学部蟹江松雄教授、佐賀大学農学部野中福次助教授に深謝の意を表する。

II. 実験材料および各実験に共通な実験法

1. 供 試 菌

供試菌には当教室保存の *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi を用いた。本菌をバレイシヨ蔗糖寒天の平面培

地上で 28°C, 4~6 日間培養し, その菌叢を直径 6 mm のコルクボーラーで打ち抜いて菌叢ディスクを得, これを各試験の接種源として用いた. なお実験を開始する前に, 本菌がサツマイモ (品種農林 2 号) の塊根に寄生性を示すことを確かめた.

2. イポメアマロンの抽出法

サツマイモ塊根からのイポメアマロンの抽出は, 野中¹²⁾ および AKAZAWA¹⁾ の方法を参考にして行なった. すなわち, サツマイモ (品種農林 2 号) の塊根を水洗, 乾燥したのち, 約 2 cm の厚さに切断し, このスライスビニール布で内張りした木製の箱のろ紙上に並べ, 1% の昇汞水をろ紙がわずかにひたる程度に加えて, ガラス板で蓋をしたのち, 25°C に保った. 48 時間後にスライスを取り出し, スライス下部の褐変部を切り取って集め, 乾燥器で 50°C, 12 時間乾燥したのち, 粉碎器で粉末にした. この粉末をエチルエーテルを溶媒として, ソックスレー脂肪抽出器で約 12 時間連続抽出を行ったのち, エチルエーテルを除去した. ここで得られた黄褐色の油状の物質を, さらに水蒸気蒸溜に付し, その溜液に 1/4 量 (V/W) の食塩を加えて, 等量のエチルエーテルで 3 回振出し, 振出液中の水分を無水硫酸ソーダで取り除いたのち, ロータリーエバポレーターを用いてエーテルを除去すると, わずかに黄色を帯びた油状物質が得られた. これをイポメアマロンとして純エタノールに溶かして保存し, 供試した. 各実験において, 試験液にイポメアマロンを添加する場合は, すべてエタノール溶液の形で加えたが, この際試験液中のエタノール濃度がいつの場合にも 2% になるように, あらかじめイポメアマロン・エタノール溶液の濃度を調整して供試した.

3. イポメアマロンの定量法

イポメアマロンの定量は, IMAZEKI and URITANI¹⁰⁾ の方法に従って行なった. すなわち定量しようとする液中のイポメアマロンを, 等量のエチルエーテルで 3 回振出し, 振出部分のエチルエーテルを除去してか

ら, エタノール 4 ml, *p*-dimethylaminobenzaldehyde の 10% エタノール溶液 2 ml および 40% 硫酸 (V/V) 4 ml を順次加えてよく振盪し, 50°C の恒温水槽中に正確に 30 分間保ったのち, 直ちに光電分光光度計 (日立 101 型) で 1 cm セルを用いて, 530 m μ における吸光度を測定し, 名古屋大学農学部瓜谷研究室より分譲された純イポメアマロンを用いて, あらかじめ作っておいた定量用の標準直線により, 吸光度から絶対量を算出した.

III. 培地中に添加したイポメアマロンの白絹病菌による不活性化

イポメアマロンを添加した培地で白絹病菌を培養した場合に, その培地中のイポメアマロンがどのような変化をするかを調べるために本実験を行なった.

実験 1. イポメアマロン添加培地中で白絹病菌を培養した場合の培地中のイポメアマロンの減少

液体培地にイポメアマロンを添加して白絹病菌を培養し, 一定期間後にその培地中のイポメアマロンの量を呈色反応で調べた.

実験法: バレイショ液体培地 (バレイショ 200 g, 蔗糖 20 g, 水 1000 ml) 50 ml を 200 ml の三角フラスコに分注し, 1 kg/cm² で 20 分間オートクレーブ殺菌を行なったのち, イポメアマロン 400 μ g をエタノール溶液の形で添加した. この培地に *C. rolfsii* の菌叢ディスク (直径 6 mm) を浮かし, 28°C の定温器中で 6 日間静置培養を行なった. 培養終了後, 菌叢をガーゼに包んでよく搾り, ろ液部分と菌体部分に分け, それぞれについてイポメアマロンの定量を行なった. すなわちろ液は, 等量のエチルエーテルで 3 回振出し, 振出部分のエーテルを除去したのち, エールリッヒ試薬を加えて 50°C に 30 分間保ち, 分光光度計で 530 m μ における吸光度を測定した. また菌体はエタノール 4 ml を加えて乳鉢中で十分にすりつぶし, 7000 rpm で 10 分間遠心沈澱を行ない, その上澄に

Table 1. Decrease of ipomeamarone in media which were added with 400 μ g of ipomeamarone, inoculated with *C. rolfsii* and incubated for 6 days at 28°C.

No. of Exp.	Medium cultured with <i>C. rolfsii</i>	Mycelial mat of <i>C. rolfsii</i>	Medium not cultured with <i>C. rolfsii</i>
1	85	Nil	306
2	50	Nil	275
3	Nil	Nil	348
4	40	Nil	285
5	Nil	Nil	315

Figures show the amount of ipomeamarone (μ g).

p-dimethylaminobenzaldehyde の 10% エタノール溶液 2 ml, 40% 硫酸 4 ml を加えて, 50°C に 30 分間保ったのち, 吸光度を測定した. 対照としてはイポメアマロンを添加した培地を, 菌無培養のまま 6 日間保ったのち, 試験区と同様に処理したものを準備した. 各試験区とも 5 本の三角フラスコを用い, 5 回反覆実施した.

結果: 結果は第 1 表に示す通りである. 各反覆とも *C. rolfsii* 培養区は, 無培養区に比べて明らかにイポメアマロンの量が少なく, また菌体からはイポメアマロンは検出されなかった. したがって白絹病菌を 28°C, 6 日間培養すると, 培地中のイポメアマロンは顕著に減少することが認められた.

実験 2. イポメアマロン添加培地中で白絹病菌を培養した場合の, 培地中のイポメアマロンの生物的活性の低下

前実験において培地中のイポメアマロンは, 白絹病菌の培養によって減少することが認められたので, その抗菌作用も当然低下していることが想像されるが, この点を確かめるために本実験を行なった.

実験法: バレイショ液体培地 50 ml を 200 ml の三角フラスコに分注し, イポメアマロン 800 µg を添加したのち, *C. rolfsii* の菌叢ディスクを浮かし, 10 日間静置培養した. この培養液を三角フラスコ 2 本分を一組として, エチルエーテルで 3 回振出し, 振出部分を 200 ml の三角フラスコにとってエーテルを除去したのち, イポメアマロンの溶媒として 3% エタノールを 1 ml 添加し, さらに新しいバレイショ液体培地 50 ml を加えた. この一連の操作は無菌的に行なった. この培地に *C. rolfsii* の菌叢ディスクを浮かし, 28°C で 10 日間静置培養し, 菌叢の伸長度を, その直径で測定した. 対照には, 菌を接種しなかった以外はすべて試験区と同様に処理した区とイポメアマロン無添加, 菌無接種以外は全く同様に処理した区の二区を設けた. 各試験区とも 5 本の三角フラスコを用い, 二

回反覆実施した.

結果: 結果は第 2 表に示す通りである. イポメアマロンを添加した培地で *C. rolfsii* を培養した試験区では, 同培地に本菌を培養しなかった試験区に比し, *C. rolfsii* の生育がはるかに良好であったが, イポメアマロン無添加, 菌無培養の試験区よりはその生育が悪いことが示された. この結果からイポメアマロンを添加した培地の抗菌作用は, その中で白絹病菌を培養することによって明らかに低下することが認められた.

実験 3. イポメアマロン添加培地中で白絹病菌を培養した場合の, 培地中のイポメアマロンの減少と培養日数との関係

実験 1 においては, 培養 6 日目に培地中のイポメアマロンを定量したが, 本実験では培養日数とイポメアマロンの減少との関係を調べるため, 6 日目まで毎日測定を行なった.

実験法: バレイショ液体培地 30 ml を 200 ml の三角フラスコに分注し, イポメアマロン 400 µg を添加したのち, *C. rolfsii* の菌叢ディスクを浮かし, 1~6 日間, 28°C で静置培養した. 1 日目以後毎日 5 本ずつの三角フラスコを取り出し, 培地と菌体のそれぞれについてイポメアマロンの量を比色法により測定した. 結果はその平均で示した. 対照には菌を接種しなかった以外は全く同様に処理した区を設けた. その他の実験法の詳細は実験 1 と全く同様である.

結果: 結果は第 3 表に示す通りである. 菌無培養の培地中のイポメアマロンは, 6 日目に若干減少の傾向を示したが, 大きな差は見られなかったのに対し, *C. rolfsii* を培養した培地中のイポメアマロンは, 5 日目で急に減少し, 6 日目にはわずかにその存在が認められるにすぎなかった. 菌体部分にはどの試験区においてもイポメアマロンは検出されなかった. 本実験では各試験区の菌叢の伸長度は測定しなかったが, 菌叢の伸びが良好な試験区では, イポメアマロンの減少

Table 2. Effect of the ether extracts of culture filtrates obtained from media which were added with 800 µg of ipomeamarone, inoculated with *C. rolfsii* for 10 days at 28°C, on the growth of *C. rolfsii*.

No. of Exp.	Medium containing ipomeamarone		Medium containing ipomeamarone
	Not cultured with <i>C. rolfsii</i>	Cultured with <i>C. rolfsii</i>	Not cultured with <i>C. rolfsii</i>
1	1.8	4.0	7
2	1.1	3.7	7

Figures show the diameter of colony of *C. rolfsii* (cm).

Table 3. Relationship of decrease of ipomeamarone in media which were added with 400 μ g of ipomeamarone, inoculated with *C. rolf sii* and incubated for 1—6 days at 28°C, and culture duration.

Treatment	No. of Exp.	Culture duration (Days)					
		1	2	3	4	5	6
Cultured with <i>C. rolf sii</i>	1	386	300	257	281	135	74
	2	330	327	325	318	120	88
Not cultured with <i>C. rolf sii</i>	1	318	342	348	332	310	283
	2	332	357	335	331	304	296

Figures show the amount of ipomeamarone (μ g).

も顕著であり、両者の間には深い関係のあることが観察された。

実験 4. イポメアマロン添加培地中で白絹病菌を培養した場合の培地中のイポメアマロンの薄層クロマトグラフィーによる検索

以上の実験においては、培地中に残存するイポメアマロンを呈色反応あるいは bio-assay によって調べたが、本実験では薄層クロマトグラフィーによって、イポメアマロンの変化を調べようと試みた。

実験法：実験 1 と全く同様な方法によって、イポメアマロン 400 μ g を添加した培地で、白絹病菌を 28°C、8 日間培養し、培養終了後、培地中のイポメアマロンをエチルエーテルで振出し、振出部分からエーテルを除去したのち、再び 0.5 ml のエチルエーテルを加え、これを薄層クロマトグラフィーの試料として用いた。対照にはイポメアマロン添加培地を、菌を培養せずに 28°C、8 日間保ったものを準備し、その他は試験区と全く同様に処理した。薄層クロマトグラフィーは橋本⁸⁾ および AKAZAWA¹⁾ の方法を参照して行なった。すなわち TCL 用のワコーゲル (B-5) 30 g に蒸留水 60 ml を加えてよく練ったのち、東洋科学製の薄層クロマトグラフ装置 HC-20 を用いて、10×20 cm のガラス板上に 0.3 mm の厚さに塗布した。このようにして作った薄層は約 30 分間風乾したのち、110°C の電気定温乾燥器中で 1 時間乾燥し、活性化してから使用した。試料約 50 μ l を、ガラス毛细管を用いて、薄層の下端より 2 cm の位置につけ、*n*-ヘキサン 9 容に酢酸エチール 1 容の混合液を溶媒として展開した。展開距離は 10 cm である。展開を終った薄層は、風乾したのち、エールリッヒ試薬を噴霧器で噴霧し、呈色せしめ、スポットの位置を調べた。この場合用いた試薬は、濃塩酸 50 ml と 95% エタノール 50 ml の混合液に、*p*-dimethylaminobenzaldehyde 5.0 g を溶かしたものである。

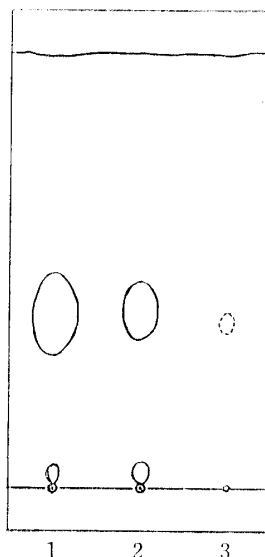


Fig. 1. Silica gel chromatostrip. 1. Pure ipomeamarone; 2. Ether extract of medium added with ipomeamarone, not cultured; 3. Ether extract of culture added with ipomeamarone and inoculated with *C. rolf sii*.

結果：結果は第 1 図に示す通りである。対照区として準備した菌無培養区では、Rf 0.4 附近に淡赤色の明瞭な大きいスポットと、原点附近に紫色がかった赤色の小さなスポットが見られた。しかし *C. rolf sii* 培養区では Rf 0.4 附近のスポットは全く見られないか、あるいは極く薄く小さいものであり、原点附近の赤紫色の小さなスポットも殆んど認められなかった。なお純イポメアマロンを試料にして得られたスポットは、対照区のそれと殆んど同じ結果が得られた。したがってこの結果からイポメアマロンと思われる Rf 0.4 附近にスポットを示す物質は、白絹病菌を培養することによって消失または減少することが認められた。またこの物質の変質などによって生ずる別の物質と思われるようなスポットは、認められなかった。

Table 4. Decrease of ipomeamarone in macerate liquids of 8-10-days-old mycelial mats of *C. rolfssii*, when the liquids were added with 200 μ g of ipomeamarone and incubated for 48 hr at 28°C.

No. of Exp.	Supernatant of macerate of mycelial mat	Precipitate of macerate of mycelial mat	Distilled water
1	75	Nil	160
2	60	Nil	160
3	Nil	Nil	125

Figures show the amount of ipomeamarone (μ g).

IV. 白絹病菌の菌体磨砕物によるイポメアマロンの減少

今までの実験によって、イポメアマロンを添加した培地中で白絹病菌を培養すると、培地中のイポメアマロンが減少することが分ったが、これは白絹病菌がイポメアマロンを変質または分解するためであると思われる。本実験はこのイポメアマロンを変質または分解せしめる能力が、白絹病菌の菌体磨砕物中に存在するかどうかを調べるために行なった。

実験法： バレイショ液体培地で 28°C、8~10日間培養した *C. rolfssii* の菌叢を集めてシャーレに取り、-20°C の冷凍庫中で凍結せしめ、この凍結菌体を乳鉢中でよく磨砕した。この磨砕物は菌体から出た水分を含んでいるので、そのまま 3000 rpm で 20 分間の遠心沈澱を行ない、上澄部分と沈澱部分とに分けた。沈澱部分は粘性が高いので、等量の蒸留水を加えた。この上澄部分と沈澱部分それぞれを、30 ml ずつ 100 ml の三角フラスコに取り、イポメアマロン 200 μ g を添加して、28°C で 48 時間静置した。その後常法にしたがって、エチルエーテルで供試液中のイポメアマロンを抽出し呈色反応、吸光度測定の手続きを経て、イポメアマロンの定量を行なった。対照には蒸留水にイポメアマロン 200 μ g を添加したものを準備し、同様に処理した。

結果： 結果は第 4 表に示す通りである。本表から明らかな通り、菌体磨砕物の遠心上澄、沈澱両部分ともに顕著なイポメアマロンの減少を示した。なお本実験の上澄部分については、呈色反応によるイポメアマロンの定量の他に、III. の実験 4 と同じ方法で、薄層クロマトグラフィーを行なったが、イポメアマロンの顕著な減少が認められた試験区では、実験 4 の場合と同様に、Rf 0.4 附近のスポットが認められず、また別の新しいスポットも見られなかった。

V. 白絹病菌の培養ろ液によるイポメアマロンの減少

前項の実験と同じ観点から、白絹病菌の培養ろ液が

イポメアマロンを減少せしめる能力があるかどうかを調べるために、本実験を行なった。

実験法： バレイショ液体培地 50 ml を 200 ml の三角フラスコに分注し、*C. rolfssii* を 28°C で 8~10日間静置培養したのち、菌体をガーゼで包んでよく搾り、培養ろ液のみを集めた。このろ液を 200 ml の三角フラスコに 50 ml ずつ取り、イポメアマロン 200 μ g を添加して、28°C で 48 時間静置したのち、残存するイポメアマロンをエチルエーテルで抽出し、呈色反応によって定量した。対照には蒸留水にイポメアマロン 200 μ g を添加したものを準備し、同様に処理した。その他の実験法の詳細は前実験と同様である。

Table 5. Decrease of ipomeamarone in the 8-10-days-old culture filtrates of *C. rolfssii*, when the filtrates were added with 200 μ g of ipomeamarone and incubated for 48 hr at 28°C.

No. of Exp.	Culture filtrate	Distilled water
1	73	110
2	82	180
3	60	168

Figures show the amount of ipomeamarone (μ g).

結果： 結果は第 5 表に示す通りである。本表から明らかな如く、バレイショ液体培地で 8~10日間培養した *C. rolfssii* の培養ろ液に加えたイポメアマロンは、48時間後には明らかに減少することが認められた。

VI. 蓚酸がイポメアマロンに及ぼす影響

V の実験において白絹病菌の培養ろ液にイポメアマロンを添加すると、その量が顕著に減少することが認められたが、この現象に、ろ液中に存在する蓚酸が関与していないかどうかを調べるために、本実験を行なった。

実験法： 蓚酸 1 g を 1000 ml の蒸留水に溶かし、そ

の 20 ml を 200 ml の三角フラスコに取り、イポメアマロン 300 μ g を加えて、28°C で 48 時間静置したのち、その溶液中のイポメアマロンをエチルエーテルで振出し、呈色反応によって定量した。対照には蒸留水にイポメアマロンを同量添加したものを準備し、同様に処理した。なお本実験に用いた酢酸水溶液の pH は 2.3 であった。

Table 6. Decrease of ipomeamarone in oxalic acid solutions (0.1%, pH 2.3) which were added with 300 μ g of ipomeamarone and incubated for 48 hr at 28°C.

No. of Exp.	Ipomeamarone in	
	Oxalic acid solution	Distilled water
1	230	225
2	250	265
3	245	245

Figures show the amount of ipomeamarone (μ g).

結果：結果は第 6 表に示す通りである。酢酸区と蒸留水区との間には差が認められず、したがって本実験の範囲内では、酢酸はイポメアマロンに影響を及ぼさないことが分った。

VII. 考 察

pisatin は *Ascochyta pisi* など数種の菌によって変質をうけ、その生物的活性を失なうことが知られている¹³⁾²²⁾ が、イポメアマロンについてはこの種の報告に接しない。本報告は白絹病菌によるイポメアマロンの変質、不活性化の問題について行なった、いくつかの実験をとりまとめたものである。

まず最初に、イポメアマロンを添加したバレイシヨ液体培地に白絹病菌を培養し、培養終了後に培養液中のイポメアマロンをエチルエーテルで振出し、エールリッヒ試薬による呈色反応で定量したところ、イポメアマロンの顕著な減少が認められた(第 1 表)。この減少の原因が、培地中のイポメアマロンが菌体内にとり込まれたためではないことを示すために、菌体をよくすりつぶし、そこに含まれているかも知れないイポメアマロンを、エタノール(第 1 表)またはエチルエーテル(未発表)で抽出し、定量したところ、いずれも 0 に近い値を示した。また白絹病菌の培養液中には多量の酢酸が蓄積され²⁶⁾、それによる pH の低下がイポメアマロンの抽出能率に悪影響を及ぼし、そのことがあたかも培地中のイポメアマロンが減少したか

の如く考えられるのではないかという疑点については、第 6 表の結果が参考になる。すなわち pH 2.3 の酢酸水溶液にイポメアマロンを添加し、抽出すると、添加量の 80% 前後が回収された。これは普通の抽出能率である。また pH 1.8~5.0 の McIlvaine buffer を用いて同様な実験を行なった(未発表)が、いずれも 80% 前後の回収率を示した。これらのことから、pH はイポメアマロンの抽出能率に悪影響を与えないように思われる。以上の諸点から考えて、イポメアマロン添加培地で白絹病菌を培養した場合の、培地中のイポメアマロンの減少は、それが白絹病菌によって変質ないし分解されたためであると思われる。

エールリッヒ反応によってその存在が認められなくなる程イポメアマロンが変質したのであれば、当然その抗菌作用も失なわれていると思われるので、この点を明らかにするために、白絹病菌を培養したイポメアマロン添加培地から、残存するイポメアマロンを抽出し、これを新しい培地に加えて再び白絹病菌を培養したところ、その抗菌作用が明らかに低下していることが認められた(第 2 表)。

白絹病菌によるイポメアマロンの不活性化について、さらに薄層クロマトグラフィーを用いて実験を行なった。第 1 図の白絹病菌無培養区の Rf 0.4 のスポットは、純イポメアマロンを用いた実験結果と比較するとき、明らかにイポメアマロンのそれであると思われるが、白絹病菌培養区ではこのスポットが認められず、イポメアマロンが消失したことを示している。ここで純品区と菌無培養区の原点より少し上方に、小さなスポットがみられたが、これはイポメアニンであると思われる²⁾。純品区にこのようなスポットが現われたのは、精製から供試までの間に時間的なずれがあり、その間にイポメアニンが生じたためと思われる。菌培養区でイポメアマロンのスポットが消失したにもかかわらず、それが変質することによって生じたと思われるスポットはみられなかった。これはイポメアマロンがエールリッヒ試薬によって発色しないほどに、大きく変化したことを示しているのではなからうか。

白絹病菌のイポメアマロン不活性化能は、菌叢の生育とよく一致することが示された(第 3 表)。これは至極当然のことであると思われるが、この機能は生きた菌にのみ存在するものなのであろうか。この点については、-20°C で凍結した白絹病菌の菌体の磨砕物中には、非常に強いイポメアマロン不活性化能が存在することが認められ(第 4 表)、また白絹病菌の培養液中でも同様な機能が存在することも認められた

(第5表)。したがって白絹病菌の有するイボメアマロン不活性化能は、生きた細胞だけがもっているものではなく、菌によって生成されるところの物質が示す機能であるように思われる。

白絹病菌の培養ろ液の一つの特徴は、多量の尿酸を含み²⁶⁾、そのpHが非常に低いことである。そのろ液中の尿酸が、イボメアマロンの不活性化に関与しているのではないかという疑点を明らかにするために、イボメアマロンに対する尿酸の影響をしらべた。普通の状態では、白絹病菌の培養ろ液中の尿酸は0.1%前後が最高である²⁶⁾と思われるが、この濃度の尿酸水溶液に48時間おいても、イボメアマロンの不活性化は認められなかった(第6表)。したがって、本実験の範囲内では、培地中の尿酸はイボメアマロンの不活性化に関与していないように思われる。

以上の諸実験の結果から、イボメアマロンは白絹病菌によって変質をうけ、その生物的活性を失なうと考えて間違いないであろう。この現象は *pisatin* が、*Ascochyta pisi* など数種の菌によって不活性化される現象に酷似しており、フィトアレキシン研究の今後に残された非常に興味深い問題であると思われる。

白絹病菌の示すイボメアマロン不活性化能の本質が、何であるかは重要な課題であるが、TURNER¹⁶⁾はエンバクの根から抽出される一種の抗菌物質 *avenacin* が、*Ophiobolus graminis* var. *avenae* の分泌するある種の酵素によって分解、不活性化されることを報告している。現在のところ、*avenacin* をフィトアレキシンの一種と考えるには、若干の疑念があるが、イボメアマロンの場合も、酵素が関与している可能性は考えられる。この点については、今後検討を進めたい。そしてこのイボメアマロン不活性化の因子の究明とともに、もう一つ重要なことは、イボメアマロンが変質をうけたのち、どのような変遷をたどり、それがどのような生物的意義をもつかということ、明らかにすることであると思われる。

VIII. 摘 要

1) 本報告は、白絹病菌 *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi による、イボメアマロンの不活性化に関するいくつかの実験を、とりまとめたものである。

2) イボメアマロンを添加したバレイショ液体培地で、白絹病菌を 28°C、6日間培養し、培養終了後のろ液から、残存するイボメアマロンをエチルエーテルで抽出し、エールリッヒ反応によって、イボメアマロンを定量したところ、培地中のイボメアマロンが顕著

に減少していることが認められた。また菌体部分からは、イボメアマロンは検出されなかった。

3) 白絹病菌を用いて、bio-assay を行なったところ、エールリッヒ反応によって培地中のイボメアマロンの減少が認められた試験区では、その生物的活性も明らかに低下していることが分った。

4) 培地中のイボメアマロンが減少した試験区について、薄層クロマトグラフィーを用いて実験を行なった結果、イボメアマロン特有のスポットが消失し、またイボメアマロンが変質をうけて生じたと思われるようなスポットも見られなかった。

5) 白絹病菌の菌体を -20°C で凍結し、よくすりつぶした磨砕物、および白絹病菌の培養ろ液にイボメアマロンを添加し、28°C で48時間おいたのち、エチルエーテルで抽出し、エールリッヒ反応でイボメアマロンを定量したところ、その顕著な減少が認められた。

6) 0.1%の尿酸水溶液中にイボメアマロンを加えて28°C で48時間おいたのち、同様にしてイボメアマロンを定量した結果、尿酸水溶液は、イボメアマロンに影響を及ぼさないことが認められた。

文 献

- 1) AKAZAWA, T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **90** (1), 82~89 (1960)
- 2) AKAZAWA, T., I. URITANI and Y. AKAZAWA: *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 52~59 (1962)
- 3) CRUICKSHANK, I. A. M. and D. R. PERRIN: *Nature*, **187**, 799~800 (1960)
- 4) CRUICKSHANK, I. A. M.: *Aust. J. Biol. Sci.*, **15** (1), 147~159 (1962)
- 5) CRUICKSHANK, I. A. M.: *Ann. Rev. Phytopath.*, **1**, 351~374 (1963)
- 6) CRUICKSHANK, I. A. M.: *Aust. J. Biol. Sci.*, **18**, 817~828 (1965)
- 7) CRUICKSHANK, I. A. M.: *World Rev. Pest Control*, **5** (4), 161~175 (1966)
- 8) 橋本庸平: 薄層クロマトグラフィー, 広川書店 (1962)
- 9) 樋浦 誠: 岐阜高農学術報告**50**, 1~5 (1943)
- 10) IMAZEKI, H. and I. URITANI: *Plant and Cell Physiol.*, **5**, 133~143 (1964)
- 11) MÜLLER, K. O.: *Phytopath. Ztschr.*, **27**, 237~254 (1954)
- 12) 野中福次・安井一臣: 佐賀大学農学彙報, **22**, 39~49 (1966)
- 13) 野中福次: 佐賀大学農学彙報, **24**, 109~121 (1967)
- 14) SUZUKI, N.: *Ann. Rev. Phytopath.*, **3**, 265~286 (1965)

- 15) 富山宏平：坂本正幸教授還暦記念論文集，141～150 (1968)
- 16) TURNER, E. M. C.: *J. Exp. Bot.*, **12** (34), 169～175 (1961)
- 17) 植原一雄：日植病報，**23** (3), 127～130 (1958)
- 18) 植原一雄：日植病報，**23** (5), 225～229 (1958)
- 19) 植原一雄：日植病報，**25** (2), 85～91 (1960)
- 20) 植原一雄：広島農短大植病研究室特別報告 **1**, 1～87 (1962)
- 21) 植原一雄：日植病報，**29** (1), 1～5 (1964)
- 22) 植原一雄：日植病報，**29** (3), 103～110 (1964)
- 23) 植原一雄：日植病報，**31** (記念号—2), 334～338 (1965)
- 24) 瓜谷郁三：植物病理の生化学，下巻，1～79 (1963)
- 25) 瓜谷郁三：坂本正幸教授還暦記念論文集，157～166 (1968)
- 26) 永田幸雄・林金雄：農化誌，**30**, 248～252 (1956)

Summary

This paper reports some experiments on the inactivation of ipomeamarone, phytoalexin-like substance produced by sweet potato, by *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi, parasitic fungi of sweet potato. The experiments and the results were as follows:

1) Fifty ml of potato sucrose liquid media in 200-ml flask were added with 400 μ g of ipomeamarone dissolved in ethanol after autoclaving, and inoculated with *C. rolfsii*. After incubating for 6 days at 28°C, the culture filtrates were extracted, three times, with an equal volume of ethyl ether, the solvent was evaporated and the residues, ipomeamarone, were diluted with 4 ml of ethanol. A mycelial mat was macerated by adding 4 ml of ethanol and the supernatant was obtained by centrifuging at 3000 rpm. Both of the residues and the supernatants were added with 2 ml of 10% *p*-dimethylaminobenzaldehyde ethanol solution and 4 ml of 40% aqueous sulfuric acid. The mixtures were incubated for 30 min at 50°C and the optical density was measured at 530 $m\mu$ by spectrophotometer, Hitachi Model 101. From the results, it was shown that when media containing ipomeamarone were inoculated with *C. rolfsii* and incubated for 6 days at 28°C, ipomeamarone in media decreased distinctly (Table 1).

2) Media were added with 800 μ g of ipomeamarone, inoculated with *C. rolfsii* and incubated for 10 days at 28°C. Ipomeamarone left residual in the media were extracted with ethyl ether, the solvent was evaporated and the residues were added with 50 ml of new medium. These media were inoculated with *C. rolfsii*, incubated for 10 days at 28°C and then the diameter of colonies were measured. The data show that the inhibitory of ipomeamarone in media against *C. rolfsii* decreased (Table 2).

3) The experiments were carried out to ascertain the effects of culture duration on to the decrease of ipomeamarone in media, provided that the containing ipomeamarone were inoculated with *C. rolfsii* by the same methods as mentioned in 1), which was followed by the examination of the amount of ipomeamarone was examined. The data showed that a high correlation existed between the decrease of ipomeamarone in media and the culture duration (Table 3).

4) With the use of the same methods as described in 1), ipomeamarone residued in the media were extracted and examined by thin layer chromatography, by using silica gel as the adsorption and 10% ethyl acetate in *n*-hexane as the solvent. Ehrlich's reaction was used for color tests. The results showed that the specialized spot of ipomeamarone was disappeared (Fig. 1).

5) In order to know whether ipomeamarone decreases or not in the macerate liquids of mycelial mat and the culture filtrates of *C. rolfsii*, 30-50 ml of these liquids obtained from 8-10 days-old culture were added with 200 μ g of ipomeamarone, incubated for 48 hrs at 28°C and the amount of ipomeamarone in the liquids were examined. As shown in Table 4 and 5, ipomeamarone decreased distinctly in these liquids.

6) Three hundreds μ g of ipomeamarone was added to 20 ml of oxalic acid aqueous solution (0.1%, pH 2.3), incubated for 48 hrs at 28°C and then the amount of ipomeamarone was examined. The data were shown in Table 6. From the results, it may correctly be assumed that oxalic acid in culture filtrates of *C. rolfsii* and pH of solutions containing ipomeamarone have no remarkable influence on the activity of ipomeamarone and its extraction.