

学位論文要旨	
氏名	國賀 武
題目	カンキツ類のファイトアレキシン生成に関する研究 (Study of phytoalexin production in <i>Citrus</i> spp.)
<p>カンキツ類のファイトアレキシンであると考えられているスコパロン(6,7-dimethoxycoumarin)の生成について、紫外線照射および灰色かび病菌を接種して調査した。</p> <ol style="list-style-type: none">1. スコパロンとその他7種類のクマリン類を供試して、灰色かび病菌およびカンキツ炭疽病菌との菌糸生長阻害率との関係を調査した結果、スコパロンの抗菌活性が最も高かった。このことから、クマリン骨格の第6および7位のメトキシル基が抗菌活性に重要な役割を果たしているとともに、病原菌の種類によって抗菌活性に差があることが推測された。2. 紫外線の照射および灰色かび病菌の接種を行ったキンカン果皮の抽出物であるクマリン類の抗菌活性をバイオグラム法によって調査した結果、クマリン類の標品に近い Rf 値付近に非常に強い阻止部があることが明らかにできた。さらに、それ以外にも孢子発芽を阻害する部分があることから新規の抗菌物質が存在することも推察された。3. カンキツ類の葉と果実について、ファイトアレキシンであるスコパロンの生成量の経時的変化を調査した結果、葉でのスコパロン生成量は12月採取葉で多かった。一方、'ユーレカ'レモン以外のカンキツ品種では、8月採取葉のスコパロン生成量は非常に低かった。果実では12月に採取した果実でのスコパロン生成量が高かった。一方、8月に採取した果実では、全てのカンキツ品種でスコパロン生成量は僅かであった。4. カンキツ類の26種・品種の果実と29種・品種の葉に対して、20分間の紫外線照射を行った場合にも、幼葉および幼果に比べて成果、成葉でのスコパロン生成量が高かった。5. 開花直後から1ヶ月ごとに採取したカンキツ類の果実に紫外線照射を行ったところ、果実の生長(成熟)が進むにつれてスコパロン生成量は多くなった。さらに、その最大値も品種間において差異が認められ、熟期の早い品種では遅い品種よりも生成量が最大に達する時期が早かった。このように、カンキツ類では種・品種間、器官別によって紫外線照射によるスコパロン生成量には大きな差異があり、また生成量の変化にも差異が認められた。6. 灰色かび病菌接種によるスコパロンの生成・蓄積量の経時変化と品種間差異についても検討した結果、紫外線照射によるスコパロン生成パターンと灰色かび病菌接種によるスコパロン生成パターンは同じではなかった。7. 以上の結果から、スコパロンは灰色かび病に対するカンキツ類のファイトアレキシンであり、その蓄積量は経時的に変化すること。さらに、スコパロンの生成パターンには品種間差異があること、菌糸侵入からスコパロン生成に至るまでの経路は灰色かび病菌を接種した場合と紫外線を照射した場合とは異なることが推察された。	

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Takeshi Kuniga

題 目

Study of phytoalexin production in *Citrus* spp.
(カンキツ類のファイトアレキシン生成に関する研究)

Plant diseases cause serious economic losses in numerous crop plants. To prevent the losses, amount of agricultural chemical is used in cultivation. But some chemical compounds harmed human being. It is important for looking for the effective methods not to use such chemicals.

Many antimicrobial compounds produced by plants have important roles in their resistance to infection by bacteria, fungi and nematodes. Phytoalexins are synthesized in response to invade by microorganisms. The response of plants to infection is first recognized by attaching pathogen to plant cell surface. Elicitor is inducer of phytoalexin, which acts like pathogen. Ultraviolet (UV), is one of an elicitor, radiation induced production of phytoalexin scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) in the leaves and flavedo of various citrus cultivars.

Scoparone was the most effective compounds among the various coumarines. Thin layer chromatography (TLC) test indicated UV radiated kumquats peel possessed antimicrobial activity.

We measured scoparone in the citrus leaves and fruits radiated UV by high performance liquid chromatography (HPLC). The amount of scoparone in young leaves and fruits (harvested in August) was less than that of matured ones (harvested in December). Duration of changes in scoparone synthesis differed among citrus cultivars, organs and growth phases. Production of scoparone is possible to relate mould decay.

Gray mold (*Botrytis cinerea* Persoon) also induced the accumulation of scoparone in the flavedo of fruit for all the citrus cultivars used in this study. The time-course of the accumulation of this compound depended on the species. In the fruit harvested in December, scoparone accumulated gradually for several days after the inoculation.

In several citrus cultivars, the compound increased up to 4 days after the treatment. In other cultivars, the maximum concentration was observed within 7 days of the treatment. 19 of 30 cultivars got to the peak 7 days after inoculation, while 11 cultivars reached maximum at 4 days after the treatment.

These results suggest that scoparone was a phytoalexin induced by gray mold, with a broad extent of citrus cultivars. However the accumulation of scoparone induced by UV and gray mold inoculation could not find any correlation. This result indicated that mechanism of scoparone synthesis was different UV radiation from inoculation with pathogen.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	國 賀 武
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 冨 永 茂 人
	副査 鹿児島大学 助教授 山 本 雅 史
	副査 宮崎大学 教授 上運天 博
	副査 佐賀大学 教授 松 本 亮 司
	副査 鹿児島大学 教授 日 高 哲 志
審査協力者	
題 目	カンキツ類のファイトアレキシン生成に関する研究 (Study of phytoalexin production in <i>Citrus</i> spp.)
<p>ファイトアレキシン (phytoalexin) とは植物が病原菌の感染を受けたときに新たに生合成される低分子量の抗菌活性物質である。カンキツ類ではクマリン類の化合物の一つであるスコパロン (6,7-dimethoxycoumarin) がアオカビ病、ソグサレ病、黒点病等に抵抗性を付与するファイトアレキシンと考えられており、スコパロン生成を人為的に誘導できればそれらの病害の薬剤防除の軽減につながり環境にやさしい減農薬栽培が期待できるが、カンキツ類を対象にしてのこの種の研究例は極めて少ない。</p> <p>カンキツ類果実に発生する灰色かび病はカンキツ栽培において重要な病害であり、特に花と幼果期および収穫後の貯蔵中の発生が多く、実際栽培においてはその効果的な予防と防除が求められている。</p> <p>申請者は、クマリン類のうちスコパロンなど 8 種類の化合物を供試し、カンキツ類の灰色かび病と炭疽病に対する抗菌活性の差違について検討するとともに紫外線 (UV) 照射と病原菌接種によるファイトアレキシン生成能力を比較し、紫外線照射による病害予防の可能性について検討した。さらに、品種別および葉と果実の発育ステージ別のスコパロン生成量の差違についても検討した。</p>	

まず、ジャガイモ煎汁培地 (Potato Dextrose Agar) にスコパロンとその他 7 種類のクマリン類を溶解し、灰色かび病菌およびカンキツ炭疽病菌の菌糸生長阻害率との関係を調査し、クマリン類の中ではスコパロンの抗菌活性が最も高いこと、クマリン骨格の第 6 および 7 位のメトキシル基が抗菌活性に重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、病原菌の種類によって抗菌活性に差があることを見出した。さらに、灰色かび病菌の接種と紫外線照射を行ったキンカン果皮の抽出物の抗菌活性をバイオオートグラム法で測定し、クマリン類以外にも新規の抗菌物質が存在することを推察した。

次に、カンキツ類の 26 種・品種の葉と果実に紫外線照射を行い、スコパロンの生成量の経時的変化と品種間差異を調査し、12 月採取の成葉ではスコパロン生成が多いが、'ユーレカ' レモンを除く多くの品種では 8 月採取の幼葉のスコパロン生成量は非常に低いこと、12 月採取の成熟果実ではスコパロン生成量が高いが、8 月採取の幼果では全てのカンキツ品種でスコパロン生成量は僅かであることを明らかにした。また、カンキツ類の果実を開花直後から経時的に採取し、紫外線照射によるスコパロン生成量の変化を調査し、果実の生長 (成熟) が進むにつれてスコパロン生成量は多くなること、その最大値には品種間差があり、早生品種では晩生品種に比べて生成が早いことなど、カンキツ類では種・品種間、器官別にスコパロン生成量には大きな差異があることを明らかにし、これらのことから、灰色かび病菌に対するカンキツの葉と果実および果実の発育ステージによる感受性の差異がファイトアレキシンであるスコパロンの生成能力に起因し、幼果と幼葉で灰色かび病が多発する原因であると推察した。

最後に病害予防という実用的な観点から、灰色かび病菌接種と紫外線照射によるスコパロンの生成と蓄積について経時的変化と品種間差異を含めて比較調査した結果、紫外線照射によるスコパロン生成パターンは灰色かび病菌接種・菌糸侵入の場合とは異なることを示し、カンキツ類におけるファイトアレキシン生成誘導による病害予防の実用化に向けての基礎的知見を示した。

以上のように、本研究は我が国の農業で重要な作物であるカンキツ類の病害抵抗性にファイトアレキシンの生成能力が関与していることを示した初めての研究で、得られた知見は将来のカンキツ類における病害予防実用化のための基礎的知見となるものであり、学位論文として十分価値があるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	國 賀 武
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 富 永 茂 人
	副査 鹿児島大学 助教授 山 本 雅 史
	副査 宮崎大学 教授 上運天 博
	副査 佐賀大学 教授 松 本 亮 司
	副査 鹿児島大学 教授 日 高 哲 志
審査協力者	
実施年月日	平成18年 1月17日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査および副査の5名は、平成18年1月17日(火)の公開審査会において、学位申請者に対して学位論文の内容について説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を申請者から得た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	國 賀 武
<p>[質問 1] 実験手法として紫外線照射によるスコパロン誘導の実験を行っているが、どのような方法で照射を行ったか？また、波長や照射時間等どのように決定したか？</p> <p>[回答 1] UV照射は殺菌灯を用いて行った。それ故、UVの波長としてはUV-Bが主体であると考えられる。予備試験で紫外線照射によるスコパロンの生成量が約20分から30分で平衡に達すること、実用的利用場面も考慮し、照射時間は20分とした。</p> <p>[質問 2] 同じ殺菌灯を使用した場合、線量が安定するまでに時間を要したり、殺菌灯が劣化することが考えられるが、実験中、線量のチェック等は行ったか？</p> <p>[回答 2] 紫外線測定装置でチェックし、安定してから実験を行った。</p> <p>[質問 3] クマリン類の抗菌活性には、6位および7位がメトキシル基となることが必要であると結論付けているが、6位だけがメトキシル基となっている物質を供試していない。この結論で良いか？</p> <p>[回答 3] 6位のみメトキシル基となった物質の入手が困難であったことから、実験には供試できなかった。ただし、5位と7位がメトキシル基となった物質では、著しく抗菌活性が低下し、また、7位だけがメトキシル基となった物質でも、6位および7位がメトキシル基となった物質ほどではないものの抗菌活性が認められることから、この結論で問題はないと考える。</p> <p>[質問 4] 灰色かび病を実験材料として選んだ理由は？他の病害に対するスコパロンの効果はどうか？</p> <p>[回答 4] カンキツで問題となる糸状菌による病害としては、灰色かび病の他に、青色かび病、そうか病などがある。この中で、青色かび病については既に報告があり、そうか病については、材料として取り扱いが難しいなどの問題があったことから、灰色かび病に焦点を絞った。灰色かび病は貯蔵病害としても重要であり、ポストハーベストの現場では農薬は使用できないことから、紫外線照射での抗菌活性の付加を検討している。また、フィットフトラやアルタナリアなどの菌類による病害についても効果があると考えている。</p>	

[質問 5] *in vitro* では、どれくらいの量で効果があるのか？

[回答 5] 灰色かび病菌、青色かび病菌については 10~20 μg という少量で明らかに増殖が抑えられた。おそらく糸状菌全体に効果はあると考えている。なお、生育の遅いそうか病菌では 50 μg を必要としたが、おそらく実験方法等、他の問題も含んでおり、検討は必要である。

[質問 6] スコパロン生成によって病気は抑えられたのか？病徴はどうか？

[回答 6] 腐敗は生じたが、発生開始は遅れた。

[質問 7] 紫外線照射と灰色かび病菌の接種では、スコパロン生成速度や量に差があり、実用化にはもう少し検討が必要であると思われるが、その点はどうか？

[回答 7] 実用化にはもう少し検討が必要であると考えており、照射する紫外線の線種の検討、照射時間の短縮など検討している。また、赤外線についても検討したい。イスラエルでは熱湯による殺菌等が行われているが、果皮が弱い我が国のカンキツ品種では果皮障害等の問題から熱湯は使えず、紫外線照射は有効な手段になると考えている。

[質問 8] スコパロンには機能性成分としての働きもあると思うが、カンキツ果実に付加価値を付けるという観点からみてどうか？

[回答 8] ご指摘のように、スコパロンには脾臓における胆汁分泌促進効果、抗酸化活性、血液凝集抑制効果などが知られており、機能性成分として有効であると考えている。ただし、同じクマリン類に属するベルガモッチンにはカルシウム拮抗作用があることから、カルシウム拮抗薬との併用には注意が必要であり、スコパロンについても検討する必要がある。