

〔論文〕

エンバク冠さび菌夏胞子の自己発芽抑制物質
とその誘導体による植物菌類病防除への試行

鶴 嶋 鉄

1. はじめに

菌類胞子が高密度状態になると発芽率の減少が起こる自己発芽抑制現象については、現在まで60種以上の菌類で報告されており、多くの場合、発芽抑制物質の存在を示唆する論文が出されている⁽¹⁾。最初に自己発芽抑制物質を分離し、構造決定したのは Macko らであった。1970年に、彼等は、*Uromyces phaseoli* の自己発芽抑制物質を methyl cis-3, 4-dimethoxycinnamate (MDC) と同定した⁽²⁾。彼等は続いて翌年、*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* の自己発芽抑制物質を、methyl cis-ferulate (MF) と同定した⁽³⁾。その後、*Puccinia helianthi*, *Puccinia antirrhini*, *Puccinia arachidis*, *Puccinia sorghi*⁽⁴⁾, *Puccinia striiformis*⁽⁵⁾ から自己発芽抑制物質が同定されたが、いずれも MDC であった。さび菌夏胞子以外では、Lepik ら⁽⁶⁾ が1972年に、*Peronospora tabacina* から自己発芽抑制物質として 5-isobutyroxy- β -ionone を単離した。安部ら⁽⁷⁾ も、1976年に *Dictyostelium discoideum* から discadenine を単離した。

さび菌夏胞子の自己発芽抑制物質は、シンナメートの側鎖の二重結合がシス型に配置した化合物で非常に強い活性を有するが、この化合物は、光照射により全く活性の無いトランス型に配置した化合物に変換する。筆者は、エンバク冠さび菌夏胞子から自己発芽抑制物質を分離・同定すると共に、自己発芽抑制物質の誘導体を

合成して、植物菌類病の防除に対する可能性について検討した。

2. 実験材料と実験方法

1) さび菌夏胞子の収集

この研究で使用したさび菌は、エンバク冠さび菌夏胞子 (*Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* Fraser et Led.) レース226, コムギ黒さび菌夏胞子 (*Puccinia graminis* Cda. f. sp. *tritici* Eriks et Henn.) およびネギさび菌夏胞子 (*Puccinia alli*) であった。野外で採取したさび菌罹病葉を水で洗い、水分を拭き取った後にデシケーターに積み重ねて、25℃湿室下に保存した。2日後には多数の新胞子を形成したので、葉をたたいて胞子を紙上に振り落とした。収集した胞子は、使用時まで5℃暗黒下に保存した。

2) 抽出物からの自己発芽抑制物質の検出法

胞子発芽液および胞子洗浄液からの自己発芽抑制物質の検出は、真山ら⁽⁸⁾ がファイトアレキシン研究のために開発した生物検定法 (TLCプレート生物検定法) を用いた。濃縮した抽出物から少量をとり、シリカゲル (Merck GF₂₅₄) の薄層板 (0.38mm) 上にスポットし、ベンゼン/ジエチルエーテル (8:2, v/v) で展開した。この薄層板は、溶媒を除去するために十分に風乾した後、水を粉霧して湿らせ、湿室箱の中に入れて20℃、暗黒状態で12~16時間置いた。薄層板上の発芽抑制活性を示す部位は、夏

胞子本来の色調が発芽後に変化して白っぽくなった周囲から、黄色のスポットとしてはっきりと識別された。

3) 水溶液中での発芽試験 (in vitro 試験)

発芽試験は、次の2通りの方法を使い分けた。

1つは、メタノールに溶かした供試検体をマイクロシリンジでベトリ皿底面に所定量塗り付け、溶媒が蒸発した後に蒸留水を入れ、ごく少量のさび菌夏胞子を附着させた白金耳で懸濁する方法であった。

もう1つの方法は、供試検体を少量のアセトンで溶解し、その溶液を滅菌蒸留水で濃度調整し、胞子を懸濁した。

いずれの場合も、胞子懸濁液は、暗黒、20℃下で12時間置き、発芽率を顕微鏡により測定した。

4) 寒天希釈法による殺菌活性試験 (in vitro 試験)

供試検体をアセトンで溶解し、そのアセトン溶液を40~50℃の寒天培地にまぜてよく分散させる。この方法により準備した一定濃度の供試検体含有培地に供試菌の胞子懸濁液を接種し、一定条件で培養後その生育の有無を判定し、菌の生育に対する供試検体の最低生育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) を決定した。2種類の供試菌を使用し、キュウリべと病菌 (*Pseudoperonospora cubensis*) の場合はしょ糖寒天培地で25℃下に2時間培養し、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の場合はジャガイモぶどう糖寒天培地で20℃下に24時間培養した。

5) 植物菌類病防除試験 (in vivo 試験)

試験液は、供試検体を少量のジメチルホルムアミドに溶解し、その溶液をリノーを含む蒸留水にて濃度 500ppm となるように調整し、8種の植物病原菌に対する防除効果を検討した (表1)。

表1 植物菌類病防除試験の供試菌

供試菌	供試植物
<i>Pyricularia oryzae</i> (いもち病菌)	イネ
<i>Fusarium oxysporum</i> (フザリウム立枯病菌)	キュウリ
<i>Pythium aphanidermatum</i> (ピシウム立枯病菌)	キュウリ
<i>Rhizoctonia solani</i> (リゾクトニア立枯病菌)	キュウリ
<i>Sphaerotheca fuliginea</i> (うどんこ病菌)	キュウリ
<i>Botrytis cinerea</i> (灰色かび病菌)	キュウリ
<i>Pseudoperonospora cubensis</i> (べと病菌)	キュウリ
<i>Puccinia coronata</i> (冠さび菌)	エンバク

地上部殺菌活性試験は、供試植物に上記試験液を塗布後、供試菌を接種した。

立枯病菌の場合は、土壤に種子を播種し、土壤表面に供試菌を接種後、試験液を土壤処理した。評価は、4~15日後 (供試菌で異なる) に行った。

3. 実験結果

1) エンバク冠さび菌夏胞子の自己発芽抑制物質の分離

エンバク冠さび菌夏胞子の自己発芽抑制物質の分離は、Macko ら²⁾の方法に従って遂行した。夏胞子 (0.5g) を、蒸留水 (100ml) 中で20℃で20分間攪拌し、そのろ液を集めた。夏胞子の総量 25g からのろ液を、等量のジエチルエーテルで3回抽出した。このエーテル抽出液を、薄層板にチャージし、ベンゼン/ジエチルエーテル (8:2, v/v) の溶媒で展開した。展開後、この薄層板の Rf 0.6近辺を約 1.5cm の幅にかき取り、無水メタノールで溶出した。溶出液を濃縮・乾固し、酢酸エチルに転溶後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した。Nucleosil 100-5カラム (住友化学工業製、粒径 5μm, 0.8×30cm) にチャージし、ヘキサン/酢酸エチル (5:1, v/v) で溶離し

た。保持時間が、17.9分（ピーク1）と23.9分（ピーク2）の位置に、大きなピークが出現した。これらの2つのピークの画分を、繰り返してHPLCにかけることにより精製した。ピーク1の画分の収量は45 μ gで、ピーク2の画分の収量は30 μ gであった。精製物は、暗黒で保存した。これらの2つの画分の純粋性を各種ガスクロマトグラフィー（GC）により確認した。ピーク1の画分は強い発芽抑制活性を示したが、ピーク2の画分には活性がみられなかった。

2) エンパク冠さび菌夏胞子の自己発芽抑制物質の同定⁹⁾

分離した2つの成分をガスクロマトグラフィー質量スペクトル装置（日立M-70ガスクロマトグラフィー質量分析装置）で分析すると、全く同じスペクトルが得られた〔電子衝撃, 20 eV: m/z 222 (分子イオンピーク, M⁺), 207 (12.9%, M⁺-CH₃), 191 (32.5%, M⁺-OCH₃), 163 (4.3%, M⁺-COOCH₃), 147 (5.2%)〕(図1)。このスペクトルは、合成した methyl *cis*, *trans*-3, 4-dimethoxycinnamate のスペクトルと一致した。この結果、活性成分であるピーク1の画分が、methyl 3,4-dimethoxycinnamate の異性体であると結論を下した。ピーク1とピーク2の構造は、合成した標品と比較することによって決定した。すなわち、ピーク1のHPLCとGCにおける保持時間は、methyl *cis*-3, 4-dimethoxycinnamate の合成標品と一

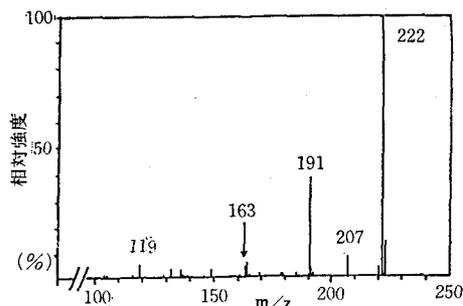


図1 エンパク冠さび菌夏胞子からの自己発芽抑制物質のマススペクトラム

致した。また、ピーク2の保持時間は、*trans*異性体と一致した。さらに、セルロースのスポットフィルム（東京化成工業製、20×20cm、展開溶媒は水）で検討した場合、ピーク1のRf値は0.6、ピーク2のRf値は0.3を示し、それぞれ methyl *cis*-3,4-dimethoxycinnamate, methyl *trans*-3,4-dimethoxycinnamate のRf値と一致した。以上の結果より、ピーク1の活性本体は、methyl *cis*-3,4-dimethoxycinnamate であると結論した。スライドガラス上での発芽試験により、methyl *cis*-3,4-dimethoxycinnamate のED₅₀は、12.5pg/mlであった。しかし、この物質の*trans*異性体には、全く活性がみられなかった。

3) 2種の methyl benzalmonate の抗菌活性

さび菌から単離された2種の自己発芽抑制物質は、いずれもシナメートの側鎖の二重結合がシス型に配置した化合物で、非常に強い活性を有する。しかし、これらの化合物は光照射により、全く活性の無いトランス型に配置した化合物に変換する。この問題点を克服するために2種の化合物を考案し合成した。これらの化合物は、シナメートの位置に相称的な構造のメトキシカルボニルを有する methyl benzalmonate である。まず、methyl 3,4-dimethoxybenzalmonate (MDB) を、薄層板上に1000, 100, 10, 1pg 相当量チャージし、ベンゼン/ジエチルエーテル (8:2, v/v) の溶媒で展開後、エンパク冠さび菌夏胞子を塗布して活性を調べる TLC 生物検定法により検討した(図2)。MDBは1pgのチャージ量でも明白な抗菌スポットが出現する、きわめて活性の強い化合物であることがわかった。次に、各種濃度の水溶液を準備し、発芽試験により活性を調べた。供試菌には、エンパク冠さび菌夏胞子とネギさび菌夏胞子を用いた。両菌どちらにしてもED₅₀は20~40pg/mlであり、80pg/mlでは完全に発芽を抑制した(図3)。2種の methyl benzalmonate の活性を、自己発芽抑制物質の

methyl *cis*-3,4-dimethoxycinnamate (MDC) および methyl *cis*-ferulate (MF) の活性と比較し、特異性があるかどうかを水溶液中での発

芽試験により検討した (表2)。供試菌にはエンバク冠さび菌とコムギ黒さび菌夏胞子を用いた。Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzalmalonate (MHMB) の場合、コムギ黒さび菌夏胞子に対する ED₅₀ は 270pg/ml であったが、エンバク冠さび菌夏胞子に対する ED₅₀ は 6800 pg/ml となり、ずっと低い値を示した。これは、MF と同じ傾向であった。逆に、MDB のコムギ黒さび菌夏胞子に対する ED₅₀ は 4160 pg/ml であったが、エンバク冠さび菌夏胞子に対しては 25pg/ml と極めて強くなった。この

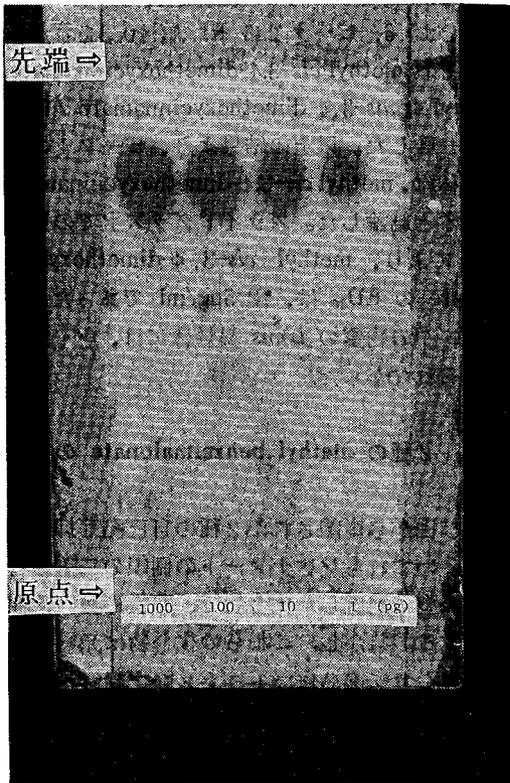


図2 TLC生物検定法による Methyl 3,4-dimethoxybenzalmalonate の抗菌性展開溶媒; ベンゼン/ジエチルエーテル (8:2, v/v)

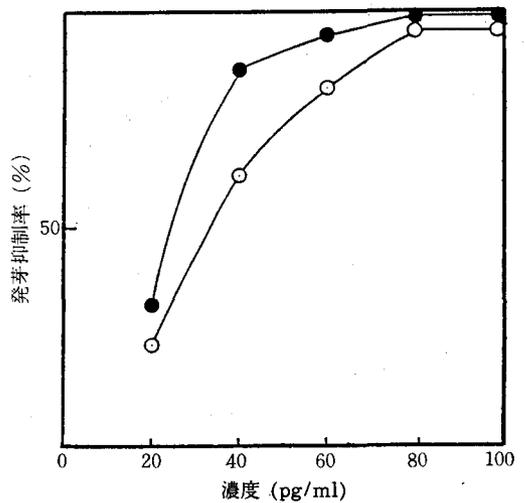


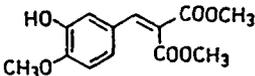
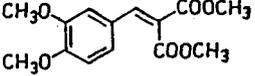
図3. Methyl 3,4-dimethoxybenzalmalonate のエンバク冠さび菌ネギさび菌夏胞子に対する発芽抑制活性
●—●: ネギさび菌
○—○: エンバク冠さび菌

表2 合成した自己発芽抑制物質とその誘導体のさび菌夏胞子の発芽に対する影響 (ED₅₀)

化合物	さび菌夏胞子	
	<i>P. coronata avenae</i>	<i>P. graminis tritici</i>
<chem>COc1ccc(COC(=O)/C=C/c2ccc(OC)c2)c1</chem>	13 pg/ml	3680* pg/ml
<chem>COc1ccc(COC(=O)/C=C/c2ccc(O)c2)c1</chem>	5570*	180*
<chem>COc1ccc(COC(=O)/C=C/C(=O)OC)c1</chem>	25	4160
<chem>COc1ccc(COC(=O)/C=C/C(=O)OC)c1</chem>	6800	270

* データーは、1972年の Macko⁽⁴⁾ から、編集した。

表3 8種の異なった病原菌に対する2種の methyl benzalmonate¹⁾ の防除効果

病原菌	防除率(%)	
		
<i>P. oryzae</i>	42	40
<i>F. oxysporum</i>	0	—
<i>P. aphanidermatum</i>	0	—
<i>R. solani</i>	0	0
<i>S. fuliginea</i>	0	0
<i>B. cinerea</i>	0	0
<i>P. cubensis</i>	100	95
<i>P. coronata</i>	30	80

1) 供試濃度; 500ppm
—; 試験せず

場合は MDC と同じ傾向であった。このように MF を MHMB に, MDC を MDB に変換させてもその活性の強さはほとんど変化せず, 特異性についても維持されていた。また, 2種の methyl benzalmonate は, 非常に安定な化合物であった。その発芽抑制作用は静菌的であり, 発芽を抑制するが発芽管の進展には影響せず, 発芽抑制されていた処理胞子を水に移し替えると再び発芽管の伸長がみとめられた。

4) 自己発芽抑制物質と誘導体の殺菌活性試験

8種の植物病原菌に対して *in vivo* での防除活性を検討したが, 500ppm の濃度では, MHMB, MDB 共に, イネいもち病菌, キュウリべと病菌およびエンバク冠さび菌に対して効果を示した(表3)。次に, 自己発芽抑制物質の誘導体98個の検体を合成し, *in vivo* での防除活性を調べた。この中で, 土壌病原菌に顕著な効果を示した9種の誘導体を選び, キュウリべと病菌および灰色かび病菌に対する *in vitro* での殺菌活性を検討した(表4)。両菌に対する MIC は, それぞれ 1~8ppm, >128ppm であり, Captan (0.03ppm, 2ppm) より劣

るものであった。しかし, 誘導体の methyl 3-methoxybenzalmonate (MMB) のその他重要病原菌に対する MIC, ED₅₀ は対照薬剤と同程度かそれより優れていた(表5)。

4. 考 察

筆者の研究により, 自己発芽抑制物質が, methyl *cis*-3,4-dimethoxycinnamate (MDC) であるさび菌夏胞子に, エンバク冠さび菌を加えることになった。エンバク冠さび菌の MDC に対する活性を検討すると ED₅₀ は 12.5pg/ml であったが, この数値は, エンバク冠さび菌の自己発芽抑制物質が, これまで単離・同定された菌類の生理活性物質のうちで, 1×10⁻⁹ M で活性を示す *Allomyces* の性フェロモンの sirenin⁽¹⁰⁾ や 6pg/ml の濃度で活性が認められる *Achlya* の性フェロモンの antheridiol⁽¹¹⁾ に匹敵する最も活性の強い物質であることを指摘する。

このさび菌の自己発芽抑制物質をリード化合物として, 誘導体による植物菌類病の防除への試みは, 興味深い結果を得た。自己発芽抑制物質の不安定さを克服するために, methyl 4-hydroxy 3-methoxybenzalmonate (MHMB)

表4 自己発芽抑制物質誘導体のキュウリべと病菌と灰色かび病菌に対するMIC

X	MIC (ppm)	
	PC*	BC**
	4	>128
	4	>128
	2	>128
	2	128
	4	128
	4	128
	1	>128
	4	>128
	8	>128
Captan	0.03	2
Daconil	0.25	>128

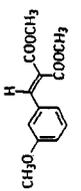
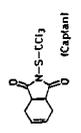
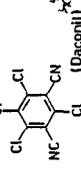
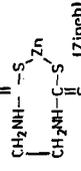
* *Pseudoperonospora cubensis*

** *Botrytis cinerea*

および methyl 3,4-dimethoxybenzylmalonate (MDB)を合成し,植物菌類病の防除について検討すると,イネいもち病菌,キュウリべと病菌およびエンパク冠さび菌に効果を示した。さらに,多数の誘導体を合成し,防除を検討すると,土壌病原菌に強い効果を示す9種の化合物があった。このことは,自己発芽抑制物質の誘導体が,他の局面で作用する可能性を示唆している。誘導体の中には,植物菌類病の防除以外の

面で有用物質として適用できるものも含まれているかもしれない。今後,他の活性作用についても検討していく必要があるだろう。植物病原菌に対する *in vivo* および *in vitro* 試験を通じて,誘導体の中で最も活性が強かったのは, methyl 3-methoxybenzylmalonate (MMB)であった。すなわち, MHMB と MDB から4位のヒドロキシル基およびメトキシル基がなくなることにより,農業上の大きな問題となってい

表5 自己発芽抑制物質誘導体と各種殺菌剤の活性の比較

菌類										
	MIC	ED ₅₀	MIC	ED ₅₀	MIC	ED ₅₀	MIC	ED ₅₀	MIC	ED ₅₀
藻菌類										
<i>P. aphanidermatum</i>	>1000*	8.1*	>125	10.7	>1000	2.6	>700	202.3	500	73.4
<i>P. melonis</i>	>1000	27.9	>1000	8.3	>1000	<2.0	>700	64.3	>1000	40.1
<i>R. chinensis</i>	500	5.1	>1000	28.4	>1000	11.8	>700	>700	>1000	74.8
子囊菌類										
<i>G. cingulata</i>	62.5	7.1	62.5	5.9	>1000	<2.0	>700	>700	125	14.0
<i>P. piricola</i>	>1000	21.9	>1000	16.1	>1000	17.0	>700	605.0	>1000	85.5
<i>S. sclerotiorum</i>	>1000	<2.0	31.2	<2.0	>1000	<2.0	>700	89.6	>1000	200.0
<i>V. inaequalis</i>	62.5	9.1	62.5	22.3	250	<2.0	350	28.8	500	161.3
<i>V. nashicola</i>	125	20.6	62.5	68.1	>1000	<2.0	700	109.4	>1000	300.8
<i>E. ampelina</i>	>1000	32.9	>1000	67.0	>1000	159.9	>700	>700	>1000	126.4
担子菌類										
<i>H. mompa</i>	>1000	52.9	>1000	39.3	62.5	<2.0	>700	13.1	125	18.3
不完全菌類										
<i>R. solani</i>	>1000	7.8	>1000	>15.6	>1000	2.1	>700	193.7	>1000	>125
<i>R. solani (P. sasakii)</i>	500	5.8	>1000	>15.6	>1000	<2.0	>700	106.6	>1000	>500
<i>B. cinerea</i>	>1000	28.3	>1000	>15.6	>1000	<2.0	>700	295.0	>1000	>1000
<i>C. lagenarium</i>	62.5	6.7	>1000	15.5	>1000	2.7	>700	97.1	1000	56.0
<i>F. oxysporum</i>	>1000	26.2	>1000	4.5	>1000	<2.0	>700	53.8	>1000	>1000
<i>A. mali</i>	>1000	38.7	>1000	26.6	>1000	31.5	>700	345.2	>1000	139.1
<i>A. kikuchiana</i>	>1000	113.4	>1000	35.3	>1000	>1000	>700	108.2	>1000	204.8
<i>P. oryzae</i>	62.5	7.4	>1000	13.5	>1000	11.3	>700	46.6	>1000	104.1
<i>D. mali</i>	62.5	14.3	500	42.4	15.6	<2.0	350	126.3	>1000	420.0
<i>Z. jamaicensis</i>	31.2	5.3	31.2	12.2	>1000	57.9	700	65.7	500	136.2

* ppm

表6 MDBとMMBのエンバク冠さび菌夏胞子に対する活性作用の比較

特 性	供試検体	
	MDB	MMB
ED ₅₀	25pg/ml	1.3μg/ml
発芽管の伸長阻害	-	+
処理胞子の洗浄による発芽能力の回復	+	-

多くの土壌病原菌に対して顕著な効果を示すことになったのである。また、この化合物の各種病原菌に対する MIC, ED₅₀ の数値は、対照薬剤と同程度かそれより優れていた。エンバク冠さび菌夏胞子に対する発芽試験により MDB と MMB の活性を比較すると、MMB の発芽抑制力は、かなり弱かった(表6)。しかし、MDB は胞子から発芽管が出現した後では全く効果を示さず、静菌的な発芽抑制物質であったが、MMB は発芽管の伸長も抑制し、作用には殺菌性がみられた。すなわち、methyl benzalmalonate は3位と4位の位置にメトキシル基を有すると、自己発芽抑制物質と同様な作用を有する静菌的な発芽抑制物質であるが、4位の位置のメトキシル基がなくなると作用の異なった殺菌物質に変化する。そのために、MMB が、*in vivo* 試験で多くの菌種に防除効果を示すのであろう。

1927年に Fleming⁽¹²⁾ が、ある種の青カビが寒天培地上で黄色ブドウ状球菌を溶かしてしまう現象への注目からペニシリンの発見へと至った経過は非常に有名である。同じ点から、筆者の行った、菌類胞子の自己発芽抑制現象に焦点をあて、その制御物質の誘導体により植物菌類病を防除しようという企ては、新しい形の農業開発に結びつく可能性があると考えらる。

謝辞

この研究のご指導をいただいた京都大学農学部深海浩教授と同上野民夫助教授、香川大学農学部谷利一教授、同真山慈志助教授に感謝の意を表す。また、本研究を遂行するにあたり、さび菌夏胞子の自己発芽抑制物質である methyl *cis, trans*-3,4-dimethoxycinnamate と methyl *cis, trans*-ferulate の合成物を提供されたコーネル大学 Macko 教授、さび菌夏胞子の自己発芽抑制物質の誘導体を合成された長崎大学薬学部入江浩教授、塩野義製薬研究室の松本公平研究員と高橋哲也博士に対し厚く御礼申し上げる。

引用文献

- (1) Allen, P. J. (1976). In "Encyclopedia of plant physiology" (Ed. R. Heitefuss and P. H. Williams). Vol. 4, pp51-85. Springer Verlag, New York.
- (2) Macko, V., Staples, R. C., Gershon, H. and Renwick, J. A. A. (1970). Science 170, 539-540.
- (3) Macko, V., Staples, R. C., Allen, P. J. and Renwick, J. A. A. (1971a). Science 173, 835-836.
- (4) Macko, V., Staples, R. C., Renwick, J. A. A. and Prione, J. (1972). Physiol. Pl. Path. 2, 347-355.
- (5) Macko, V., Trione, E. J. and Young, S. A. (1977). Phytopathology 67, 1473-1474.
- (6) Leppik, R. A., Hollomon, D. W. and Bottomley, W. (1972). Phytochemistry 11, 2055-2063.
- (7) Abe, H., Uchiyama, M., Tanaka, Y. and Saito, H. (1976). Tetradron Lett. 42, 3807-3810.
- (8) Mayama, S., Tani, T., Matuura, Y., Ueno, T. and Fukami, H. (1981). Physiol. Pl. Path. 19, 217-226.
- (9) Turushima, T., Ueno, T., Fukami, H., Mayama, S. and Tani, T. (1984). Agric. Biol. Chem., 48(8), 2147-2148.
- (10) Machlis, L., Nutting, W. and Rapoport, H. (1968). J. Am. Chem. Soc. 90, 1674-1676.
- (11) Barksdale, A. W. (1969). Science 166, 831-837.
- (12) Fleming, A. (1929). Brit. J. Exp. Path. 10, 226.

(1987年6月29日受理)