

冠さび菌感染エンバク葉の脂質含量および抗菌性

田中明美・山本弘幸・藤原尉嗣・谷 利一

(香川大学農学部)

Changes in Lipid Contents and Their Antifungal Activity in Oat Leaves Inoculated with Crown Rust. by Akemi TANAKA, Hiroyuki YAMAMOTO, Yasutsugu FUJIWARA and Toshikazu TANI (Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa 761-07)

Changes in lipids were analyzed for oat leaves inoculated with incompatible and compatible races of the crown rust fungus, *Puccinia coronata* f.sp. *avenae*. There was no substantial changes in the amounts of simple lipid, glycolipid, and phospholipid among all leaves examined. Germination tests with uredospores exhibited no differences in antifungal activity of three lipids isolated from leaves inoculated with the compatible or incompatible races and uninoculated leaves. Fractionation by column chromatography with DEAE-Sephadex CL-6B column, however, clearly revealed the presence of antifungal activity in the fraction containing phospholipids from leaves inoculated with the incompatible race. It was thus suggested that antifungal substances other than avenalumin are produced in leaves responding with resistance.

緒 言

青枯病に罹病したタバコ葉では抵抗反応を示す際にリン脂質および糖脂質が減少するが、これは過敏反応の結果であると考えられている (ÁDÁM *et al.*, 1989)。また最近、病原菌の感染にともなう酵素作用で植物細胞膜の脂肪酸が遊離し、その酸化物が抗菌性を示すと報告されている (SHIMURA *et al.*, 1983; 加藤ら, 1986; OHTA *et al.*, 1991)。これらの結果は脂質代謝が抵抗反応と関連性があることを強く示唆するものである。

本実験では、冠さび菌感染エンバク葉中の脂質類の変化を調べるとともに抗菌活性を比較し、感染型との関係を検討した。

実験材料および方法

1. 材料および接種法

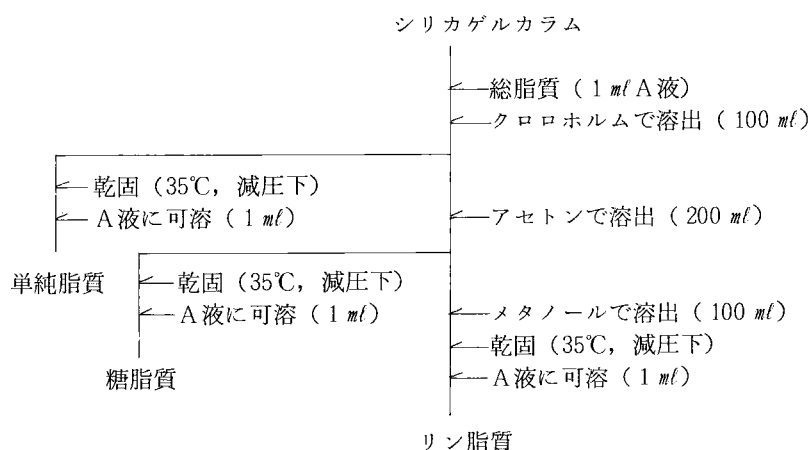
エンバク (*Avena sativa* L.) 品種勝冠1号と冠さび菌 (*Puccinia coronata* Cda. f.sp. *avenae* Fraser and Led.) 不親和性レース226および親和性レース203を用いた。接種は常法 (山本, 1978) に従い播種7日後のエンバク子苗の初生葉裏面に夏胞子を細筆で全面に塗布し、20℃、16時間飽和湿度下に放置した。

2. 総脂質の抽出と分画

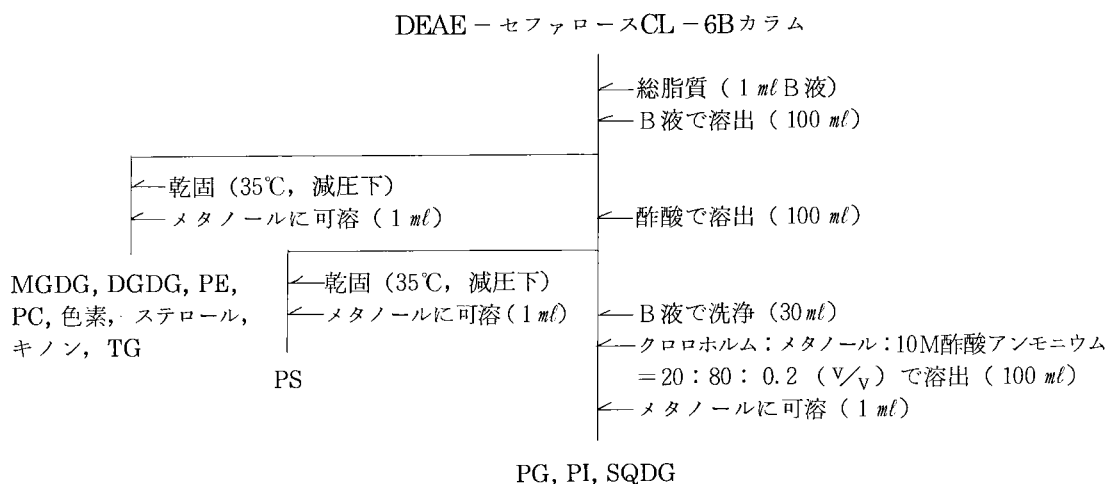
総脂質の抽出はBLIGH and DYER (1959) の方法に準じた。エンバク葉5gを細断し、45mlのクロ

ロホルム：メタノール＝1：2（ V/V ）を加え、氷冷下のホモジナイザーで磨砕した。ろ液に15 ml のクロロホルムと22 ml のイオン交換水を順次加え、遠心分離（ $1000\times g$ ，10分間）により2層に分け、クロロホルム層を回収した。これを減圧下で乾固させ5 ml のクロロホルム：メタノール＝2：1（ V/V ）に溶かして -20°C で保存し、適宜分画実験に供した。

分画は次の2種類の方法を用いた（第1および2図）。脂質はシリカゲルカラムによって3種類に大別され（藤野，1978），DEAE－セファロースCL－6B（Pharmacia Fine Chemicals）カラムによる分画では主にリン脂質が複数の部分に分画される（MURATA *et al.*, 1982）。



第1図 シリカゲルカラムによるエンバク葉中の総脂質の分画
A液：クロロホルム：メタノール＝2：1（ V/V ）



第2図 DEAE－セファロースCL－6Bカラムによるエンバク葉中の総脂質の分画
B液：クロロホルム：メタノール＝1：4（ V/V ）

MGDG:モノガラクトシルジアシルグリセロール，DGDG:ジガラクトシルジアシルグリセロール，
PE:ホスファチジルエタノールアミン，PC:ホスファチジルコリン，TG:トリアシルグリセロール，
PS:ホスファチジルセリン，PG:ホスファチジルグリセロール，PI:ホスファチジルイノシトール，
SQDG:スルホキノボシルジアシルグリセロール

3. 各種脂質類の定量

(1) 単純脂質

単純脂質は山田(1989)の方法に従いエステル量より算出した。すなわち、前述の方法で溶出されたクロロホルム画分 100 μ l を乾固させ、アルカリ性ヒドロキシルアミンを 1 ml 加え、65℃、2 分間反応後、5 分間氷冷した。次に希過塩素酸第二鉄溶液 3 ml を加え、室温で 30 分間反応後、530 nm で吸光度を測定した。

(2) 糖脂質

糖脂質はスルホ脂質とガラクト脂質に分けて定量した (ROUGHAN and BATT, 1968) が、結果は両者を合わせて表示した。スルホ脂質は前述の方法によって溶出されたアセトン画分 100 μ l に 5% フェノール溶液 1 ml、濃硫酸 4 ml を加え、室温で 15 分間反応後 485 nm で吸光度を測定した。また、ガラクト脂質は、フェノール溶液を 2% に変えて同様に反応させ、480 nm で吸光度を測定した。

(3) リン脂質

第 1 図の方法で溶出されたメタノール画分 200 μ l に 70% 過塩素酸：20 N 硫酸：イオン交換水 = 13：100：87 (V/V) 200 μ l を加え 95℃ で 2 時間、さらに 165℃ で 2 時間加熱した。1 M 酢酸ナトリウム：2.5% モリブデン酸アンモニウム：イオン交換水 = 1：1：8 (V/V) 2 ml を加え、37℃ で 2 時間反応後、820 nm で吸光度を測定した (CHEN *et al.*, 1956)。

4. 薄層クロマトグラフィーによる脂質の定性反応

シリカゲル (60 F 254, 0.25 mm) の薄層プレート (Merck 製) に各脂質画分の抽出液を着点し、展開した。単純脂質画分にはヘキサン：エーテル：酢酸 = 80：20：1 (V/V) を、糖脂質およびリン脂質画分はクロロホルム：メタノール：イオン交換水 = 65：25：4 (V/V) をそれぞれ溶媒として用いた。展開後はプレートを十分に乾燥させ、脂質検出用の試薬 (藤野, 1978; 滝谷・鈴木, 1985) を噴霧して発色させた。

5. 抗菌性の検定法

第 1, 2 図の方法で分画した試料 10 μ l を直径 0.5 cm のろ紙片 (Whatman 製, 3 MM) に吸着させ、真空下で 1 晩乾燥後、冠さび菌夏孢子を塗布した。ろ紙片は、スライドガラス上の 0.8% アガロースブロック上に置き、25℃、暗黒下の湿室ペトリ皿に納め、6 時間後に検鏡した。

結

果

1. 脂質類の変化

冠さび菌感染エンバク葉における脂質類の変化と感染型との関係を調べるために、健全葉および不親和性レース 226、親和性レース 203 接種葉中の単純脂質、糖脂質およびリン脂質の含量を接種 16 時間後より経時的に測定した (第 1 表)。単純脂質含量はレース 226 接種葉において測定期間中健全葉に比べてわずかに高く、レース 203 接種葉では健全葉より低かった。糖脂質含量はレース 226 接種葉で接種 28 時間後に健全葉に比べやや高い傾向にあったが接種 48 時間後には減少した。レース 203 接種葉では接種 28 時間以降、健全葉より低かった。リン脂質含量は測定期間中ほぼ一定値を示し、健・病間で著しい差異はみられなかった。

第 1 表 冠さび菌感染エンバク葉における脂質類の変化 (勝冠 1 号)

脂質画分	反 応	脂質量 (μ g / g 生重)		
		16※	28	48
単純脂質	健 全	5.44	5.00	4.76
	罹病性	3.50	3.98	3.44
	抵抗性	5.90	5.72	6.18
糖 脂 質	健 全	1.43	1.51	1.90
	罹病性	1.58	1.07	1.15
	抵抗性	1.43	2.07	1.52
リン脂質	健 全	0.14	0.14	0.15
	罹病性	0.13	0.12	0.12
	抵抗性	0.16	0.17	0.17

※ 接種後の時間 (時)

以上の結果より、3種の脂質画分において、抵抗性、罹病性間に有為な差異はないといえよう。

次に、薄層プレート上に出現するスポットによる質的变化の有無について調べてみた。単純脂質で7個、糖脂質で5個、リン脂質で5個の主要スポットがそれぞれ検出されたが、健・病間による差異は認められなかった。

2. 各脂質画分の抗菌活性

接種28時間後の各脂質画分の抗菌性の検討を行った(第2表)。健全、抵抗性、罹病性の各感染型における単純脂質、糖脂質、リン脂質の抗菌性は3区分とも差異はみられなかった。

しかし、第2図の方法に従って脂質類を分画し、抗菌性を調べると、クロロホルム-メタノール-酢酸アンモニウム混液で溶出されるホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、スルホキノボシルジアシルグリセロール含有画分において、夏胞子の発芽が強く抑制された(第3表)。モノガラクトシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、トリグリセロール、色素、ステロールおよびキノンを含む画分では抗菌性はみられず、健・病間に差異はなかった。なお、酢酸で溶出されるホスファチジルセリン画分は溶媒自身による発芽阻害が現れ、正確な検定が不可能であったため本表から削除した。

第2表 各種脂質画分の抗菌活性

(接種28時間後)			
脂質画分	反 応	発芽率	発芽管長
単純脂質	健 全	57※	120
	罹病性	78	110
	抵抗性	66	99
糖 脂 質	健 全	98	40
	罹病性	113	73
	抵抗性	83	53
リン脂質	健 全	37	79
	罹病性	151	70
	抵抗性	61	68

※ 対照区の値を 100 として表した。

第3表 脂質粗画分の抗菌活性

(接種28時間後)			
溶出画分	反 応	発芽率	発芽管長
クロロホルム-メタノール	健 全	69※	47
-酢酸アンモニウム	抵抗性	0	0
クロロホルム-メタノール	健 全	85	64
	抵抗性	80	55

※ 対照区の値を 100 として表した。

考

察

Pseudomonas syringae pv. *syringae* に感染したタバコ葉では過敏反応が起こり、リン脂質ならびに糖脂質類が分解され減少する (ÁDAM *et al.*, 1989)。また、イネいもち病の抵抗性と葉中の酸化型不飽和脂肪酸の含量は相関しており (加藤ら, 1986)、リノレン酸およびその酸化物 (SHIMURA *et al.*, 1983)、リノール酸酸化物 (OHTA *et al.*, 1991) がそれぞれ抗菌性を示す。

Uromyces phaseoli に感染したインゲンマメ葉では宿主細胞膜の透過性との関連で、抵抗性葉でホスファチジルセリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸が増加し、モノガラクトシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロール およびホスファチジルグリセロールが減少する (HOPPE and HEITEFUSS, 1974)。しかし、罹病性葉でもリン脂質については同様の変化が認められており、感染後のリン脂質の変化は感染型とは関係がないものとしている (HOPPE and HEITEFUSS, 1975)。ジャガイモ *Phytophthora infestans* の系でも脂質類の変化が検討され、糖脂質が罹病性の組合せで減少し、抵抗性の場合に増加しているが、これらは有意な変化ではなく感染型との相関性はないとされている (FLORYSZAK-WIECZOREK and STROINSKI, 1986)。

本実験では、エンバク葉脂質の経時的变化を勝冠1号の健全葉、不親和性レース226接種葉、親和性

レース 203 接種葉を用いて感染型による単純脂質、糖脂質、リン脂質の含有量を比較したところ、含有量に大差がみられなかった（第 1 表）。また、極性の違いによって分別した 3 画分においても抗菌活性に差異は認められなかった（第 2 表）。

以上のように、本実験系においても単純脂質、糖脂質、リン脂質の含量の変化および抗菌性のレベルでは抵抗反応との関連性は見いだせなかった。しかし、脂質の分画法を変えて、健・病間で抗菌活性を比較してみると、リン脂質のホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、スルホキノボシルジアシルグリセロールが主に含まれる画分でのみ抵抗性葉に強い活性を認めた（第 3 表）。このことは脂質画分中に既知のファイトアレキシンであるアベナルミン（TANI and MAYAMA, 1982; MAYAMA, 1983）以外に別種の抗菌性物質が存在する可能性を示唆している。

摘 要

エンバク冠さび菌親和性レースおよび不親和性レースに感染したエンバク葉の脂質含量の変化を調べたところ、単純脂質、糖脂質およびリン脂質含量に有意な変化はみられなかった。また、健全葉、親和性レース接種葉および不親和性レース接種葉の脂質 3 画分の冠さび菌夏胞子に対する抗菌活性も差はなかった。しかし、DEAE-セファロース CL-6B カラムにより分画したリン脂質を主に含む画分では、抵抗性葉にのみ抗菌活性が認められた。このことは、ファイトアレキシンのアベナルミン以外に抵抗性に関連した抗菌性物質が存在することを示唆している。

引 用 文 献

- ÁDÁM, A., T. FARKAS, G. SOMLYAI, M. HEVESI and Z. KIRALY (1989): Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Plant Pathol.*, 34: 13 ~ 26.
- BLIGH, E. G. and W. J. DYER (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911 ~ 917.
- CHEN, P. S., JR., T. Y. TORIBARA and H. WARNER (1956): Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28: 1756 ~ 1758.
- FLORYSZAK - WIECZOREK, J. and A. STROINSKI (1986): Postinfectious changes of lipid metabolism in potato tuber resistant and susceptible to *Phytophthora infestans*. *J. Phytopath.*, 116: 135 ~ 146.
- 藤野安彦 (1978): 脂質分析法入門. 学会出版センター, 東京, 270 pp.
- HOPPE, H. H. and R. HEITEFUSS (1974): Permeability and membrane lipid metabolism of *Phaseolus vulgaris* infected with *Uromyces phaseoli*. II. Changes in lipid concentration and ^{32}P incorporation into phospholipids. *Physiol. Plant Pathol.*, 4: 11 ~ 23.
- HOPPE, H. H. and R. HEITEFUSS (1975): Permeability and membrane lipid metabolism of *Phaseolus vulgaris* infected with *Uromyces phaseoli*. IV. Phospholipids and phospholipid fatty acids in healthy and rust-infected bean leaves resistant and susceptible to *Uromyces phaseoli*. *Physiol. Plant Pathol.*, 5: 263 ~ 271.
- 加藤忠弘・山口仁宏・上原忠夫・生井恒雄 (1986): イネいもち病抵抗性と酸化型不飽和脂肪酸. *化学と生物*, 26: 183 ~ 188.
- MAYAMA, S. (1983): The role of avenalumin in the resistance of oats to crown rust. *Mem. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 42: 1 ~ 64.

- MURATA, N., N. SATO, N. TAKAHASHI and Y. HAMAZAKI (1982) : Compositions and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Cell Physiol.*, 23 : 1071 ~ 1079.
- OHATA, H., K. SHIDA, Y. - L. PENG, I. FURUSAWA, J. SHISHIYAMA, S. AIBARA and Y. MORITA (1991) : A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiol.*, 97 : 94 ~ 98.
- ROUGHAN, P. G. and R. D. BATT (1968) : Quantitative analysis of sulfolipid (sulfo-quinovosyl diglyceride) and galactolipids (monogalactosyl and digalactosyl diglycerides) in plant tissues. *Anal. Biochem.*, 22 : 74 ~ 88.
- SHIMURA, M., S. MASE, M. IWATA, A. SUZUKI, T. WATANABE, Y. SEKIZAWA, T. SASAKI, K. FURIHATA, H. SETO and N. OTAKE (1983) : Anti-conidial germination factors induced in the presence of Probenazole in infected host leaves. III. Structural elucidation of substances A and C. *Agric. Biol. Chem.*, 47 : 1983 ~ 1989.
- 滝谷昭司・鈴木政夫 (1985) : 薄層クロマトグラフ法. 共立出版, 東京 : 82 ~ 92.
- TANI, T and S. MAYAMA (1982) : Evaluation of phytoalexins and preformed antifungal substances in relation to fungal infection. *In Plant Infection* (Eds. ASADA, Y. *et al.*), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo : 301 ~ 314.
- 山田晃弘 (1989) : 植物脂質代謝実験法. 学会出版センター, 東京, 234pp.
- 山本弘幸 (1978) : エンバク冠さび病の抵抗性発現機構に関する研究. 香川大農紀要, 31 : 1 ~ 55.