

氏名・（本籍）	やまぐちよしひろ 山 口 仁 宏
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 1022 号
学位授与年月日	昭 和 62 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）化学第二専攻
学位論文題目	イネの代謝する酸化型脂肪酸に関する研究
論文審査委員	（主査） 教 授 山 本 嘉 則 教 授 伊 東 椒 教 授 吉 越 昭 助 教 授 加 藤 忠 弘

論 文 目 次

- 第 1 章 序 論
- 第 2 章 抗いもち菌物質の単離・構造決定
- 第 3 章 いもち菌り病と酸化酵素
- 第 4 章 実験の部
- 第 5 章 スペクトルデータ
- 謝 辞

論文内容要旨

第1章 序 論

イネは、いもち菌にリ病すると、抗いもち菌物質（ファイトアレキシン）を代謝することが、植原によって初めて見いだされた。その後、この活性物質の本体を明らかにしようとする試みが数多くの研究者により、なされてきた。しかし、筆者らが本研究に着手した時期には、明確な結論は得られていなかった。

本研究では、イネが如何にして、いもち菌リ病に抵抗するかを物質サイドから究明するためにイネの代謝する抗いもち菌物質の検索を行なった。

第2章 抗いもち菌物質の単離・構造決定

イネは、品種によって、いもち菌に対する抵抗性が大きく異なる事が知られている。ササニシキのように大きな病型病斑を作る品種やフクニシキのように全然病斑を作らない無病斑型、あるいは、ふくゆきのようにリ病はするが小斑点のみを作るかっ点型等の品種がある。

これら品種間に見られる抵抗性の差には、イネ自体に存在する抗いもち菌物質の有無に由来する可能性もあり、まずこの点について調べた。

その結果、ササニシキの場合、健全体にはいもち菌の発芽を抑える活性物質は殆ど含まれていないが、リ病することによりその量が増加する。一方、いもち菌に強い品種である、ふくゆきやフクニシキの場合には、既に健全体に抗いもち菌物質が入っていることがわかった。つまり、品種間に見られる抵抗性の差に物質が関与している事が明らかとなった。これらの結果に基づき、リ病したササニシキおよびふくゆき、フクニシキについて、その代謝する抗いもち菌物質の構造を明らかにすることにした。

イネをアセトン抽出し、粗抽出物から活性な酸性部を得た。この部分を更に分画し、不飽和脂肪酸部と酸化型不飽和脂肪酸部にした。酸化型不飽和脂肪酸は、再カラムにより、エポキシド部アルコール部およびその他の部分に分離した。

比較的活性の弱い不飽和脂肪酸部は、大部分がリノール酸と α -リノレン酸の混合物であった。活性の強いエポキシド部からは、(1)~(5)の5種類のエポキシドを単離した。更に、アルコール部からは、(6)~(10)のアリルアルコールを単離した。

エポキシ脂肪酸、アリルアルコール脂肪酸は、共に非常に強い抗いもち菌活性を示し、10~40 ppm の低濃度で、いもち菌の発芽と管伸長を50%抑制した。また、エポキシ脂肪酸の抵抗性誘導の実験結果より、リ病性を示すササニシキがエポキシドの取り込みによって、ふくゆきと同じ抵抗型に変化したことが明らかとなった。

イネの代謝する活性物質の全容を明らかにすることおよびイネ生体内における脂肪酸の代謝経路を究明することを目的に、その他の部分についても、その検索を行なった。このフラクションは、複雑な混合物であるが、各種クロマトを繰り返すことにより、8種類の化合物 (11)~(18) を

単離することが出来た。これらの平面構造は、物理データから決定することが出来たが、各々の不斉炭素の立体化学については、何ら情報が得られなかったため、合成によって、決定することとした。

エポキシ脂肪酸(1)と(4)のメチルエステルを出発原料として用い、立体選択性の確立した反応を組み合わせることにより、考えられる全ての立体異性体を合成した。立体化学の確立した合成品は天然物と比較し、天然物の相対配置を決定した。

絶対配置は、天然物のベンゾエートのC D スペクトルを測定することにより決定した。

高酸化型不飽和脂肪酸は、エポキシ脂肪酸やアリルアルコール脂肪酸に比べ全体的に、いもち菌発芽抑制の活性が弱いのが特徴である。

第3章 いもち菌り病と酸化酵素

ササニシキにみられる病斑とふくゆきにみられる病斑は、形状および形成のされ方が、まったく異なる。しかも、ふくゆきには、健全体・り病体両方に抗いもち菌物質が多く存在しているが、ササニシキの健全体には、その活性物質は殆ど存在せず、り病することによりその量が増加する。これら活性物質の本体は、アリルアルコール脂肪酸(6)、(9)等であるが、ササニシキにみられた現象は、いもち菌が侵入することにより、脂肪酸酸化酵素の活性が増加し、不飽和脂肪酸を酸化して、アリルアルコール脂肪酸を代謝したと考えることも可能である。そこで、イネのいもち菌り病と酸化酵素の増加の関連性について調べた。また、病斑の差と脂肪酸酸化酵素活性の関係についても調べ、両者に興味深い関係があることもわかった。

イネの葉をすりつぶし、緩衝液を用いて、ホモジナイズし、ガーゼろ過し、ホモジネートを得た。得られたホモジネートは、遠心分離にかけ、クロロプラストや組織片等を除いた上清液とした。ホモジネートは不飽和脂肪酸を酸化するが、クロロプラストを除いた上清液は、能力がないことがわかった。従って、以下の実験においては、粗酵素として、このホモジネートを用いた。

最初に、本実験の目的のひとつである健全体とり病体における酸化酵素活性の違いを調べた。材料のイネは、農林21号を用いた。図1に健全体とり病体の酸化酵素活性の違いを示した。明らかにり病体では、脂肪酸酸化酵素活性が増大していることがわかる。

この酵素反応の最適条件を検討した所、最適温度は22℃、最適P Hは6.4であった。

次に、第二の目的である病斑形成の差と脂肪酸酸化酵素の関係を調べた。いもち菌接種後日数と脂肪酸酸化酵素の関係を図2に示した。り病型病斑を形成するササニシキの酸化酵素活性は7日目に急激に増大する。一方、かっ点型病斑を形成するふくゆきの酸化酵素活性は、2日～3日目に最大値を示し、両者の病斑形成の時期と密接に関連している。この結果は、かなり一般的なものである。

酵素反応生成物の構造決定は、H P L C 分析・化学変換により行ない、ヒドロペルオキシド(19, 20, 21)の混合物であることがわかった。その生成比率は、ササニシキの場合、り病体に含まれる相当するアリルアルコール脂肪酸の比率とほぼ同程度である。

酵素反応より得られたヒドロペルオキシドの生物試験を行なった所、これらヒドロペルオキシドは、抗いもち菌活性を示すばかりでなく、非常に強い細胞毒性も示すことがわかった。

以上のことをまとめると、

1. 脂肪酸酸化酵素活性の増加は、かっ点型・リ病型で大きく異なり、病斑形成の時期と密接に関係している。
 2. 酸化酵素により生成した脂肪酸のヒドロペルオキシドが、イネ自身の細胞を殺すことによって、いもち菌の繁殖が阻止される。
 3. イネがいもち菌に感染すると、脂肪酸酸化酵素活性が増加し、生成したヒドロペルオキシドは、イネの酸化型脂肪酸の重要な前駆体であり、ササニシキの場合、リ病することにより、酸化型脂肪酸が増加する。
- 等を考える事が出来、イネのいもち菌病に対する防御機構のいくつかを明らかにする事が出来た。

エポキシおよびアリールアルコール脂肪酸の構造

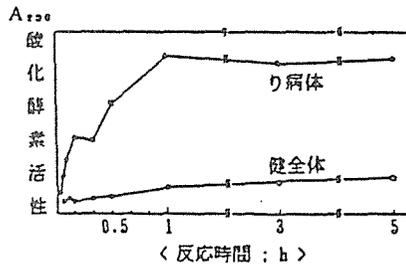
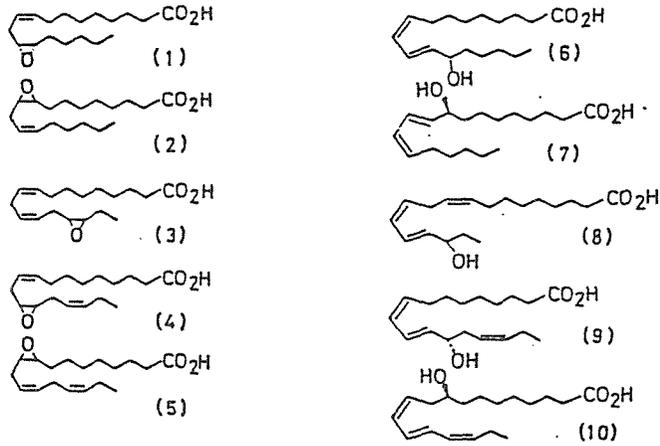


図1 農林21号における健全体とり病体の酸化酵素活性の比較

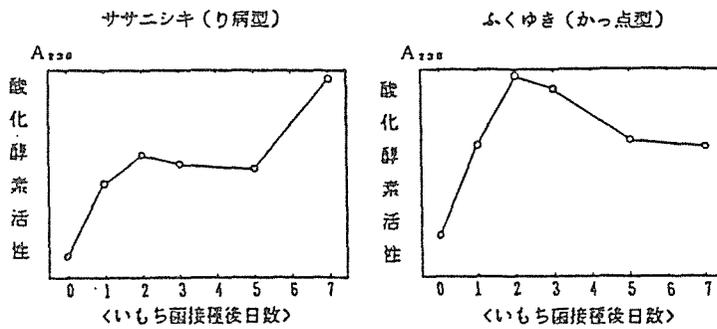
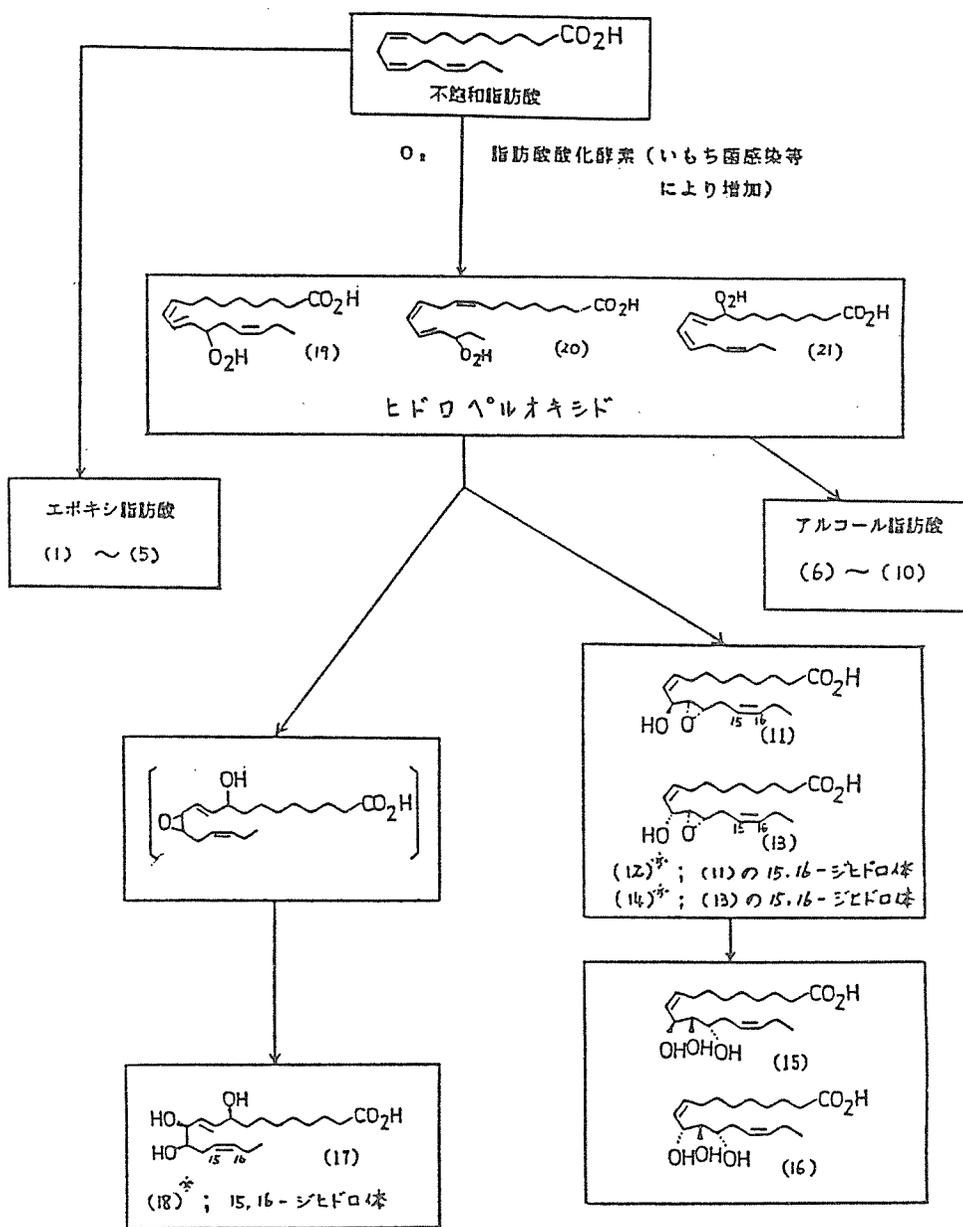


図2 いもち菌接種後日数と脂肪酸酸化酵素活性
—— 病班型の違いによる酵素活性の差 ——

酸化型不飽和脂肪酸の構造と生体内生成



* 15,16-ジヒドロ体はリノール酸より代謝された化合物である。

論文審査の結果の要旨

山口仁宏提出の論文は、イネの代謝する酸化型不飽和脂肪酸に関する研究であり、5つの章から構成されている。第一章においては、イネの代謝する酸化型不飽和脂肪酸を研究するに至った経緯について述べており、第二章においては抗いもち菌活性を有する酸化型不飽和脂肪酸の構造決定と合成およびその生理活性について詳述している。イネはいもち菌に罹病すると抗いもち菌物質（ファイトアレキシン）を代謝すること、イネは品種によってもいもち菌に対する抵抗性が大きく異なることなどはよく知られていたが、この問題を有機化学の立場から解明しようとする試みは殆んど行われていなかった。健全および感染イネを材料とし、抗いもち菌活性を指標として活性物質を追求した結果、活性は酸化型不飽和脂肪酸に由来することをつきとめた。活性区分を根気よく、ていねいに分離、精製し、NMR、Mass等の解析手段を駆使してそれらの構造を推定した。最終的には合成によって推定構造の確認を行なっている。さらに、合成品による抗いもち菌活性テストを行ない、酸化型不飽和脂肪酸がイネのいもち菌抵抗性に本質的に関与していることを明らかにした。

第三章においては、イネの酸化酵素を用いる実験によって、酸化型不飽和脂肪酸の生成と罹病との関係を追究している。その結果、イネは罹病すると不飽和脂肪酸を酸化する酵素が増加すること；増加は病斑形成の時期と密接に関係していること；および酵素酸化生成物であるパーオキシドは強い細胞毒性をもち、イネの壊死に関係している等の事実を発見し、イネのいもち菌罹病と酸化型不飽和脂肪酸とが密接に関連していることを明らかにしている。第四章、五章においては実験を詳細に記述し不飽和脂肪酸誘導体のスペクトルデータを集録している。

以上述べたように、本論文はイネが如何にしていもち菌罹病に抵抗するのかを物質サイドから究明したものであり、自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって山口仁宏提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。