稻熱病の生化学的研究

第5報 培養液の窒素源の稻熱病菌菌體成分及びアミラーゼ活性に及ぼす影響について

田中正三・香月裕彦・香月文子*

TANAKA, S., KATSUKI, H. and KATSUKI, F.: Biochemical studies on the blast disease. V. Effect of the difference of nitrogen sources in the culture media upon the mycelial constituents and amylase activity of the blast disease fungus.

1. 緒 言

前報¹⁾で稻熱病菌を稻稈煎汁添加培養液の窒素源として夫々硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、磷酸アンモニウムを用いて培養し、菌の生長、糖、窒素の消費等を研究した結果、本菌はイオンの選擇吸収による培地の酸性化を防げばアンモニア態窒素をも良く利用する事、又窒素源として硝酸態窒素と、アンモニア態窒素が共存する時にはアンモニア態窒素を優先利用することを明らかにした。一般に窒素源としてアンモニウム鹽が與えられた時はそのイオンの選擇吸収により培地の酸性化が起り、硝酸態窒素の場合にはアルカリ性に傾くのが普通で、これは豫め培地に炭酸カルシウム

を加えるか、又アンモニウムイオンを同じ速さで吸収利用される琥珀酸、枸橼酸等のような有機酸鹽を用いることによつて培地の酸性化を防ぐことが出来る²⁾。

著者等は窒素源を異にする培地で生育した稻熱病菌の菌體成分及び分泌酵素活性に如何なる差異があるかを明らかにし、これより寄主たる稻の組織中に於ける本菌の栄養生理並びに罹病性の問題の研究に資する爲に實驗を行つた。

2. 實驗の部

第4報に述べた様に第1表に示す組成の合成培地を用いて稻熱病菌第一號株を一定期間 28°C で培養後菌體濾液及び生育菌體をとり、これを試料として次の諸成分について定量を行つた。

第 1 表

培 地	成 分 (1 L についての gram 数)		
A	MgSO ₄ ·7 H ₂ O.....0.25	KH ₂ PO ₄0.25	KNO ₃1.00
	CaCl ₂ ·6 H ₂ O.....0.05, FeCl ₃ ·5 H ₂ O.....trace 稈煎汁, 蔗糖 15.0	K ₂ HPO ₄0.25	
B	同 上	同 上	NH ₄ NO ₃0.7907
C	同 上	同 上	NH ₄ NO ₃0.3958
D	同 上	KH ₂ PO ₄0.9616	(NH ₄) ₂ HPO ₄0.6533
		K ₂ HPO ₄0.1000	CaCO ₃1.400

菌體成分の分析法は次の方法によつた。

菌體炭水化物: 硫酸乾燥器中で乾燥粉末とした菌體に 0.7 N-HCl を加え封管中で 100°C にて 2 時間半加水分解後、中和して Micro-BERTRAND 法で還元力を測り葡萄糖として計算した。

蛋白質: Micro-KJELDAHL 法で全窒素量を測り 6.25 の係数を乗じたもので表わした。

脂 質: 粉末試料を Ether-Methanol 等量混液で

煮沸して抽出し、抽出液を合して Na-Ethylate を加え溫浴上で溶媒を除去し硫酸酸性にして、石油-Ether を用いて溫抽出を繰返した後、溶媒を完全に除き、重クロム酸銀-重クロム酸カリウムの濃硫酸溶液の一定量を加え 130°C に 30 分加熱して、殘存した重クロム酸イオンを沃度滴定して係数を乗じて脂質量とした³⁾。

菌のアミラーゼ活性の測定は次の方法⁴⁾によつた。

細胞外アミラーゼ活性: 培養液の一定量を取り、これに硫酸飽和液を加えて 2/3 飽和とし、冷蔵庫に一夜放置して生じた沈澱をガラス濾過器で濾し、同濃度の

* 京都大學理學部化學教室

硫酸溶液で洗滌後水で溶解し、その一定量に對し可溶性澱粉溶液と、稻熱病菌アミラーゼの最適 pH である pH 6⁴⁾ の磷酸緩衝液を各等量宛加えて Toluene 少量を浮べて 38°C に 24 時間放置し生成した還元糖を Micro-BERTRAND 法により定量し葡萄糖量として表わした。

細胞内アミラーゼ： 菌體粉末の一定量に水を加え、Toluene を加えて 38°C で 24 時間放置して自己消化させ、この濾液の一定量について上と同方法により糖化力を定量した。

a) 菌體炭水化物 先ず菌體を 80% Methanol で煮沸抽出したが、その抽出液には殆んど還元力を示さず従つて此の菌は可溶性糖を含まないと推定できる。又前記の加水分解條件では膜質形成炭水化物は加水分解されぬから前記の方法で得た第 2 表の値は栄養性貯藏糖を表わすものである。

第 2 表 (% で示す)

培養 日数	培地	貯藏糖	蛋白質	脂肪	培養 日数	培地	貯藏糖	蛋白質	脂肪
2	A	—	35.8	—	10	A	12.6	13.9	6.10
	B	—	46.3	—		B	12.8	27.6	4.24
	C	—	42.8	—		C	12.6	14.6	7.36
	D	—	22.4	0.31		D	10.9	14.5	5.96
4	A	10.1	18.1	2.25	12	A	12.1	14.3	5.79
	B	11.3	39.9	1.96		B	11.4	21.6	5.30
	C	12.2	36.6	3.17		C	12.1	13.0	7.67
	D	6.26	23.3	2.96		D	14.6	12.8	7.72
6	A	11.0	17.9	5.74	18	A	12.0	17.1	3.90
	B	11.6	36.0	4.28		B	11.3	23.4	4.18
	C	—	22.2	5.11		C	10.9	14.6	3.96
	D	8.95	15.9	5.55		D	—	10.9	6.15
8	A	—	15.1	7.55					
	B	10.3	33.0	4.10					
	C	10.0	17.4	7.15					
	D	9.29	16.5	6.08					

これによれば培地の窒素源の種類による相違は僅かに D の初期に於いて稍々低い値を示す他は著しい變化が認められない。又生長段階に於ける變化も少く糖含量の極大は常に生長極大期の稍々前にある事を示す。

b) 蛋白質 第 5 報の培地よりの窒素吸収からも豫想されるが、培地の窒素の殆ど總てが菌體に發見され、生長極大期に於ける菌體全窒素量は培地より吸収されたものの A: 96.5%, B: 87%, C: 95%, D: 91% となっている。

c) 脂肪 窒素の種類如何に拘わらず、生長初期には

脂質含量が非常に低く、生長が進むにつれ急激に増加し、その極大は生長極大期の稍々前にある。B のみは他に比べて脂質含量が低いのは初期の異常生長に原因するものと推測される。

d) アミラーゼ活性 第 3 表に示す様に細胞外アミラーゼの活性はその生長初期に於いてはアンモニアを窒素源としている C, D に於いて高く、B は著しく低い。A は初期にはかなり低いが、後には他と殆んど同程度の活性を示すようになる。

第 3 表

培養 日数	培地	細胞外アミラーゼ		細胞内アミラーゼ	
		總計	單位菌體量に 對する活性	總計	單位菌體量に 對する活性
4	A	29.6	0.18	—	—
	B	0.5	0.01	—	—
	C	22.6	0.43	—	—
	D	51.8	0.44	—	—
6	A	57.2	0.25	—	—
	B	0.8	0.01	—	—
	C	29.1	0.17	—	—
	D	32.8	0.20	—	—
8	A	61.1	0.22	7.20	0.026
	B	0.8	0.007	6.06	0.053
	C	43.0	0.17	17.08	0.069
	D	41.8	0.22	19.44	0.102
10	A	—	—	13.20	0.044
	B	—	—	21.84	0.089
	C	—	—	16.30	0.056
	D	—	—	14.22	0.062
12	A	64.5	0.22	12.52	0.043
	B	20.8	0.06	30.34	0.091
	C	68.6	0.22	11.28	0.036
	D	81.2	0.30	13.98	0.051
18	A	66.4	0.28	13.18	0.055
	B	32.4	0.018	23.55	0.078
	C	54.7	0.20	12.12	0.045
	D	87.8	0.28	9.84	0.032

細胞内アミラーゼも生長初期ではアンモニア態窒素源の場合の方が硝酸態窒素源の場合より強い傾向が認められる。B では後期に高い活性を示すようになり、細胞外酵素の活性とは逆になる。

3. 考 察

窒素源としてアンモウム鹽及び硝酸鹽を用いた場合、

生長した菌の菌體成分は少くとも貯藏糖、蛋白質、脂質の含有率については著しい差異が認められない。炭水化物は生長の各段階を通じて變動は大きくないが、脂質は初期に極めて少くその後急激に増すので脂肪は相當生長を遂げた菌體内で合成される二次的代謝産物である事が明らかである。又貯藏糖及び脂質は生長最大期の稍々前にその極大があるが、菌が生長の極大期に達した時には、これら貯藏性栄養の消費が既に始まっている。これに反し窒素は初期に急に吸収同化され、菌體蛋白の合成が盛んであるが生長の進むに従つて含有量は漸減している。

これは初期の細胞分裂の盛んな時に細胞構成の主要要素である蛋白質の必要性が高い爲であらう。

アミラーゼは細胞内酵素が培地の pH の変化によつて餘り變動しないに拘らず、細胞外酵素は酸性培地に生育中の菌では著しく低下することが認められた。この事實は嘗つて西門氏⁵⁾によつて認められた罹病性稲の液汁の pH が耐病性のものに比して稍々酸性の度が低いという事實と對照し興味ある研究問題と考える。

4. 摘 要

窒素源としてアンモニヤ態窒素及び硝酸態窒素を用

いた培地に生育した稻熱病菌菌體成分の中、貯藏糖、脂質、蛋白質含量には著しい差は認められなかつた。生長の初期には窒素の吸収が急速で蛋白合成が盛んであるが、脂質は非常に少なく生長が進むにつれその合成は盛んになり、生長極大期の稍々前に貯藏糖及び脂肪含有率の極大期が現われる。蛋白含量は生長に伴つて漸減し、自己消化が起ると貯藏糖、脂肪の消費と相まち、再び相對的含量が高まる。アミラーゼ活性は窒素源によつて差異はなく、培地が酸性になると細胞内酵素の活性は低くないに拘らず細胞外酵素の活性は非常に低下するのが認められた。

(昭和 26 年 12 月 12 日受理)

文 献

- 1) 田中正三・香月裕彦・香月文子：日植病報 16; 103-106 (1952).
- 2) 田中正三・香月裕彦：昭和 26 年 5 月植物病理學會總會講演發表.
- 3) Bloor, W. K.: Jour. Biol. Chem., 77; 53 (1928)
- 4) 田中正三・原 啓次：未發表.
- 5) 西門義一：病菌害蟲彙報, 15; 1 (1926).

Résumé

The rice-blast fungus was cultivated on the culture media containing either ammonium salt or nitrate as the nitrogen source. Between the two mycelia grown on the above media any marked difference has not been observed in the mycelial constituents, such as reserved carbohydrate, lipid and proteinous substance. In both cases rapid absorption of nitrogenous matter and synthesis of protein occurred at the initial stage of the growth. On the other hand activity of lipid synthesis which was very low at the initial stage, rose gradually with the growth. The maximum contents of reserved carbohydrate as well as of lipid were ob-

served just before the maximum growth.

Contrary to carbohydrate and lipid, the amount of protein was seen to decrease gradually with the growth, but the relative content increased again owing to exhaustion of carbohydrate and lipid when autolysis began. Activity of exo- and endo-amylase of the mycelia grown on these media were almost the same. Though activity of endo-amylase showed little change when the media become acidic by the selective absorption of cation, marked lowering in the activity of exo-enzyme was observed to occur.