植物病原細菌のセルラーゼに関する研究

第2報 Cx-セルラーゼの活性と pH, 温度及び塩類溶液との関係

後 藤 正 夫・岡 部 徳 夫*

Masao Goto and Norio OKABE: Studies on the cellulolytic enzymes of phytopathogenic bacteria. Part 2. Relations between the activity of cellulase "Cx" and pH, reaction temperature or salts.

著者らは前報において、植物病原細菌における cellulase "Cx" の分布を明らかにしたが、それぞれ属を異にした細菌によつて生産される酵素の性質を明確ならしめることは、単に酵素化学の見地のみでなく、細菌生理の面からも重要な問題である。Reese ら (1950) は多数の細菌、糸状菌及び *Actinomyces* から生産される cellulase "Cx" について、作用機構は似ていても個々の酵素の作用条件は異なることを報告している。

著者らは主として *Pseudomonas*, *Xanthomonas* 及び *Erwinia* 属細菌によつて生産される cellulase "Cx" の作用条件について 2, 3 の実験を行つたので、その結果を報告する。

I. cellulase "Cx" の活性度と pH との関係

cellulase の至適 pH は酵素の母体によつて多少異なるが、一般に pH=5.0 附近に存在するものと考えられており、細菌 cellulase もこの例外ではない。しかし Reese (1950) らによれば *Actinomyces* sp. の cellulase "Cx" は pH 7.0~8.0 で最大の活性を示し、また Husain and Kelman (1958) は *P. solanacearum* の生産する cellulase "Cx" が pH=7.0 で最大の活性を示すことを報じている。

著者らは植物病原細菌の生産する cellulase "Cx" の至適 pH を明らかにする目的でこの実験を行つた。

材料及び方法：供試した菌種は *X. campestris*, *X. oryzae*, *E. carotovora* strain *chrysanthemi*, *P. solanacearum*, *P. panici*, *Corynebact. sepeidonicum* の 6 種である。基質は Mc' Ilvaine 氏緩衝液を用いて pH=3.0~8.0 に調節した 1.2% CMC 溶液を用い

た。酵素液は 0.2% CMC 加用ブイヨンの 7 日目培養をザイツ汙過器で汙過し、この汙液を用いた。酵素の活性度は CMC 溶液の粘度低下で表わした。粘度の測定は前報と全く同じ方法で行つた。

結果：各 pH の CMC 溶液の 30 分後における粘度低下を図示すると、第 1 図の如くである。

第 1 図 cellulase "Cx" の活性に及ぼす pH の影響
Fig. 1. Effect of pH on the activity of cellulase "Cx" in culture filtrates, represented by percent losses of viscosity of one percent CMC after 30 minutes of reaction time.

すなわち cellulase "Cx" の至適 pH は、それらを生産した細菌の種類によつてまちまちであり、しかも属を同じくする菌種の間にも一定の関係は認められない。しかし以上の結果から供試した大部分の菌種の cellulase "Cx" が一般に pH=5.0~7.0 の間に至適 pH を有することが判明した。更にこの pH 範囲内で、0.2 宛 pH を異にする 1.2% CMC 溶液を調製し、上

* 静岡大学農学部

述の方法で粘度喪失速度を測定した結果、各菌種の cellulase “Cx” の至適 pH をおよそ次のように決定することが出来た。

第1表 6 菌種の cellulase “Cx” の至適 pH
Table 1. Optimum pH for the activity of cellulase “Cx” of some phytopathogenic bacteria.

Bacterial species	pH
<i>E. carotovora</i> strain <i>chrysanthemi</i>	6.0
<i>X. campestris</i>	5.0~6.0
<i>X. oryzae</i>	7.0
<i>P. solanacearum</i>	6.0
<i>P. panici</i>	5.0
<i>Corynebact. sepedonicum</i>	5.0

II. cellulase “Cx” の活性と温度との関係

Reese ら (1950) によると、30 種の微生物によつて生産された cellulase “Cx” は何れも 30~60°C の間では温度が高いほど活性は高く、60°C で最高を示したと報告している。しかし植物病原細菌 cellulase の温度関係については全く知られていない。著者らは上記の細菌によつて生産される cellulase “Cx” が如何なる温度で最高の活性を示すかを知る目的で本実験を行った。

材料及び方法：供試菌株は *X. oryzae* のかわりに *X. pisi* を用いた以外は前項と同じである。恒温水槽

第2図 cellulase “Cx” の活性に及ぼす温度の影響
Fig. 2. Effect of temperatures on the activity of cellulase “Cx” in culture filtrates, represented by percent losses of viscosity of one percent CMC after 30 min. of reaction time.

の温度を 30~60 ± 1°C に調節し、各温度における酵素活性を 1.0 % CMC 溶液の粘度の低下で表わした。実験方法は前項の場合と全く同様である。

結果：酵素の活性度を、基質 CMC 溶液の初期粘度に対する作用時間 30 分後の比較粘度であらわすと第2図の如くである。

すなわち供試した 6 菌種の cellulase “Cx” は 30~60°C の範囲内では、温度が高くなるほど、活性度も増加した。しかし温度の上昇に伴う活性度の増加は必ずしも直線的ではなく、*E. carotovora* strain *chrysanthemi* の cellulase “Cx” では 40°C 以上で活性度の増加は余り認められない。また *P. panici* の酵素では 30~40°C で活性度に殆んど変化がなく、40°C 以上の温度において直線的な増加がみられるのに対し、*X. campestris*, *X. pisi*, *Corynebact. sepedonicum* では最初から殆んど直線的な増加がみられる。*X. pisi*, *P. panici*, 及び *P. solanacearum* の cellulase “Cx” は *X. campestris*, *E. carotovora* strain *chrysanthemi* 及び *Corynebact. sepedonicum* のそれに比べて温度変化の影響を大きく受け、就中、*P. panici* の酵素において著しい。

なお 70°C 以上の温度では、基質 CMC 溶液の粘度が著しく低下し、酵素活性を測定することは極めて困難であつたので、この温度における実験結果は省略した。またすべての酵素は 75~80°C, 10 分間の加熱によつて、その活性を著しく低下し、83~85°C, 10 分間の加熱で殆んど完全にその活性を喪失した。

III. cellulase “Cx” の活性に及ぼす塩類の影響

一般に金属イオンはその種類によつて酵素作用に対し、促進的または阻害的に働くことが知られている。

Husain and Kelman (1958) は、*P. solanacearum* の cellulase “Cx” が NaCl 及び KCl 溶液によつてその酵素作用を僅かに促進されるのに対し、Cu, Zn, Hg の如き重金属イオンを含む塩類溶液は著しく阻害的に作用することを認めている。しかし、これらの作用がすべての cellulase “Cx” に共通に働くものであるか否かは明らかでない。そこで、属を異にする 6 種の細菌の培養液について、この関係を明らかにする目的で実験を行った。

材料及び方法：使用菌種は *Corynebact. sepedonicum* のかわりに *E. carotovora* strain CVII を用いたほかはすべて前項と同じ菌種を用いた。基質 CMC 溶液は 2.4 % に調製し、その 2.5 ml と塩類の 1 M

第3図
cellulase "Cx" の活性に及ぼす塩類の影響

Fig. 3.
Effect of one M solutions of salts on the activity of cellulase "Cx", represented by percent losses of viscosity of one percent CMC after 30 min. of reaction time.

溶液 2.5 ml を Ostward's 粘度計に入れてよく混合し、これに前項と全く同じ方法で得た酵素液 1 ml を加え、10 分毎に粘度の低下を測定した。塩類は $NaCl$, KCl , $MnCl_2$, $MgSO_4$, 及び $CaCl_2$ の 5 種類を用いた。

結果：実験結果を一括して図示すると第3図の如くである。

すなわち供試した塩類溶液は、それぞれの種類によつて僅かではあるが促進的または阻害的に働くか、あるいは全く無関係である。

一般に *X. campestris*, *E. carotovora* strain *chrysanthemi* の如く活性の高い酵素では、塩類溶液の影響はそれほど大きくないが、比較的活性の低いその他の cellulase は、比較的大きい影響を受けるようである。

塩類溶液の種類と酵素作用の促進的または阻害的作用との関係は、cellulase "Cx" の種類によつて、必ずしも一定したものではない。この関係をまとめて表に示すと第2表の如くである。

すなわち KCl は *E. carotovora* strain *chrysanthemi*, *X. pisi*, *E. carotovora* strain CVII の酵素に対しては明らかに阻害的に作用するのに対し、*P. solanacearum* の酵素に対しては、促進的に作用する。同様に $MnCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2$ なども酵素の種類によつて促進的及び阻害的の両作用を示すことが認められる。*P. solanacearum* の酵素に対

第2表 Cellulase “Cx” の活性に及ぼす
塩類の影響と菌種との関係Table 2. Summary of the effect of salts
on the cellulase “Cx” activity.

Bacterial species	Kind of salt				
	NaCl	KCl	MnCl ₂	Mg SO ₄	CaCl ₂
<i>P. solanacearum</i>	×	○	△	△	×
<i>P. panici</i>	×	○	△	○	○
<i>X. campestris</i>	×	×	×	△	×
<i>X. pisi</i>	△	△	○	△	○
<i>E. carotovora</i> strain <i>chrysanthemi</i>	△	△	×	△	△
<i>E. carotovora</i> strain CVII	×	△	○	△	○

×……No effect

△……Obstractive effect

○……Promoting effect

する KCl 及び NaCl の促進的作用は Husain (1958) らの実験結果によく一致している。

IV. 考 察

Cellulase “Cx” の活性と pH 及び温度との関係は、既往の非植物病原細菌における研究結果とよく一致している。

一般に植物病原細菌の cellulase “Cx” は比較的広範囲に至適 pH を有すると考えられ、殊に *X. campestris*, *E. carotovora* strain *chrysanthemi* においてこの傾向がみられる。また pH=3.0 及び 8.0 の両極における酵素作用の低下は、前者においては酵素の不活性化に基づくものであることが明らかとなつたが、アルカリ側における作用低下の機作は充分明らかでない。*X. campestris* の酵素はこれら両極の pH において、他の cellulase “Cx” よりもかなり強い活性を維持する点で特徴がある。

酵素作用と温度との関係は、一般に他の化学反応と同様、温度の上昇に伴つて酵素作用は著しく促進されるが、ある温度以上では酵素の熱不活性によつて急激に減少する。cellulase “Cx” が最高の酵素触媒反応を起す温度は 60~70°C の間にあると考えられ、70°C 以上の温度では酵素活性は急激な低下を示す。この点、Reese ら (1950) の研究結果とよく一致した。

酵素に対して阻害及び活性化を促進する金属イオンの存在も古くから知られている。前者の例としては、 Hg^{++} または Ag^+ のような重金属イオンがよく知ら

れており、これらは酵素分子中触媒作用に不可欠の部分と結合することによつて、酵素作用を阻害する。しかし Mn^{++} , Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} , Na^+ , 等の中にも阻害作用を有するものがあり、しかも酵素の種類によつて、その関係は必ずしも一定していない。これはこれらイオンによる阻害作用の正確な機作が個々の酵素によつて異なることを示唆しているものと考えられる。

また上記イオンのあるものは特定の酵素に対して活性化を促進する。一般に金属イオンによる酵素触媒作用の増加は、酵素液中に存在する阻害剤の捕捉に関係することが明らかにされているので、かかる金属イオンによる酵素活性化の促進を検討する場合に当つては酵素標品の均一性が極めて重要な問題である。従つて、著者らが得た結果が精製酵素についても同様に活性化を促進するか否かは疑問であり、かかる観点からこの問題を再検討する必要がある。

V. 摘 要

1) 各菌種の cellulase “Cx” の至適 pH は、酵素の種類によつて異なるが、一般に pH=5.0~7.0 の間に存在する。

2) 各酵素は 30~60°C の間では温度の高い程酵素活性を増大するが、70°C 以上では著しく熱不活性を受ける。83~85°C, 10 分の加熱で殆んど活性を失う。

3) Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} , K^+ , Na^+ の各金属イオンは、それぞれの酵素に対し、阻害または活性化を促進する作用を有するが、その関係は酵素の種類によつて必ずしも一定していない。

(1959 年 1 月 16 日受理)

参 考 文 献

- 1) Fruton, J. S. and S. Simmons (1953), General Biochemistry, John Wiley & Sons. Inc. New York, (江上等共訳; 丸善, 1957).
- 2) Goto, M. and N. Okabe (1958), Nature, Lond., 182: 1516.
- 3) 後藤正夫・岡部徳夫 (1959), 日植病報, 24: 182~188.
- 4) Husain, A. and A. Kelman (1957), Phytopath., 47: 111~112.
- 5) Husain, A. and A. Kelman (1958), ditto, 48: 377~385.
- 6) 西沢一俊・小林敏雄 (1952), 農化, 27: 239~242.
- 7) 西沢一俊・小林敏雄 (1952), 同上, 27: 242~245.
- 8) Reese, E. T. et al. (1950), Jour. Bact., 59: 485~497.

Summary

(1) The effect of pH on the activity of cellulase (Cx) was tested with the one-percent CMC solution prepared by Mc'Ilvain buffer solution varying in pH value from 3.0 to 8.0. The change of enzymic activity was shown by the percent loss of viscosity after 30 minutes of reaction time. The optimum pH value was varied from 5.0 to 7.0 corresponding to the bacterial species which produced the enzyme (see Fig. 1). In general, the enzyme was very unstable in pH 3.0 and rapidly inactivated.

(2) It was evidenced that the effect of temperature on cellulase activity, which was represented by the percent loss of viscosity of the mixture of one-percent CMC solution and 7 day-old culture filtrate, was remarkable in higher temperatures between 30 to 60°C tested (see Fig. 2).

(3) The effect of five kinds of salts on the cellulase activity was variable according to the bacterial species or strains tested (see Fig. 3 and Table 2). Some salts, recognized as having a promoting effect to the activity of cellulase (Cx) secreted by one bacterium, were obstructive to those from other bacteria.

(Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Iwata, Japan)

雑 録

センリョウの病害について

後 藤 正 夫*

Masao Goro: Diseases of "Senryo", *Chloranthus glaber* Makino.

センリョウは冬期、花物として珍重せられ一部の農家で副業的に栽培されているが、最近、当磐田地方では病害の被害が激しく、その栽培を断念せざるを得ない状態になつていゝところが少くない。著者は最近これについて若干調査する機会を得たので、ここにその概略を報告する。未だ不完全なものであるが、何らかの参考になれば幸である。調査に当つて便宜を与えられた江塚昭典氏（現中国農試）に深謝の意を表する。

1. 褐斑病 年中発生しているが、春期殊に著しい。はじめ葉の表面に暗褐色の周縁不明瞭な小汚斑を生ずる。これは次第に拡大して直径 7~15 mm の円形、褐色乃至暗黒色病斑となる。周縁は判然としており、健全部と明瞭に区別される。病斑中央部はやがて淡褐色となり表面に稍隆起した多数の小黒点を生ずる。時に同心輪紋を形成することがある。病斑は1葉に数個乃至 10 数個形成され、落葉の原因となるばかりでなく、商品価値を著しく損ずる。

病原菌、*Septoria* sp., 病斑上に形成される柄子殻は3月上旬までは未熟で柄子を認め得ないが、中旬以後は成熟し、多数の柄子を認めることが出来る。柄子殻ははじめ表皮下に形成され、のち成熟するとともに孔口（径 15~36 μ ）を外に突出する。球状又は扁球状で直径 60~140 μ （100 コの平均 94.9 μ ）の大きさを有する。柄子は稍わん曲するか又は直線形、0~3 コ、多くの場合 1 コの隔膜を有し、無色、大きさ 15.4~30.4 $\times$ 2.5 μ （100 コの平均 23.2 $\times$ 2.5 μ ）。柄子の殺菌水浮游液から馬鈴薯寒天上に分離した菌糸片を用い

て病原性を調べた結果、有傷接種の場合、10 日目頃より暗褐色病斑を形成し、のち病斑上に柄子殻の形成をみた。

自然状態では5月上旬に至り上記の病斑上に柄子殻と並んで *Guignardia* sp. の子囊殻を生じ、やがて病斑には子囊殻のみ認める様になつたが、この菌の病原性及び *Septoria* sp. との同根関係については未だ確認してない。*Guignardia* sp. の形態、子囊殻は球形又は扁球形、径 76~110 μ 、子囊は棍棒状乃至紡錘形、38~46 $\times$ 7~8 μ で側糸はない。子囊胞子は無色単胞、紡錘形、大きさ 11.4~15.2 $\times$ 4~5 μ 。

2. 立枯れ症状を呈するもの 4 月下旬~5 月上旬より発生しはじめるもので1株中1~数本の枝の地際部に暗褐色の大型病斑を生じ、終にはこれを枯死せしめるが、この様な株では株全体の発育が次第に悪くなり、最後には株ごと立枯れ状に枯死する。根にも大小種々の暗黒色病斑が認められる。地際部及び根の新しい患部には線虫が多数認められるので、本病に何らかの関係を有するものと考えられるが、寄生性その他については全く判つていない。

3. その他 5 月上旬、主として古梢の新芽が急に黒変枯死するもの、花梗及び若い果梗が褐変枯死して落花及び落果を惹き起すもの等が大きな被害を与えている。前者の患部からは *Glomerella*, *Gloeosporium*, *Pestalotia*, *Phoma* 等が分離されたが、接種試験の結果、有傷接種で *Glomerella* sp. にのみ弱い病原性を認めた。後者の病害が同一菌によるものであるか否かは確認できなかった。

* 静岡大学農学部