沱紙電気泳動法による植物病原菌菌糸たんばくの検索

達 山 和 紀*

Kadzunori TATSUYAMA: On the proteins detected by the paper-electrophoresis in mycelia of several phytopathogenic fungi

緒 言

罹病植物の生理的な変化を追究する方法の一つとして最近沱紙電気泳動法がしばしば試みられており、菌類病についても山本¹⁾、浅田²⁾、Heitefuss³⁾、Barret⁴⁾などの報告があるが、いずれも病原菌の泳動たんばくについては詳しく触れていないようである。すなわち山本らは罹病ジャガイモ塊茎中に共存する疫病菌菌体の絶対量を罹病植物と比べて無視できる量であるとし、浅田らはイネごまはがれ病病斑部の泳動試料を調製する過程で、ごまはがれ病菌の泳動たんばくが除かれるため考察の対象としてはいない。また Heitefuss³⁾らは菌体のたんばくを主として血清反応の場面でとらえている。しかし、罹病した植物組織のたんばく構成あるいはその変化などを追求する場合、菌体のたんばくを無視できない場合もしばしば起こると考えられ、筆者はいもち病菌など数種の植物病原菌の主として菌糸原形質に含まれるたんばくを沱紙電気泳動法によって検索したので、現在までに得られた二、三の結果を報告する。

本実験を行なうに当り、本研究室山本昌木教授他研究室員各位に多くの助言をいただき、また、京都大学農学部植物病理学研究室から数種の植物病原菌を分与して頂いたのでそれぞれ感謝の言葉を申し上げる。

実験材料および方法

実験に用いた植物病原菌は次の通りである。

Cochliobolus miyabeanus (Ito et KURIB.)

DRECHSLER et DASTUR

Corticium sasakii (SHIRAI) MATSUMOTO

Gibberella fujikuroi (SAWADA) WR.

Guignardia camelliae BUTL.

Phytophthora infestans (Mont.) DE BARY

Phytophthora macrospora (SACC.) Ito et TANAKA

Piricularia oryzae CAV.

Shiraia bambusicola P. Henn.

菌体の培養は可溶性澱粉 0.1%, 粉末酵母エキス 0.02% の液体培地を用い、100 cc 三角フラスコに 50 cc ずつ入れて接種後 28°C の定温器中に置き、特別の場合を除いて2週間目に実験に供した。

培養後の菌糸塊は、蒸留水で充分洗ってから吸引沱紙で表面に附着した水分を除き、石英砂とともに乳鉢で磨砕し、冷却しながら直ちに1万回転10分間遠心分離してその上澄液を泳動試料とした。試料は0.02 cc ずつ沱紙(東洋沱紙 No. 51, 26×12 cm)の中心部から負極側へ5 cm の位置に附着させ、ペロナール第一磷酸カリ一硼砂液、すなわち近藤⁵⁾のNo. 4液の3倍稀釈液⁶⁾をかんしょう液とし0.25 mA/cm の定電流で3時間泳動させた。泳動後の沱紙は105°C で20分間乾燥し、ブロムフェノールブルー1%昇汞飽和アルコールで染色、0.5%酢酸で一昼夜洗った後風乾し、パラフィンで半透明にして日立分光光度計(590 mμ)で吸光度(%)を測定した。

実験結果および考察

A) 植物病原菌の種類と泳動たんばく

第1図に示すように*P. oryzae*(P-2系統)の菌糸では原点部にI、また正極側へII、IIIの明瞭な泳動分割がみとめられる。吸光度曲線は第2図の通りである。また*C. miyabeanus*(京大No.13)、*G. fujikuroi*(京大No.25)、*G. camelliae*、*P. infestans*、*P. macrospora*でも同じ位置に泳動分割がみとめられ、筆者の実験の範囲では、糸状菌菌糸の原形質は大体類似のたんばく構成から成り立っているものが多いようである。常に肉眼的にはつきり指摘できるこれら三つの分割がそれぞれ1種のたんばくなのか、あるいは易動度の近接した2種以上のたんばくの集団であるのか、(*P. oryzae*についてはD)で考察をすすめる)また各分割の細部の構造は菌の種類によつて若干ちがつているのかなどは、今後の研究にまきたい。

*C. sasakii*は培養数日間で菌核を形成し、*S. bambusicola*は硬質の菌糸塊を形成する。これらの菌では、

* 島根農科大学植物病理学研究室

第1図 植物病原菌菌糸に含まれるたんぱくの沝紙電氣泳動図

Fig. 1. Paper-electrophoresis of the proteins included in mycelia of several phytopathogenic fungi.

第2図 植物病原菌菌糸に含まれる泳動たんぱくの吸光度曲線

Fig. 2. Optical density curves of the electrophoretic run of the proteins included in mycelia of several phytopathogenic fungi.

* 泳動試料の調製法が筆者と異なっているため、それぞれ一例ずつの実験結果を比較考察することは困難である。

II, III 分割の中間にさらに一つの分割 II' がみとめられたので, *C. sasakii* についてつぎの実験を行なった。すなわち, II' 分割が菌核だけに含まれる特殊のたんぱくであるかどうかを確かめるため, 培養2週間目の菌体を菌糸と菌核に分けてそれぞれ泳動を行なった。その結果では, 第3図に示す通り菌糸, 菌核ともに四つの分割がみとめられ, すでに菌糸原形質のたんぱく構成が *P. oryzae* などと異なっており, 菌核だけが特殊なたんぱく構成を持っていると考えることはできない。しかしこれが菌核を形成する菌全般について同様であるかどうかは三沢⁶⁾のイネ小粒菌核菌体の泳動たんぱくについての報告*もあり, 断言はできない。

B) 系統の異なる菌体の泳動たんぱく

P. oryzae をはじめ, 多くの植物病原菌にはそれぞれ数種の菌系統があり, 病原性その他の性質を異にする。それらの系統の菌糸たんぱく間に構成のちがいがああるかどうかを知るため, *P. oryzae* については P-2, B-5, *C. miyabeanus* については京大 No. 13, No. 21, *G. fujikuroi* については京大 No. 25, No. 26, について, それぞれ泳動たんぱくを比較した。

第3図 *Corticium sasakii* の菌糸および菌核に含まれる泳動たんぱくの吸光度曲線

Fig. 3. Optical density curves of the electrophoretic run of the proteins included in mycelia and sclerotia of *Corticium sasakii*.

第4図 系統を異にする植物病原菌菌糸に含まれる泳動たんばくの吸光度曲線

Fig. 4. Comparison of optical density curves of the electrophoretic run of the proteins between two races of *Piricularia oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus* and *Gibberella fujikuroi*.

第5図 培養日数を異にした *Piricularia oryzae* および *Corticium sasakii* の菌糸に含まれる泳動たんばくの吸光度曲線

Fig 5. Optical density curves of the electrophoretic run of the proteins included in mycelia of *Piricularia oryzae* and *Corticium sasakii* in different stages.

第1表 培養期間と *P. oryzae* の1フラスコ当り生体重ならびに *P. oryzae* *C. sasakii* 培養液の水素イオン濃度

Table 1. Fresh weight of mycelium of *Piricularia oryzae* and pH of culture medium of *P. oryzae* and *Corticium sasakii* in different stages.

Weeks	<i>P. oryzae</i>		<i>C. sasakii</i>
	Fresh weight	pH	pH
2	750 (mg)	6.82	6.82
3	679 (ク)	8.20	6.98
4	418 (ク)	8.54	7.16
5	326 (ク)	8.62	7.28

これらの菌はそれぞれ培地上で外観がはつきり区別できるものである。

第4図がその結果を示すものであるが、これら3種の植物病原菌に関してはそれぞれの泳動図に質的な差はみとめられず、いずれも対応する位置に三つの分割をみとめることができ、系統間の差はないものである。量的なちがいについては実験例が少ないので考察をさける。

C) 菌の培養日数と泳動たんばく

一般に菌体は培養が古くなると自己消化を起し、その生理状態も変つて来る。これが構成たんばくの泳動図にどのような変化を与えるかをしらべるために、*P. oryzae* *C. sasakii* の培養の2, 3, 4, 5週間目の菌体についてそれぞれ比較してみた。その結果は第5図の通りである。供試菌の菌体重および培地の水素イオン濃度は第1表の通りである。水素イオン濃度は2週間→5週間でアルカリ側に傾き、その程度は *P. oryzae* が顕著である。また *P. oryzae* の生体重は培養が進むにつれて減少し、自己消化を起していることが推察される。

第5図に示す通り、*P. oryzae* の菌糸では培養が古くなるにつれて泳動たんばくは減少し、5週間目には痕跡程度となり6週間後では全くみとめられない。この結果は高等植物における近藤ら⁵⁾の報告と類似しているようである。これに反して、*C. sasakii* ではほとんど変化がみとめられない。これは、さきに菌糸と菌核で泳動たんばくに本質的なちがいのなかつたことから考えると、菌糸が古くな

第6図 硫酸銅または昇汞溶液に接触させた *Piricularia oryzae* の菌糸に含まれるたんぱくの紙電気泳動図

Fig 6. Paper-electrophoresis of the proteins included in mycelia of *P. oryzae* contacted with the solutions of copper sulfate and mercuric chloride for 20 hours.

第7図 硫酸銅または昇汞溶液に接触した *Piricularia oryzae* の菌糸に含まれる泳動たんぱくの吸光度曲線

Fig. 7. Optical density curves of the electrophoretic run of the proteins included in mycelia of *P. oryzae* contacted with the solutions of copper sulfate and mercuric chloride for 20 hours.

第2表 硫酸銅または昇汞溶液に 20 時間接触した *P. oryzae* の 1 フラスコ当り生体重

Table 2. Fresh weight of mycelium of *P. oryzae* contacted with the solutions of copper sulfate and mercuric chloride for 20 hours.

Conc. of solu. (mol)	Fresh weight (mg)	
	copper sulfate	mercuric chloride
0	815	804
10^{-5}	666	569
10^{-4}	512	315
10^{-3}	398	318
10^{-2}	314	—

り仮に *P. oryzae* の菌糸と同じような傾向をたどるとしても、菌核はそのままであると考えられ、菌全体としての泳動図に大きな変化のみとめられないのも当然といえよう。

D) 硫酸銅または昇汞溶液に接触させた *P. oryzae* の泳動たんぱく

植物病原菌菌糸の泳動分割がそれぞれ菌の生理にどのような役割を果しており、またどのようなたんぱく構成からなっているかを検討する一つの手段として、たんぱく変性剤である重金属イオンを *P. oryzae* の菌体に接触させ、その泳動図に対する影響を観察した。

培養 13 日目にフラスコ中の培養液を種々の濃度の硫酸銅または昇汞溶液と交換し再び 28°C の定温器中に 20 時間放置したものを実験に供した。

第2表に示す通り、これら溶液に接触した菌体は溶液の濃度が大きい程生体重が減少する。硫酸銅溶液に接触した菌体は第 6, 7 図に示す通り 10^{-5} モルでは著しい変化はみとめられないが、 10^{-4} モルでは各分割の吸光度が減少し、特に I, II 分割吸光度の減少がめだっている。さきに筆者は *P. oryzae* などの泳動分割がそれぞれ 1 種のたんぱくか、あるいは 2 種以上のたんぱくの集団であるか不明であるとしたが、 10^{-4} モルの硫酸銅溶液に接触した *P. oryzae* の III 分割は、第 7 図に示すように III_a, III_b の二つの部分に分けられ III_a に比べて III_b の減少が著しい。このことから、菌糸泳動たんぱくの III 分割は一般に二つの部分に分けて考察してよいかも知れないが、無処理の菌糸たんぱく泳動

第8図 泳動直前に硫酸銅または昇汞溶液を加えた *Piricularia oryzae* の菌糸播砕液に含まれるたんぱくの沱紙電気泳動図

Fig. 8. Paper-electrophoresis of the macerated juice of *P. oryzae* added with solutions of copper sulfate and mercuric chloride just before starting electrophoresis.

図の再現性の問題とともに今後の研究で確かめたい。昇汞溶液の場合も各分劃の減少がみとめられるが、III分劃の減少の仕方など若干ちがいがあるようである。

重金属イオンがたんぱくを変性沈澱させる機作については多くの研究がなされているが、不明の点も多いようである。筆者の実験結果では硫酸銅や昇汞溶液の濃度の増大にともなつて菌糸たんぱくが変性して不溶性になり、その程度はI, II分劃において著しく、それらは泳動試料調製の途中で沈澱として除かれてしまうことが推察される。

第8図および第9図は、硫酸銅または昇汞溶液を泳動直前の菌糸汁にそれぞれの濃度になるように加え、充分かくはんしてたんぱくと接触させた後、泳動させたもので、硫酸銅、昇汞ともに 10^{-4} モルの濃度では対照区とほとんどちがいが無い。 10^{-3} モルでは昇汞で不溶部が若干増加して、原点分劃の吸光度が増大する。すなわち、泳動試料中に含まれる重金属イオンは 10^{-4} モル濃度までは試料の泳動に直接影響を与えることはないと考えてよい。硫酸銅の 10^{-1} モル濃度では大部分のたんぱくが沈澱して原点分劃に残るために、その泳動図は対照区とかなりちがったものになった。

第6, 7図と第8, 9図の相異が、菌糸たんぱくと金属イオンの接触の仕方のちがいによるものか、あるいは接触時間の長短によるものかなどについては、今後の実験で確かめて行きたい。

以上の実験結果から直ちに各泳動分劃の菌体における生理的意義を推論することはできないが、重金属イ

第9図 泳動直前に硫酸銅または昇汞溶液を加えた *Piricularia oryzae* の菌糸播砕液に含まれる泳動たんぱくの吸光度曲線

Fig. 9. Optical density curves of the electro-phoretic run of the proteins in the macerated juice of *P. oryzae* added with solutions of copper sulfate and mercuric chloride just before starting electrophoresis.

オンなどたんぱく変性剤、その他殺菌剤の接触によって起こる菌体たんぱく泳動図の変化を検討することは、殺菌剤の作用機作を追求する一つの方法であると考えられる。

摘 要

濾紙電気泳動法によつて罹病植物のたんぱく構成またはその変化などを追求する場合、共存する植物病原菌菌体に含まれるたんぱくを無視できない場合もあると考えられるので、*P. oryzae* など8種類の植物病原菌の泳動たんぱくについて二、三の実験を行なつた。

P. oryzae, *C. miyabeanus* などの菌糸原形質のたんぱくは原点部を含む少なくとも三つの泳動分割から構成されているが、*C. sasakii*, *S. bambusicola* では四つの分割がみとめられた。

P. oryzae など3種の菌では、それぞれ菌系統の間に泳動図の質的な差はみとめられない。

P. oryzae 菌糸の泳動たんぱくは培養が古くなるにしたがつて減少し、6週間以後は全く消失する。

10^{-4} モルの重金属溶液（硫酸銅または昇汞）に20時間接触させた *P. oryzae* 菌糸の泳動たんぱくは変性を受けて、その泳動図が変化する。

(1960. 9. 24. 受理)

引用文献

- 1) 浅田泰次, 橋 泰典 (1959). 日植病報, **24**: 213~218.
- 2) Barret, R. E. and McLaughlin J. H. (1954). J. Agr. FoodChem. **2**: 1026~1029.
- 3) Heitefuss R., Buchanan ~ Davidson, D. J., Stahmamn M. A. and Walker J. C. (1960). Phytopathology **50**: 198~205.
- 4) 近藤 弘, 香川 彰, 林 金雄 (1957). 農化雑誌, **31**: 433~437.
- 5) 近藤 弘, 鷺見美代子 (1956). 生物物理化学, **3**: 25~27.
- 6) 三沢正生, 加藤 盛 (1960). 日植病報, **25**: 75~79.
- 7) 山本昌木, 達山和紀 (1959). 日植病報, **24**: 52.

Summary

1) The present paper deals with the results of experiments through the paper-electrophoresis on the proteins contained in mycelia of several phytopathogenic fungi.

2) Under the current of 0.25 mA/cm for 3 hours using veronal- K_2HPO_4 -Na Borate buffer solution, three components of proteins (I, II, III) were recognized in mycelia of *Piricularia oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Gibberella fujikuroi*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora macrospora* and *Guignardia camelliae*, but in mycelia of *Corticium sasakii* and *Shiraia bambusicola* four components of proteins (I, II, II', III) were recognized.

3) There were no qualitative difference between the two paper-electrograms of mycelia of different races of *Piricularia oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus* and *Gibberella fujikuroi*.

4) The proteins detected by the paper-electrophoresis in mycelia of *Piricularia oryzae* decreased with the growing stages, and with in the extent of the writer's experiments, no electrophoretic proteins were recognized six weeks after the inoculation.

5) Proteins, especially I and II components, contained in mycelia of *Piricularia oryzae* decreased, if the mycelia were contacted with 10^{-4} molar solution of copper sulfate or mercuric chloride for 20 hours. The decrease of the components were probably caused by the degeneration of the proteins contacted with heavy metallic ions, but in the case of adding the metallic solutions to the juice macerated from mycelia of *P. oryzae* just before starting electrophoresis, the proteins did not decrease even at the concentration of 10^{-3} molar.

(Shimane Agricultural College, Matsue, Japan)