水稻ごま葉枯病病斑周縁組織のでん粉蓄積機構

4. 病原菌培養ろ液のでん粉分解作用の抑制*

田 中 寛 康**・赤 井 重 恭***

Hiroyasu TANAKA and Shigeyasu AKAI: On the mechanism of starch accumulation in tissues surrounding spots in leaves of rice plants due to the attack of *Cochliobolus miyabeanus*.

IV. Inhibitory effect of culture filtrate of the causal fungus on the starch decomposition.

水稻ごま葉枯病病斑周縁組織に多量のでん粉が蓄積される原因として、その部分での β -amylase 活性の低下⁹⁾、ならびに水稻葉中のでん粉流転作用の抑制に SH-阻害剤のような物質が関与していること⁷⁾などをすでに報告した。しかしこのような物質が直接あるいは間接にでん粉分解作用を阻害するとしても、これらの物質が寄主と寄生菌との共存場においてはたして寄主組織あるいは病原菌のどちらに由来して生ずるかを追究することは至難である。水稻に本病原菌を接種して 20~24 時間後に観察すると、病斑はごく小さい点状の初期の段階を示し、その周縁部ではでん粉はかえつて消失する¹⁾。したがつたとえ阻害物質が寄主組織に由来すると仮定しても、感染以前に十分な濃度に存在するとは考えがたく、むしろ病原菌の侵入にともなつておこる異常代謝の結果生成されたものと考えるのが妥当のようである。一方ごま葉枯病原菌の培養ろ液が β -amylase の活性を阻害することはすでに後藤⁴⁾が認めているので、このような阻害物質が本菌の代謝産物として培養ろ液中に生産され、それがどのような性質のものであつて、どのような機構ででん粉の分解を抑制するかを明らかにすることは興味深い問題である。これらのことを追究するに先立つて、筆者らはまず本病原菌の培養ろ液が β -amylase の活性を阻害するか否かを確めた。

実験材料および実験方法

供試菌には水稻ごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) 京大保存 13 号菌を用いた。ジャガイモ煎汁培地を 200 ml 三角フラスコに 50 ml ずつ分注し、それ

ぞれ一定期間本菌を培養してえた培養ろ液を約 40~50°C で減圧濃縮して原培地量の 1/25 量にし、それを培養ろ液濃縮液 (FC) として種々の実験に供した。

本菌は生育にともなつて菌体内にも菌体外にも多量のでん粉分解酵素を生産する*。したがつて β -amylase 標品の活性に対する培養ろ液の阻害力を調べるにあつて、ろ液中に生産されたでん粉分解酵素が結果を妨害すると思われるので、ろ液中のでん粉分解酵素を除くためつぎの操作を行なつた (第 1 図参照)。

エタノール除蛋白 (E) FC に最終濃度が 90% になるように 99% エタノールを添加して一夜室温に放置し、生じた洗でんをろ別してもとの FC の量に減圧

Fig. 1. Fractionation of culture filtrate of the fungus.

* 京都大学農学部植物病理学研究室業績, 第 157 号

** 農林省園芸試験場興津支場

*** 京都大学農学部

* 未発表 (近日中に日植病報に投稿予定)

濃縮したもの。

硫酸塩析（S） FC 20 ml に硫酸 15 g を添加し、よくかく拌したのち一夜氷室中に放置し、生じた沈でんをろ別して、さらにセロファン袋¹⁾に入れて流水中で硫酸がなくなるまで透析し、20 ml に減圧濃縮したもの。

透 析（外液：Do, 内液：Di） FC をセロファン袋に入れ、約 20 倍のイオン交換水で 5 日間氷室内で透析したのちそれぞれ FC の量まで減圧濃縮したもの。

なお S の対照区としてイオン交換水に上記硫酸塩析操作を行なったものをも供試した。

これらのフラクションの β -amylase 標品²⁾の活性に対する阻害力を調べるため、まずジニトロサリチル酸法⁵⁾に準じて基質には最終濃度 0.5% 可溶性でん粉を、緩衝液には 0.4 M 酢酸塩緩衝液を用い、反応温度を 37°C として β -amylase 活性を測定した。しかし β -amylase の活性測定には、その標品の種類によつて異なるが、通常 pH 4.3~6.8 の範囲の緩衝液が用いられているので、pH 4.4 と 6.0 の緩衝液を用いてその影響を調べ、同時に β -amylase 標品の濃度および反応時間も調べた。その結果本酵素は pH 4.4 でも 6.0 でも同様に強い活性を示したが、一方酵素液の濃度が 0.001% では活性が非常に弱く、0.002%, 0.005%, 0.01% と濃度が大になるに従つてその活性も増大し、0.01% 以上ではほとんど同じであつた。なお反応時間は 0.5 時間でも 1 時間でも、ほとんど同様の結果を示した。以上の結果から β -amylase 活性の測定条件をつぎのように定めた。

反応混液

緩衝液：0.4 M 酢酸塩 (pH 6.0).....2.0 ml

基質溶液：2% 可溶性でん粉.....2.0 ml

酵素液：0.005% β -amylase.....2.0 ml

イオン交換水または培養ろ液

のフラクション.....2.0 ml

反応温度.....37°C

反応時間.....30分

実験結果ならびに考察

本菌培養開始後 12, 24, 36 および 60 日目の培養ろ液濃縮液 (FC) について、それぞれ上記の操作を行なつてフラクションに分け、それらの性質ならびに β -amylase に対する阻害力を調べた。 β -amylase 標品の活性は反応液中に生成した還元糖量であらわしたが、各フラクション中に残存する還元糖も阻害力測定妨害因子の 1 つとなるので、各フラクションについて残糖量およびでん粉分解力の 2 つの妨害因子を調べ、あわせて色調をも併記した (第 1 表)。まず FC の残糖量は培養 12 日目では非常に多いが、以後次第に減少して 60 日目にはほとんど消失する。しかしでん粉分解力は全期間を通じてかなり強く、ほぼ一定である。E ではエタノール最終濃度が 90% であつたので、残糖量が FC とほぼ同様であるのは当然であるが、でん粉分解力も認められることから除蛋白が完全に行なわれなかつたようである。しかし S では残糖量もでん粉分解力もほとんど認められなかつた。一方 Di の 12 日目は糖が FC より減少しているもののなおかなり存在し、また Do, Di 両区ともでん粉分解力が認められることは、限られた量の水での透析が不完全であつたことを示すものであろう。培養ろ液を褐色にする物質は、透析前の S がかなり着色しているにもかかわらず、それを透析するとほとんど無色になることから、透析によつてほとんど完全に除かれるくらい低分子のものようである。以上の結果から S では残糖量、でん粉分解力ならびに色の 3 者ともすべて一

Table 1. Characteristics of various fractions from the culture filtrate of the fungus

Fraction ^a	Amount of residual sugar				Ability of starch decomposition				Color intensity
	12 ^b	24	36	60	12	24	36	60	
FC	+++	++	+	±	+++	+++	++	+++	+++
E	+++	++	±	±	+	++	+	+	+++
S	±	±	—	—	±	±	—	±	±
Do	+++	++	±	±	++	+	+	+++	++
Di	++	±	—	—	++	+++	±	++	+

^a See Fig. 1., ^b Culture duration (days).

*1) Visking Co. (米国) 製品, Size: 27/32

*2) 麦芽より製精した酵素標品, NBC 社 (米国) 製品。

Table 2. Inhibitory effect of fractions on the β -amylase activity.

Fraction ^a	Percent inhibition on β -amylase activity				
	0 ^b	12	24	36	60
DW	0	—	—	—	—
FC	0	—	0	42	37
E	0	—	29	43	46
S	6	28	42	56	74
Do	0	—	0	40	38
Di	0	0	21	41	39

^a See Fig. 1., ^b Culture duration (days).

か土であつて(第1表),これらのフラクション中ではとくに異なつてゐることがわかる。

上記のフラクションの β -amylase に対する阻害力は,第2表からもわかるように,培養前(培養日数0)には全然認められない。また硫酸処理の影響も小さい。FCの阻害力は24日目までは認められなかつたが,その後はかなり強い阻害力を示し,Do,DiもFCとはほぼ同様の結果であり,Eも24日目に阻害力を示している以外はFCとほとんど異ならない。しかしSは全期間を通じて他のフラクションよりも強い阻害力を示した。したがつて菌によつて生産されるでん粉分解酵素を除去すると,培養ろ液の β -amylase 標品に対する阻害力がより顕著にあらわれる。一方D₀においてもかなり強い阻害力が認められることから,阻害物質はセロファン袋からかなり透析され则认为られる。したがつてSの阻害力も透析によつて減少したとすると,培養ろ液の阻害力はSの阻害力よりさらに強かつたものと考えられる。

以上の実験結果から,本菌は培養ろ液中に一方ではでん粉分解酵素を生産するとともに,他方では異種の

β -amylaseを阻害する物質をも生産するものと考えられる。このことは一見矛盾するようであるが,ある種の銹胞子が発芽するさいに,同時に自己阻害物質を生産する^{2,3,8,9)}ことを考慮すれば,十分起こりうる現象であらう。

摘 要

水稻こま葉枯病菌培養ろ液は,培養24日ごろまでは残糖量が多量のため β -amylase 標品に対する阻害力を確認しえなかつたが,36日目以後では残糖量が非常に少なくなり,阻害力を確認しえた。

一方培養ろ液を硫酸塩析により除蛋白すると,糖およびでん粉分解力が除かれ,培養初期からすでに β -amylase の標品に対する強い阻害力を示した。

以上のことから本菌培養ろ液中には β -amylase に対する阻害物質が生産されるものとする。

(1965.1.21 受理)

引 用 文 献

1. 赤井重恭・田中寛康・野口喜久子(1958). 日植病報 23:111-116.
2. Allen, P.J. (1955). Phytopath. 45:259-266.
3. Forsyth, F.R. (1955). Can. J. Bot. 33:363-373.
4. 後藤岩三郎(1958). 山形大紀要(農学)2:1-152.
5. 満田久輝・千葉英雄(1957). 農芸化学実験書2(京大農,農化教室編),東京,p.619.
6. 田中寛康・赤井重恭(1960). 日植病報 25:80-84.
7. ——— (1960). Ibid. 25:156-164.
8. Wilson, E.M. (1958). Phytopath. 48:595-600.
9. Yarwood, C.E. (1959). Mycologia 48:20-24.

Summary

The culture filtrate of *Cochliobolus miyabeanus* (Ito et Krib.) Drechs., the causal fungus of *Helminthosporium* leaf spot of rice plant, exhibited a strong ability for starch decomposition throughout the whole culture duration. Furthermore, the culture filtrate contained much residual sugar in the early stage of culture, namely, for the first 24 days after inoculation in this experiment. Because of those two characteristics of the filtrate, its inhibitory effect on β -amylase preparation was hardly detected. However, when the cultural filtrate was deproteinized by means of salting-out with ammonium sulfate, it revealed a striking inhibitory effect on the activity of β -amylase preparation, for starch decomposing ability was removed from the filtrate. From those results, it was concluded that certain kinds of inhibiting substances for starch decomposition were produced in the culture filtrate of this fungus. (Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan)