腐敗性ならびに腐生性 *Pseudomonas* 属細菌の ペクチン質分解酵素

大内 昭*・富永時任*

Akira, OHUCHI* and Tokitō, TOMINAGA*: Pectolytic Enzymes Secreted
by Soft Rot and Saprophytic *Pseudomonads*

Abstract

Studies on pectolytic enzymes secreted by *Pseudomonas marginalis* were conducted to elucidate a specific dissolution of pectic substances in infected host cell walls.

Two isolates of pathogenic bacteria, N-6122 and N-6301, secreted pectic acid *trans*-eliminase (PATE), when grown on pectin-asparagine medium. Pectin esterase (PE) activity was extremely weak in culture filtrates. As for N-6301, the dialyzed filtrate also had a strong pectin *trans*-eliminase (PTE) activity, which reacts specifically to methylated pectin. In addition, weak polygalacturonase (PG) activity was found in this preparation. In the case of N-6122, these enzyme activities were not detected. From these results, it is concluded that polyuronide-chain splitting enzyme system in N-6122 obviously differs from N-6301.

PATE and PTE showed maximum reaction velocity at pH 8.3 in Sørensen borate buffer systems, when pectin was used as a substrate. PATE activity was remarkably accelerated by addition of 10^{-3} M CaCl_2 , and completely inhibited by 10^{-4} M EDTA, using sodium-polypectate as a substrate. PTE activity was not apparently affected by these chemical compounds.

Dialyzed culture filtrate of N-6122, mainly containing PATE, showed typical action to degradate plant tissues. When maceration activity was measured by per cent loss in dry weight of radish, the preparation indicated an ability to decrease about 12% of sliced tissues, after incubation at 30°C for 8 hours. The physical properties of tissue-macerating agent in dialyzed filtrate were similar to those of PATE. They responded in the same way to pH and temperature, viz. inactivation by lower or higher pH value and heating. From these reasons, it can be said that the tissue degradation in this preparation is, in part, attributable to an action of PATE, although the enzyme has not been purified to homogeneous state.

In culture filtrates obtained from two saprophytic isolates of *Ps. fluorescens*, only a trace of *trans*-eliminase activity was detected. From these results, it is proposed that pathogenic pseudomonads are able to secrete pectolytic enzyme(s), causing degradation of plant tissues, but saprophytes have a little or no ability to produce them in this culture medium.

(Received March 11, 1973)

緒 言

植物病原細菌による宿主組織の崩壊は、古くから細菌の分泌するペクチン質分解酵素によると理解されて

きた⁶⁾。腐敗病細菌を含めたいわゆる soft rot bacteria グループでは、細菌の病原性に関連して本酵素がとくに重視され、これまでに多くの研究がなされてきた^{5,8,10,28,29,32,33,37)}。その結果、従来から性格が不

* 農業技術研究所 National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo, Japan.

明確なまま取り扱われてきた一群の酵素の詳細がようやく解明されるようになった^{19,20,22,24,25,34}。しかしいずれの場合も、水溶性の基質に作用する酵素群に解析の重点が置かれているため、細胞壁に含まれる不溶性のペクチン質に作用する酵素については不明な点が多い。

筆者らは前報²⁷⁾で、宿主細胞壁の中層および一次壁に存在するペクチン質成分が、腐敗病細菌の侵入にともなって急速に溶解、消失することを認め、さらに腐生菌 *Pseudomonas fluorescens* では、このような現象がみられないことを明らかにした。

本報では、罹病宿主における細胞壁成分の特異的消失を解明する手がかりを得るために、腐敗病細菌のペクチン質分解酵素を再検討するとともに、腐生細菌の生産する酵素と比較することにした。

本研究を行なうにあたり、御懇篤な御指導と御校閲をいただいた農業技術研究所病理科長、水上武幸博士に厚くお礼を申し上げる。

実験材料および方法

供試菌：前報²⁷⁾で用いた腐敗病細菌、*Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens, 2菌株 (N-6122, N-6301), および腐生細菌, *Ps. fluorescens* Migula, 2菌株 (IAM-1154, IAM-1179) を供試した。なお、実験によっては軟腐病細菌, *Erwinia aroideae* (Townsend) Holland の E1-1-5 株 (農研保存菌株) も用いた。

培地および培養法：供試菌はすべてアスパラギンペクチン培地で培養した。すなわち、アスパラギン 10 g, KH_2PO_4 4.5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g および $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g を順次 800 ml の蒸留水に溶解して、pH を 7.0 に調整したあと、300 ml 容のエンマイヤーフラスコに 40 ml ずつ分注した。市販ペクチン 5 g を別に 200 ml の蒸留水に溶かして、10 ml ずつ試験管にとり、それぞれ別々に加圧滅菌した。両者を無菌的に混合したのち、あらかじめ肉汁寒天培地で得た新鮮な菌体を移植して、28°C で 72 時間静置した。

酵素液の調整法：所定時間後の培養液を 10,000×g, 20 分間遠沈して菌体をとりのぞき、4°C で一昼夜、蒸留水に透析した上澄液を粗酵素液とした。実験に際しては該酵素液 1 ml あたりの蛋白量を約 1.03 mg とするようになった。なお、各粗酵素液を 100°C で 15 分間加熱したものを対照区とした。

基質の調整法：a) **ペクチン；** EtOH による沈澱法¹⁸⁾ にもとづき、市販かんきつペクチンからガラクト

ウロン酸などの還元糖を含みぬペクチンを得た。本標品のメトオキシシル基含量は約 6.3% であり、ウロン酸含量は 92.8% であった。なお、1% 水溶液 (pH 7.0, 30°C) における比粘度は約 3.75 であった。

b) **ペクチン酸；**市販かんきつペクチンをアルカリけん化¹⁸⁾ して、比粘度が約 1.03 のペクチン酸を得た。

c) **メチル化ペクチン；**ペクチン酸を Morell らの方法²³⁾ でメチル化し、メトオキシシル基含量が 17.2% のメチル化ペクチン (polymethyl polygalacturonic acid methyl ester) を得た。

実験に際し、これらの基質はすべて NaOH で中和した。

酵素活性の測定法：a) **ペクチンエステラーゼ (PE) 活性の測定；**2% のペクチン溶液 5 ml, 0.5 M の NaCl 0.5 ml, および蒸留水 2.5 ml よりなる混合液に、粗酵素 2 ml を加えて 30°C で 24 時間作用させ、生じたカルボキシシル基およびメタノールをアルカリ滴定法¹⁸⁾ およびクロモトロップ酸法¹³⁾ でそれぞれ定量した。なお後者の方法では、反応液に pH 6.0 の酢酸緩衝液を 0.025 M となるように加えた。

b) **粘度降下作用の測定；**オストワルド型粘度計に 1.5% のペクチン溶液 4 ml, および 0.15 M の緩衝液 1 ml を加えて、30°C の恒温槽に 15 分間静置したのち、あらかじめ同温度に保った粗酵素液 1 ml を加えて、粘度の変化を測定した。結果は斎藤らの方法³¹⁾ にしたがって、粘度降下率で示した。

c) **還元力の測定；**b) と同組成の反応液 30 ml における還元基の遊離を、Willstätter-Schudel 変法¹⁶⁾ で定量した。消費した 0.01 N, I_2 溶液 1 ml は 0.9 mg グルコースとして換算した。

d) **トランス エリミナーゼ活性の測定；**1% の基質溶液 2 ml に 0.1 M の緩衝液 1 ml, および粗酵素液 1 ml を加え、30°C で一定時間インキュベートした。所定時間後に反応液を 0.05 N, HCl で 10 倍量に希釈して、235 nm における紫外外部吸収を測定した¹⁾。また、Weissbach の方法³⁶⁾ に準拠して、チオバービツル酸反応を試みた。

e) **組織崩壊力の測定；**0.04 M の緩衝液を含む粗酵素液 10 ml に、ダイコン (*Raphanus sativus* L. var. *acanthiformis* Makino, 品種；秋詰) 肥大根部の薄切片 (直径約 8 mm × 厚さ 0.1 mm) 10 枚を浸漬した。30°C で 8 時間静置したのち、乾燥重量の変化を百分率で求めた。

上記の諸活性の測定にあたり、作用時間が 2 時間を越える場合、反応液にトルオールを加えて、微生物の

混在による影響を回避するようにした。

実験結果

1) PE 活性の検出

腐敗病細菌2株の粗酵素液は、いずれも微量のPE活性をもつことが判明した。Table 1 のとおり、N-6122 および N-6301 株におけるカルボキシル基の遊離は、反応液 10 ml あたりそれぞれ約 0.72, および 0.78 μ moles と定量された。また、メタノールの遊離はそれぞれ約 0.81, および 0.89 μ moles であった。これらのことから、両粗酵素液は約 0.7~0.9 μ moles のメチルエステル基を水解すると結論される。しかし、*Er. aroideae* では反応液 10 ml あたり、約 5.08 μ moles のカルボキシル基と、約 5.12 μ moles のメタノールが測定された (Table 1) ので、腐敗病細菌の PE 活性は *Er. aroideae* に比べて、きわめて低いと判断される。

Table 1. Excretion of pectin esterase by *Pseudomonas marginalis* and *Ps. fluorescens* when grown on pectin-asparagine media.

Isolate	Liberation of	
	carboxyl group ^{a)} μ moles/10 ml ^{c)}	methanol ^{b)} μ moles/10 ml ^{c)}
<i>Ps. marginalis</i>		
N-6122	0.72	0.81
N-6301	0.78	0.89
<i>Ps. fluorescens</i>		
IAM-1154	0.00	0.00
IAM-1179	0.00	0.00
<i>Erwinia aroideae</i>		
E 1-1-5	5.08	5.12

- a) Carboxyl group was determined by titrating method, and b) methanol determined by chromotropic acid test.
c) 10 ml of reaction mixture.

一方、腐生細菌2株では明瞭な PE 活性は検出されなかった (Table 1)。また、培地組成のうち炭素源、および窒素源をとりかえても、これと同じ結果を得た。したがって、供試の腐生細菌の PE 活性は皆無と判断された。

2) 粘度降下作用

pH が異なる基質溶液に、供試菌の粗酵素液を2時間作用させ、粘性の変化を検討した。Fig. 1 のように、供試の粗酵素液は中性~アルカリ側で基質の粘性を低下させることが判明した。N-6122 および N-6301 株

Fig. 1. Effect of pH on depolymeric activity in culture filtrates of *Ps. marginalis* and *Ps. fluorescens*.

Activity was determined by viscometric method after 2 hours, and by hypiodite method after 24 hours incubation. Buffer system: MacIlvaine citrate-phosphate buffer, and Sørensen borate buffer. Substrate: 1% pectin.

Fig. 2. Comparison of depolymeric activity in culture filtrates of pathogenic pseudomonads.

Activity was determined by viscometric and hypiodite method, using 1% pectin as a substrate containing 0.025 M MacIlvaine buffer (pH 8.0).

における該作用は pH 8.0~9.0 附近で最大となり、2 時間のインキュベーションで約 46%、および 95% の粘度降下率を示し、後者の菌株でより強い作用性が認められた。両酵素液の活性は pH が 6.0 附近でもなお認められるが、5.0 附近では著しく低下し、とくに N-6122 株では皆無となっていた。

他方、腐生細菌の 2 株では pH 8.0 において、それぞれ約 7~8% の粘度降下率が認められるものの、病細菌株に比べきわめて低い値であった (Fig. 1)。このことから、IAM-1154 および 1179 株の粘度降下作用は、病細菌株と顕著に異なると推考される。

つぎに、所定時間ごとにおける粘度降下率の変動を調べてみると、Fig. 2 のように病菌 2 株の間で興味ある相異が認められた。すなわち、N-6122 株の降下率は時間の経過にほぼ比例して増大するのに対し、N-6301 株では作用時間と正の相関を示さなかった。とくに後者では、反応を開始した 15 分後に、約 50% 以上の粘度降下率が測定された。このことから、本菌株の粘度降下作用は反応の初期に急速に進むと推考される。

3) 還元力の変動

1% 濃度の基質溶液に粗酵素液を 24 時間作用させ、各 pH における還元力の増加を測定した。Fig. 1 のとおり、病細菌 2 株の粗酵素液はペクチンより明らかに還元基を遊離していた。該作用の至適 pH はいずれも 8.0 附近にあって、N-6122 および N-6301 株は反応液 1 ml あたり、それぞれ約 27.0 μ g、および 46.5 μ g のグルコースに相当する還元基を遊離していた。両酵素液の該作用は pH 6.0 附近でも見出されるが、pH 5.0 附近では著しく低くなり、N-6122 株では皆無となっていた。これらの結果は前述の結果によく一致していた。

他方、腐生菌の IAM-1154 および 1179 株においては、反応液 1 ml あたりそれぞれ 1.8 μ g、および 3.2 μ g の還元力が測定されたが、病細菌株に比べていずれもきわめて低い値であることが判明した。(Fig. 1) このことから、病細菌との相異が指摘された。

つぎに、病細菌における還元力の増加を反応時間と対比させたところ (Fig. 2)、N-6122 株では両者の間にほぼ正の相関が見出された。これに対し、N-6301 株では反応初期に著しい還元力の増大が確認され、粘度測定で得た知見によく一致する結果を得た。反応速度における以上の相異から、ペクチン質分解酵素の差異が考えられるが、本実験の結果だけではその詳細は明らかでない。

4) 粘度降下作用におよぼす塩類の影響

粘度降下作用におよぼす塩類の影響を調べて、病菌2

Table 2. Effect of various salts on depolymeric activity in culture filtrates of pathogenic pseudomonads.

Compound tested ^{a)}	Per cent loss in viscosity ^{b)}	
	N-6122	N-6301
None	29.0 (100.0) ^{c)}	26.0 (100.0) ^{c)}
(NH ₄) ₂ SO ₄	29.4 (101.4)	25.7 (98.8)
KCl	24.2 (83.4)	23.1 (88.8)
Li ₂ SO ₄	28.1 (96.9)	25.3 (97.3)
MgSO ₄ 7H ₂ O	29.9 (103.1)	26.1 (100.4)
MnSO ₄ H ₂ O	29.0 (100.0)	26.6 (102.3)
CaCl ₂	60.9 (210.0)	57.1 (219.6)
EDTA-Na	0.0 (0.0)	20.5 (78.8)

a) EDTA-Na salt was used at 1×10^{-4} M, other salts used at 1×10^{-3} M.

b) Viscosity loss shows values of 60 minutes incubation in N-6122, and 3 minutes incubation in N-6301 culture filtrates.

c) Relative activity.

株におけるペクチン質分解酵素の差異を検討した。数種の無機塩類および EDTA-Na 塩の濃度が、それぞれ 10^{-3} および 10^{-4} M となるように反応液に加え、30℃で 60 分後の粘度降下率を測定した。なお、N-6301 株の場合には 3 分間のインキュベーションとした。Table 2 のように、N-6122 株の該作用は CaCl₂ の添加によって著しく高まり、無添加区の約 2.1 倍に賦活されていた。(NH₄)₂SO₄、Li₂SO₄、MgSO₄ および MnSO₄ などでは明らかな影響は認められず、KCl はわずかに阻害的に働いていた。一方、本粗酵素液の作用性は EDTA によって完全に阻害され、明瞭な粘度降下の現象が認められなくなっていた (Table 2)。

N-6301 株の粗酵素液に対する無機塩類の影響は、前者の菌株とはほぼ同様の傾向を示し、Ca⁺⁺ で著しく賦活されていた (Table 2)。しかし、EDTA の影響は N-6122 株の場合ほど顕著でなく、約 22% 程度の阻害率が観測されるにすぎなかった。

これらのことから、両粗酵素液の粘度降下作用はいずれも Ca イオンで賦活され、EDTA による阻害で異なると要約されるが、その詳細についてはさらに検討する必要があると思われる。

5) トランスエリミナーゼ活性の検索

pH 8.0, 0.025 M のトリス-HCl 緩衝液を含む 0.5% ペクチン溶液に、各粗酵素液を 24 時間作用させ、紫外外部吸収の測定を行なった。病細菌株の粗酵素液を処理した反応液では、いずれも 235 nm 附近で明瞭な紫外

Fig. 3. Effect of pH on *trans*-eliminase activity in culture filtrates of *Ps. marginalis* and *Ps. fluorescens*.

Activity was determined by measuring the increased absorbancy at 235 nm, using 0.5% pectin as a substrate. Buffer system: Same as Fig. 1.

部吸収が認められた。また、これらはチョーバービツール酸試薬に陽性の反応を呈していた。したがって、これらの両粗酵素液にはペクチン質に作用するトランスエリミナーゼが含まれると判断される。Fig. 3 のとおり、ペクチンに対する該作用の至適 pH は、いずれも 8.0~8.3 附近にあって、pH 5.0 附近では作用性が認められなくなっていた。

他方、腐生細菌の粗酵素液ではごくわずかな紫外部吸収と、チョーバービツール酸反応が認められるにすぎなかった。したがって、該 2 菌株のトランスエリミナーゼ活性はきわめて低いと考えられる。このことは Fig. 3 の結果からも支持される。

つぎに、病原細菌 2 株におけるトランスエリミナーゼの差異を知るために、該作用の基質特異性、ならびに塩類の影響を調べた。基質にはペクチン酸およびメチル化ペクチンを、塩類には CaCl_2 および EDTA-Na 塩をそれぞれ用いた。Fig. 4-A に示したように、N-6122 株の粗酵素液はペクチン酸に特異的に作用し、メチル化ペクチンには全く作用しなかった。それゆえ、該活性はペクチン酸トランスエリミナーゼ (PATE) に相当すると推定される。本活性の反応速度は作用時間と正の相関にあって、時間の経過とともに吸光度が増大していた (Fig. 4-A)。また、この作用は 10^{-3} M の CaCl_2 によって著しく賦活され、 10^{-4} M の EDTA の添加で完全に阻害されていた (Fig. 4-A)。以上の結果

Fig. 4. Comparison of *trans*-eliminase activity in culture filtrates of N-6122 and N-6301 isolates.

A: N-6122 B: N-6301

Reaction mixture contained 0.5% substrate and 0.025 M tris-HCl buffer (pH 8.0).

は粘度および還元力測定で得た知見とよく一致していた。それゆえ、本菌株で認められた粘度降下および還元力の増加はいずれも PATE の作用によるものと考えられる。

一方、N-6301 株の粗酵素液は Fig. 4-B に示したとおり、供試したいずれの基質にも作用することが判明した。ペクチン酸で認められる作用性は Ca イオンで賦活され、EDTA によって完全に阻害されていた。また、その反応速度は作用時間にはほぼ比例していた (Fig. 4-B)。したがって、該活性も PATE に相当すると考えられる。他方、メチル化ペクチンで認められる作用性は Fig. 4-B のように、 10^{-4} M の EDTA で全く

阻害されず、短時間のインキュベーションで著しく吸光度が増大していた。これらの性質は明らかにPATEのそれと異っており、基質に対する特異性からみて、該酵素をペクチントランスエリミナーゼ (PTE) と推定した。それゆえ、N-6301株の粗酵素液にはPATEのほかにPTE活性を含むと判断され、N-6122株のペクチン質分解酵素系と明らかに異なることが、ここで明確となった。

6) 粗酵素液の組織崩壊作用

N-6122株の粗酵素液8 mlに、0.2 Mの緩衝液2 mlを加え、各pHにおける組織崩壊作用を検討した。その結果、該酵素液はpHが6.5~9.5の範囲で、ダイコン根組織を解離、崩壊することが判明した。該作用はpH 8.0付近で最大値を示し、8時間のインキュベーションで供試組織の乾燥重量を約12%減少させていた (Fig. 5-A)。とくに興味のある点は既述のように、

PATE活性が認められるpH域で該作用が見出されたことである。この知見から、PATEが組織の崩壊にも関与する可能性が考えられる。そこで、両活性の2~3の性質を検討して、両者の関係を調べた。

pH 安定性: 供試の粗酵素液を0.1 N, HClおよびNaOHで種々のpHに調整したのち、pHに対する安定性を24時間後に検討した。Fig. 5-Bのように、PATEおよび組織崩壊作用はいずれもpH 6.0~8.0付近で最も安定であり、pH 5.0以下の酸性側、およびpH 9.0以上のアルカリ側で不安定であることが判明した。

耐熱性: Fig. 5-Cのとおり、両者の活性はいずれも40℃までの10分間加熱に安定であり、50℃以上でともに急激に失活していた。なお、45℃の加熱では約70%程度の活性が残存していた。

至適温度: Fig. 5-Dのように、両活性の至適温度は35℃付近にあって、45℃付近で著しく低下していた。

Fig. 5. Effect of pH and temperature on tissue macerating and PATE activities in culture filtrate of N-6122.

Tissue macerating activity was measured by per cent loss in dry weight of sliced radish (8×0.1 mm). PATE activity was determined by the same method as Fig. 3, using sodium polypectate as a substrate.

A: Optimum pH on tissue maceration. B: pH stability.
C: Optimum temperature. D: Thermal stability.
—○—○— PATE activity, —●—●— Macerating activity.

以上のように、組織崩壊作用の物理的性質が、PATEのそれにきわめてよく一致していることから、本酵素液ではPATEが組織の崩壊に関与すると推察される。

考 察

腐敗病に罹病した宿主で観察される組織の崩壊を解析するために、本病細菌が分泌するペクチン質分解酵素を再検討した。

供試した *Ps. marginalis* 2 菌株の粗酵素液は、いずれも PE 活性を含むが、該活性は *Er. aroideae* の E1-1-5 株に比べ、きわめて低いことが判明した。Ceponis ら⁵⁾、Friedman ら¹⁰⁾、および Nasuno ら²⁴⁾ は本菌においてそれぞれ痕跡程度の該活性を認め、Lange ら²⁰⁾、Prunier ら²⁹⁾ および Smith^{32,33)} は全く検出されないとした。このような結果の不一致は、他の *Pseudomonas* 属細菌でも知られている。Oxford²⁸⁾ および Smith³²⁾ は Mills²¹⁾ が *Ps. prunicola* で認めた PE 活性を否定し、菌株によって差異があることを指摘した。したがって、腐敗病細菌においても当然、菌株間の差異を考慮しなければならないが、本実験の結果から判断すると、本病細菌の PE 活性はきわめて微弱と要約できる。

つぎに、ウロン酸鎖を開裂する酵素に論及してみると、N-6122 株で見出された粘度降下と還元基の遊離は、いずれも PATE の作用によることが判明した。他方、N-6301 株では PATE のほかに、基質特異性などの諸性質が該酵素と異なる PTE 活性が同時に検出された。さらに本菌株では、これらのトランスエリミナーゼ作用が見出されない pH 5.0 附近 (Fig. 3) で、粘度降下作用および還元基の遊離が認められる (Fig. 1) ことから、ポリガラクトウロナーゼ (PG) の存在も指摘された。したがって、N-6301 株では PATE、PTE および PG によってウロン酸鎖が開裂すると理解され、N-6122 株の酵素系と明らかに異なることが判明した。

Ps. marginalis による PATE の分泌はすでに Knösel¹⁹⁾、Lange²⁰⁾ および Nasuno ら²⁴⁾ によって指摘されている。また、Ceponis ら⁵⁾ および Friedman ら¹⁰⁾ が報告した *Ps. marginalis* の“ペクチンデポリメラーゼ”は、近年の知見から正しくは PATE であろうと考えられるようになった^{19,20,24)}。それゆえ、本病細菌は一般的に該酵素を分泌すると考えられる。

一方、PTE の産生については、Nasuno ら²⁴⁾ による否定的な見解以外には、これまで積極的に触れられていない。Edstrom ら⁹⁾ によって数種の *Aspergillus* 属菌で確認された本酵素が、供試の N-6301 株で見出

されたことはきわめて興味深い。しかし、腐敗病細菌が普遍的に本酵素を産生するかどうかは、今後の検討に待たねばならない。

本病細菌の PG については、これを産生する場合^{19,24)} と、しない場合^{5,20)} が知られている。この相異には培養条件の差異が考えられる。しかし、本実験でも明らかに、同一条件で生育させた 2 菌株で結果が異なることから、むしろ菌株における差異が大きいに思われる。Smith³²⁾ はすでにこの点を強調し、3 菌株のうち 1 菌株だけがペクチングリコシダーゼ活性をもつことを明らかにしている。

前実験²⁷⁾ で、レタス葉に病原性を示さなかった *Ps. fluorescens* 2 株では、PE および PG 活性は全く検出されず、トランスエリミナーゼの活性も皆無に等しかった。これまで本細菌は PE 活性を示さず、ペクチンゲルも溶解しないとされている^{14,28,29,30)}。しかし、Hildebrand¹⁴⁾ はウロン酸鎖を開裂する 1 菌株をゲル溶解法で確認し、Huether ら¹⁵⁾ も PE、PG および PATE 活性を示す 2 株を見出した。ところが、前者の菌株は腐敗症状を呈したレタス個体から分離され、後者の 2 株はジャガイモに Pinkeye disease を基因することから、Hildebrand¹⁴⁾ が指摘したように、これらはいずれも病原細菌 (*Ps. marginalis*) とするのが妥当であろう。Fuchs¹¹⁾ が PATE 活性を認めた 3 株も、キュウリ子苗より得られているので、上記の可能性が強いと考えられる。これらのことから、腐生的な *Ps. fluorescens* は一般的にペクチン質分解酵素の諸活性がきわめて低いか、あるいは皆無と推定される。

植物組織を軟化、崩壊する酵素はプロトペクチナーゼ⁶⁾ あるいはマセレーション酵素^{3,17,35)} と呼称され、水溶性の基質に作用する酵素と一応区別して取り扱われてきたが、近年になって *endo*-型の PG、PATE および PTE が組織崩壊に関与することが指摘されるようになった^{2,4,7)}。N-6122 株の粗酵素液においても、これと同様の知見が得られ、組織の崩壊に PATE が関与する可能性が示唆された。したがって、本菌株ではプロトペクチナーゼのような特定の酵素を想定する必要はないように思われる。しかし、ペクチン質分解酵素以外の因子によっても、植物組織の崩壊がおきるとされている^{12,17,35)} ので、本酵素を純化してさらにこの点を確認する必要がある。

摘 要

腐敗病に罹病した宿主個体で観察される、ペクチン質成分の特異的消失を解明するために、*Ps. marginalis*

のペクチン質分解酵素を検索した。N-6122およびN-6301株の培養液より調整した粗酵素液は、いずれも顕著な PATE 活性を示し、わずかな PE 活性も検出された。N-6301株では、さらに PTE 活性と痕跡程度の PG 活性が見出され、菌株間における酵素系の差異が明らかとなった。PATE および PTE はいずれも 8.0~8.3 に至適 pH をもつが、基質特異性、反応速度および塩類の影響などにおいて、両者の性質は明らかに異なっていた。

N-6122株の粗酵素液はダイコンの根部組織を崩壊するが、その物理的性質が PATE によく一致するため、該酵素による組織の崩壊が推測された。

腐生性細菌、*Ps. fluorescens* 2株の粗酵素液では、PE, PG 活性は全く検出されず、トランスエリミナーゼ活性も、きわめて微弱であった。このことから、本細菌は病原細菌に比べペクチン質分解酵素の諸活性がきわめて低いと判断された。

引用文献

- 1) Albersheim, P. Neukom, H. and Deuel, H. (1960). *Helv. Chim. Acta* 43: 1422-1426.
- 2) Bateman, D. F. (1963). *Phytopathology* 53: 1178-1186.
- 3) Byrde, R. J. W. and Fielding, A. H. (1962). *Nature* 196: 1227-1228.
- 4) Byrde, R. J. W. and Fielding, A. H. (1968). *J. gen. Microbiol.* 52: 287-297.
- 5) Ceponis, M. J. and Friedman, B. A. (1959). *Phytopathology* 49: 141-144.
- 6) Davison, F. R. and Willaman, J. J. (1927). *Botan. Gaz.* 83: 329-361.
- 7) Dean, M. and Wood, R. K. S. (1967). *Nature* 214: 408-410.
- 8) Echanid, E. Gundy, S. D. and Walker, J. C. (1957). *Phytopathology* 47: 549-552.
- 9) Edstrom, R. D. and Phaff, H. J. (1964). *J. Biol. Chem.* 239: 2403-2408, 2409-2415.
- 10) Friedman, B. A. and Ceponis, M. J. (1959). *Science* 129: 720-721.
- 11) Fuchs, A. (1965). *Antonie van Leeuwenhoek* 31: 323-340.
- 12) Ginzburg, B. Z. (1958). *Nature* 181: 398-400.
- 13) 畑中千歳・小沢潤二郎 (1966). *農化誌* 40: 421-428.
- 14) Hildebrand, D. C. (1971). *Phytopathology* 61: 1430-1436.
- 15) Huether, J. P. and McIntyre, G. A. (1969). *Amer. Potato J.* 46: 414-423.
- 16) Jansen, E. F. and MacDonnell, L. R. (1945). *Arch. Biochem. Biophys.* 8: 97-112.
- 17) 梶 明・橘 禎男・栗飯原重男・穴吹吉夫 (1959). *香川大農学報* 11: 248-254.
- 18) Kertesz, Z. I. (1951). *The pectic substances*. Interscience Publisher, New York.
- 19) Knösel, D. (1967). *Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz.* 74: 150-155.
- 20) Lange, E. and Knösel, D. (1970). *Phytopath. Z.* 69: 315-329.
- 21) Mills, G. B. (1949). *Biochem. J.* 44: 302-305.
- 22) Moran, F. Nasuno, S. and Starr, M. P. (1968). *Arch. Biochem. Biophys.* 123: 298-306.
- 23) Morell, S. Baur, L. and Link, K. P. (1934). *J. Biol. Chem.* 105: 1-13.
- 24) Nasuno, S. and Starr, M. P. (1966). *Phytopathology* 56: 1414-1415.
- 25) Okamoto, K. Hatanaka, C. and Ozawa, J. (1964). *Agr. Biol. Chem.* 28: 331-336.
- 26) 大内 昭・富永時任 (1968). *日植病報* 34: 185, 373-374. (講要).
- 27) 大内 昭・富永時任 (1973). *農技研報 C* 27: 53-79.
- 28) Oxford, A. E. (1944). *Nature* 154: 271-272.
- 29) Prunier, J. P. and Kaiser, P. (1964). *Ann. Épiphyt.* 15: 205-219.
- 30) Sabet, K. A. and Dowson, W. J. (1951). *Nature* 168: 605.
- 31) 斎藤日向・蓑田泰治・丸茂博太 (1954). *農化誌* 28: 810-814.
- 32) Smith, W. K. (1958). *J. gen. Microbiol.* 18: 33-41.
- 33) Smith, W. K. (1958). *Ibid.* 18: 42-47.
- 34) Starr, M. P. and Moran, F. (1962). *Science* 135: 920-921.
- 35) 谷 利一 (1965). *香川大農紀要* 18: 1-83.
- 36) Weissbach, A. and Hurwitz, J. (1959). *J. Biol. Chem.* 234: 705-709.
- 37) Wood, R. K. S. (1955). *Ann. Bot.* 19: 1-27.