〔農化 第 35 卷, 第 6 号, p. 493~498, 1961〕

白絹病菌の生化学的研究 (第 8 報)*

植物細胞の致死とプロトペクチナーゼ活性 (II)

永田 幸雄, 林 金雄 (岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 35 年 7 月 26 日 受 理

白絹病菌の培養液を使用した実験結果から⁽¹⁾, B. B. Higgins⁽²⁾ らの考えたように培養液中に集積する蔞酸により寄主細胞が殺されることは否定できない。すなわち培養液を中和し蔞酸を除去すれば致死力は大きく減退し, また蔞酸の蓄積が少い培養液の致死力も弱い。培養日数培地の組成と致死力の関係も, 一般に白絹病菌の生育が旺盛で, 蔞酸の蓄積量が著しく多い時期に致死力もまた大である。培養液を透析すると時間の経過と共に致死力は減退するが, この透析内液の蔞酸含量もまた減少する。かように白絹病菌の培養液の細胞致死力は常に培養液中の遊離蔞酸量と平行する。

しかしながらこの白絹病菌培養液中には, またペクチナーゼ群を含み, 特にプロトペクチナーゼ, デポリメラーゼが強力に生産される⁽³⁾。これらの培養液中に生産される酵素活性はまた殆んどの場合その中の蔞酸含量と平行的である。しかして培養液中の蔞酸を除去する, または中和する操作によってペクチナーゼ活性もまた減退する。前報⁽¹⁾で述べた各種の操作によつては, 細胞の致死力とプロトペクチナーゼ作用とは極めて密接な関係を有し, 両者のいずれかを特に強く生産する培養条件は, 菌蓋培養以外の実験ではえられなかった。ここに W. Brown⁽⁴⁾ の提案する致死作用はペクチナーゼであるとする根拠が生ずる。この白絹病菌の寄主細胞の致死力とプロトペクチナーゼ作用との関係をさらに詳細に研究する目的で, 白絹病菌より強力なプロトペクチナーゼ作用を有する粗酵素標品を調製し, その致死力とプロトペクチナーゼ作用について研究した。

I. 実験方法

1. 使用菌種, 被検植物組織 白絹病菌 [*Corticium centrifugum* (Rév) Bres] は前報⁽¹⁾ と同一系統のもので使用した。植物組織は馬鈴薯 (品種男爵) を用い, 径 9 mm, 厚さ 3/8 mm の切片として使用した。

2. 細胞死, プロトペクチナーゼ測定法 いずれも馬鈴薯切片を使用し前報⁽⁵⁾と同様に測定した。また第 1 図のプロトペクチナーゼの活性度は 1000/組織崩潰に要する時間 (MT.) で表わし, なお酵素濃度はその対数値で示した。

3. 酵素調製法 生馬鈴薯に白絹病菌を接種し 30° で 3~4 日間培養後菌体を集めてよく水洗し, これに少量の水を加えてミキサーで磨砕する。この時 CaCO₃ を加えて pH を約 4 に調節する。約 5° で 1 夜放置後圧搾濾過し透明な抽出液をうる。抽出液を 0~3° に冷却しつつ冷アルコールを約 60% まで加え, 生じた白色沈澱を直ちに遠心分離して集める。沈澱を水に溶かして硫酸 0.5 飽和として 5~6 時間約 5° に放置後遠心分離して沈澱を捨てる。上澄液に硫酸を加えて飽和とし 1 夜約 5° に放置後遠心分離して沈澱を集める。これを少量の水に溶かして流水透析する。透析液に冷却下でアルコールを約 60% まで加え生じた沈澱を遠心分離して集める。アルコール, エーテルで脱水乾燥して白色の酵素標品を得る。

アルコール, アセトンによる酵素の分別沈澱は前記酵素抽出液にそれぞれアルコールまたはアセトンを 50%, 60%, 70% にまで加え, 生じた沈澱をアルコールまたはアセトンとエーテルで脱水乾燥して酵素標品とした。

II. 実験結果

1. 反応液の pH と酵素の致死力とプロトペクチナーゼ作用 アルコールと硫酸沈澱によってえた酵素標品を用いて, 細胞の致死力とプロトペクチナーゼ作用に及ぼす pH の影響について実験した。結果を第 1 表に示す。pH 2 では強いプロトペクチナーゼ作用が認められると共にまた強い細胞死がおこる。この細胞死は酵素を入れ

* Biochemical Studies on the *Corticium centrifugum*. Part VIII. On the Killing of Plant Cells and Protopectinase Activity. (2)

By Yukio NAGATA and Kaneo HAYASHI (Department of Agricultural Chemistry Faculty of Agriculture University of Gifu)

第1表 pH と致死力とプロトペクチナーゼ作用*

作用 時間 (分)	pH															
	2				3				4				5			
	酵素(+)		(—)		(+) (—)		(—)		(+) (—)		(—)		(+) (—)			
	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k		
30	0~1	0	0	0	0~1	2~3	0	3~4	0~1	3~4	0	4~5	0~1	4.5~5	0	4.5~5
45	0~1	0	0	0	1~2	1~2	0	2~2.5	1~2	2~3	0	4~5	0~1	4.5~5	0	4~4.5
60	1~2	0	0~1	0	1~2	0~0.5	0	0.5	1~2	0~0.5	0	4	0~1	4~4.5	0	4
75	2~3	0	0~1	0	2~3	0	0~1	0	2	0	0~1	3~4	0~1	1.5~2	0	4
90	3~4	0	0~1	0	3~4	0	0~1	0	2	0	0~1	3	0~1	1~1.5	0	3.5~4

* 反応組成: 0.0025 mg 酵素/ml 0.1N 酢酸-酢酸カリ液, 30°

m: プロトペクチナーゼ作用 k: 細胞死

第2表 酵素量と致死力とプロトペクチナーゼ作用*

作用 時間 (分)	酵 素 量 (mg/ml)															
	0.250		0.100		0.075		0.050		0.025		0.010		0.005		0.0025	
	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k
30	5	0~1	4	0~1	4	2~3	2	2~3	1	2	1	3~4	1	3~4	0~1	4
45	6	0	5~6	0~1	5	1~2	4	0~1	4	0~1	2	1~2	1	2~3	1~2	3~4
60	6	0	6	0	6	0	5	0	4~5	0	4	0	2	0~1	1~2	3
75	6	0	6	0	6	0	6	0	5	0	4~5	0	2~3	0	2~3	2~3
90	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	5	0	3~4	0	3~3.5	1~1.5

* 反応組成: 酵素 mg/ml (M/30 クエン酸緩衝液 pH 3.0), 27°

第1図 酵素濃度とプロトペクチナーゼ活性

関係を図示すれば第1図のようである。この酵素活性と濃度は、0.05~5.0 mg/ml の範囲ではほぼ直線関係がえられたが、その前後の濃度ではこの関係は認められない。

3. 作用温度と致死力とプロトペクチナーゼ作用 酵素標品の各温度における馬鈴薯切片に対する致死力とプロトペクチナーゼ作用の関係を第3表a及びbに示した。作用温度5°においても60分後にはほぼ完全な組織崩壊を認める。5~15°の反応温度では酵素作用は余り差が認められないが、致死力は温度の上昇と共に強くなり、20°は10°の場合のほぼ3倍の細胞死を認める。反応温度50°までは酵素作用力は上昇するが60°では急激に低下し僅かの作用力を認めるのみである。細胞死は高温において特に強く現われ、40°以上では殆んど5分以内に細胞死を認める。しかしながら60°では高温による細胞死もまた5分以内におこる。

4. 反応液中の遊離酢酸と致死力とプロトペクチナーゼ作用 酵素標品を酢酸の存在下で馬鈴薯切片に作用させた結果を第4表に示した。酢酸添加量 500 mg%, 250 mg% では反応液の pH はそれぞれ1以下、および

ぬ対照区でも同様に認められる。pH 3 では反応初期は pH 2 よりもやや強い酵素作用を認めるが、細胞死は反応開始後約60分頃までは完全には認められない。pH 4 では酵素作用は約1/2となり、pH 5 ではこの作用時間内では殆んど認められない。細胞死は pH 2, 3 では殆んど対照と同様に認められるが、pH 5 では酵素作用は殆んど認められないにもかかわらず、細胞死は酵素を入れた区分で75分後に明らかに認められた。

2. 酵素量と致死力とプロトペクチナーゼ作用

結果を第2表に示した。致死作用は0.25, 0.1 mg/ml 区共に30分で殆んど細胞死が認められるが、0.075~0.025 mg/ml 区までは大きな差は認められず、0.01 mg/ml 区では30分後に20~40%の細胞死を認める。0.001 mg/ml 区では60分後に約20%の細胞死を認めるのみである。酵素濃度とプロトペクチナーゼ活性の

第 3 表 作用温度と致死力とプロトベクチナーゼ作用

a)*

作用時間
(分)

5°

10°

15°

20°

	5°		10°		15°		20°	
	m	k	m	k	m	k	m	k
5	0	5	0	5	0	5	0	5
10	0	5	0~1	5	0~1	5	1~2	4~5
15	0~1	5	0~1	4~5	0~1	4~5	4~5	2~2.5
20	0~1	4~5	0~1	4~5	1~2	4~5	5	0.5~1
30	0~1	4~5	2~3	4~5	2~3	4~5	6	0
45	4~5	2~3	4~5	2~2.5	4~5	1.5~2	6	0
60	5~6	1~2	6	0~0.5	6	0	6	0
75	5~6	0	6	0	6	0	6	0
90	6	0	6	0	6	0	6	0

b)*

作用時間
(分)

40°

50°

60°

	40°		50°		60°	
	m	k	m	k	m	k
5	2~3	1.5~2	2~3	0	0~1	0
10	3~4	0	4~5	0	1~2	0
15	4~5	0	5~6	0	1~2	0
20	5~6	0	6	0	1~2	0
30	6	0	6	0	1~2	0

* 反応組成：酵素 0.05 mg/ml (M/10 グエン酸-燐酸塩緩衝液 pH 3.0)

* 反応組成: 酵素 1mg/ml (M/10 クエン酸-磷酸塩緩衝液 pH 3.0)

* 反応組成: 酵素 0.05mg/ml (M/10 クエン酸-磷酸塩緩衝液 pH 3.0)

第 4 表 尿酸の添加と致死力とプロトベクチナーゼ作用

作用時間 (分)	尿酸添加量 (mg%)									
	500		250		100		50		0	
	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k
30* (3)**	0~1	0	0~1	0	0~1	3~4	0~1	4~5	0~1	4~5
45 (6)	0~1	0	0~1	0	0~1	2	0~1	3~4	1~2	3~4
60 (9)	0~1	0	0~1	0	0~1	1~2	1~2	3	2	3
75 (12)	0~1	0	1~2	0	2	0~1	2	2~3	2~3	2~3
90 (15)	1~2	0	1~2	0	2~3	0	2~3	1~2	3~3.5	1~2
pH***	<1		1		1.6		2		3	

* プロトベクチナーゼ作用時間 ** 細胞致死作用時間 *** pH 試験紙による大略の値
反応組成: 酵素 0.0025 mg/ml (M/10 クエン酸-磷酸塩緩衝液 pH 3.0), 作用温度 30°

第 5 表 分別沈澱によってえた酵素の作用力*

作用時間 (分)	アルコール沈澱						アセトン沈澱					
	~50%		50~60%		60~70%		~50%		50~60%		60~70%	
	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k	m	k
10	0~1	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5
20	3~4	1.5~2	2~3	2.5	1	4.5~5	3~4	1~2	3	2.5~3	1~2	5
30	4~5	1	3~4	2~1.5	1~2	4.5	3~4	1.5	3~4	2~2.5	1~2	5
40	5~6	1	3~4	1.5	1~2	4	5~6	1	4	0.5	1~2	5
50	6	0	5~6	0.5	2~3	2~2.5	6	0	5~6	0~0.5	1~2	4.5~5
60	6	0	6	0	2~3	2~2.5	6	0	6	0	1~2	4.5~5
収量 (mg%)	171		182		312		124		152		173	

* 酵素濃度 0.5mg/ml (M/10 クエン酸-磷酸塩緩衝液 pH 4.0), 30°

第 6 表 部分的にプロトベクチナーゼ作用を受けた
馬鈴薯切片* に対する尿酸の毒性

尿酸浸漬 時間 (分)	馬鈴薯切片の細胞死 N/10 尿酸-尿酸カリ pH			
	3		4	
	酵素処理	無処理	酵素処理	無処理
0	4	4	4	4
10	3~4	3.5~4	3~4	4
20	2~2.5	2.5~3	2.5~3	4
30	~0.5	2~2.5	1~1.5	3~4

* 酵素処理条件: 0.0025 mg 酵素/ml (M/30 クエン酸-磷酸塩緩衝液 pH 3.0), 30°, 30 分処理

1で酵素作用も極めて弱い。無添加, 100mg%, 50mg%では殆んどその酵素作用力には影響が認められず, この実験条件下の pH 範囲では尿酸は特にプロトベクチナーゼ作用を促進する結果は得られなかった。これに反して致死力は尿酸の添加量の増加と共に強くなり認められた。

5. 分別沈澱によってえた酵素標品による作用

アルコールとアセトンを用いてそれぞれ分別沈澱してえた酵素を用いて, 致死力とプロトベクチナーゼ作用

を実験した結果を酵素収量と共に第 5 表に示す。アルコール沈澱によってえられた酵素標品はやや水に難溶性であるが, アセトンを使用してえた標品は一般に易溶性であった。けれども第 5 表にみられるようにプロトベクチナーゼ作用は, アルコール沈澱によってえた標品が, アセトン沈澱でえたそれよりも作用力は強くまた沈澱剤の

第7表 蔗糖溶液中における酵素の細胞致死とプロトペクチナーゼ作用*

pH	作用 時間 (分)	蔗糖添加量 (M)							
		0.0		0.05		0.075		0.10	
		m	k	m	k	m	k	m	k
2.2	5	1~2	4~4.5	1~2	4~4.5	1~2	5	1~2	5
	10	4~5	0	4	3~4	4~5	4~4.5	4~5	3.5~4
	15	5	0	5~6	3~3.5	5	4~4.5	5	3.5~4
	20	6	0	6	1.5~2	6	2.5~3	6	3.5~4
	30	6	0	6	0.5	6	0.5	6	0.5
	45	6	0	6	0	6	0	6	0
3.0	5	1~2	5	1~2	5	1~2	5	1~2	5
	10	3~4	3.5~4	3~4	4~4.5	3~4	5	3~4	5
	15	4~5	1~1.5	5	4~4.5	4~5	4~4.5	5	4~4.5
	20	6	0.5~1	5~6	4~4.5	5~6	4~4.5	5~6	4~4.5
	30	6	0	6	4~4.5	6	4~4.5	6	4~4.5
	45	6	0	6	3.5~4	6	4~4.5	6	4~4.5
4.0	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5
	10	2	4~4.5	1~2	4~4.5	2	4.5~5	2	4.5~5
	15	3	4~4.5	2~3	4~4.5	2~3	4~4.5	2~3	4~4.5
	20	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5	3	4~4.5	3	4~4.5
	30	3~4	3.5~4	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5
	45	4	3.5~4	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5	4	4~4.5
	60	4~5	3.5~4	5	4~4.5	4	4~4.5	4~5	4~4.5
	75	5	3.5~4	5	4~4.5	4~5	4~4.5	5	4~4.5
	90	6	3.5~4	5~6	4	5~6	4	5~6	4~4.5

* M/10 クエン酸-酢酸緩衝液, 酵素濃度 1 mg/ml 反応液, 30°

第8表 KNO₃ 溶液中における酵素の細胞致死とプロトペクチナーゼ作用*

pH	作用 時間 (分)	KNO ₃ 添加量 (M)							
		0		0.05		0.075		0.10	
		m	k	m	k	m	k	m	k
2.2	5	1~2	4~4.5	0~1	4~4.5	0~1	4.5~5	0~1	5
	10	4~5	0	2~3	4~4.5	1~2	4~4.5	1~2	4.5~5
	15	4~5	0	4~5	3.5~4	2~3	4	2~3	3.5~4
	20	6	0	5~6	2.5	5	3.5	3~4	3.5~4
	30	6	0	6	0.5	5~6	1~0.5	5	1~0.5
	45	6	0	6	0	6	0	6	0
3.0	5	1~2	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5
	10	3~4	3.5~4	2~3	4~4.5	2~3	4~4.5	1~2	4~4.5
	15	4~5	1~1.5	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5
	20	6	0.5~1	5	4~4.5	5	4~4.5	5	4~4.5
	30	6	0	6	4~4.5	5~6	4~4.5	5~6	4~4.5
	45	6	0	6	4~4.5	6	4~4.5	6	4~4.5
4.0	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5	0~1	5
	10	2	4~4.5	2	4~4.5	1~2	4~4.5	1~2	5
	15	3	4~4.5	2~3	4~4.5	2~3	4~4.5	2	4~4.5
	20	3~4	4~4.5	2~3	4~4.5	2~3	4~4.5	2~3	4~4.5
	30	3~4	3.5~4	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5
	45	4	3.5~4	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5	3~4	4~4.5
	60	4~5	3.5~4	4~5	4~4.5	4~5	4~4.5	4	4~4.5

* 反応組成は第7表に同じ。

第9表 酢酸溶液中へ蔗糖の添加と細胞死の遅延

作用 時間 (分)	N/10 酢酸-酢酸カリ液 (pH 2, 30°) 蔗糖添加量 (M)		
	0	0.5	1.0
5	4.5~5	5	5
10	4~4.5	5	5
15	3~3.5	5	5
20	0.5	5	3~4
25	0	5	1~1.5
30	0	5	0

低濃度でえられた標品が活性は大である。致死力は両者共に殆んど同様の傾向を示し、60~70%の沈澱部分の活性は著しく弱い。

6. 部分的にプロトペクチナーゼを作用させた馬鈴薯切片に対する酢酸の作用 酵素溶液で一定時間馬鈴薯切片を処理した後、酢酸溶液に浸漬してその毒性をしらべた結果を第6表に示す。何れも酵素処理によって酢酸に対する感受性は大になっており、細胞死に至る時間は1/2~1/3に短縮される。

7. 酵素の致死力とプロトペクチナーゼ作用に及ぼす蔗糖及び KNO₃ の影響 蔗糖及び KNO₃ 液中で酵素を馬鈴薯切片に作用させた実験結果を第7, 8表に示した。第7表から認められるように、蔗糖はプロトペクチナーゼ作用に対しては特に影響はみられず、対照区とはほぼ同様に作用し、低い pH 領域においてより強い作用力を認める。致死力に対しては特に低い pH 下で強い影響力を示し、pH 2.2 では蔗糖無添加区が10分後に明らかに全細胞死が認められるにもかかわらず、0.1 M 添加区はなお 70~80% の生細胞が認められる。KNO₃ 添加実験では僅かながらプロトペクチナーゼ作用は弱まるが、pH 2.2, 3.0 では細胞死は著しく遅延する。

けれどもこの蔗糖などを加えた酵素液中で認められる細胞死の遅延と同様な現象が、第9表に示すように pH 2 の酢酸溶液中へ蔗糖を加えた場合の細胞死にも認められる。

III. 考 察

植物病原菌によって生産される毒素に関しては、いわゆる細胞毒⁽⁶⁾、酵素⁽⁴⁾、有機酸⁽²⁾及び uncopler⁽⁷⁾ などが知られている。寄主植物に軟腐現象をおこす植物殺生菌によってひきおこされる植物細胞の致死に関しては、有機酸をその本態とするものと、酵素にその作用を帰するものとが対立してきたが、近年は W. Brown⁽⁴⁾ 一門の酵素説が一般に認められてきた。白網病

菌は強力でかつ重要な植物殺生菌であるが、この病原菌は旺盛な蔞酸醱酵を営むと共に、強力なプロトペクチナーゼを分泌する。従って本菌によって観察される細胞致死作用は、蔞酸によるものとする考えと⁽²⁾、酵素または酵素様物質の存在に起因するものとする考え⁽⁹⁾が提案された。著者らは本菌の炭水化物代謝経路を明らかにすると共に⁽⁹⁾、細胞致死作用の本態を究明する目的で一連の研究を行ってきた⁽¹⁰⁻¹³⁾。その結果白絹病菌培養液中には強力な細胞致死物質と呼吸阻害物質及びプロトペクチナーゼ作用の存在を示し、酵素作用と細胞致死作用は多くの場合常に平行して現われ、両者を区別することは困難であることを知った。すなわち旺盛な蔞酸醱酵が行われる時には、常に強力なプロトペクチナーゼ作用が随伴し、またプロトペクチナーゼが強力に作用する条件下では常に細胞致死力も大である。培養液の組成、培養温度、作用温度などを変化して実験しても、或いはまた透析中和などの処理によっても殆んどの場合プロトペクチナーゼ作用、呼吸阻害作用、細胞致死力を区別することはできなかった。この結果は白絹病菌の生産するプロトペクチナーゼが著しい酸性下にその最適作用力を示し中性付近では全くその活性を示さぬことにもよる。白絹病菌からプロトペクチナーゼ標品を調製し、馬鈴薯に作用させると、明らかに呼吸阻害を示し組織は崩潰し遂には細胞死に至り、呼吸は全く認められなくなる。

この酵素作用後に認められる細胞死は、反応の pH が低い場合により短時間で達成される。このことは酵素作用が低い pH でより活性に作用した結果とも考えられるが、一方酵素を含まぬ同一反応液でも又低い pH で同様な呼吸阻害と細胞死が認められる。プロトペクチナーゼ作用が尚認められる比較的高い pH 下で酵素を馬鈴薯切片に作用せしめるときは、酵素を含まぬ反応液では全く呼吸阻害も細胞死も認められぬ時間内で、明らかな呼吸阻害と細胞死を観察する。この作用力は透析その他の操作によってもプロトペクチナーゼ作用と分別することはできず、この試料中には酵素以外の細胞毒はまず含まれていないものと考えられる。これらの結果は、細胞死はプロトペクチナーゼそのものによってひきおこされることを暗示しており、著者らもこの実験条件下ではプロトペクチナーゼ作用の結果細胞死がおこるものとする。

白絹病菌からえられた酵素標品のプロトペクチナーゼ作用の最適 pH は 2~3 の極めて低い値を示し、酵素量と致死力の関係をみると、高い酵素濃度では短時間内に強い致死力が認められるが、この作用は明らかにプロトペクチナーゼ作用によるものと考えられる。なぜならば既に報告したように、この反応 pH と作用時間内で酵素が加えられぬ場合には、殆んど細胞死は認められぬからである。低酵素濃度では、組織の崩潰よりも細胞死が先行する。これは反応液の pH が 3.0 であることから考え合せて、馬鈴薯切片が部分的に酵素作用をうけた後の低い pH による細胞死であると思われる。或る酵素濃度の間では、酵素量とプロトペクチナーゼ作用の間に直線関係がみられるが、斎藤⁽¹⁴⁾はデポリメリックガラクトウロナーゼも各酵素濃度で一定時間作用してえられる値を酵素濃度の対数値から作図して直線関係のあることを認めている。酵素標品のプロトペクチナーゼ作用は 5~10° の比較的低温下でも十分活性を示し、寄主植物の組織崩潰力を示すが、かかる低温では白絹病菌は生育が不可能で⁽¹⁰⁾、菌糸の生長、プロトペクチナーゼ、蔞酸の分泌が認められず、寄主植物を自然条件下では侵害しえないものと考えられる。

反応液中へ蔞酸を pH 2 以下にまで添加すると、プロトペクチナーゼ作用はかえって阻害される。この時認められる強い細胞死はプロトペクチナーゼとの協同作用の結果ではなくして、蔞酸の添加による反応液の pH の低下に伴う細胞死と考えられる。したがって白絹病菌の生産する蔞酸は、自己の分泌するプロトペクチナーゼ作用を最も好適な pH 環境下におく程度に生産されると共に、他方強力な致死作用を営むものとする。Tribe⁽¹⁵⁾は植物組織が原形質分離をおこすような化合物の高濃度溶液中では、バクテリアからえた酵素標品による細胞致死力は大きく弱まるが、組織崩潰力は殆んど関係なくひきおこされることを認めた。その後 Fushtey⁽¹⁶⁾も *Bact. aroidae* と *Bot. cinerea* からえた酵素を使用してかかる事実を確めた。白絹病菌からえた酵素溶液中へ蔗糖、KNO₃などを添加すると、プロトペクチナーゼ作用とは無関係に細胞死の遅延が認められるが、この結果はプロトペクチナーゼ作用、即ち細胞致死作用ではないことを示す実験結果として注目される。このことは細胞死とプロトペクチナーゼ作用は別個であると考え、白絹病菌の細胞致死物質は蔞酸であるとする著者らの結論⁽¹³⁾を支持するものである。プロトペクチナーゼ作用をうけた植物の組織細胞が、或る実験条件下で死ぬからといって、それが直ちにその病原菌はプロトペクチナーゼによって殺すものであるとは断定し難い。なぜならば自然条件下で病原菌によって植物細胞が殺される場の外的、内的条件は、人為的条件に比して遙かに複雑であることは想像に難くないからである。プロトペクチナーゼ作用をうけて組織が崩潰し細胞死に至る場合は、いわゆる細胞毒によ

る細胞死とは全く異なるものであり、蔗糖溶液中でプロトペクチナーゼ作用をうけた細胞が、組織崩壊をおこした後にもなお或る程度細胞死への時間が延びるのは、蔗糖溶液によって細胞原形質が或る保護をうけている結果ではなからうか。この実験結果から標品中のプロトペクチナーゼ作用と細胞死をひきおこす物質は、それぞれ別個であると考えよりは、酵素標品中にはいわゆる細胞毒は存在しないものと考え。けれどもこの結果プロトペクチナーゼ作用は、細胞致死とは全く無関係であるとは考えない。なぜならばプロトペクチナーゼ作用をうけ個個に切り離された細胞は、自然状態とは遙かにかけはなれた理化学的条件におかれ、早晚細胞死への転移をとり、或いはまた部分的にプロトペクチナーゼ作用を受けた組織細胞は、低濃度の蓚酸によっても明らかに呼吸の阻害、細胞死を認めるからである。

以上の実験結果から著者らは白絹病菌の細胞致死物質はその代謝産物である蓚酸であり、しかしこの蓚酸のみにても白絹病菌は十分に細胞致死を遂行するが、同時に分泌されるプロトペクチナーゼの協同作用によって、より強力かつ急速な細胞致死作用を示すと共に、本疾病の病徴である軟腐症を呈するものであると思料する。

IV. 結 論

白絹病菌から粗酵素標品を調製し、馬鈴薯切片に対するプロトペクチナーゼ作用と細胞致死力について実験した。

粗酵素標品のプロトペクチナーゼ作用は pH 2~3 において最も強く、pH 6 以上では殆んどその作用を認めない。細胞致死力もまた低い pH においてより強い。50° までは作用温度の上昇と共にプロトペクチナーゼ作用は大きくなるが、60° では極めて弱い。細胞死は作用温度の上昇と共に大きくなる。

反応液中への蔗糖の添加は、粗酵素標品のプロトペクチナーゼ活性には殆んど影響ないが、細胞致死力は大きく減退する。遊離の蓚酸は一定の条件下では、プロトペクチナーゼ作用を促進しない。部分的にプロトペクチナーゼ作用をうけた馬鈴薯切片は、蓚酸の毒性に対する感受性が酵素作用をうけなかったものに比して大である。

(1) 永田幸雄, 林 金雄 : 本誌, 35, 399(1961).	(8) 黒田佐俊 : 農業技術, 11, 255 (1955).
(2) B. B. Higgins : <i>Phytopath.</i> , 17, 417(1927).	(9) 永田幸雄, 林 金雄 : 本誌, 30, 248(1956).
(3) 永田幸雄, 林 金雄 : 日農化会大会要旨, p. 66 (1959).	(10)~(13) 永田幸雄, 林 金雄 : 本誌, 35, 307 395(1961); 投稿中.
(4) W. Brown : <i>Ann. of Bot.</i> , 29, 313(1915).	(14) 斎藤日向 : 本誌, 28, 814 (1954).
(5) 永田幸雄, 林 金雄 : 本誌, 35, 301(1961).	(15) H. T. Tribe : <i>Ann. of Bot.</i> , 19, 351(1955).
(6) E. Gäumnn : <i>Adv. in Eng.</i> , 11, 401(1951).	(16) S. G. Fushtey : <i>ibid.</i> , 21, 273 (1957).
(7) 瓜谷郁三, 赤沢 堯 : 本誌, 28, 205(1953).	

〔農化 第 35 卷, 第 6 号, p. 498~501, 1961〕

タバコ葉の褐変に関する研究 (第3報)* 品種間差異について

松 山 晋 (日本専売公社岡山たばこ試験場)

昭和 35 年 8 月 25 日 受 理

緒 言

黄色種タバコの中には収穫後の鉄管乾燥中に褐変現象が現われやすい品種と、現われにくい品種があるが、このような特性をもった 4 品種を供試して、かかる褐変現象発現の難易が品種特性のいかなる差異によるものかを検討し、あわせて鉄管乾燥中に現われる褐変現象に関与する因子を明らかにしようとして本実験を試みた。本実験に用いた黄色種の var. Bright Yellow は比較的褐変現象を起し易い品種であり、他の 3 品種は褐変現象の現われにくい品種で、とくに var. Yellow Special A は乾葉の鮮黄度がきわめて強い品種である。

実験材料および方法

1. 材料 1957 年 (4 月 10 日移植) 当場圃地において栽培された黄色種の var. Bright Yellow, var.

* Studies on the Browning of Tobacco Leaves. Part III. Varietal Differences.

By Susumu MATSUYAMA (Okayama Tobacco Experiment Station, Japan Monopoly Corporation)