のり赤腐れ病の治ゆ中における葉体の細菌相と 構成成分の変化

野田 宏行・天野 秀臣
太田 扶桑男・堀口 吉重

(1979 年 4 月 16 日受理)

Changes in bacterial flora and in chemical constituents
of red rot infected-laver, *Porphyra yezoensis*, during
treatment with histidine

Hiroyuki NODA^{*1}, Hideomi AMANO^{*1}, Fusao OHTA^{*2},
and Yoshishige HORIGUCHI^{*1}

These experiments elucidated the mechanism involved in the activity of histidine in curing "akagusare", or red rot disease, of the laver *Porphyra yezoensis*. The infected frond was cultured in seawater containing histidine or some amino acids for reference. The bacterial flora on the frond and its chemical constituents were analysed.

Results showed that *Flavobacterium* was the most predominant, followed by *Alcaligenes*, irrespective of the added amino acid and of the length of treatment. In the histidine-treated frond, the levels of photosynthetic pigments such as chlorophyll, phycoerythrin and phycocyanin, and of free amino acids were increased significantly.

前報¹⁾で赤腐れのりを低濃度のヒスチジンの存在下において、12 時間以上培養すると治ゆ効果がみられ、かつその効果が少なくとも 2 週間持続すること、およびヒスチジンは *in vitro* では赤腐れ菌系の発育阻止作用を示さないことなどを明らかにした。以上の事実から海水に添加したヒスチジンは、のり表面の化学環境を改善して栄養塩の吸収を円滑にしたり、あるいは赤腐れ葉体に吸収、代謝されてのり自体の抵抗性が高まり、それらの結果として疾病が治ゆされるものと推察される。

そこで、赤腐れのり病葉をヒスチジンをはじめある程度の治療効果が認められたチロシンとメチオニン、さらに比較のため治療効果がみられなかつたアルギニンなど二、三のアミノ酸の存在下で培養後、葉体表面の細菌相と葉体成分の変化を調べ、赤腐れ治ゆおよび防除の機構を解明する手掛りを得ようと試みた。

試料と実験方法

試料と培養方法 試料は前報¹⁾同様に、熊本県宇土郡三角町の熊本県のり研究所で室内採苗したスサビノリ (*Porphyra yezoensis*) を赤腐れ病に感染させたものを

用いた。そのほか、熊本県飽託郡河内町地先の養殖場で採集した野外養殖のりも供試した。培養海水と培養方法は前報¹⁾記載のとおりである。

葉体付着細菌の検索 Tween-80 10 ppm と海砂 1 g を添加した振落し用滅菌人工海水 ASP6 10 ml をネジ口試験管に入れ、常法により 120°C で 15 分間加熱滅菌した。アミノ酸の添加培養を終了した葉体は無菌箱中で 1 cm 円に打ち抜いて海水に浮遊し、上下に激しく 200 回振盪して葉面から細菌を振落した。この液を 10, 10², 10³ 倍に希釈して、各希釈液 1 ml を Zobell 2216E²⁾ の重層混和平板培地に移して細菌を分離した。25°C で 4 日間培養後、10³ 倍に希釈した培地上のコロニーの形状、隆起、粗滑、色調、透明度等の性状に基づいて分け、計数後、各細菌を Zobell 2216E 培地に白金線で線条にひいて植え付けた。斜面培地で 25°C, 18~20 時間純粋培養した菌につき、グラム染色、運動性能、鞭毛染色を実施すると共に、OF テスト、オキシダーゼテストおよび色素産生能など生化学検査に付し、その諸結果から清水³⁾の図式に従って分離菌を同定した。なお、結果は同定した菌の割合で表示した。

^{*1} 三重大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Mie University, Tsu, Mie Prefecture 514).

^{*2} 熊本県のり研究所 (formerly Kumamoto Prefectural Laver Research Laboratory, Misumicho, Udogun, Kumamoto Prefecture 869-32).

葉体成分の定量 クロロフィルは 80% アセトン抽出液を、フィコエリスリンおよびフィコシアニン水抽出液を、それぞれ調製して定量した⁴⁾。次に、試料を 75% 熱エタノールで 3 回抽出し、減圧濃縮後ジエチルエーテルで脱脂、脱色して再び濃縮し、一定容にし、遊離アミノ酸および糖の定量に供した。遊離アミノ酸総量は YEMM-COCKING 法⁵⁾により測定した。さらに常法により上記の供試液を日立アミノ酸自動分析計 KLA-5 型に付して遊離アミノ酸組成を調べた。他方、エキス成分調製時の残渣は 6N 塩酸で 110°C、24 時間加水分解後、前記分析計によりそのアミノ酸組成を調べた。糖は陰、陽両イオン交換樹脂に上記の供試液を通して得た中性画分をフェノール硫酸法⁶⁾に付して測定した。

実験結果と考察

アミノ酸添加培養によるのり葉面細菌相の変化 のり正常葉体の表面には湿重量 1 g 当り $10^3 \sim 10^5$ の、また、り病葉体には $10^6 \sim 10^7$ 程度の細菌が着生、増殖しているとされているが⁷⁾、葉体を無菌的に培養すると生長が抑制され、葉形が糸状や塊状に変化することはよく知られた事実である。TSUKIDATE^{8,9)} はのりの生育にとって細菌は栄養素の供給、毒物の中和、細胞表面の化学環境の安定化などに重要な役割を果たしている。同氏はさらに、細菌はのりからアミノ酸など栄養素の供給を受け、添加アミノ酸の種類によつてのりの生育に有利な菌相に変化したり、阻害的な菌相になったりと推測している。そこで、赤腐れ葉体をヒスチジン添加海水で培養すると、葉体表面の細菌相が変化し、それに伴つて微環境が改善され、栄養塩などの吸収が円滑に進行する結果、赤腐れ菌系が防除されるのではないかと考えられた。

赤腐れり病成葉を 22 日間培養後、対照区とアミノ酸添加区の細菌相を比較した。葉体表面から分離同定された細菌はグラム陰性の *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, および *Pseudomonas* の 3 種であつた。Fig. 1 に示すように対照区では *Flavobacterium* が 98% と圧倒的な比率を示し、残部を *Alcaligenes* とごく僅かな *Pseudomonas* 属が占めていた。しかしアミノ酸処理すると *Flavobacterium* の割合がヒスチジン区は 54%, チロシン区は 83%, メチオニン区は 48%, アルギニン区は 65%, シスチン区は 77%, グルタミン酸区は 79% と、いずれもかなり減少し、逆に *Alcaligenes* 属の割合が高くなった。正常葉体の場合にもほぼ同様の結果が得られた。

このように、正常およびり病葉ともに低濃度のアミノ酸で添加処理すると、表面の菌相が変化した。ただし、

Fig. 1. Generic percentage distribution of heterotrophic bacteria isolated from red rot-infected lavers kept for 22 days in mineral-enriched seawater containing respective amino acids at 10 ppm.

Fig. 2. Generic percentage distribution of heterotrophic bacteria isolated from red rot-infected lavers kept for 5 days in mineral-enriched seawater containing respective amino acids at 10 ppm.

これは赤腐れ病に有効なアミノ酸にのみ特有な現象ではなく、無効だつたり、むしろ病気を促進するアミノ酸にも共通して認められた。

一方、野外から室内に移した重症のり病葉体に前記 6 種類のアミノ酸を 10 ppm 添加培養したところ、対照区の葉体の傷みが激しく、部分的に腐敗脱落してきたので 5 日間で取り上げた。ヒスチジン区の葉体を検鏡すると赤腐れ病は既に抑制され、病患部は回復していた。

Fig. 2 に示すように、菌相は全試験区で *Flavobacterium* 属が 90% を超える状態になり、対照区とヒスチジン区に菌相の相違は認められなかつた。ちなみに芝ら* も筆者らと同一の培地を用いて各種海藻体表面の菌相を調べ、常に *Flavobacterium* が優先したと報じている。TSUKIDATE⁸⁻¹⁰⁾ は培養のりから *Aeromonas*,

* 芝 恒男・多賀信夫：昭和 50 年度日本水産学会春季大会講演要旨集，p. 90.

Table 1. Contents of some chemical constituents of red rot-infected lavers which were treated for 23 days in mineral-enriched seawater containing respective amino acids at 10 ppm.
(mg/100 g on dry basis)

Additive	Constituent				
	Chlorophyll	Phycocerythrin	Phycocyanin	Free amino acid	Free sugar
Control	472	1650	1840	2620	580
Histidine	521	1990	2000	3780	920
Tyrosine	492	1610	1720	3240	708
Methionine	508	1850	1960	3440	612
Arginine	490	1490	1680	3480	600
Cystine	485	1650	1750	3390	592
Glutamic acid	435	1600	1510	2700	548

Table 2. Free amino acid composition of red rot-infected lavers which were treated for 23 days in mineral-enriched seawater containing respective amino acids at 10 ppm.
(% on dry basis)

Amino acid	Additive				
	Control	Histidine	Tyrosine	Methionine	Glutamic acid
Alanine	750	892	726	746	609
Aspartic acid	75	108	84	95	94
Asparagine	143	142	110	141	154
Citrulline	230	215	173	180	76
Glutamic acid	335	394	346	321	283
Glycine	31	9	13	28	32
Isoleucine	6	6	8	8	7
Leucine	12	9	12	13	14
Lysine	13	6	8	10	8
Phosphoserine	23	14	15	23	12
Serine	25	44	26	38	39
Taurine	749	897	777	731	736
Threonine	13	12	24	42	34
Tyrosine	trace	trace	9	9	10
Valine	13	9	12	12	13
Total	2418	2757	2343	2397	2121

Staphylococcus, *Bacillus*, *Flavobacterium* を分離し、とくに *Aeromonas* の菌数が多いと報告している。さらに、養殖のりから *Enterobacter*, *Xanthomonas* 等 16 種類の細菌を分離している¹¹⁾。

前記のように 10 ppm のアミノ酸を含む培地で長期間培養すると、葉体表面の共生細菌相が著明に変化することを確かめた。ただし、この変化は赤腐れ病に対する効力に関係なく、いずれのアミノ酸添加区でも認められ、また 5 日間という短期間の培養によつて赤腐れ病が治ゆした後も菌相は対照区と変りなかつた。従つてヒスチジンの赤腐れ病治ゆないし防除作用が葉体表面の細菌相の変化と関連する可能性はいまのところ小さい。

アミノ酸添加培養中における葉体の各種成分の変化
ヒスチジンは赤腐れ菌糸の発育を促進するにもかかわら

ず、疾病の治療と予防に著効を発揮する¹⁾。培地に添加したヒスチジンは病葉体に吸収、代謝され、その結果として葉体が抵抗性を獲得し、疾病が治療される可能性が強い。抵抗性発現機構の解明に先立つて、各種の葉体成分の中で、のりの光合成に関与する色素からクロロフィル、フィコエリスリン、フィコシアニンの 3 者、および光合成の初期産物である遊離アミノ酸と糖を選び、アミノ酸添加培養中におけるその消長を調べた (Table 1)。

光合成色素中、クロロフィルについてはヒスチジン区およびチロシン区で対照区に比べて 10% 程度増加がみられた。フィコエリスリン含量は対照区に比べてヒスチジン区が約 20% 多く、アルギニン区が 10% 少ないが、他の試験区では有意差はなかつた。フィコシアニンはヒ

Table 3. Amino acid composition of the insoluble residue of red rot-infected lavers which were treated for 23 days in mineral-enriched seawater containing respective amino acids at 10 ppm. (% on dry basis)

Amino acid	Additive				
	Control	Histidine	Tyrosine	Methionine	Glutamic acid
Alanine	3.3	3.7	3.3	3.2	2.9
Arginine	2.3	2.5	2.2	2.6	2.5
Aspartic acid	3.5	3.8	3.3	3.3	3.8
Cystine	0.4	0.6	0.5	0.7	0.7
Glutamic acid	3.3	3.7	3.2	3.3	2.9
Glycine	2.6	2.8	2.5	2.6	2.9
Histidine	0.5	0.6	0.5	0.7	0.5
Isoleucine	1.5	1.6	1.5	1.6	1.6
Leucine	2.7	2.9	2.6	2.8	2.8
Lysine	2.8	2.2	1.9	2.3	2.1
Methionine	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6
Phenylalanine	1.5	1.9	1.5	1.6	1.6
Proline	1.7	1.8	1.7	1.7	2.0
Serine	1.7	1.9	1.9	1.9	1.9
Threonine	2.0	2.2	1.6	2.0	2.3
Tyrosine	1.3	1.8	1.3	1.3	1.3
Valine	2.5	2.7	2.4	3.0	3.0
Total	34.1	37.3	32.5	35.2	35.4

スチジン区が 10% 前後高く、逆にグルタミン酸区が 20% 低い値を示すのが目立つた。遊離アミノ酸含量はすべての試験区で対照区を上回り、とりわけヒスチジン区が 44% 増を示し注目された。また、糖含量は対照区よりヒスチジン区が 59%, 次いでメチオニン区が 22% 上回っていたが、他の試験区では有意差は認められなかった。

次に、各試験区のエキシアミノ酸組成を Table 2 に示す。エキス総量ではヒスチジン区が対照区より 14% 増加した。アミノ酸を個別にみると、アラニンとタウリンが約 20%, グルタミン酸が 18%, アスパラギン酸が 34% およびセリンは 74% 高くなっているが、他のアミノ酸はむしろ対照区より低い値であつた。対照区に比してチロシン区はアスパラギン酸とシトルリンが、メチオニン区ではシトルリンが、グルタミン酸区はアラニンとシトルリンが減少していたが、他のアミノ酸には顕著な相違がみられないようである。

エキス抽出残渣のアミノ酸組成を Table 3 に示す。アミノ酸の総量はチロシン区のみで対照区より低いが、ヒスチジン区は 10%, メチオニン区とグルタミン酸区は 4~5% いずれも高い。

以上のように、赤腐れのり葉体をヒスチジン処理すると、クロロフィル、フィコエリスリン、フィコシアニン量が対照区をはじめ他試験区を上回って回復が著しかった。また、エキシアミノ酸の蓄積も著しく、とくにアミ

ノ酸生成の要めの役割を果すグルタミン酸、アラニンおよびアスパラギン酸が増大することは興味深い。同時に抽出残渣中のアミノ酸量も上昇するところから、ヒスチジン添加のりは他試験区ののりに比較して病斑部が回復して代謝が活発になつているようにみえる。したがって、ヒスチジンは病葉に取り込まれて代謝され、赤腐れ病の治癒ないし防御物質の産生に利用されるものと思われ、目下この点を検討中である。

本研究を行なうに当り、原稿を校閲して下さつた東京大学農学部橋本周久教授に厚くお礼申し上げる。また、アミノ酸分析をしていただいた東京大学農学部渡辺勝子氏に感謝の意を表する。本研究は一部文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) 野田宏行・天野秀臣・太田扶桑男・堀口吉重: 日水誌, **45**, 1155-1162 (1979).
- 2) C.H. OPPENHEIMER and C.E. ZOBELL: *J. Mar. Res.*, **11**, 10-18 (1952).
- 3) 清水 潮: 海洋微生物 (多賀信夫編), 東大出版会, 東京, 1974, pp. 45-65.
- 4) 天野秀臣・野田宏行: 日水誌, **44**, 911-916 (1978).
- 5) E.W. YEMM and E.C. COCKING: *Analyst*, **80**, 209-212 (1955).
- 6) 福井作蔵: 還元糖の定量法, 東大出版会, 東京,

- 1969, pp. 44~47.
- 7) 藤田雄二・小野原隆幸・松原孝之・銭谷武平：
長崎大水研報，No. 36, 61-68 (1973).
- 8) J. TSUKIDATE: *Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab.*, No. 3, 19-22 (1970).
- 9) J. TSUKIDATE: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*,
37, 376-379 (1971).
- 10) J. TSUKIDATE: *Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab.*, No. 4, 1-12 (1971).
- 11) 月舘 潤一：のりの病気，恒星社厚生閣，東京，
1973, pp. 105-113.