抗糸状菌剤に関する研究 (第6報¹⁾) 糸状菌胞子発芽時の
生理, 生化学的研究 その 3¹⁾

黒田久寅, 徳広真知子

神戸女子薬科大学²⁾

Studies on Fungicides. VI.¹⁾ Physiological and Biochemical
Studies on Germinating Fungal Spores. (3¹⁾)

HISATORA KURODA and MACHIKO TOKUHIRO

Kobe Women's College of Pharmacy²⁾

(Received August 25, 1967)

The conidia of *Cochliobolus miyabeanus* was incubated in distilled water and variation in the spore substances with germination was followed. In the first stage of germination and germ-tube forming stage, soluble carbohydrate was consumed, with increase in amino acids, RNA, and fatty acids. In the germ-tube elongation stage, insoluble carbohydrates decreased, and the sterol fraction containing ergosterol and glucose began to increase. Over 70% of soluble carbohydrate was trehalose, which underwent active metabolism since the start of incubation, and decreased to one-third the original amount within 15 minutes. From these facts, it was considered that trehalose is the most important metabolic substrate in the first stage of germination.

前報²⁾において *Cochliobolus miyabeanus* 分生胞子の発芽過程が, 発芽活動初期, 発芽管形成期, 発芽管伸長期の3期にわけられること, 3期を通して細胞内燐の分布に大きな変動が認められないことなどを報告した。そこで胞子内諸物質の発芽に伴う量的変化を追究することによって, 発芽代謝基質を決定し, さらにその代謝経路を推定する目的をもって本実験を開始した。

実 験 の 部

実験方法

実験材料 前報¹⁾と同様の方法によって得た *Cochliobolus miyabeanus* 分生胞子を 30° の蒸留水にけんだくし (胞子濃度 250 mg/50 ml) 振とう培養する。(30°) 一定時間ごとにこれを取り, グラスフィルターでろ集し, 4° 以下の蒸留水で洗浄し, 一部を鏡検して発芽率を検するとともに, 残部をただちに凍結乾燥して分析試料とした。

分 画 各発芽段階の胞子を Chart 1 にしたがって分画した。1. 分析試料約 100 mg を精秤し, アセトンおよび4倍量のガラス粒を加え乳鉢で磨砕し, さらにアセトンを加えて一夜放置後 5 min 遠沈する (3000 rpm)。2. 1 で得た沈殿を, MeOHCHCl₃ 混液 (1:1) 10 ml ずつで 3 回 10 min 加熱抽出し, 遠沈する。3. 2 で得た沈殿を 4° 以下の 5% 過塩素酸 10 ml ずつで 3 回冷時抽出し遠沈する。4. 3 の沈殿に 5% 過塩素酸 10 ml ずつを加え, 3 回 80° で 30 min 熱抽出し遠沈する。この上澄液を 50 ml とし核酸分画とする。沈殿は, さらに N NaOH 10 ml ずつで 3 回熱抽出し, たんぱく質分画とする。5. 1, 2 の上澄液を合せて溶媒を留去後, 残留物をアセトンで抽出し, 25 ml としステロール, 脂肪酸エステル, 脂肪酸分画とする。アセトン不溶物を CHCl₃ に溶解し 25 ml とし燐脂質分画とする。別に分析試料 20 mg を磨砕し, 0—4° において 5% トリクロ酢酸 10 ml ずつで 3 回抽出し, 可溶性炭水化物, アミノ酸分画とする。また分析試料 20 mg を磨砕し, 72% H₂SO₄ 10 ml を加えて一夜放置後遠沈し, さらに沈殿物を 2 回 72% H₂SO₄ で抽出し, 抽出液を合せて総炭水化物分画とする。

定量法 各分画をつぎの方法にしたがって, () 内の物質を標準物質として定量した。たんぱく質, Lowry

1) 第5報, その2: 薬誌, 88, 101 (1968); 日本薬学会第87年年会で発表, 京都, 1967年4月。

2) Location: Motoyama-cho, Higashinada-ku, Kobe.

Chart 1. Fractionation of Cellular Materials in Germinating Spores

の方法³⁾ (牛アルブミン); RNA, オルチノール法⁴⁾ (酵母 RNA); DNA, インドール法⁵⁾ (サケ精液 DNA); ステロール, Sobel の方法⁶⁾ (エルゴステロール); 脂肪酸エステル, ヒドロキサム酸法⁷⁾ (パルミチン酸メチル); 脂肪酸; 検液を EtOH 溶液として, フェノールフタレインを指示薬として 0.01N NaOH で滴定し, 滴定値をもって脂肪酸量とした. 磷脂質, 60% 過塩素酸を加えて加熱分解後, 中村の方法⁸⁾ で磷を定量した. (レンチン); 糖および総炭水化物, アンスロン法⁹⁾ (グルコース); アミノ酸, ニンヒドリン法¹⁰⁾ (グルタミン酸); グルコース, Glucostat reagent 法 (Worthington Biochemical Co. 製) (グルコース).

薄層クロマトグラフィー (TLC と略記する) ステロールの分離, kieselgel G (Merck 社製) の 250 μ 厚さのプレートをつくり, 110° で 30 min 活性化し, 10% ウンデカン-石油エーテル溶液に 1 min 浸し, 1 hr 風乾する. このプレートに試料の CHCl₃ 溶液をスポットし, 酢酸-水 (90:10) の溶媒で展開する. 展開後 1 hr 風乾し, さらに 90° で 45 min 乾燥後, 10% 磷モリブデン酸-EtOH 溶液を噴霧し, 90° で 10 min 加熱して発色せしめた.

炭水化物の分離, Kieselgel G, 250 μ のプレートに試料をスポットし, *n*-BuOH—AcOH—H₂O (6:3:1) の溶媒で展開し, 風乾後アンスロン試薬またはアンモニア性硝酸銀液¹²⁾ を噴霧し, 100° 10 min 加熱して発色せしめた.

ペーパークロマトグラフィー (PPC と略記する) 東洋汙紙 No. 51 に試料をスポットし, 酢酸エチル-ピリジン-水 (12:5:4) を用いて展開し, 風乾後アンモニア性硝酸銀液¹²⁾ を噴霧し, 100° で 10 min 加熱して発色せしめた.

ステロールの分離 12 hr 蒸留水中で発芽培養し, 凍結乾燥した孢子 100 mg をガラス粒とアセトンを加えて乳鉢で磨砕後, CHCl₃—MeOH (1:1) 混液 10 ml ずつで 3 回熱抽出し, 抽出液を合せて溶媒を留去後 EtOH 50 ml, KOH 液 (KOH 100 g に水を加えて 100 ml とする) 15 ml を加え, 30 min 還流してけん化する. 不けん化物を石油エーテル 150 ml で抽出し, フェノールフタレインで中性になるまで水洗し, 無水硫酸ナトリウム 5 g を添加して脱水後, 溶媒の大部分を留去する. これをアルミナカラム (1×12 cm) に添加し, 3% アセトン-

3) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

4) A.H. Brown, *Arch. Biochem.*, **11**, 269 (1946).

5) G. Ceriotti, *J. Biol. Chem.*, **214**, 59 (1955).

6) A.E. Sobel, A.M. Mayer, B. Kramer, *Ind. Eng. Chem. (Analytical Edition)*, **17**, 160 (1945).

7) 春日誠次, 土田雅子, 榊下町 醇, 生化学, **32**, 367 (1960).

8) 中村道徳, 農化, **24**, 1 (1950).

9) D.L. Morris, *Science*, **107**, 254 (1948).

10) E.W. Yemm, E.C. Cocking, *Analyst*, **80**, 209 (1955).

11) L. Hough, *Nature*, **165**, 400 (1950).

石油エーテル溶液で溶出し、溶出液を 3 g ずつ分取した。

トレハロースの分離 孢子 2.0 g をガラス粒とともに磨砕し、80% EtOH 50 ml を加えて約 2 hr 還流する。抽出液を集め、濃度が 5% となるようにトリフルオロ酢酸を加えて一夜放置し、沈殿を遠沈により除き、上澄液を減圧濃縮し、Sephadex G-10 のカラム (1.5×100 cm) に添加して蒸留水で溶出した。(溶出速度 10 ml/hr)。溶出液を 5 ml ずつ分画し、分画番号 11—13 を集めて減圧濃縮し、MeOH を加えて 4° 以下に放置し、析出する無色柱晶を MeOH から再結晶した。mp 97°, $[\alpha]_D^{20} +178.2^\circ$ (水を溶媒とする) 収量 120 mg。

アセチル化 孢子より得た無色柱晶 (mp 97°) 50 mg に Ac_2O 5 g, ZnCl_2 0.5 g を加え、120° で 60 min 還流する。冷後反応液を多量の氷水中に投入し一夜放置する。生成した褐色樹脂状物を CHCl_3 で抽出し、10% Na_2CO_3 液で洗浄後、さらに中性を呈するまで水洗し溶媒を留去する。残留物を活性炭と MeOH で精製し無色の針晶を得た。mp 101—102°, $[\alpha]_D^{20} +162.1^\circ$ (CHCl_3)。

結果および考察

実験に使用した孢子の発芽状態は Fig. 1 のようであった。30° の蒸留水中において、発芽管形成は培養開始

Fig. 1. Germination of Conidia of *Cochliobolus miyabeanus*

後 30 分頃よりはじまり、60 分でほぼ完了しており発芽管長の平均値も、60 分以後は急増して発芽管伸長期に入っていることを示している。したがって本報告では、培養開始後 0—30 分を発芽活動初期、30—60 分を発芽管形成期、60 分以後を発芽管伸長期としてとりあつかうことにした。その間の発芽活動は自家栄養源のみに依存して行なわれているため、菌体の乾燥重量は発芽に伴ってむしろ減少する傾向を示している。これら各発芽段階の孢子を Chart 1 のように分画し、各分画について () 内の物質を定量し、その量的変化を追跡することによって発芽時の代謝基質を推定しようとした。

孢子の発芽に伴うたんぱく質、アミノ酸、核酸の量的変化をもとめ Fig. 2 を得た。たんぱく質は発芽活動初期に、わずかに減少したが、発芽管形成期以後は増加を続けている。冷酸可溶性のニンヒドリン反応陽性物質をアミノ酸として定量した結果 (標準物質; グルタミン酸)、培養初期から急激な増加を示し、約 60 分後を頂点としてそれ以後は減少している。発芽活動初期のたんぱく質の減少にくらべてアミノ酸の増加量ははるかに大きく、たんぱく質の分解によりアミノ酸が蓄積されたとは考え難く、発芽活動初期からアミノ酸合成が活発に行なわれているものと推定される。しかし蒸留水中で発芽させており外部からのチッ素の補給は考えられず、このアミノ態チッ素の増加が細胞内のどのような形のチッ素化合物に由来しているのか不明である。RNA はたんぱく質が急増した時期に平行して増加したが、それ以後はほぼ一定した値を示している。DNA にも大きな変化は起こ

Fig. 2. Protein, Amino Acid, RNA, DNA content in Conidia at Different Stages of Germination

Fig. 3. Fatty Acid, Fatty Acid Ester Content in Conidia at Different Stages of Germination

Fatty acid represents the titration value with 0.01N NaOH

ていない。一般に胞子の発芽時には、細胞が多核化するのが普通であり、DNA 増加が培養開始後 3 時間までにほとんど認められない理由については、現在核染色による形態的観察とあわせて検討しつつある。

Fig. 3 は脂肪酸および脂肪酸エステルに関するものである。脂肪酸は 0.01N NaOH の滴定値をもって示したが、発芽活動初期にやや急激な、そしてそれ以後はゆるやかな増加を示している。小笠原等¹²⁾ はイモチ菌胞子の発芽において乳酸が蓄積されることを、Gottlieb 等は¹³⁾ *Penicillium atrovirens* の発芽時脂肪酸が増加することを報告している。本菌胞子の場合、後述するように炭水化物が発芽初期に急激に消費され、また R.Q. が常に高い値を示していたこと¹⁾ などからも、有機酸の蓄積は予想されたことである。脂肪酸エステルは培養期間を通してほとんど変化しなかった。

Fig. 4 は磷脂質，ステロール分画に関するものである。磷脂質には著明な量的変化を認めなかったが、ステロール分画は発芽管伸長期になってから急激に増加し、24 時間目には最初の約 3 倍量に達している。Gottlieb 等¹⁴⁾ はサビ病菌の uredospore を蒸留水中で発芽させるとき、エルゴステロールその他の不けん化脂質が培養開始後 18 時間目まで増加することを報告しているが、本菌胞子もまた 24 時間にいたるまで増加をつづけていた。このステロール分画について、ウンデカンで処理したシリカゲルの TLC による逆相クロマトグラフィーを試みた結果、Fig. 5 のようにエルゴステロールに相当するスポットおよび、燐モリブデン酸でわずかに発色し、1,3-ジクロロヒドリンで呈色しない不明の物質のスポットを得た。

Fig. 4. Sterol, Phospholipid Content in Conidia at Different Stages of Germination

Fig. 6. Carbohydrate Content in Conidia at Different Stages of Germination

Fig. 5. Thin-Layer Chromatograph Patterns of Sterol Fractions from Conidia

The sterol fractions were chromatographed on undecane immersed Kieselgel G plate by use of AcOH-water (90:10) as solvent system.

① Detected by phosphomolybdic acid reagent.

② Detected by 1,3-dichlorohydrin reagent.

A: Cholesterol. B: Sterol fraction from conidia.
C: Fraction 13 given by Al_2O_3 column chromatography of sterol fraction from conidia. D: Ergosterol.

また胞子 100 mg を 12 時間発芽培養し凍結乾燥した試料を、 $CHCl_3$ -MeOH 混液 (1:1) で抽出し、不けん化物を集めアルミナカラムに吸着させ、3% アセトン-石油エーテル溶液で溶出し、3 g ずつ分画採取したところ、13-14 分画が強く Rosenheim 反応陽性を示した。またこの分画の EtOH 溶液は 271, 282, 293 $m\mu$ に極大吸収を示して、エルゴステロール標品の吸収と一致し、TLC においてもエルゴステロール標品の R_f (0.49) と一致した。以上の結果から、本菌胞子ステロール分画にはエルゴステロールまたはその近似物質が存在していると考えられる。

12) 小笠原長法, 玉利勤治郎, 菅 正倫, 富樫邦彦, 農化, **35**, 1416 (1961).

13) J.L. van Etten, D. Gottlieb, *J. Bacteriol.*, **89**, 409 (1965).

14) P.G. Caltrider, S. Ramachandran, D. Gottlieb, *Phytopathology.*, **53**, 86 (1963).

Fig. 6 は炭水化物の変化について得たものである。冷酸可溶性分画でアンスロン反応陽性物質を可溶性炭水化物、総炭水化物から可溶性炭水化物を差引いたものを不溶性炭水化物として示した。奥¹⁵⁾ は本菌胞子の総炭水化物定量法として、胞子を直接アンスロン試薬で処理する方法を報告しているが、胞子を 72% H_2SO_4 で処理しても完全に胞子中の炭水化物を抽出することができ、抽出液をアンスロン法によって定量し、再現性の高い結果を得ることができた。なお抽出残留物をアンスロン試薬で処理しても糖の呈色を認めなかった。胞子中の不溶性炭水化物は発芽管形成期以後に、徐々に減少するが可溶性炭水化物は、発芽活動初期から急激に減少し、その後発芽管伸長期には増加しはじめている。この現象は胞子中に貯蔵されていた低分子の糖が、発芽活動開始に際して、まず力源として消費され、その後発芽管伸長期になって高分子の炭水化物が徐々に低分子化し、利用されてゆくことを推測させるものである。

以上の結果、発芽活動初期および発芽管形成期にアミノ酸、脂肪酸、RNA などが急激に増加し、可溶性炭水化物が減少することが明らかとなった。したがって、発芽活動初期の代謝基質を解明するためには、同時期に急激な減少を示す可溶性炭水化物分画の検討を行なうことが必要であると考え、胞子の 80% EtOH 熱抽出液について PPC および TLC をこころみ Table I を得た。胞子の EtOH 抽出液はアンスロン試薬に対して強く、アンモニア性硝酸銀液に対してわずかに反応したが、フェーリング液、ベネディクト試液と反応せず非還元性糖の存在を予測せしめた。PPC, TLC の結果はグリセロール、マンニトールのような糖アルコールが存在しなくて、非還元性二糖類であるトレハロースに相当するスポットを与えた。また TLC においてトレハロースのスポットに相当する部分 (R_f 0.64) を削りとり 2N HCl で抽出、加水分解後 Dowex 1 のカラムを通して脱酸し、濃縮した液は PPC, TLC においてグルコースに相当するスポットのみを与えた。さらに胞子 2.0 g からの 80% EtOH 抽出液を除たんばく後濃縮し、Sephadex G-10 のカラム (1.5×100 cm) に添加して蒸留水で溶出し Fig. 7, Table II の溶出図を得た。Table II の結果、 R_f 0.64 にのみスポットを与える分画 (11—13) を集め、この部分から mp 97° $[\alpha]_D^{20} +178.2^\circ$ の無色柱晶を得た。これはトレハロース 2 水和物標品の融点、比旋光度と

Fig. 7. Fractionation of 80% EtOH Extract of Spores by Sephadex G 10 Column

Carbohydrate was assayed by Anthrone method. (Glucose was used as standard material).

一致する。またこの結晶を ZnCl_2 を触媒として無水酢酸と加熱し、アセチル化したところ mp $101-102^\circ$ $[\alpha]_D^{20} +162.1^\circ$ (CHCl_3 溶媒) の無色針晶を得たがこれは、トレハロース 2 水和物標品を同様に処理して得た trehalose octaacetate と融点および比旋光度が一致した。非還元性で PPC, TLC の R_f 値が一致し、加水分解によりグルコースのみを与えること、遊離糖およびアセチル化物の融点、比旋光度が一致することなどから、本菌胞子可溶性炭水化物分画にトレハロースが存在することは明らかである。

そこで各発芽段階の胞子の EtOH 抽出液を TLC で

TABLE I. PPC and TLC Patterns of hot 80% EtOH extract From Conidia

Compound	R_f value ^{a)}		Compound	R_f value ^{a)}	
	PPC ^{b)}	TLC ^{c)}		PPC ^{b)}	TLC ^{c)}
Glucose	1.00	1.00	Trehalose	0.79	0.64
Glycerol	1.25	—	Extract	0.79	0.64
Fructose	1.07	0.96		0.61	0.31
Sucrose	1.04	0.80		0.39	
Mannitol	0.96	—			

a) R_f value represents the rate of movement of the compound as compared with that of glucose.

b) Chromatographed on Toyo Roshi No. 51 paper by use of ethyl acetate—pyridine—water (12:5:4) as solvent system.

c) Chromatographed on Kieselgel G plate by use of *n*-BuOH—AcOH—water (6:3:1) as solvent system.

TABLE II. Examination by TLC of Sugar Components in Various Fractions of Sephadex Column Chromatography of Conidia Extract

Tube No.	Glucose (R _G 1.00)	Trehalose (R _G 0.64)	Tube No.	Glucose (R _G 1.00)	Trehalose (R _G 0.64)
9	—	—	14	±	+
10	—	±	15	+	±
11	—	+	16	+	—
12	—	++	17	—	—
13	—	+			

Conidia extract with 80% EtOH was subjected to Sephadex G-10 column chromatography and fractions were chromatographed on kieselgel G plate by use of *n*-BuOH—AcOH—water (6:3:1) as solvent system.

+ : positive against Anthrone reagent. — : negative against Anthrone reagent.

展開し、トレハロースに相当する部分を削りとりアンスロン法によって糖を定量して、発芽に伴う胞子内トレハロースの変化を追跡し Fig. 8 を得た。保存胞子は約 8—9% の可溶性炭水化物をもっていたが、その約 70% 以上を占めているトレハロースは、発芽活動開始とともに急激に減少し、15 分以内に約 1/3 量となった。全培養期間を通して培養液にアンスロン反応陽性物質の増加は認められず、この急激な減少が細胞外への漏出によるものではなくて代謝基質として消費されたものと考えられる。

また、保存胞子にはグルコースがほとんど認められなかったが、発芽管伸長期以後になって増加している Fig. 6 のようにこの時期に不溶性炭水化物の減少が始まっており、胞子内に貯蔵されていた多糖類がこの時期にはじめてグルコースに変化して利用されるものと推測される。奥¹⁵⁾ は本菌胞子には貯蔵物質としてデキストラン類似の多糖類が存在し、発芽に際して消費されることを報告しているが、おそらく不溶性炭水化物分画がこれにあたり、発芽管伸長期の力源となっているのであろう。Sussman 等¹⁶⁾ は *Neurospora tetrasperma* の ascospore に、Mandels 等¹⁷⁾ は *Myrothecium verrucaria* の、Horikoshi は¹⁸⁾ *Aspergillus oryzae* の分生胞子にトレハロースが存在し、発芽に際して消費されることを報告している。M. *verrucaria*, *Asp. oryzae* はいずれも発芽に際して外部栄養を必要とし、胞子内にはグリセロール、マンニトールなどの糖アルコールが共存している点为本菌とは異なっている。しかしいずれにしても、これら糸状菌胞子の発芽活動初期には、トレハロースが重要な役割を果していることは明らかであり今後発芽機作の解明のために、トレハロースの代謝経路を追跡する必要があると考えられる。

結 論

Cochliobolus miyabeanus 分生胞子の発芽に伴う胞子内物質の変動を追跡しつぎの結果を得た。

1. 発芽活動初期および発芽管形成期に、可溶性炭水化物が消費され、アミノ酸、RNA、脂肪酸などが急増する。
2. 発芽管伸長期にエルゴステロールまたは近似物質を主体とするステロール分画、およびたんぱく質が増加し、アミノ酸は減少する。
3. 可溶性炭水化物の主体を占めるものはトレハロースであり、培養開始直後から活発な代謝を受け、15 分以内に約 1/3 量にまで減少する。
4. 不溶性炭水化物は、発芽管伸長期になってから消費され、同時にグルコースが蓄積され始める。

謝辞 本研究の一部は文部省科学研究費によってなされたものであり、感謝の意を表します。

- 16) K. Budd, A.S. Sussman, F.I. Eilers, *J. Bacteriol.*, **91**, 551 (1966).
- 17) G.R. Mandels, R. Vitols, *J. Bacteriol.*, **93**, 159 (1967).
- 18) K. Horikoshi, Y. Ikeda, *J. Bacteriol.*, **91**, 1883 (1966).

Fig. 8. Trehalose, Glucose Content in Conidia at Different Stages of Germination