

# タマネギ灰色腐敗病菌 (*Botrytis allii* Munn) の 生産するペクチン分解酵素の諸性質

田端信一郎・田部 真  
信州大学農学部 植物病理学研究室

## 緒 言

高等植物細胞膜の主要な構成成分はペクチン質で細胞膜の中葉部を形成し、細胞相互を接着する役目を果たしていると考えられている。ペクチン質の主成分はD-galacturonic acidの $\alpha$ -1,4 glycoside 結合をしている直鎖状の物質からなっている。この polygalacturonic acid (pectic acid) の carboxyl 基は種々の程度に methyl 化され、pectinic acid, pectin となる。ペクチン分解酵素はペクチン質に作用して  $\alpha$ -1,4 glycoside 結合を切断したり methyl ester の加水分解等を行なう酵素で、その分類については基質に対する作用の様相から種々混乱があつたが、最近 Bateman & Miller は  $\alpha$ -1,4 glycoside 結合を切断する酵素を8種類に分類した<sup>3)</sup>。

果実類の軟化、罹病組織の軟化や崩壊<sup>3,14)</sup>、導管閉そく等<sup>11)</sup>はこれらの酵素によるペクチン質の分解に起因するものである。*B. allii* に感染したタマネギのりん片組織は軟化し、ついには崩壊する。この軟化組織や菌の侵入個所の細胞膜中のペクチン質は変質、消失しており、ペクチン分解酵素の作用によるものであることが考えられた<sup>13)</sup>。*B. allii*, *B. cinerea* および *B. squamosa* による *in vitro*, *in vivo* でのペクチン分解酵素について Hancock<sup>7)</sup> は報告しているが、*B. allii* による *in vitro* での酵素生産とその諸性質についてくわしい報告はない。

## 実験材料および方法

菌の培養は  $MgSO_4$  0.5g,  $KH_2PO_4$  2.0g,  $(NH_4)_2SO_4$  5.0g, pectin 10g, 純水 1000ml, pH 6.5の合成培地で行なつた。pectin と塩類は別々に高圧殺菌を行ない、使用時に混合した。50 ml 三角フラスコに培地 15 ml を加え、あらかじめ準備した孢子けん濁液 1 ml を接種して 25°C で8日間培養後菌体をろ別し、ろ液を粗酵素液として供試した。透析はセロファン袋を用い、5°Cで24時間純水中で行なつた。

酵素液のりん片組織に与える影響を調べるため、健全りん片の赤道面を  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  にとりそのまま酵素液に浮かべた場合を健全組織の処理とし、またこれらの小片を70%の沸とうエタノールで3回処理後冷70%エタノールで2回洗じようし乾燥したものを浮かべた場合を死組織の処理とした。

pectin methylesterase (PME) 活性は Kertesz の方法<sup>10)</sup>により、pH 4.0に調整した1%

pectin 溶液 10 ml に酵素液 2 ml を加え 30°C で 40 分間反応させた後反応開始時の pH に戻すのに要する 0.01N NaOH 量を測定した。

polygalacturonase (PG) 活性は 1% pectic acid を含む 0.05M 酢酸緩衝液, pH 5.0, 4 ml を Ostwald 粘度計に入れ, 水槽中で 30°C 定温となした後酵素液 1 ml を加え粘度低下を測定した。反応開始時の落下秒数を  $T_0$ , 一定時間後の落下秒数を  $T_h$ , 純水の落下秒数を  $T_a$  としたとき, 酵素の作用力を分解率 A であらわすと次式のようになる<sup>1)</sup>。

$$A\% = \frac{T_0 - T_h}{T_0 - T_a} \times 100$$

polymethylgalacturonase (PMG) 活性は基質として pectic acid の代わりに 1% pectin と 2 倍に希釈した酵素液を用い, 粘度低下を測定し分解率を求めた。

pectic acid, pectin の加水分解の結果として生成する遊離 aldehyde 基の測定は Jansen らの方法<sup>9)</sup>によった。反応条件は PG 測定の場合と同様にし, 所定の時間ごとに反応液より一定量を取り測定した。分解率は 2.5%  $H_2SO_4$  で 120°C, 1.5 時間加水分解して生じた遊離 aldehyde 基の量を 100 とし, これに対する比で表した。

## 結 果

**りん片組織に与える培養ろ液の影響** りん片の健全組織, エタノール処理による死組織を種々の酵素液に浮かべ, 組織の軟化程度を調べた結果は表-1, 2 のようである。組織の軟化は 25~30°C, pH 5.0 で最も強く現われた。粗酵素液処理ではりん片の死組織の軟化程度が大きく, 透析した酵素液処理では健全組織の軟化が激しかった。酵素液を 100°C, 10 分間加熱処理した液中ではりん片組織の軟化は全く認められなかつた。これらのことから菌体培養ろ液中には組織軟化作用を有するペクチン分解酵素が存在していると思われた。

**PMEの活性とpH, 温度との関係** PME活性の有無を知るため種々の pH のもとで反応させた結果は図-1 のようで, pH 4.0 で活性が最大であつた。一方温度との関係を調べてみると図-2 に示すように 50°C が最適温度で割合高温であつた。

**PG, PMG活性とpH, 温度との関係**  $\alpha$ -1, 4 glycoside結合を切断する 2 種の酵素活性と pH との関係を調べた結果は図-3, 4 のようである。PG の最適 pH は 5.0 であるが pH 4.5,

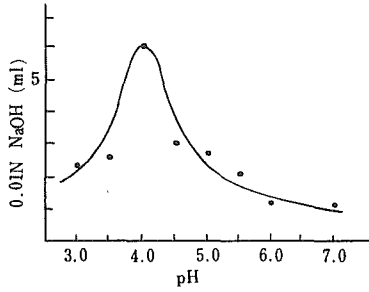
表-1 培養ろ液のりん片組織に与える影響と温度との関係

温 度	粗酵素液		透析した酵素液		加熱した酵素液	
	健全	死	健全	死	健全	死
15°C	-	+	++	++	-	-
20	±	++	+++	+++	-	-
25	+	++	+++	++	-	±
30	+	+++	+++	+++	-	-

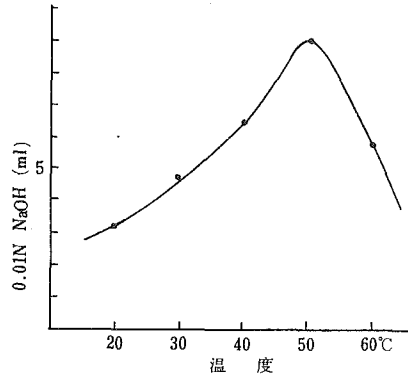
- 変化なし, + やや軟化, ++ かなり軟化, +++ 崩壊

表-2 培養ろ液の pH とりん片組織に与える影響

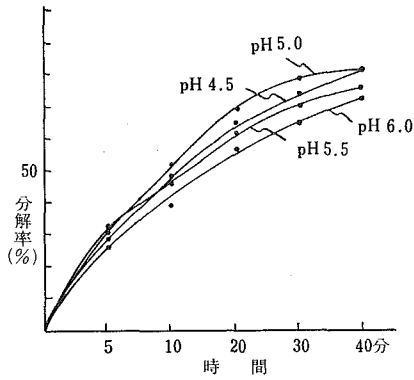
pH	粗酵素液		透析した酵素液		加熱した酵素液	
	健全	死	健全	死	健全	死
4.0	+	+	+++	+	-	±
5.0	+	++	+++	++	-	-
6.0	±	+	+++	+	-	-
7.0	-	+	±	-	-	-
8.0	-	±	-	±	-	-



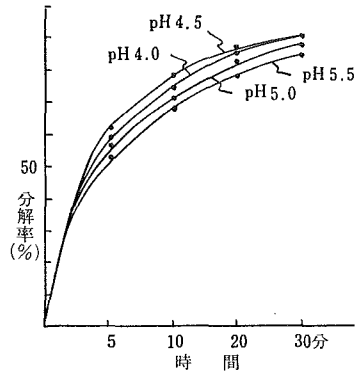
図一 1 PME活性とpHとの関係



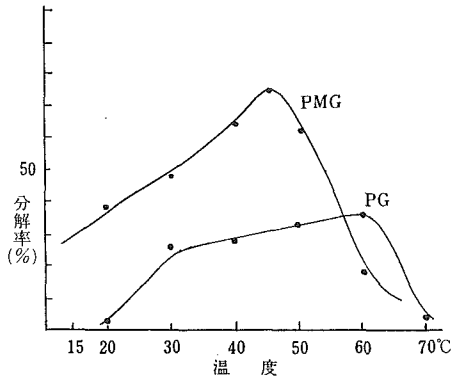
図一 2 PME活性と温度との関係



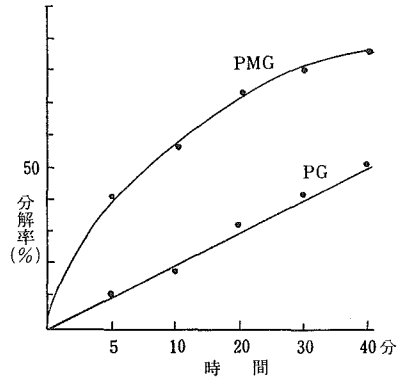
図一 3 PG活性とpHとの関係



図一 4 PMG活性とpHとの関係



図一 5 PGP, MG活性と温度との関係



図一 6 透析液の酵素活性

5.5とは余り差がなかつた。pH 6.0になるとかなり活性が低下した。PMG活性は非常に強いため酵素液を2倍に希釈したものを用いて測定した結果pH 4.5が最適で、pH 4.0, 5.0でもほとんど差がなく、pH 5.5でやや低下した。以上の結果からPG, PMGに関する実験では反応液のpHを5.0として行なつた。温度と活性の関係は反応10分後の分解率を求め図一5に示した。最適温度はPG 60°C, PMG 45°Cであつた。最適温度以上では急激な活性の低下がみられるが低温側での活性低下の程度は少ない。PG活性は30°C以下で急激に低下し、15°Cではほとんど認められないが、PMGは割合低温でも作用するようで15°Cでもかなりの活性を示した。

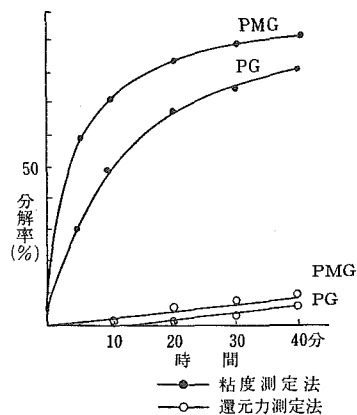
**透析と塩類添加の影響** 粗酵素液を透析処理し、各酵素活性の変化を調べた結果は図一6のようである。PMGは透析によりほとんど影響を受けないが、PME, PG活性は約50%低下した。ペクチン分解酵素は金属イオンにより増大することもあるが<sup>13)</sup>、透析により低下した活性が塩類添加によりどのように変化するかを調べたのが表一3, 4である。各種塩類を反応液中0.01Mの濃度になるように加え、PMEは反応40分、PGは30分後に測定した。PME活性には塩類の効果は全くなく、MgCl<sub>2</sub>は活性を更に低下させた。一方PGも同様に塩類添加の効果は全く認められなかつた。これらのことは透析により一部分失活したためと思われる。

表一3 PMEと塩類との関係

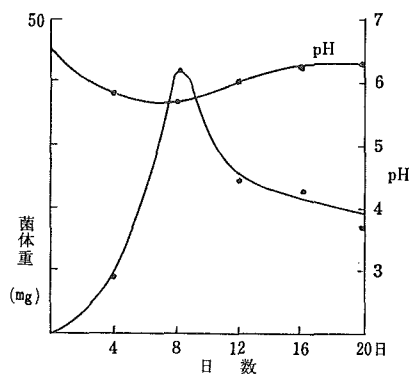
塩類	PME
KCl	0.45 ml
NaCl	0.43
NH <sub>4</sub> Cl	0.43
MgCl <sub>2</sub>	0.23
CaCl <sub>2</sub>	0.40
透析液	0.44
粗酵素液	0.81

表一4 PGと塩類の関係

塩類	分解率
KCl	45.1%
NaCl	46.0
NH <sub>4</sub> Cl	45.1
MgCl <sub>2</sub>	46.1
CaCl <sub>2</sub>	45.0
透析液	46.0
粗酵素液	77.1



図一7 PG, PMGの測定法の違いによる分解率の相違



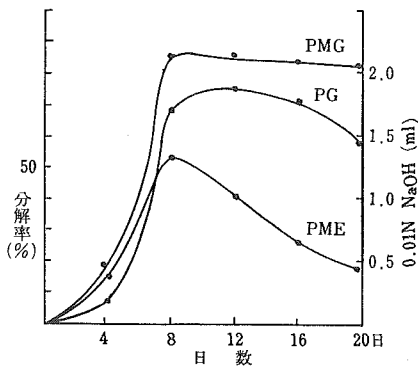
図一8 培養による菌体重、培地pHの変化

**PG, PMG 活性の粘度法と遊離 aldehyde 基測定法による比較** 2つの方法による活性を測定した結果は図一7に示した。粘度測定法によると PG, PMG 共に反応10分前後で分解率50%に達し、その後も分解は進み40分で約90%になる。この反応と全く同様な反応条件で  $\alpha$ -1,4 glycoside 結合の加水分解結果生じる遊離 aldehyde 基の還元力を測定して分解率を求めると、反応5~10分ではほとんど認められず、反応40分で、PG 5.0%, PMG 8.9%と非常に少なかった。

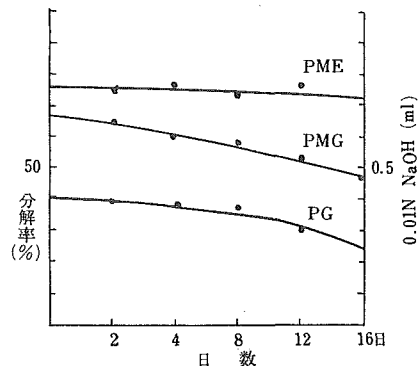
粘度低下に比し還元力の増加がわずかであることから、PG および PMG は基質の pectic acid, pectin 鎖を中間から任意に切断する endo-PG, endo-PMG であることは明らかである。もし分子鎖の末端から1つずつ galacturonic acid を遊離する exo 型であれば、粘度降下の程度よりも還元力増大がより大きく現われるはずである。

**菌生育と酵素活性との関係** 培養日数と菌体重の関係は図一8のとおりである。菌体重の変化は培養4日目ころから対数増殖期に入り8日目に最大となる。その後菌体は自己分解を起し漸減する。培地 pH は8日目までは低下してゆくがその後は増加する。このような培養液中の酵素活性をみたのが図一9である。PME, PG, PMG は菌体重の増加と並行して活性を高め、8日目以後は PME 活性が急激に低下し、PG 活性は10日目までは増加するがそれ以後は同様に低下した。また PMG 活性は8日目以後ほとんど変化がなかった。これらのことから PME の生産は8日目で、PG の生産は10日目で停止するが PMG は8日目以後でもいづらか生産されているようである。

培養液中の酵素の安定性をみるため、ろ液をザイツ型ろ過器で無菌ろ過した液を30°Cで16日間保ち、酵素活性の変化を調べた結果は図一10のようである。PME の活性は16日後でもほとんど変化がなく安定であるが、PG, PMG 活性は4日目から漸次低下していった。PME の安定性にもかかわらず、培養8日目以後その活性がかなり低下してゆくのは酵素生産が停止し、培地中の菌自身による分解不活性化が生じているものと思われる。PG は菌体重が最大となつた8日後も増加し10日目で最大となりその後低下するが、その程度はこのろ液を30°Cに保つた時の低下の程度よりも大きい。PME の場合と同様に菌の作用によるもの



図一9 培養日数による酵素活性の変化



図一10 酵素の安定性

表一五 培養基中の炭素源の種類と酵素活性

炭 素 源	PME	PMG	PG
Pectin	0.86ml	86.4%	66.9%
Pectic acid	0.51	62.2	69.8
glucose	0.0	0.0	0.0

と思われる。一方 PMG 活性は 8 日目  
最大となりその後は余り変化がない。  
PMG は PG と同程度の安定性を示すが、  
活性低下の少ないことは 8 日目以後の菌  
体が自己分解をしながらもわずかずつ生  
産しているのか、菌による作用を受け難  
いことによるものと思われる。

**炭素源の種類と酵素生産との関係** これまでの実験では培地中の炭素源として pectin を用いていたが、pectin 以外の炭素源で培養した場合に酵素生産がどのように変化するかを調べたのが表一五である。pectic acid を用いると PME, PMG 活性は pectin の場合よりやや低いが PG 活性はわずかに高くなる。glucose を炭素源とするといずれの酵素活性も検出されなかつた。

*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* 等はペクチン分解酵素を生産するのに炭素源としてペクチン質を必要とせず構成的に生成されるが<sup>5,6)</sup>, *B. allii* ではペクチン質を必要とし、しかも pectin で培養すれば PME, PMG 活性が高く、pectic acid では PG 活性が高くなることから適応的に生産されているものと思われる。

## 考 察

培養ろ液でりん片組織を処理し軟化作用を調べると、粗酵素液では健全組織の軟化程度は死組織よりも少なく、また透析液処理の場合の軟化よりも軟化に対し非常に抵抗的である。このことは粗酵素液中に含まれる pectin 加水分解産物の galacturonide やその他の有機、無機化合物がりん片組織にとり込まれ、軟化抵抗のためのエネルギー源として利用されているのではないかと考えられる。透析処理をすると低分子物質は除かれ、ペクチン分解酵素等の高分子化合物のみが残るが、これらはりん片の軟化抵抗に利用されることなく、健全組織自身の有するペクチン分解酵素と協力して死組織よりも軟化を強く促進するものと思われる。死組織はいずれの酵素液でも同程度の軟化を示していたことから、健全組織軟化程度の相違は明らかに生きた細胞の処理に対する反応の違いによるものである。

りん片組織の軟化を生ずる最適条件は 25~30°C, pH 5.0 であつたが、培養ろ液中のペクチン分解酵素活性も比較的高温で pH 4.0~5.0 を示した。罹病りん片組織の pH を組織化学的に調べてみると、軟化した部分の pH は 4.0~4.8 で酵素作用に適した条件となつている<sup>13)</sup>。またりん片の軟化腐敗は 20~25°C で最も強く現われるが<sup>12)</sup>, endo-PMG は 20°C 前後でもかなりの活性を示して軟化の原因になつているようである。しかしこれらの酵素生産は適応的に行なわれ、しかも種々の培養条件で生産される酵素の性質が変つてくることから<sup>2,4,8)</sup>, 軟化したりん片組織中のペクチン分解酵素が本実験での酵素の性質と一致するとは断言出来ない。

本実験の結果から得られたペクチン分解酵素によるペクチン質分解経路は endo-PMG による pectin 鎖の任意部分の切断による oligomethyl-galacturonide から漸次 methylgalacturonide への分解と、PME による methoxyl 基の脱 methyl 化の結果生じた pectic acid に

endo-PG が作用し oligogalacturonide から最後に galacturonide に分解する 2 つの場合が考えられる。培養による菌体重の変化と酵素活性の変化をみると、PME, PG, PMG の活性はほとんど同時に現われて増加する。しかも PG に対し PMG は約 2 倍の活性を示すことからペクチン分解の多くは PMG により行なわれ、PME と PG によるものは少ないようである。

## 摘 要

1. りん片の健全および死組織を *B. allii* の培養ろ液で処理した時の軟化程度は 25~30°C, pH 5.0 で最大であつた。
2. PME, PG, PMG の活性の最適 pH は 4.0, 5.0, 4.5 であり、最適温度はそれぞれ 50, 60, 45°C であつた。
3. 粗酵素液を透析すると PMG の活性はほとんど変わらないが、PME, PG の活性は半減した。
4. 基質に対する作用を調べた結果、PG および PMG は endo 型の酵素であつた。
5. 菌培養の結果 8 日目に菌体重が最大となりその後減少するが、PME, PG も同じ傾向を示した。しかし PMG は 8 日目以後も活性低下が少なかつた。
6. *B. allii* によるペクチン分解酵素は適応的に生産される。

## 参 考 文 献

1. 赤堀四郎編 (1963). 酵素研究法 2. 東京. 朝倉書店.
2. Bateman, D.F. (1966). *Phytopath.* 56: 238-244.
3. Bateman, D.F. and R.L. Miller (1966). *Ann. Rev. Phytopath.* 4: 119-146.
4. Damle, V.P. (1952). *J. Indian Bot. Soc.*, 31: 13-35.
5. Gäuman, E. and E. Böhni (1947). *Helv. Chem. Acta* 30: 24.
6. Gäuman, E. and E. Böhni (1947). *Helv. Chem. Acta* 30: 1951.
7. Hancock, J. G., R. L. Miller and J. G. Lorbeer (1964). *Phytopath.* 54: 928-931.
8. Hancock, J. G. (1965). *Phytopath.* 55: 1061.
9. Jansen, E.F., L. R. MacDonnel and R. Jang (1945). *Arch. Biochem.* 8: 133.
10. Kertesz, Z. I. (1937). *J. Biol. Chem.* 121: 589.
11. Scheffer, R. P. and J. C. Walker (1953). *Phytopath.* 43: 116-125.
12. 田端信一郎・田部 真 (1966). 北陸病虫研報. 14: 81-83.
13. 田端信一郎・田部 真 (1967). 信州大農紀要. 4(3): 235-250.
14. Wood, R. K. S. (1959). *Plant Pathology. Problems & Progress.* 1908-1958. 100-109. Univ. Wisconsin Press.

## Some Properties of Pectic Enzymes Produced by *Botrytis allii* Munn in *Vitro*

By Shin-ichiro TABATA and Makoto TANABE

Laboratory of Phytopathology, Fac. Agr., Shinshu Univ.

### Summary

*Botrytis allii* causes a soft rot of onion bulb tissues. In rotted tissues the degradation of pectic materials present in the cell walls had been observed histochemically.

Therefore, it is suggested that this pathogen can produce pectic enzymes. The present investigation was studied *in vitro* on the production of extracellular pectic enzymes by *B. allii* and some properties of these enzymes. The results are as follows.

1. The healthy and dead tissues of onion bulbs incubated in culture filtrates (crude enzyme solution) of *B. allii* were softened strongly at 25°~30°C and pH 5.0.

2. Pectin methylesterase (PME), polygalacturonase (PG), and polymethylgalacturonase (PMG) had an optimum pH for activity of 4.0, 5.0, and 4.5, and optimum temperatures were 50, 60, and 45°C.

3. Enzyme activities of dialyzed enzyme solution being measured, PMG activity was similar to that of crude enzyme solution, but PME and PG had a half activity of it. The reduced activities did not recover with addition of metal ions to reaction mixtures.

4. It was concluded from the results of measuring the viscosity and free aldehyde groups in reaction mixtures that PG and PMG hydrolyzing  $\alpha$ -1,4 glycosidic bond were endo type.

5. In the time course study of the growth of *B. allii* the maximum growth was indicated in the liquid culture of 8 days and then, declined in dry weight.

PME and PG activity of culture filtrates increased with increase of the mycelial growth and decreased after the maximum growth. PMG activity increased similarly but was maintained for a period of time after weight increase ceased.

6. *B. allii* produced these pectic enzymes adaptively when pectic substrates were present in culture medium.