

植物病原菌培養濾液中に見出される 未同定ニンヒドリン陽性物質について*

江川 宏^{***}・関塚 彰^{***}・達山和紀^{***}

Hiroshi EGAWA, Akira SEKIZUKA, and Kadzunori TATSUYAMA :
Studies on An Unidentified Ninhydrin Positive
Substance Detected in Culture Filtrate of Plant
Pathogenic Fungi

緒 言

ツアベック培地の成分である硝酸ナトリウムの窒素を等量のアミノ酸でおきかえた培地に植物病原菌を培養すると培養初期の培地中に未同定ニンヒドリン陽性物質の産生が認められ、数日後に消失することが明らかにされた²⁾。その後このニンヒドリン陽性物質は植物病原菌の種類に関係なく、またアミノ酸の種類を種々変えても産生されることが明らかにされたが、この物質の糖部分の TLC における Rf 値がフラクトースの Rf 値と一致することから、この物質は N-fructoside または amino-fructose ではないかと推定された³⁾。そこで今回は窒素源としてトリプトファンを用い、また炭素源として蔗糖の代りに種々の糖でおきかえた改変ツアベック培地を調製し、これに植物病原菌を培養した場合、このニンヒドリン陽性物質が産生されるかどうかを調査した。またこのニンヒドリン陽性物質と糖類、とくにフラクトースとの関係についても検討し、二、三の結果が得られたので報告する。

実験方法および実験結果

1. 培地中の糖の種類を変えた場合の未同定ニンヒドリン陽性物質の産生

ツアベック培地の硝酸ナトリウムすなわち窒素源を等量の L-トリプトファンでおきかえ、蔗糖の代りにフラクトース、グルコース、マンニトール、イノシトールお

よびキシロースでおきかえた培地を調製した。供試薬はいずれも半井化学製特級品を用い、120°C、10分間加圧滅菌後 *Alternaria solani*(Ellis et G. Martin)Sorauer を接種して、28°C、2日間培養したのち、培養濾液中に未同定ニンヒドリン陽性物質が産生されるかどうかを TLC で調査した。TLC はシリカゲル-G (Merck 社製)を用いた厚さ 0.25mm のものを使用し、ブタノール：酢酸：水=4：1：2 (v/v) で展開した。その後 0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液を散布後 120°C、10分間加熱して発色させた。この結果は第1図に示すとおりで、いずれの試料においてもトリプトファンの発色が認められ、未同定ニンヒドリン陽性物質 (NPS) は *A. solani* を蔗糖とトリプトファンを用いた改変ツアベック培地に培養したものだけに認められた。このニンヒドリン陽性物質と同じ Rf 値をしめしたものは濾液番号 11, 12に認められるフラクトースであった。このフラクトースは未同定ニンヒドリン陽性物質と同様にこの条件でピンク色に発色し濾液番号 3に認められる NPS はフラクトースではないかと考えられた。グルコースおよびキシロースもピンク色に発色したが、これらの Rf 値はフラクトースおよび未同定ニンヒドリン陽性物質の Rf 値とは明らかに相異していた。イノシトールを含む培地では *A. solani* を培養した場合も、また *A. solani* を培養しない対照区においてもピンク色の発色は認められなかったが、イノシトールの Rf 値をしめす部分に白いスポットとして認められた。またマンニトールを含む培地では *A. solani* 培養前に一つのピンク色のスポットが認められたが培養後ではこれが消失していた。このスポットがどのような物質かは現段階では明らかでない。

* Studies on the nitrogen utilization by plant pathogenic fungi (14).

** 島根大学農学部, Fac. of Agr., Shimane Univ., Matsue 690, JAPAN.

蔗糖の発色は認められなかった。グルコース、キシロース、フラクトースの位置にニンヒドリンによる発色が認められたが、糖類そのものがニンヒドリンによって発色するのか、または糖にニンヒドリン陽性物質が混在または結合し、たまたま同一の Rf 値のこのニンヒドリン陽性物質によって発色するのかについては明らかでなかった。

2. 未同定ニンヒドリン陽性物質とフラクトースとの関係

前項の実験において未同定ニンヒドリン陽性物質とフラクトースとの Rf 値が同じ値をしめしたので、未同定ニンヒドリン陽性物質がフラクトースそのものではないかと推定し、蔗糖とトリプトファンを含むツアパック培地に *A. solani* を培養して産生させた未同定ニンヒドリン陽性物質とフラクトースとを TLC で比較した。TLC 展開の条件は前述の通りで、ニンヒドリン発色も同様の処理を行い、あわせて糖類の検出法であるアニスアルデヒド試薬による発色を行った。この結果を第2図にしめした。未同定ニンヒドリン陽性物質とフラクトースの Rf 値は一致し、また未同定ニンヒドリン陽性物質もフラクトースと同様にアニスアルデヒド試薬による発色が認められた。

3. 糖類のニンヒドリンによる発色

1の実験で糖類がニンヒドリンによって発色することが考えられるので、フラクトース、グルコース、キシロースなどのニンヒドリンによる発色の有無、および発色とこれらの糖の濃度との関係を検討した。発色の対照としてトリプトファンを用いた。

供試した糖およびトリプトファンの 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 %の溶液を調製し、これをシリカゲル-G 0.25mm の厚さに塗布した TLC 板にスポットした。風乾後0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液を散布し、120°C、10分間加熱し発色させた。この結果は第1表にしめした。トリプトファンの発色はいずれの濃度区においても認められたが、キシロースは 1/32% 以上の濃度で発色し、グルコース、フラクトースは 1/2% 以上の

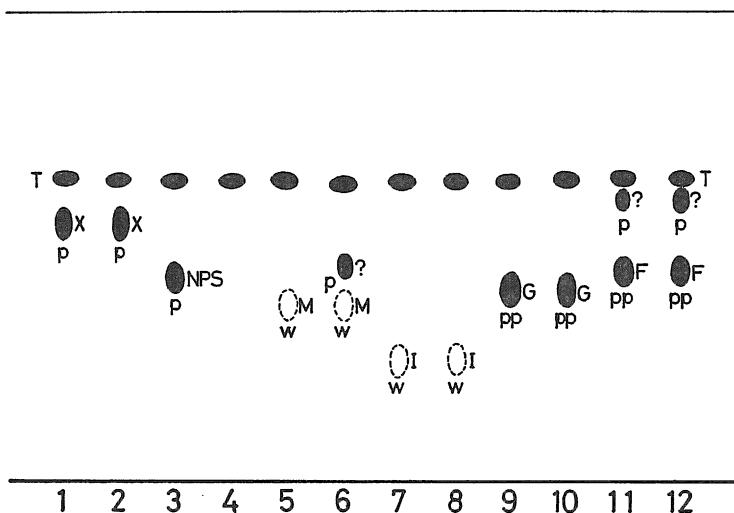


Fig. 1. Detection of ninhydrin positive substance in culture filtrate from modified Czapek's solution using TLC method.

Tryptophan was used in place of sodium nitrate of Czapek's solution, and Xylose (1, 2), Sucrose (3, 4), Mannitol (5, 6), Inositol (7, 8), Glucose (9, 10), or Fructose (11, 12) was used a carbon source of the solution. Samples in odd numbers were not inoculated with the fungus (*Alternaria solani*) as Controls. F : Fructose, G : Glucose, I : Inositol, M : Mannitol, NPS : Unidentified ninhydrin positive substance, p : pink, pp : pale pink, T : Tryptophan, w : white, X : Xylose.

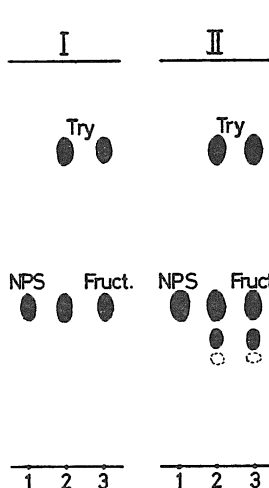


Fig. 2. TLC of An unidentified ninhydrin positive substance (NPS) and fructose.

Silica gel-G : 0.25mm in thickness
I : sprayed 0.2% ninhydrin-butanol sol. heating at 120°C for 10min.
II : sprayed anisaldehyde reagent heating at 110°C for 10 min.

Sample 1 : An unidentified ninhydrin positive substance (culture filtrate that the fungus cultured in the modified Czapek's solution containing tryptophan and sucrose)

Sample 2 : Sample 1+Sample 3

Sample 3 : Fructose

濃度において発色が認められた。この場合は発色は1の実験で行ったような酢酸酸性下での発色でなく、発色の条件が十分に満たされなかったことも考えられたので、糖およびトリプトファンをスポットした TLC 板を風乾したのち、ブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 2 (v/v) を散布し再び風乾してニンヒドリンによる発色を行った。この結果を第2表にしめした。すなわち酢酸であらかじめ処理することによってフラクトース、グルコース、キシロースのニンヒドリンによる発色は処理を行わなかった場合に比較して著しく強められた。しかしフラクトース、グルコース、キシロースの発色は放置することによって褪色し、数時間後には色は消失した。この色の消失したスポットは再加熱による発色は認められず、また水や酢酸を散布して加熱しても発色しなかった。しかし酢酸酸性にした0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液を散布した後加熱した場合は再び当初と同様の発色が認められた。したがって、糖類の発色には酸性の条件が必要であると考えられ、また褪色後は再度酢酸酸性ニンヒドリン-ブタノール溶液を散布して加熱しなければ発色しないことが明らかになった。酢酸以外の酸として塩酸および硫酸酸性にした0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液を上述と同様にして散布した場合、トリプトファンを除く他のスポットの発色は認められなかったので、糖のニンヒドリンによる発色は酢酸酸性の条件が必要であるのではないかと考えられる。

つぎに、フラクトース、グルコースの発色をトリプトファンの発色と比較するために、フラクトース、グルコース、トリプトファンを1と同じ方法でシリカゲル-Gを塗布した TLC 板を用いてブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 2 (v/v) で展開後、風乾しニンヒドリンで発色させた。その後発色したフラクトース、グルコース、トリプトファンをブタノールで溶出させてから分光光度計(日立製200-20型)を用いて可視部の吸光度を調べた。この結果が第3図である。フラクトース、グルコースの発色の最大吸収はトリプトファンの発色と同様に414.5, 506.5nmで、フラクトース、グルコースもトリプトファンと同様の発色をしめすことが明らかにされた

考 察

Table 1. Coloration of sugars and tryptophan by ninhydrin on the silica gel layer

	Concentrations of sugars and tryptophan (%)								Color
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Fructose	+	±	-	-	-	-	-	-	pale pink
Glucose	±	±	-	-	-	-	-	-	pale pink
Inositol	++	+	+	±	-	-	-	-	pale pink
Mannitol	±	±	-	-	-	-	-	-	pale pink
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	—
Xylose	+	+	+	+	±	±	-	-	pale pink
Tryptophan	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±	pink

Table 2. Coloration of sugars and tryptophan by ninhydrin on the silica gel layer treated with acetic acid.

	Concentrations of sugars and tryptophan (%)								Color
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Fructose	++	++	++	++	++	+	±	±	pink
Glucose	++	+	+	+	±	±	±	-	pink
Inositol	+	±	±	-	-	-	-	-	pale pink
Mannitol	±	-	-	-	-	-	-	-	pale pink
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	—
Xylose	++	++	++	+	+	+	±	±	pink
Tryptophan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	±	pink

2), 3) 前報においてアミノ酸と蔗糖を含む改変ツアベック培地に植物病原菌を培養すると培養初期に未同定のニンヒドリン陽性物質が培地中に生じ、その後消失することが見出され、この物質は N-fructoside または amino-fructose ではないかと推定した。今回はアミノ酸としてトリプトファンを用い、糖類を種々変えた改変ツアベック培地を調製し、これに *A. solani* を培養した場合、未同定ニンヒドリン陽性物質が生ずるかどうかについて検討した。トリプトファン、蔗糖を含む改変ツアベック培地に *A. solani* を培養すると前報通りに未同定ニンヒドリン陽性物質が産生された。トリプトファン、フラクトースを含む改変培地を用いた場合も NPS と同じ位置にニンヒドリン陽性が認められ、また、フラクトース培地に植物病原菌を培養しない場合も認められるので、NPS はフラクトース そのものではないかと推定される。しかしフラクトースがニンヒドリン陽性反応をしめすという報告が見当たらないので、この点を知る目的で市販のフラクトース、グルコース、キシロースなどを用いてニンヒドリン陽性をしめすかどうかを調べた。この結果酢酸酸性下ではいずれの糖もニンヒドリン反応陽性をしめすことが明らかになった。しかしこれらの供試した糖類中にニンヒドリン陽性物質の混在することも推定さ

れるので、TLC, IR, カラムクロマトグラフィーなどで調査したが現在迄の結果ではこれらの糖類中にニンヒドリン陽性物質の混在するという確証は得られなかった。この点については更にくわしい検討を要するが、蔗糖が植物病原菌の β -D-Fructofranoside fructohydrolase によりフラクトースとグルコースに分解されるのは当然考えられることで、また培養日数が経過すれば消費されて消失し、その結果 NPS としての検出は不可能になるのは当然である。しかし、今回の実験で明らかにされたように、蔗糖が分解されてフラクトースのみが検出され、グルコースが見出されないのはどう言うことだろうか。その理由として (1) グルコースはフラクトースより先に植物病原菌に利用され、フラクトースのみが培地中に一時的に認められる、(2) グルコースは直ちにフラクトースに変化し、見かけ上フラクトースのみが培地中に見出されるようになる、(3) 蔗糖からフラクトースのみを生ずる酵素系が存在する などの場合が考えられる。このうち (1) については *Leuconostoc mesenteroides* などに存在の認められる α -1, 6-Glucan : D-fructose-2-glycosyl-transferase の場合と同様の機構があるかも知れない¹⁾。(2), (3) についてはこのような例は現在のところ見出されず、(2) については更に培養の早い時期に菌体内外での糖についてのくわしい検討を加えるか、阻害剤を用いての実験で証明出来るかも知れないが、(3) については理論的にもその存在は不可能だと考えられる。更に上記の3つ以外の機構も存在するかも知れないが、現段階では不明であり、今後更に検討をすゝめたい。

摘 要

アミノ酸と蔗糖を含む改変ツアベック培地に植物病原菌を培養すると培養初期に未同定ニンヒドリン陽性物質の産生が認められ、このものは N-fructoside または amino-fructose ではないかと推定された。

今回はアミノ酸としてトリプトファンを用い、炭素源としてフラクトース、グルコース、イノシトール、マンニトール、キシロースまたは蔗糖のおのおのを加用した改変ツアベック培地に *A. solani* を接種し、NPS の産生を調べた。その結果蔗糖加用した培地のみ NPS の産生が認められ、この NPS の Rf 値はフラクトース加用培地の *A. solani* 接種および非接種区のフラクトースの Rf 値と一致した。したがって NPS とフラクトースは同一物質であるかどうかを TLC で更に検討したところ、フラクトースもニンヒドリン陽性反応をしめ

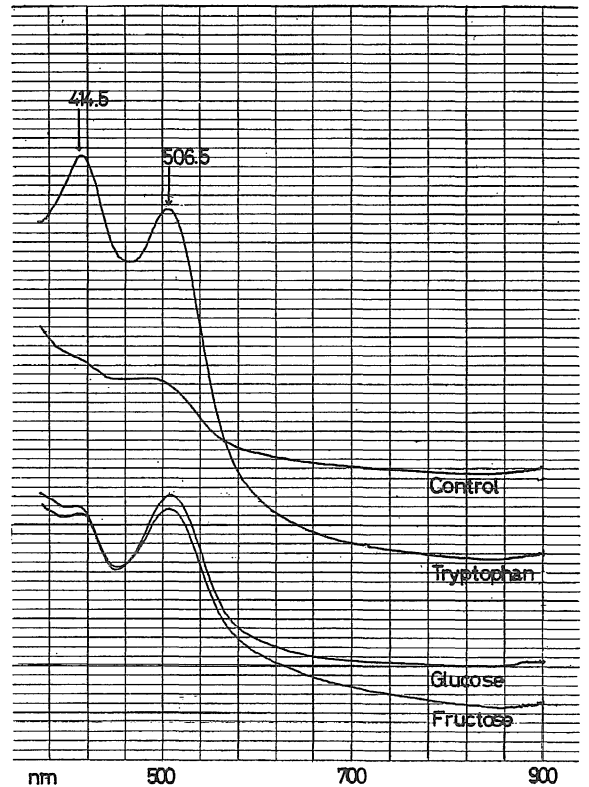


Fig 3. Visible spectra of butanol extracts made from ninhydrin positive spots of fructose, glucose, and tryptophan on TLC plates.

し、NPS と Rf 値は一致し、アニスアルデヒド試薬による反応でも NPS とフラクトースの Rf 値は一致したので、NPS はフラクトースではないかと推定した。

引用文献

1. 赤堀四郎編：酵素ハンドブック 朝倉書店、東京、1966、p. 234.
2. Egawa, H., M. Masuko and A. Ueyama : Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 34 : 56-60, 1968.
3. Egawa, H., M. Masuko and A. Ueyama : Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 34 : 235-241, 1968.
4. Lewis, B. A. and F. Smith : Thin layer chromatography (edited by E. Stahl) Springer-Verlag Berlin, Heiderberg and New York, 1969, p. 810.

Summary

In the previous studies^{2,3}, a ninhydrin positive substance (NPS) was detected in culture filtrate from Czapek's solution containing amino acid in place of sodium nitrate on which a plant pathogenic fungus had been cultured.

In this study, modified Czapek's solution containing tryptophan in place of sodium nitrate was prepared, and sucrose, xylose, manitol, inositol, glucose, or fructose was used as a carbon source of the culture medium. *Alternaria solani* was inoculated in the medium.

The NPS was detected only in the culture filtrate containing sucrose as a carbon source of the medium, and the R_f value of the NPS on a TLC plate was equal to that of fructose. It was shown by the other experiments that the spot of fructose on the TLC plate was colored by spraying ninhydrin reagent, and the spot of NPS was colored by anisaldehyde reagent.

These experimental results strongly suggest the possibility that the NPS is fructose.