

ワサビ墨入病の黒色質物に関する研究 (第3報)

墨入病菌の酵素活性について

曾 我 治

Studies on the Blackish Substances found in *Eutrema Wasabi*
afflicted with Black Leg Disease.

III.

On the Enzyme Activities of *Phoma Wasabiae*

Osamu SOGA

ABSTRACT

The enzyme activities of *Phoma Wasabiae* were studied. Activities were measured by the use of the enzyme suspension without purification. It turned out that the mold had polyphenol oxidase and peroxidase activities. Therefore, it has been recognized that the enzyme activities of *Phoma Wasabiae* resemble the activities of *Ceratocystis fimbriata*. It is thought possible that this polyphenol oxidase activity is allowed to change color of the root-stock of Wasabi and the culture solution of potato.

1 緒 言

さきに、筆者は墨入病菌 (*Phoma Wasabiae*) の酵素活性としてチロシナーゼ活性、すなわちポリフェノールオキシダーゼ活性について報告した¹⁾。その後さらにこの酵素活性及び二、三の酸化還元酵素活性について検討した結果、墨入病菌の酵素活性はサツマイモ黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata*) の酵素活性に類似したものであることが認められたので、本報においてこれらの酵素活性について一括報告する。

2 実 験 方 法

2・1 墨入病菌の培養

保存培養にはバレイショ煎汁寒天培地を用いた。前培養には合成培地 (YPG 培地) を用い、振とう培養を行なった。YPG 培地の組成は次の通りである。粉末酵母エキス 3 g, ペプトン 10 g, グルコース 20 g を蒸留水 1000 ml に溶かして pH を 7.0 に調節した。合成培地 50 ml を 300 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、25°C において 100~140 rpm で往復振とうした。実験により得られた増殖曲線¹⁾より 72 時間経過したものを菌の試料として用いた。

表1 反応液の組成

| 活性 | クレゾラーゼ | | カテコラーゼ | |
|----|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
| 主室 | 菌懸濁液 | 3.0ml | 菌懸濁液 | 3.0ml |
| | McIlvaine 緩衝液 (pH7.0) | 2.0 | McIlvaine 緩衝液 (pH7.0) | 2.0 |
| | ゼラチン液 (5mg/1ml) | 1.0 | ゼラチン液 (5mg/1ml) | 1.0 |
| | 蒸留水 | 0.5 | 蒸留水 | 0.5 |
| 側室 | α-クレゾール液 (4mg/1ml) | 1.0 | ヒドロキノン, カテコール } *1 | 1.0 |
| 副室 | 20% KOH | 0.5 | 20% KOH | 0.5 |
| 計 | | 8.0 | | 8.0 |

*1 ヒロキノン 5mg+カテコール 0.1mg/1ml

2・2 試料作成

72時間振とう培養して得られた菌体を吸引口過し、フラスコ1個に繁殖した菌体(1~1.5g)を約500mlの蒸留水で洗浄したのち、菌体1gにつき、蒸留水7ml, 14ml, 28mlをそれぞれ加え、ホモジナイザーで懸濁液を作り酵素液として用いた。この酵素液は後述するように精製されたものでないため乾燥量が非常に大きい。

2・3 酵素活性と測定法

2・3・1 ポリフェノールオキシダーゼ

1) クレゾラーゼ

クレゾラーゼ活性は Mallette, Dawson³⁾ の方法によった。反応液の組成は表1に示すものを標準として緩衝液、基質の濃度を変えて25°Cで測定を行ない、5分間隔で30分間酸素吸収量を測定した。活性度は次式に示す Q_{O_2} で表示した。

$$Q_{O_2} = \frac{(A-B) \times 2}{a}$$

A: 30分間に消費した添加呼吸量 (μl)

B: 30分間に消費した自家呼吸量 (μl)

a: 菌懸濁液の乾燥量 (mg)

2) カテコラーゼ

Adams, Nelson⁴⁾ の検圧法によった。反応液の組成は表1に示すものを基準として、緩衝液、基質の濃度を変えて測定した。クレゾラーゼ活性と同様反応温度25°Cにおいて5分毎に30分間測定し、 Q_{O_2} で活性度を表示した。

2・3・2 ラッカーゼ

1) ワールブルグ法により測定した。反応液は表2⁵⁾に示される組成のものを使用し、反応温度25°Cで測定した。操作はクレゾラーゼ活性の測定に準じた。

2) さらに、表3⁶⁾に示す反応液について25°Cで測定した。

2・3・3 ペルオキシダーゼ

1) まず, Sumner, Gjessing⁷⁾ の方法に準じて測定を行なった。蒸留水 15ml, 5%ピロガロール液 2 ml, 0.1Mリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) 2 mlを 20°Cで温度平衡にし, これに懸濁液 1 ml, 0.5%過酸化水素水 1 mlを加え, 正確に 5分後, 5%硫酸 5 mlを加えて反応を停止させた。生成した黄色のプルプロガリンを分液ロート中でエーテル抽出した。エーテルは15, 10,

表2 反応液の組成

| 活性 | ラ ッ カ ー ゼ |
|------------|----------------------------|
| 主 室 | 菌懸濁液 3.0 ml |
| | リン酸塩緩衝液 (1/15M, pH7.4) 1.5 |
| | 蒸留水 2.5 |
| 側 室 副 室 | ヒドロキノン液 (1/10M) 0.5 |
| | 5%KOH 0.5 |
| 計 | 8.0 |

表3 反応液の組成

| 活性 | ラ ッ カ ー ゼ |
|------------|------------------------------|
| 主 室 | 菌懸濁液 3.0 ml |
| | McIlvaine 緩衝液 (pH6.1) *1 2.0 |
| | ゼラチン液 (5mg/1ml) 1.0 |
| | 蒸留水 0.5 |
| 側 室 副 室 | ヒドロキノン液 (10mg/1ml) 1.0 |
| | 20% KOH 0.5 |
| 計 | 8.0 |

*1 0.2M クエン酸+0.4M第二リン酸ソーダ

10mlに分けて使用した。エーテルを合わせて100mlに定容し, その一部をとって 430 m μ における吸光度を測定し, プルプロガリンの量を検量線 (図1) より求めた。この方法において, ペルオキシダーゼ以外に一般のオキシダーゼが空気中の酸素によってピロガロールを酸化することも考えられるので, 過酸化水素水の代りに蒸留水を用いて測定も行なった。

2) つぎに, 瓜谷, 村松²⁾ の実験を参考にしてオキシダーゼ, ペルオキシダーゼの測定を行なった。

i) オキシダーゼ

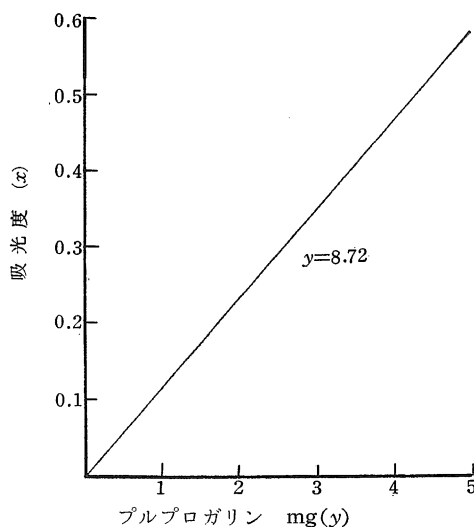


図1 プルプロガリンの検量曲線

表4 反応液の組成

| 活性 | オキシダーゼ | |
|----|------------------------|--------|
| 主室 | リン酸塩緩衝液 (1/15M, pH6.0) | 3.0 ml |
| | 0.5% ピロガロール液 | 3.0 |
| 側室 | 菌懸濁液 | 2.0 |
| 計 | | 8.0 |

表5 反応液の組成

| 活性 | ペルオキシダーゼ | |
|----|------------------------|--------|
| 主室 | 菌懸濁液 | 2.0 ml |
| | リン酸塩緩衝液 (1/15M, pH6.0) | 3.0 |
| | 0.5%ピロガロール液 | 3.0 |
| 側室 | 0.5%過酸化水素水 | 1.0 |
| 計 | | 8.0 |

ワールブルグの検圧装置を用いて、振とうにより空気を接触させた。反応液の組成を表4に示す。容器をマンメーターに取り付けて30°Cの恒温槽で温度平衡を行ない、酵素液を混入して振とうし、120~140 rpmで10分間反応を行なわせ、直ちに2N硫酸1mlを加えて酵素作用をとめ、生成したプルプロガリンをエーテルで抽出した。エーテル中のプルプロガリンを検量線により求めた。

ii) ペルオキシダーゼ

つぎに酵素液中に存在するオキシダーゼの影響を除くために、ワールブルグ検圧計を用いて窒素ガス中で実験を行なった。反応液の組成を表5に示す。反応液を入れた容器をマンメーターに取り付け、30°Cで5分間温度平衡させた。容器及びマンメーター中の空気を窒素ガスで置換したのち両者を合わせ振とうした。5分間作用させた後、2N硫酸1mlを加えて酵素作用をとめ、プルプロガリンをエーテルで抽出した。ペルオキシダーゼ、及びオキシダーゼの作用力はプルプロガリン数(PN)で表示した。

$$PN = W/vd$$

W: 生成したプルプロガリン量 (mg)

v: 用いた懸濁液の容量 (ml)

d: 懸濁液1mlの乾燥量 (mg)

なお、標準溶液に用いたプルプロガリンは大根のペルオキシダーゼを用いて調製した⁷⁾。すなわち、蒸留水200mlに0.5gのピロガロールを溶かしこれにガーゼでろ過した大根のおろし汁50mlを加え、さらに2.6%の過酸化水素水10mlを1時間で滴下した。生成したプルプロガリンをエーテルで抽出し、抽出液を芒硝で脱水し、ろ過、エーテルを留去し得られた赤かっ色のブ

ルプロガリンをエタノールで再結した。融点274°Cを示す。

3 実験結果と考察

測定した酸素吸収量の補正を行なうために自家呼吸量の測定と、懸濁液の代わりに蒸留水を用いて、ブランクテストを行なったが、懸濁液を除いたものは酸素吸収量が極めて少く無視して差支えないものと認めた。

3・1 ポリフェノールオキシダーゼ

1) クレゾラーゼ

実験の結果を表6に示し、その1例を図2に示す。(表中*印) 墨入病菌のクレゾラーゼ活性と比較するため、バレイシヨ皮部のクレゾラーゼ活性を測定した。この酵素液は第1報¹⁾に準じて調製した。

墨入病菌、バレイシヨ皮部の酵素液はともに反応液を赤橙色に着色させた。バレイシヨ皮部の酵素液は116~152の Q_{O_2} を示し、墨入病菌は最高17.8~最低1.7の Q_{O_2} が得られた。第1報¹⁾で報告した値とあまり相異はない。

2) カテコラーゼ

実験の結果を表7に示し、その1例を図3に示す。(表中*印) 反応液は赤橙色~あづき色を示した。 Q_{O_2} の値は2.2~7.0を示し、この値も第1報で報告した値とあまり相異はない。

表6 クレゾラーゼ活性

| 基 質 濃 度 P - クレゾール (水 1ml中) | McIlvaine 緩衝液濃度 クエン酸-第2リン酸ソ ーダ | 菌 懸 濁 液 (菌 1g に対する水) | Q_{O_2} |
|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------|
| 4 mg | 0.1M— 0.2M | 14 ml | 5.9 |
| | | | 5.3 |
| | | | 5.0 |
| 4 | 0.2 — 0.4 | 14 | 7.3 |
| | | | 7.0 |
| | | | 5.2 |
| | | | 6.3 |
| | | | 2.5 |
| 4 | 0.2 — 0.4 | 7 | 6.3 |
| | | | 2.5 |
| 4 | 0.2 — 0.4 | 28 | 6.4 |
| | | | 5.3 |
| | | | 1.7 |
| | | | 6.4 |
| | | | 5.3 |
| 8 | 0.2 — 0.4 | 14 | 14.4 |
| | | | 10.3 |
| | | | 10.2 * |
| | | | 10.2 * |
| 8 | 0.2 — 0.4 | 7 | 8.5 |
| | | | 7.3 |
| | | | 7.3 |
| | | | 7.3 |
| 8 | 0.2 — 0.4 | 28 | 17.8 |
| | | | 8.8 |
| | | | 8.8 |
| | | | 7.3 |

3・2 ラッカーゼ

実験結果の1例を図4, 5に示す。

1) 第1の方法によっても反応液の色調は変化せず、且つ添加呼吸量と自家呼吸量との差は殆んど認められなかった。(図4)

2) 第2の方法によっては反応液は僅かに桃色を示したが、添加呼吸量と自家呼吸量との差は認められなかった。(図5)

したがって先に報告⁴⁾したと同様に、墨入病菌はラッカーゼ活性を持っていないものと認められる。

3・3 ペルオキシダーゼ

1) Sumner, Gjessing の方法により測定した結果を表8に示す。反応液は黄色を示した。なお、菌懸濁液の代わりに蒸留水を用いたものについては変化が認められなかった。PN 値は実験条件として設定した程度の基質、緩衝

液、菌懸濁液の濃度によってはあまり変化が認められず極めて低い値0.028~0.059を示した。大根のしぼり汁の活性度を同様な方法で測定した結果、0.39なる値を得た。文献⁸⁾によれば大

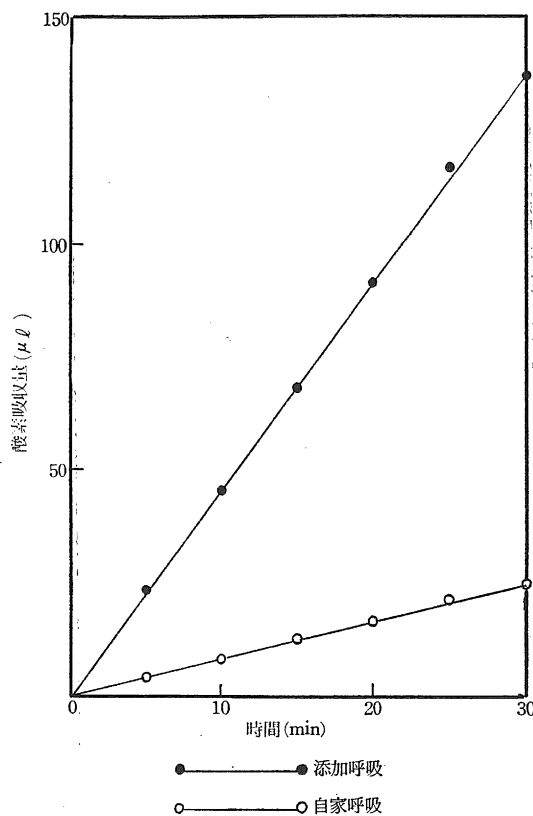


図2 クレブラーゼ活性

表7 カテコラーゼ活性

| 基質濃度 ヒドロキノン, カテコール (水 1ml 中) | | McIlvaine 緩衝液濃度 (クエン酸-第2リン酸 ソーダ) | 菌懸濁液 (菌 1g に対する水) | Q _{o2} |
|------------------------------------|--------|--|----------------------|-----------------|
| 5 mg | 0.1 mg | 0.1M— 0.2M | 14 ml | 2.2 |
| | | | “ | 3.5 |
| | | | 7 | 3.6 |
| | | | 28 | 3.6 |
| | | | “ | 7.0 |
| 5 | 0.1 | 0.2 — 0.4 | 14 | 3.9 |
| | | | “ | 5.2 |
| | | | 28 | 5.5 |
| | | | “ | 6.4 |
| 10 | 0.2 | 0.2 — 0.4 | “ | 7.0 |
| | | | 14 | 6.3 * |

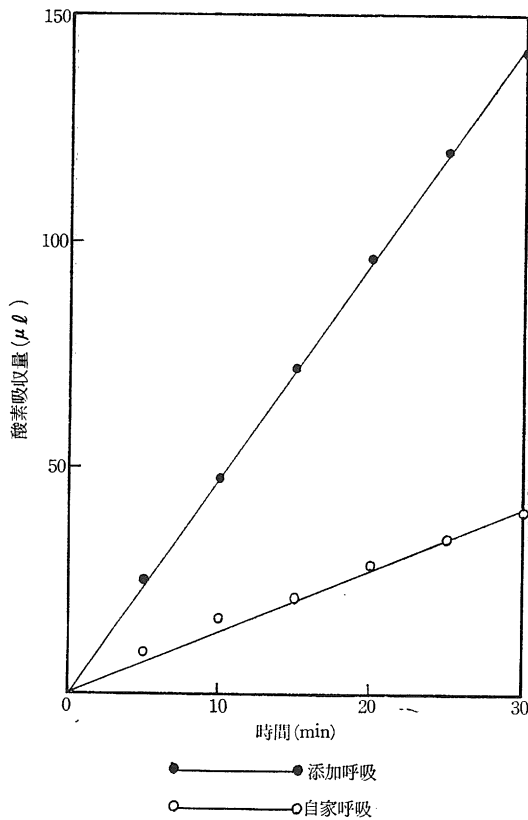


図3 カテコラーゼ活性

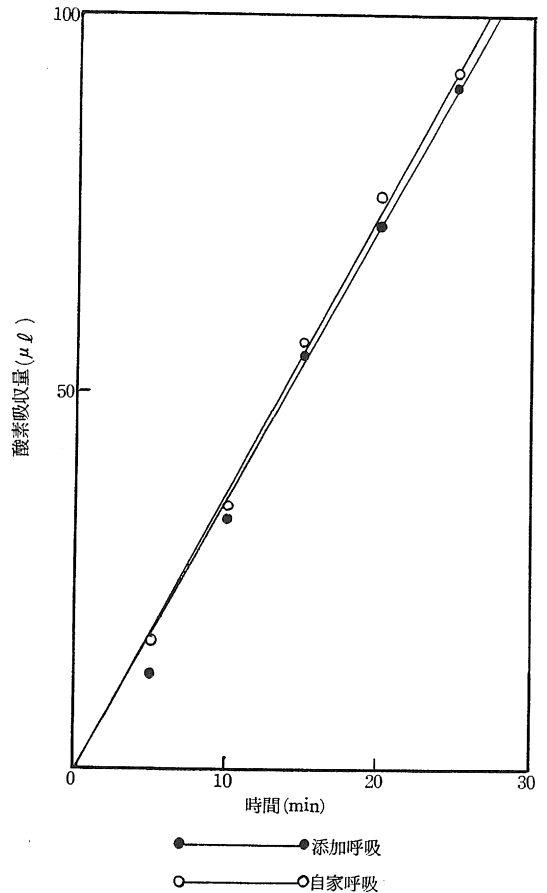


図4 ラッカーゼ活性

根のペルオキシダーゼの PN 値は1420内外であるので実験で得られた大根汁の PN 値は極めて低い。これは酵素の精製を全く行っていないため、乾燥量が極めて大きいので斯る値を得られたものと考えられる。このことは墨入病菌についても云えることであり、この実験により墨入病菌が大根の10分の1を示していることは、酵素の精製を充分行なったとすれば相当大きい値を与えることを示すものではないかと考えられる。過酸化水素水の代わりに蒸留水、菌体1gに水14mlを加えて作られた懸濁液を用い、0.1Nリン酸塩緩衝液、5%ピロガロールを基質としてオキシダーゼ活性を測定した結果、0.013, 0.010, 0.015のPN値を得た。

2) 次に瓜谷、村松の実験に準じてオキシダーゼ、ペルオキシダーゼの活性を測定した。酵素液は菌体1gに水14mlを加えて作られた懸濁液のみについて行なった。墨入病菌の生育に最適の温度⁹⁾は大体26°C内外であるためか、30°Cの測定温度では Sumner, Gjessing の値より低い値が得られた。

i) オキシダーゼ

10分間の反応により, 0.007, 0.005, 0.005の PN 値が得られた。平均値0.006で, 5分間の反応値は 0.003である。ブランクテストの結果, 反応液はほとんど変化しなかった。

ii) ペルオキシダーゼ

さらに, ペルオキシダーゼ活性の測定を窒素ガス中で行なった結果, 0.015, 0.010, 0.008の PN 値が得られ, ブランクテストの結果何ら変化が認められなかった。活性度の大きさは実験の方法により異なるが, 反応液はすべて黄色となり, 墨入病菌はペルオキシダーゼ活性を持っていると考えられる。

以上の実験結果を総合的に考察するに, 反応液中の緩衝液の最終濃度については更に検討を要するも, Q_{O_2} や PN 値が極めて小さい値を示す原因は酵素液としての菌懸濁液の乾燥重量の大きいことによると考えられる。しかし, 反応液がそれぞれ着色することからみて, この菌は(1)

ペルオキシダーゼ, オキシダーゼ活性をもち, (2)ポリフェノールオキシダーゼ活性を持っていることは, 定性的にも間違いなく, それに対し, (3)ラッカーゼ活性は持たない。これらの事から墨入病菌はサツマイモ黒斑病菌の酵素活性に類似した酵素系を持つかびと考えられる。

4 総 括

ワサビ墨入病菌の酵素活性中, とくにポリフェノールオキシダーゼ, ペルオキシダーゼ, ラッカーゼ活性について定性的な実験を行なった。酵素液としては菌懸濁液を用いた。ワールブルグ検圧法によりポリフェノールオキシダーゼ, ラッカーゼ活性の測定を, プルプロガリン法によりペルオキシダーゼ活性の測定を行なった。

1) ポリフェノールオキシダーゼ活性については, クレゾラーゼ, カテコラーゼの両活性を測定した。

i) クレゾラーゼ

基質, 緩衝液の濃度, 菌懸濁液の濃度などの条件を変えて測定したが, Q_{O_2} の値はあまり大

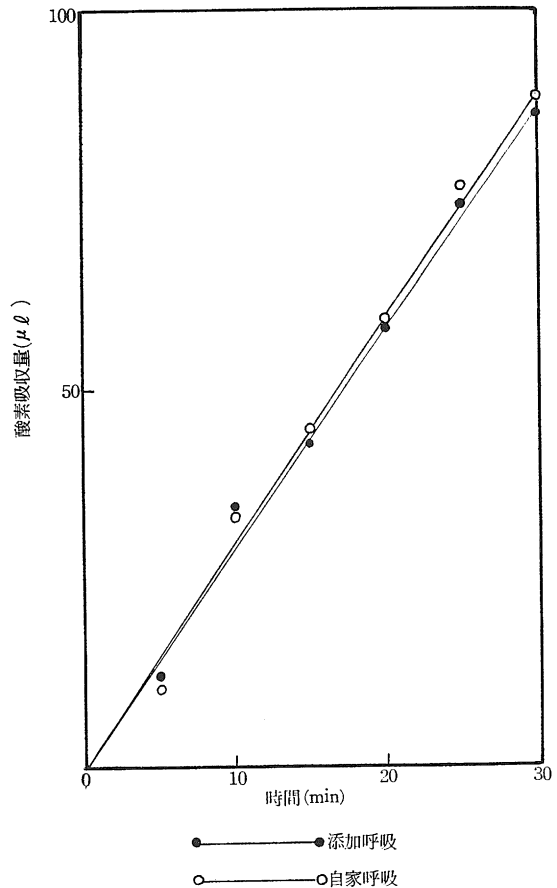


図5 ラッカーゼ活性

表 8 ペルオキシダーゼ活性

| 基 質 濃 度 (ピロガロール) | リン酸塩緩衝液 濃 度 | 菌 懸 濁 液 (菌 1g に対する水) | PN |
|---------------------|----------------|-------------------------|-------|
| 5 % | 0.1 N | 14 ml | 0.046 |
| | | | 0.040 |
| | | 7 | 0.033 |
| 5 | 0.2 | 28 | 0.037 |
| | | | 0.059 |
| | | | 0.047 |
| 10 | 0.1 | 14 | 0.036 |
| | | 7 | 0.028 |
| | | 28 | 0.055 |
| 10 | 0.2 | 14 | 0.042 |
| | | 7 | 0.047 |
| | | 28 | 0.048 |
| 10 | 0.1 | 14 | 0.042 |
| | | 7 | 0.048 |
| | | 28 | 0.040 |
| 10 | 0.2 | 14 | 0.055 |
| | | | 0.055 |
| | | 28 | 0.054 |

きな差異が認められなかった。バレイシヨ皮部の Q_{O_2} が116~152であるのに対し、墨入病菌の Q_{O_2} は1.7~17.8であった。反応液は何れも赤橙色に着色した。

ii) カテコラーゼ

クレゾラーゼと同様に条件の変化による差は認められなかった。墨入病菌のカテコラーゼ活性の Q_{O_2} は2.0~9.0であった。反応液は赤橙色~あづき色に着色した。

2) ラッカーゼ

反応液はわずかに桃色に着色したが、添加呼吸量と自家呼吸量には差が認められなかった。

3) ペルオキシダーゼ

Sumner, Gjessing の方法により、墨入病菌の活性を測定した結果、0.028~0.059のPN値を得た。また、過酸化水素水を含まぬ反応液についてオキシダーゼ活性を測定した結果、0.010~0.015のPN値が得られた。さらに、瓜谷、村松の方法にならい、オキシダーゼ活性を測定した結果、0.003のPN値を得た。窒素ガス中でのペルオキシダーゼ活性の測定では0.008~0.015のPN値を得た。反応液はいずれの場合も黄色に着色した。

以上の実験結果より墨入病菌はポリフェノールオキシダーゼとペルオキシダーゼ活性を有し、ラッカーゼ活性は持たないものと認められた。ポリフェノールオキシダーゼとペルオキシダーゼの活性度が小さい値を示すのは酵素液として未精製の菌懸濁液を用いたため、その乾燥量が大きいと推定される。

墨入病菌はサツマイモ黒斑病菌と同様にポリフェノールオキシダーゼ¹⁰⁾を含み、この菌の

浸入によりワサビの根茎やバレイシヨ煎汁培養基などが黒かっ色に変化するものと考えられる。

この研究に関して、終始御懇篤な指導、鞭撻を賜わっている京都大学後藤良造教授に厚く御礼を申し上げます。なお、この実験に協力いただいた山崎雅江氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 曾我治, 島根大学論集 (自然科学), 第16号, 90 (1966).
- 2) 瓜谷郁三, 村松敬一郎, 農化, **26**, 289 (1952).
- 3) M. F. Mallette, C. R. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 466 (1947).
- 4) M. H. Adams, J. M. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2474 (1938).
- 5) 日本化学会編, “実験化学講座 (第24巻) 生物化学Ⅱ”, 丸善 (1958) p. 465.
- 6) D. C. Gregg, W. H. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 1374 (1940).
- 7) J. B. Sumner, E. C. Gjessing, *Arch. Biochem.*, **2**, 291 (1943); 赤堀四郎編, “酵素研究法 (第2巻)”, 朝倉 (1961) p. 336.
- 8) 森田雄平, 京大食糧科研報告, **15**, 56 (1954); 日本化学会編, “実験化学講座 (第24巻) 生物化学Ⅱ”, 丸善 (1958) p. 448.
- 9) 横木国臣, 島根県農事試験場創立77周年記念報告第3輯, 9 (1952).
- 10) 兵藤宏, 化学と生物, **5**, 441 (1967).