

ワサビ墨入病の黒色物質に関する研究 (第1報)*

墨入病菌のチロシナーゼ活性

曾 我 治

1 緒 言

ワサビ墨入病は元島根県農事試験場技師の横木国臣氏により発見され、詳細な研究がなされている。¹⁾ その病原菌は不完全菌類 (Fungi Imperfecti), 擬球殻菌科 (Spaeriodaceae), *Phoma* 属に属する一種の糸状菌で、昭和8年その学名は *Phoma Wasabiae* Yokogi と命名された。²⁾

墨入病は腐敗病と共にワサビにとって重大な病害の一つであり、根茎の被害が最も大きい、その名の示すように、罹病したワサビの根茎は黒かっ色に変色し、通称「スミ入り」と呼ばれている。墨入病の病状は被害部により異なるようであるが、根茎では傷をうけたところから発生すると云われ、発生するとその部分が黒かっ色に変じ、その変色は次第に内部に進み、維管束に達したのち、維管束に沿って進展する。そしてこの黒変は皮部に向って進展することはあるが、髓部には深く入らないことが認められている。¹⁾

ところで、ワサビが何故黒変するか、また、黒変した物質はどのようなものであるかについては何ら報告がなく、単に墨入病菌のチロシナーゼ酵素によりチロシンが酸化されてメラニンになるのではないかと推論されているに過ぎない。

筆者はワサビ黒色物質の本体並びにその黒色物質形成の機構を明らかにするため本研究をとりあげた。本報では墨入病菌のチロシナーゼ活性について得られた2, 3の知見と培養基の着色並びに変色について報告する。

2 実 験 と 結 果

2.1 ワールブルグ法による墨入病菌のチロシナーゼ活性

1) 墨 入 病 菌

実験に使用した墨入病菌は島根県農事試験場病虫科より分与していただいた。

* 1964年4月, 日本化学会第17年会発表

菌糸の発育に及ぼす最適条件¹⁾である温度は25°C, pHは7.0に限定して実験を行なった。

菌の保存培養にはバレイショ煎汁寒天培養基を使用し, 培養基は次のようにして調製した。即ち外皮を除いたバレイショ 200g を細切し, これに蒸留水 1 l を加え, 2時間煮沸し, ガーゼでろ過し, 冷却後水を補充して 1 l にし, pH を 7.0 に調節したのち, グルコースと寒天とをそれぞれ 20g 加え溶解し, 2 kg/1 cm² で 15 分間高圧滅菌した。

2) 前培養

菌糸のチロシナーゼ活性を調べるための前培養には次の組成の YPG 合成培地を使用した。即ち, 酵母 (エビオス) 3g を蒸留水 1 l 中で加温浸出し, 3分間 3000 rpm で遠心分離したのち水を補充して 1 l にし, これにグルコース 20g, ペプトン 10g を加え pH を 7.0 に調節したのち定法通り常圧滅菌した。

振とう培養には, 合成培地 50 ml を 300 ml エルレンマイヤーフラスコに入れ, 25°C, 100~140 rpm で往復振とうした。振とう培養の結果, 菌糸の増殖曲線は図1に示すような結果が得

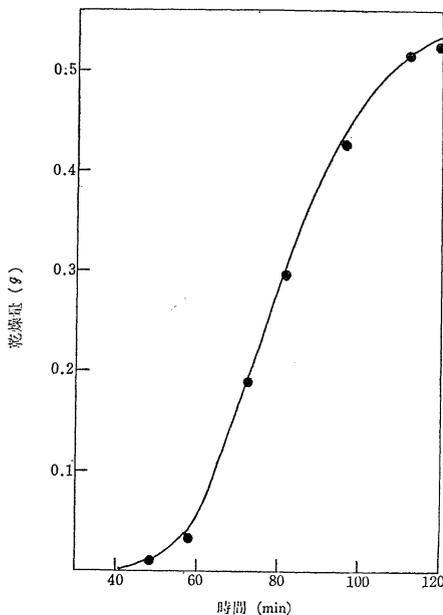


図1 菌体増殖曲線

られ, 60~90時間がこの菌糸の対数増殖期にあたる事が判明した。したがって, 実験試料には72時間振とう培養したものを使用した。

3) 試料作成

振とう培養した菌糸は吸引・ろ過し, 口液が銀鏡反応をしめさなくなるまで蒸留水で洗浄したのち, 生体重量 1g に対し 14 ml の割合に蒸留水を加えてホモジナイザーにかけ, 懸濁液をつくり試料とした。また, 菌糸のチロシナーゼ活性と比較するため, チロシナーゼ酵素液としてバレイショ皮部のチロシナーゼを用いた。³⁾ 即ち, バレイショの外皮 10g に蒸留水 50 ml を加えて, ホモジナイザーにかけ, この液をガーゼでろ過し, 10分間静置したのち, 上澄液を東洋口紙 No.2 でろ過しその口液を用いた。

4) クレゾラーゼ活性とカテコラーゼ活性

チロシナーゼはモノフェノールに作用するクレゾラーゼ活性と, ジフェノールに作用するカテコラーゼ活性のあることが認められているので, この両活性について検討した。

クレゾラーゼ活性は Mallette, Dawson⁴⁾ の方法に従い, また, カテコラーゼ活性は Adams, Nelson⁵⁾ の方法に従い, それぞれ表1の組成のものを使用した。反応は何れも 25°C で行ない, 反応容器としては内容積 40 ml のゲフエースを使用した。バレイショの酵素活性には 0.2 ml の懸濁液を用いた。クレゾラーゼ活性は基質を加えてから 10 分後を反応開始時とし, 以後 5 分毎に

表1 反応液の組成

	クレゾラーゼ活性		カテコラーゼ活性	
主 室	菌懸濁液	3.0ml	菌懸濁液	3.0ml
	Mcllvaine 緩衝液*1	2.0	Mcllvaine 緩衝液*1	2.0
	ゼラチン液*2	1.0	ゼラチン液*2	1.0
	蒸留水	0.5	蒸留水	0.5
側 室	p-クレゾール液*3	1.0	ヒドロキノン, カテコール混合液*4	1.0
副 室	20% KOH	0.5	20% KOH	0.5
計		8.0		8.0

*1 pH 7.0

*2 蒸留水 1 ml にゼラチン 5 mg を溶解し, 1 週間毎に調製した。

*3 再蒸留した p-クレゾールを用い, 0.037M 濃度の溶液を使用した。

*4 蒸留水 1 ml にヒドロキノン 5 mg, カテコール 0.1 mg を溶解した。

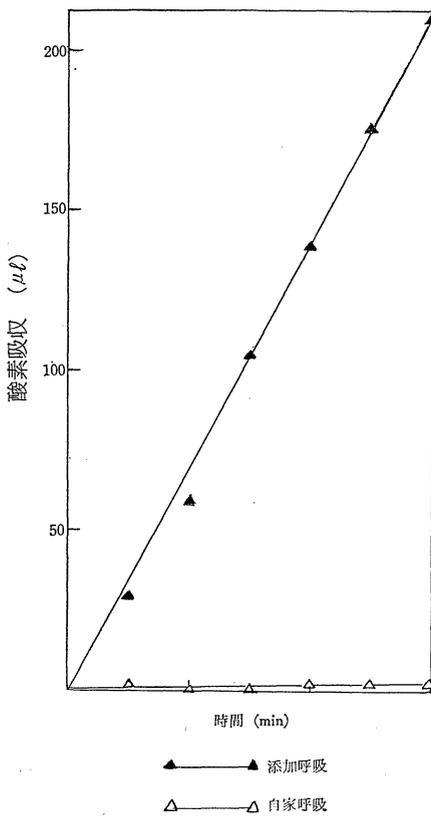


図2 バレイシヨ クレゾラーゼ活性

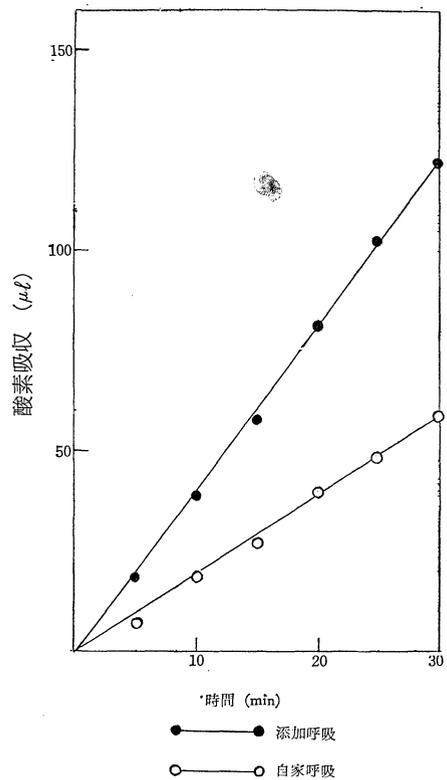


図3 墨入病菌 クレゾラーゼ活性

30分間測定した。カテコラーゼ活性は温度平衡後、基質を加えた時を反応開始時とし、以後5分毎に30分間測定した。

バレイシヨ及び墨入病菌のクレゾラーゼ活性の測定の一例を図2, 3に示す。両者とも基質を加えた反応液は紅色を示した。

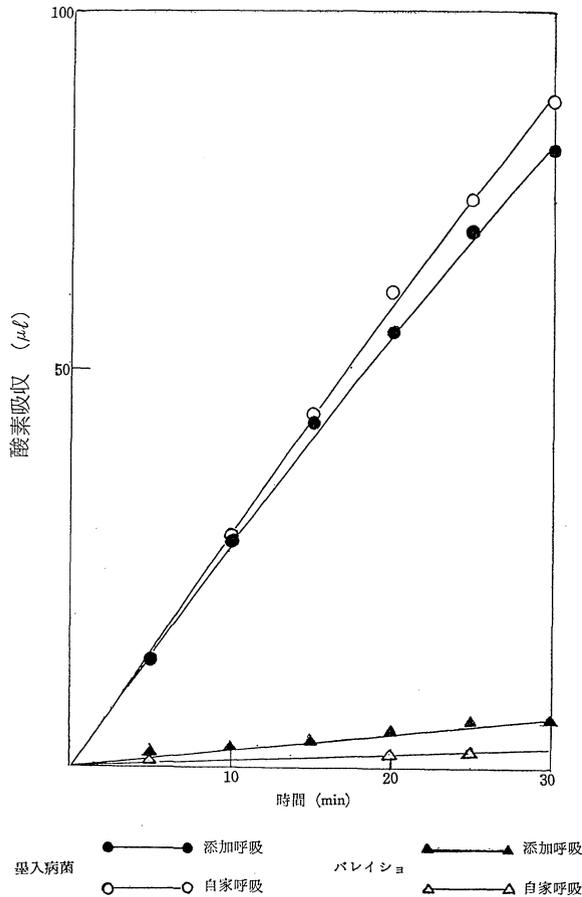


図4 ラッカーゼ活性

懸濁液中にラッカーゼが存在すればヒドロキノンが酸化されて酸素を吸収することが認められているので、カテコラーゼ活性を測定する基質と同濃度のヒドロキノンを経験として予備実験を行なった結果、図4に示すように、バレイシヨ酵素液には酸素吸収が殆んど認められず、菌懸濁液では自家呼吸量がヒドロキノン添加により僅かながら阻害をうけ、ヒドロキノン活性は認められなかった。自家呼吸量が添加呼吸量より多いことについては更に検討を加えなければならないが、少なくとも、同濃度のヒドロキノンを加えても酸素吸収量が自家呼吸量より多くないことから、この墨入病菌の複合酵素系中にはラッカーゼは存在しないか、或は、極めて活性が弱いものと考えられる。

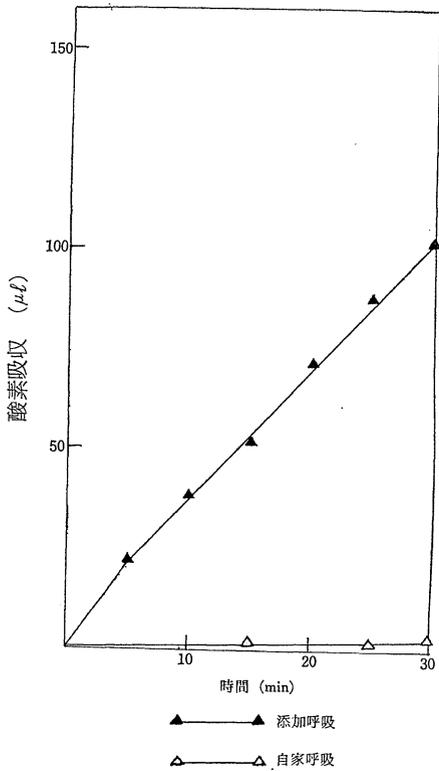


図5 バレイシヨ カテコラーゼ活性

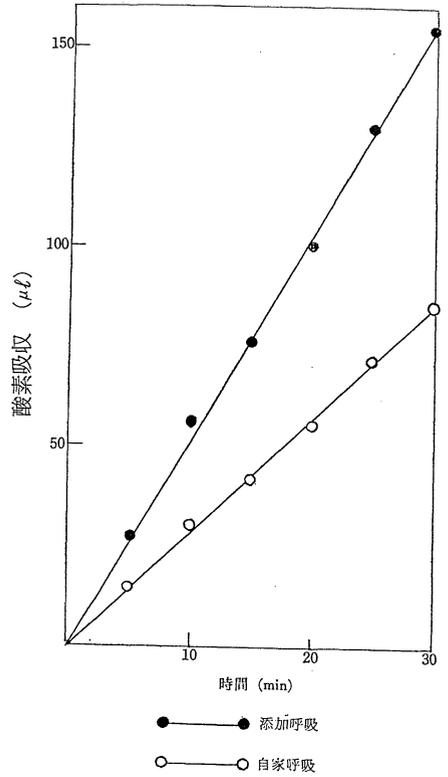


図6 墨入病菌 カテコラーゼ活性

バレイシヨ, 墨入病菌のカテコラーゼ活性の一例を図5,6に示す。この場合も基質を加えた反応液は赤橙色に着色した。

図2, 3, 5, 6, で示された30分の酸素吸収量から60分の吸収量を求め、乾燥量1 mg当りの酸素吸収量 (QO₂) を表2に示す。測定値については更に(1) 懸濁液の処理法, (2) 基質の濃度, (3) 緩衝液の濃度等について吟味を必要とするが, それにしても墨入病菌の活性は極めて小さいことがわかる。

かりに, 墨入病菌のチロシナーゼ活性によりワサビ内のチロシンが, 既に明らかにされている過程によりメラニンを形成⁶⁾ するとしても, ワサビ内にチロシナーゼが含まれていることについては⁷⁾ どのように考察してよいか, ワサビの黒色化については多くの問題がある。

表2 バレイシヨ, 墨入病菌のチロシナーゼ活性 (QO₂)

	バレイシヨ			墨入病菌				
クレゾラーゼ活性	397.6	376.1	353.6	8.7	5.6	5.4	5.3	4.8
カテコラーゼ活性	199.0	186.4	181.6	5.1	5.1	4.9	4.4	3.9

2.2 寒天培養基*の着色に対するチロシンの影響

白菜煎汁, 乾杏煎汁, バレイシヨ煎汁等の天然寒天培養基に墨入病菌を接種すると, 培地は黒かっ色もしくは暗かっ色になり, ペプトン加用の合成培地ではこのような黒色化をしないことが認められている。1) 培養基の黒変が特にチロシンと関係があるかどうかを検討するため, 表3に示す寒天培養基 (pH7.0) を用いて実験をこゝろみた。

1) 培養基の変色

4種類の培養基に墨入病菌を接種して25°Cの定温器中に放置した結果, 14日, 70日目の培養基の変色は表4に示す通りで, バレイシヨ煎汁培養基, 合成培地1 (YPG培地) 共に菌糸の発育は旺盛であったが, 前者だけが黒色を示した。

表3 寒天培養基の種類

No.	培養基名	培養基の組成*
1	バレイシヨ煎汁	バレイシヨ 200g, 蔗糖 (グルコース) 20g
2	合成培地1	酵母 3g, ペプトン 10g, グルコース 20g
3	合成培地2	グルコース 30g, (NH ₄) ₂ SO ₄ 5g, KH ₂ PO ₄ 2.5g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.25g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01g
4	合成培地3	蔗糖 50g, KH ₂ PO ₄ 5g, FeCl ₃ trace, NH ₄ NO ₃ 10g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 2.5g

* 何れも蒸留水1ℓ, 寒天20gを使用。

表4 寒天培養基の変色

No.	培養基の色	培養基の変色過程	菌糸の発育
1	無色	黄色→黒色	旺盛
2	淡黄色	黄橙色 → 赤橙色 → 赤かっ色	旺盛
3	無色	黄色 (一部かっ色)	不良
4	無色	黄色 (一部かっ色)	不良

バレイシヨ煎汁培養基の変色は次の通りである。即ち, 菌を培地に接種すると3日目から菌糸の生育している培地が黄色に変化し, ついで黒色の柄子殻が出現すると共に, 培地が黄色から黒色に変化する傾向がみられる。それに対し, YPG合成培地は淡黄色の培地が黄橙色に変化し, その色調を濃くするだけで, 黒色の柄子殻は出現しない。No.3,4の合成培地は菌糸の発育は極めて不良であるが, 菌糸が生育するにしたがい, 培地が黄色となり一部かっ色となる。何れの培地も2週間で明白に変色し, 10週目においても変化はなかった。これらの培地が変色する共通点は菌糸の発育初期において, 菌糸の接している培地が黄色となることである。そし

* バレイシヨ煎汁, YPG液体培養基でも色に変化し, バレイシヨ煎汁液体培養基は黒色に, YPG液体培養基は赤かっ色となる。

で黒色の柄子殻の生ずる培地は速かに黒色となり、出現しない培地は黒変する速度が遅いか、もしくは黒色とならず赤橙色ないし赤かっ色となった。また、これらの変色は培地の表面から次第に深部に向って進行することが認められた。

2) アミノ酸添加合成培地の変色

チロシンを初め12種のアミノ酸（協和醸酵KK製 ペーパークロトグラフ用）30 mgを合成培地1（YPG培地）100 mlに添加、滅菌した寒天培養基に墨入病菌を接種し、25°C定温器中に放置した結果、菌糸の発育はよいが、アミノ酸無添加のYPG合成培地と全く同様に変色し、チロシンの培地が特に黒色にはならなかった。使用したアミノ酸は次の通りである。

L-ロイシン、DL-アラニン、L-セリン、L-シスチン、DL-メチオニン、L-フェニールアラニン、L-チロシン、L-プロリン、DL-トリプトファン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸。

また、合成培地2、3に同様L-チロシン、L-リジンを加えた培地も黄色になるだけで、無添加培地と何らの相異が認められなかった。

2.3 墨入病菌と糖類との関係

前述したようにチロシンを加えた合成培地に墨入病菌を接種しても、これらの培地は黒変しなかったので、グルコース、蔗糖などに墨入病菌がいかなる作用をあたえるかについて検討した。あらかじめ、YPG合成培地で前培養した菌糸を吸引口過、滅菌水で洗浄して、その一定量（生体重量）0.2 gもしくは1.0 gを表5に示した反応液に加えて25°Cで24時間、48時間振とうした。その結果、グルコース、蔗糖を含んだ反応液が淡い赤橙色を示し、チロシンには何ら関係がなかった。この結果から墨入病菌はアミノ酸のような窒素化合物より糖類に対し反応性があり、これら糖類と反応して一種の着色物質を形成するように考えられる。

表5 墨入病菌と糖類との反応

No.		A, 24時間	B, 48時間
1	0.1M リン酸塩緩衝液 50ml	-	-
2	0.1M リン酸塩緩衝液 50ml + L-チロシン 5 mg	-	-
3	0.1M リン酸塩緩衝液 50ml + L-チロシン 5 mg + グルコース 1 g	+	+
4	0.1M リン酸塩緩衝液 50ml + L-チロシン 5 mg + 蔗糖 1 g	+	+
5	0.1M リン酸塩緩衝液 50ml + グルコース 1 g	+	+
6	0.1M リン酸塩緩衝液 50ml + 蔗糖 1 g	+	+

注 A: 菌体1.0 g, B: 菌体0.2 g

No. 5, 6の菌体無添加の反応液は振とうしても着色物質を生成しない。

3 総 括

ワサビ墨入病菌のチロシナーゼ活性をワールブルグ法で測定し、クレゾラーゼ、カテコラー

ゼの両活性を求めた。また、寒天培養基の着色、変色の状態を観察した結果次のことが判明した。

1) 墨入病菌のチロシナーゼ活性はバレイシヨ皮部の酵素活性ほど強いものではなく、(i) バレイシヨのクレゾラーゼ活性 (QO_2) は 397.6~353.6 を示し、それに対し墨入病菌は 8.7~4.8 を示した。(ii) カテコラーゼ活性 (QO_2) はバレイシヨでは 199.0~181.6 を示し、墨入病菌は 5.1~3.9 を示した。

2) 墨入病菌をバレイシヨ煎汁寒天培養基並びに 2, 3 の合成培地にうえた場合、いずれも最初黄色物質が生成し、のち、(i) バレイシヨ煎汁寒天培養基は黒色となり、(ii) YPG 合成培地は赤かっ色となり、(iii) その他の合成培地は菌糸の発育がわるく、殆んど変化しなかった。(iv) また、L-チロシンを添加した合成培地でも何ら黒色を示さなかった。

3) あらかじめ、YPG 液体培養基で前培養した墨入病菌の一定量を、L-チロシン、グルコース、蔗糖等を加えた 0.1M リン酸塩緩衝液に加え、振とうした結果、チロシンには関係なく、グルコース、蔗糖と反応して赤橙色の着色物質を生成するような結果が得られた。

この研究を行なうにあたり、終始御懇篤な指導、鞭撻を賜わった京都大学後藤良造教授、元鳥根県農事試験場技師横木国臣博士に、また、実験に種々便宜と有益なる助言をいただいた本学助教授西上一義博士に、さらにこの実験に協力いただいた井原裕子氏にそれぞれ深甚の謝意をささげる。

参 考 文 献

- 1) 横木国臣, 山葵の病害に関する研究, 鳥根県農事試験場創立77周年記念報告第3輯, 1~70 (1952).
- 2) 野津六兵衛, 横木国臣, 日植病報, **2**, 549 (1933).
- 3) 高野トミ子, 東京女子医大誌, **30**, 1557 (1960).
- 4) M. F. Mallette, C. R. Dawson, J. Am. Chem. Soc., **69**, 466 (1947).
- 5) M. H. Adams, J. M. Nelson, J. Am. Chem. Soc., **60**, 2474 (1938).
- 6) H. S. Mason, J. Biol. Chem., **168**, 433 (1947); **172**, 83 (1948); **180**, 255 (1949).
- 7) 西田ミツエ, 生化学, **32**, 801 (1960).