

腐敗病細菌のペクチン質分解酵素(endo-PTE)による細胞壁多糖質の可溶性化

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	大内,昭 富永,時任
発行元	日本植物病理學會
巻/号	40巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 427-432
発行年月	1974年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



腐敗病細菌のペクチン質分解酵素 (endo-PTE) による 細胞壁多糖質の可溶性化

大内 昭*・富永時任*

Akira OHUCHI* and Tokitō TOMINAGA*: Liberation of Cell
Wall-Polysaccharides by the Action of Pectolytic
Enzyme from Soft Rot Pseudomonad

Abstract

Previously, we demonstrated histochemically that pectic substances in middle lamella and primary walls were specifically dissolved by the infection of soft rot pseudomonads. The present investigation was conducted to confirm the characteristics of carbohydrates liberated from cell wall materials during enzymatic maceration, using purified endo-PTE preparation from *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens, N-6301 isolate. When radish fiber, instead of cell wall materials, was incubated with the purified enzyme at 30°C in 0.033 M tris-HCl buffer (pH 8.0), a large amount of carbohydrates were released rapidly in water-soluble state at the initial stage of reaction. The total yield of carbohydrates was about 27.5 mg per 100 mg of radish fiber at 90 min. incubation, which corresponds to about 3 to 4 folds of non-enzymatic degradation. About 80% of these water-soluble carbohydrates were galacturonide residue, and about 95% of them were insoluble with 80%-EtOH. It is concluded, therefore, they mainly correspond to pectin-like substances.

EtOH-soluble carbohydrates contained two fractions, neutral sugars and oligogalacturonides. In neutral sugar, no visible change was observed between incubation mixture with enzyme and without enzyme. Oligogalacturonides specifically increased by the enzyme action, and the liberation of methyl esters was confirmed by paper chromatographic analysis. These results suggest that oligogalacturonide methyl esters are released from cell wall polysaccharides by *trans*-eliminative reaction of the enzyme used.

(Received March 1, 1974)

緒 言

植物の細胞壁に分布する水不溶性のペクチン質（プロトペクチン）を分解して、組織を解離崩壊させる一群の酵素は、古くからプロトペクチナーゼと総称されてきた^{20,34)}。本酵素群は病徴発現あるいは病勢進展に関与する因子として、組織腐敗をおこす病害ではとくに重視されていたが^{7,10,33)}、その詳細は長らく不明のままであった。

近年の著しい酵素化学の進歩、とくに酵素精製法の発展にともない、これまで混合酵素系の総合作用とし

て観察されていた組織の崩壊現象が、単一のペクチン質分解酵素 (endo-PG^{2,15,18,27,31)}, endo-PATE^{8,19,30)} および endo-PTE^{5,6,14)} によって起因されると理解されるようになってきた。また、Kaji¹⁶⁾ および谷²⁹⁾ らはこれらと別に、水不溶性のペクチン質だけに作用する macerating enzyme の存在を指摘している。しかし、プロトペクチンの構造が複雑で、その水不溶性に関する知見が不明確なため^{20,26,34)}、これらの酵素による組織の崩壊機構もきわめてあいまいで²⁰⁾、実験データにもとづく論拠も貧弱である。

筆者ら^{21,22,23,24)} はこれまでに、腐敗病細菌 *Pseudo-*

* 農業技術研究所 National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo, Japan.

monas marginalis (Brown) Stevens に感染した宿主において、細胞壁のペクチン質成分が特異的に喪失することを認め、本病細菌のペクチン質分解酵素のうち、endo 型の PATE および PTE が単独で植物組織を解離することを明らかにした。しかし、その解離機構については未検討のままであって、早急な解明が望まれた。本報では、ダイコン根部より調製した粗繊維に純化 PTE を作用させ、組織の崩壊過程で遊離する糖質を検討することにした。

起稿にあたり、御懇篤な御指導と御校閲をいただいた農業技術研究所病理昆虫部長 水上武幸博士に厚くお礼を申し上げる。

実験材料および方法

粗繊維の調整法：組織の崩壊作用を検定するために、これまでにダイコンの根部を用いてきたが、この方法では生組織に含まれる諸酵素の影響を回避できないこと、さらに均一な実験系を得るのが困難であることなどから、本実験では以下の方法によって粗繊維を調製することにした。すなわち、ダイコン（品種：秋詰）の肥大根部 200 g をすりおろして、60°C の Abs. EtOH 800 ml に加え、10 分間同温度で攪拌したのち、吸引ピンを附したガラスフィルター上で濾過した。この残渣を 80% の EtOH 400 ml とともにホモジナイズし、得られた沈査をさらに 2 回同様に処理した。ついで、この EtOH-不溶部を 3 回、600 ml ずつの蒸溜水でホモジナイズして、水に可溶性の成分を除去した。以上の操作で得た粗繊維部分を常法にしたがって、EtOH およびエーテルで順次脱水し、 P_2O_5 を含むデシケーターで真空乾燥した。粗繊維の収量は供試組織 1 kg 当り約 9.20 g であり、灰分の含量は約 3.68% であった。

酵素液の調整法：供試の endo-PTE は、既報²⁴⁾の方法にしたがって腐敗病細菌 N-6301 株の培養液から純化した。実験に際し、酵素力価を 0.2 PTE 単位/ml となるようにした。

反応液の組成：粗繊維 300 mg に 30 ml の蒸溜水を加えて、4°C で 3~4 時間あらかじめ膨潤させたのち、0.1 M, pH 8.0 のトリス-HCl 緩衝液 20 ml および純化酵素液 10 ml を加え、振盪しながら 30°C でインキュベートした。所定時間後、直ちに反応液を 80°C の湯煎に 10 分間浸漬して酵素の反応を止め、ガラスフィルター濾過および遠沈操作によって清澄な溶液を得た。

糖含量の測定法：前記の上澄液に含まれる糖質を

フェノール-硫酸法⁹⁾ およびカルバゾール-硫酸法⁴⁾ で定量した。中性糖類およびウロン酸含量の算出は、畑中らの方法¹³⁾ に準拠し、両者の和を全糖量とした。結果は粗繊維 100 mg より遊離した糖量で表示した。

不飽和化合物の検出法：反応液に遊離した不飽和化合物を、235 nm における吸収¹⁾ およびチョパービツール酸法³²⁾ で測定し、標準曲線より不飽和ジガラクトウロン酸量に換算した。

EtOH による糖質の分別：上澄液に EtOH を 80% 濃度になるように加え、解離した糖質を EtOH-可溶部および不溶部に分けた。本実験では、とくに前者の画分について検討した。

ペーパークロマト法による糖の定性：EtOH-可溶部に含まれる中性糖類およびウロナイドをペーパークロマト法で検討した。すなわち、減圧下で EtOH を溜去した本画分を Dowex 50 W (H^+ 型) および Dowex 3 (OH^- 型) カラムで処理したあと、通過液を濃縮して東洋濾紙 No. 51 の原点につけた。展開はフェノール-水 (77:23) および n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5) を用いる二次元法で行なった。なお、メチルウロナイドの確認は n-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3) で展開した濾紙によった。呈色剤にはジフェニルアミン-アニリン³⁾ のほか、前報²³⁾ で用いた種々の発色試薬を用いた。

実験結果

酵素作用にともなう糖質の遊離：ダイコンの根部より調整した粗繊維に、endo-PTE を作用させると、多量の糖質が短時間のうちに解離することが判明した (Fig. 1-A)。すなわち、pH を 8.0 として本酵素を 30°C で 90 分間作用させた場合、粗繊維 100 mg から約 27.5 mg の全糖質が解離していた。Fig. 1-A のとおり、該糖質の遊離は急速に進み、10 分間のインキュベーションですでに約 21.7 mg が定量され、90 分後の値の約 78% に達していた。ウロナイドの遊離も短時間のうちに進み、10 分後には約 18.3 mg のガラクトウロン酸が定量され、90 分後における測定値の約 81% に相当していた。これらのことから、約 10 分程度のいわゆる反応初期において、各糖質が粗繊維から急速に解離すると理解され、水溶性の基質で認められた作用曲線²³⁾ にきわめてよく一致する傾向が得られた。

Fig. 1 で明らかなように、全糖量に対するウロナイドの割合は約 80% 程度であって、所定時間ごとに得られた糖質において、ほぼ一定の比率が得られた。したがって、粗繊維から遊離した糖質の大部分はウロナ

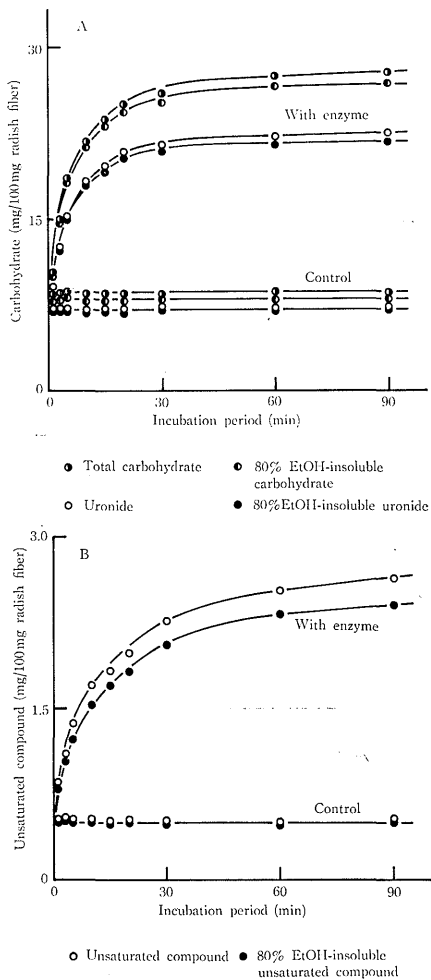


Fig. 1. Liberation of carbohydrates and unsaturated compounds from radish fiber during enzymatic maceration by endo-PTE. Fig. 1-A: Carbohydrates, Fig. 1-B: Unsaturated compounds.

Reaction mixture contained 300 mg radish fiber and purified enzyme (2.0 unit) in 0.033 M tris-HCl buffer, pH 8.0.

Total carbohydrate was shown as a total amount of neutral carbohydrate and uronide, determined by phenol- H_2SO_4 ³⁾ and carbazole- H_2SO_4 ⁴⁾ methods.

Unsaturated compounds were determined by the method of Albersheim et al.¹⁾ and calculated as unsaturated digalacturonic acid.

イド成分と考えられ、約 20% 程度の中性糖質を含むと判断される。

一方、加熱酵素液あるいは蒸留水を加えて、同様に処理した対照区では、粗繊維 100 mg 当り約 8.7 mg

の全糖質および約 8.1 mg のウロナイドが定量された (Fig. 1-A)。これらの値はいずれも酵素処理区の 1/3~1/4 に相当するが、対照区の値としては相当大きな数値であるように思われる。この原因には多くのことが考えられるが、本実験ではトリス緩衝液を加えて加熱処理したために、水不溶性の糖質が非特異的に解離したと推定される。もし以上の諸点を再吟味すれば、さらに良好な結果が得られるものと期待される。

Fig. 1-A に示したとおり、酵素処理区の各糖質はいずれも、約 95% 以上が 80%-EtOH に不溶性であった。したがって、これらはおもに比較的高分子の多糖質と考えられる。対照区の糖質も、その大部分が EtOH に不溶性であって、可溶性のウロナイドは皆無に等しかった。

不飽和化合物の遊離: endo-PTE の作用にとまって、反応液に解離する不飽和化合物を紫外部吸収によって測定した。Fig. 1-B で明らかなように、該化合物も短時間のうちに解離し、10 および 90 分後にそれぞれ約 1.70 および 2.63 mg の不飽和化合物が定量された。一方、対照区における該化合物の遊離はいずれも約 0.53 mg 程度であって、酵素処理区に比べて低い値を示していた。

90 分間の酵素作用で遊離した不飽和化合物のうち、約 90% に相当する 2.37 mg が EtOH に不溶性の高分子成分であった。一方、対照区における不飽和化合物は、そのすべてが 80% EtOH に不溶性であって、可溶性の成分は測定されなかった。

EtOH-可溶性画分の糖含量: 80% EtOH-可溶性画分における中性糖類およびウロナイドの含量を、フェノール-硫酸法およびカルバゾール-硫酸法で定量した。Table 1 に 90 分間のインキュベーションで得られた結果を示す。Table 1 のとおり、酵素処理区および対照区における中性糖類の収量には明らかな差異がなく、いずれも粗繊維 100 mg から約 320~330 μg のグルコースに相当する糖質が解離していた。したがって、本画分の中性糖類は供試酵素の作用によるよりも、むしろ非特異的な作用によって解離したと理解される。

一方、EtOH に可溶性のウロナイド成分をみると、処理区および対照区の間で明瞭な差異が認められた。Table 1 に示したとおり、対照区における該ウロナイドの遊離は、粗繊維 100 mg 当り約 7 μg であるのに対し、酵素処理区では約 335 μg のガラクトウロン酸が定量された。このことから、酵素処理区で測定されたウロナイド成分は PTE の作用によって、特異的に

Table 1. Amounts of neutral sugar and uronide in 80% EtOH-soluble fraction of water-soluble carbohydrates

	Exp.	$\mu\text{g}^{\text{a)}$ of			(U)/(N)+(U)
		Neutral sugar ^{b)} (N)	Uronide ^{c)} (U)	(N)+(U)	
Control	I	333.4	7.6	341.0	0.022
	II	321.0	7.7	328.7	0.023
	III	330.9	7.4	338.3	0.022
With enzyme	I	325.9	334.4	660.3	0.506
	II	316.1	330.9	647.0	0.511
	III	335.8	336.2	672.0	0.500

a) Micrograms per 100 mg radish fiber.

b), c) Calculated as glucose and galacturonic acid, determined by the same method in Fig. 1.

Table 2. Neutral sugars and oligogalacturonides detected on paper chromatograms of 80% EtOH-soluble fraction

	Neutral sugars			Oligogalacturonide methyl esters			
	Sucrose	Glucose	Fructose	Unsaturated dimer	Unsaturated trimer	Unsaturated tetramer	Polymer
Control	+ ^{a)}	+	±	—	—	—	±
With enzyme	+	+	±	+	+	±	±

a) Indicates relative intensities of spots.

分離したと結論される。

EtOH-可溶性画分における糖の種類：EtOH-可溶性画分に含まれる糖質をペーパークロマト法で検討し、Table 2に示す結果を得た。中性糖類はTable 2のとおり、酵素処理区と対照区との間で差異はなく、いずれの場合もグルコースと、痕跡程度のしょ糖およびフラクトースが検出された。したがって、本実験の結果からも該糖質の遊離は非特異的と考えられ、前述の定量法で得られた知見とよく一致する結論を得た。

一方、本画分におけるウロナイド成分は、酵素処理区と対照区で著しく異なることが判明した。Table 2で明らかなように、処理区ではクロマトグラム上に不飽和ジマー、トリマーおよびテトラマーガラクトウロン酸のメチルエステルが検出され、さらにペンタマー以上のポリウロナイドも見出された。これに対し対照区では、上記のような不飽和オリゴウロナイドは検出されず、原点附近にわずかなポリウロナイドが見出されるにすぎなかった。このような結果から、酵素処理区で確認されたオリゴウロナイドはendo-PTEの作用によって、trans-eliminativeに解離したと結論される。

考 察

植物細胞壁のミクロフィブリルはセルロースよりなり、非結晶性のマトリクスがこれを取りかこんでいる²⁶⁾。マトリクスは、おもにペクチン質およびヘミセルロースからなるポリサッカライドであって、ミクロフィブリルを強固に膠着している。マメ科植物などでは、さらに蛋白質様成分が膠着に関与するとされている¹¹⁾。一方、植物病原菌による組織の崩壊は、これらの細胞壁成分の分解にもとづくとして理解され³⁴⁾、緒言で触れたような数種の酵素がすでに記載されている。しかし、組織の崩壊は細胞壁成分の可溶性化によって起る現象と推測されているだけで、その機序についてはきわめて漠然としている。

筆者らは、腐敗病に罹病した宿主で観察される細胞壁の変化を解明するために、本病原細菌のendo-PTEを粗繊維に作用させたところ、ウロナイドを主成分とする多量の糖質が遊離することが判明した。既述のとおり、該糖質の大部分はEtOHに不溶性であるので、これらは分子量が比較的大きなペクチン質様成分と考

えられる。組織の崩壊にともなう、どのような糖質が溶離するかについては、現在まであまり論及されていないが、本実験の結果と同様な知見はすでに Suzuki ら²⁸⁾によって得られている。彼らは *Rhizopus* sp. の endo-PG をダイコンの根部組織に作用させ、10~40% の中性糖質を含んだポリウロナイドが遊離することを明らかにした。また、Kaji¹⁶⁾は *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* の macerating enzyme を用いて、雁皮の韌皮部からペクチン質が解離することを指摘している。

これまで、ペクチン質はガラクトウロン酸残基からなる homopolysaccharide であるとされてきた。しかし近年の知見によれば、このような例はむしろ稀で、sunflower head および amabilis fir から得られたものの以外は、すべて 10% あるいはそれ以上の中性糖類を含むとされている²⁵⁾。Hatanaka ら¹²⁾および畑中ら¹³⁾も種々の酵素を用いて、ウロン酸分子に非ウロナイド残基が結合していることを明らかにしている。したがって、植物組織から得られるペクチン質は、一般に複合多糖質と考えられる。既述のとおり、本実験で得られた多糖質では、比較的多量の非ウロナイド成分が検出されたが、これらの成分がウロナイド鎖に結合しているのか、あるいは単なる混在なのかは明らかでない。これらの点についてはさらに検討するつもりである。

つぎに、EtOH-可溶性の低分子成分に論及してみたい。本画分のうち中性糖類の解離は非特異的であって、酵素処理区および対照区の間で明瞭な差異が見出されなかった。一方、オリゴウロナイドの遊離は酵素の作用によって著しく高められ、とくに不飽和メチルウロナイドの解離が顕著であった。これらのことから、本画分のウロナイドは供試酵素の *trans-eliminative* な作用によって解離したと考察される。Suzuki ら²⁸⁾も endo-PG を用いた実験系で、ガラクトウロン酸が特異的に解離することを認めている。このような知見から、ペクチン質分解酵素による組織の崩壊は、水不溶性ペクチン質の単なる可溶性化ではなく、Kaji¹⁷⁾が macerating enzyme ですでに指摘しているように、グルコシド結合の分解にもとづくものと理解される。

すでに述べたように、EtOH-可溶性の画分は遊離糖質の 10% にも満たない。したがって、組織の崩壊過程における本画分の意義は二次的と解釈され、EtOH-不溶性の多糖質がより重要であるように思われる。この糖質の詳細は次の機会ですべて述べたい。

摘 要

腐敗病細菌 *Pseudomonas marginalis* による組織腐敗の機序を知るために、N-6301 株より純化した endo-PTE を細胞壁物質に作用させ、組織の崩壊過程で遊離する糖質を検討した。反応液を pH 8.0 とし、30°C で 90 分間 2.0 PTE 単位の酵素を作用させた場合、全糖質およびウロナイドの解離は粗繊維 100 mg 当り、それぞれ約 27.5 mg および 22.5 mg と定量され、いずれも対照区の値の 3~4 倍に相当した。これら各糖質の解離は短時間のうちに急速に進み、10 分程度のいわゆる反応初期において、すでに 90 分後の値の 78~81% に達していた。遊離糖質におけるウロナイドの含量は約 80% と計算され、20% 程度の中性糖質を含んでいた。粗繊維から解離した糖質のうち、約 95% が 80% 濃度の EtOH に不溶性の多糖質成分であり、可溶部はきわめて微量であることから、その大部分がペクチン質成分と推定された。

EtOH-可溶性画分のうち、中性糖類は非特異的作用によって解離すると考えられ、酵素処理区および対照区において、収量および組成に著しい差異は見出せなかった。一方、本画分におけるウロナイド成分の収量は、酵素処理によって著しく高められ、とくに不飽和オリゴウロナイドの解離が顕著であった。それゆえ、これらの成分は供試酵素の *trans-eliminative* な作用によって溶離したと考察した。

引用文献

1. Albersheim, P., Neukom, H. and Deuel, H. (1960). Arch Biochem. Biophys. 90: 46-51.
2. Ayers, W. A., Papavizas, G. C. and Lumsden, R. D. (1969). Phytopathology 59: 925-930.
3. Bailey, R. W. and Bourne, E. J. (1960). J. Chromatog. 4: 206-213.
4. Bitter, T. and Muir, H. M. (1962). Anal. Biochem. 4: 330-334.
5. Bush, D. A. and Codner, R. C. (1968). Phytochemistry 7: 863-869.
6. Byrde, R. J. W. and Fielding, A. H. (1968). J. gen. Microbiol. 52: 287-297.
7. Ceponis, M. J. and Friedman, B. A. (1959). Phytopathology 49: 141-144.
8. Dean, M. and Wood, R. K. S. (1967). Nature 214: 408-410.
9. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Anal. Chem. 28: 350-356.

10. Friedman, B. A. and Ceponis, M. J. (1959). Science 129: 720-721.
11. Ginzburg, B. Z. (1958). Nature 181: 398-400.
12. Hatanaka, C. and Ozawa, J. (1964). Agr. Biol. Chem. 28: 627-632.
13. 畑中千歳・小沢潤二郎 (1966). 農化誌 40: 98-105, 106-109.
14. Ishii, S. and Yokotsuka, T. (1971). Agr. Biol. Chem. 35: 1157-1159.
15. Ishii, S. and Yokotsuka, T. (1972). *ibid.* 36: 1885-1893.
16. Kaji, A. (1956). Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 20: 8-12.
17. Kaji, A. (1959). *ibid.* 23: 131-136.
18. Kaji, A. and Okada, T. (1969). Arch. Biochem. Biophys. 131: 203-209.
19. 梶 明・藤井 勇・岩原章二郎・佐藤優行 (1972). 農化誌 46: 509-516.
20. Kertesz, Z. I. (1951). Pectic Enzymes: The Enzymes. Vol. 1, Part 2. Academic Press, New York. pp. 745-768.
21. 大内 昭・富永時任 (1973). 農技研報 C 27: 53-79.
22. 大内 昭・富永時任 (1973). 日植病報 39: 417-424.
23. 大内 昭・富永時任 (1974). 農技研報 C 28: 63-89.
24. Ohuchi, A. and Tominaga, T. (1974). Ann. Phytopath. Soc. Japan 40: 22-29.
25. Rogers, H. J. and Parkins, H. R. (1968). The Hemicelluloses and Pectins: Cell Walls and Membranes. E & F. N. Spon, London. pp. 27-44.
26. Setterfield, G. and Bayley, S. T. (1961). Ann. Rev. Plant Physiol. 12: 35-62.
27. Suzuki, H., Abe, T., Urade, M., Nishizawa, K. and Kuroda, A. (1967). J. Ferment. Technol. 45: 73-85.
28. Suzuki, H., Henmi, N., Nishizawa, K. and Kuroda, A. (1967). *ibid.* 45: 1080-1088.
29. 谷 利一 (1965). 香川大農紀要 18: 1-83.
30. Unbehaun, L. M. and Moore, L. D. (1970). Phytopathology 60: 304-308.
31. Wang, M. C. and Keen, N. T. (1970). Arch. Biochem. Biophys. 114: 749-757.
32. Weissbach, A. and Hurwitz, J. (1959). J. Biol. Chem. 234: 705-709.
33. Wood, R. K. S. (1955). Ann. Bot. 19: 1-27.
34. Wood, R. K. S. (1960). Ann. Rev. Plant Physiol. 11: 299-322.