

Xanthomonas campestris pv. citri Ku 7101の産生する耐熱性抗菌物質の精製と若干の性質

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	松尾,憲総 松山,宣明 脇本,哲
発行元	日本植物病理學會
巻/号	47巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 472-479
発行年月	1981年9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



Xanthomonas campestris pv. *citri* Ku 7101 の 産生する耐熱性抗菌物質の精製と若干の性質

松尾憲総*・松山宣明**・脇本 哲**

Norifusa MATSUO*, Nobuaki MATSUYAMA** and Satoshi WAKIMOTO**:
Purification and Some Properties of a Heat-Stable Antibacterial Substance
Released from *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Ku 7101

Abstract

An antibacterial substance which is only effective to homologous isolate was released from bacterial cells of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Ku 7101 by heat treatment. The substance was dialyzable through Visking tube and stable to DNase, RNase, Trypsin, Pronase treatment and heating at 120°C for 30 min. This substance was eluted from active carbon column by 20-25% ethanol and antibacterial activity of eluates was correlated with intensity of anthrone color reaction. This fraction showed single spot on thin layer chromatogram. The active substance was positive to naphthoresorcinol and sulfuric acid, suggesting that the substance could be mainly composed of sugars.

The antibacterial substance considerably inhibited multiplication of *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 in liquid medium and ghost cells were observed with high frequency under electron microscope. The substance, however, was inactive against resting cells in phosphate buffer.

(Received February 6, 1981)

諸 言

Xanthomonas campestris pv. *citri* の1菌株 Ku 7101をクロロホルム処理または53~55°C, 30分間熱処理すると自分自身に抗菌作用を示す物質を菌体外に放出する⁹⁾。この物質は200,000×g, 240分間の遠心でも沈澱せず、また、その抗菌スペクトラムは極めて限られており、産生株自身と *X. campestris* pv. *campestris* X1-1-1 株に対してだけ明瞭な阻止帯を形成した⁹⁾。

一般にバクテリオシンはたん白質性であり、バクテリオシン産生株は自分自身が産生するバクテリオシンに対して免疫性であるといわれている^{2,5,6,10,12)}。免疫性でないといわれた特殊な菌株、例えば、*Escherichia coli* 15h⁻¹³⁾、グループAに属する *Streptococcus* 属菌^{14,15)}の産生する物質はいずれもバクテリオシンではなく、それぞれ、欠陥ファージ¹⁾、過酸化水素⁴⁾であることが明らかにされた。

本実験は *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株の産生する抗菌物質の諸性質を明らかにする目的で行ったものである。

材料および方法

供試細菌 *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株は佐賀県園芸試験場より送付を受けた罹病カンキツ葉から著者らが分離したものであり、*X. campestris* pv. *citri* Ku 7101-1 株は *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株を PSA 斜面培地〔ジャガイモ (300g) 煎汁 1 liter, リン酸二ナトリウム 2g, 硝酸カルシウム 0.5g, ペプトン 5g, ショ糖 20g, 寒天 15g, pH7.2〕で継代中に自然突然変異によって生じたものであり、抗菌物質は産生するが、その物質に対して免疫性に変異した菌株である。*X. campestris* pv. *citri* N 6101-1, *X. campestris* pv. *campestris* X1-1-1, *Erwinia carotovora* N 7131 株は農林水産省農業技術研究所より分譲されたもので

* 現在、石原産業(株)中央研究所 Present address: Central Research Laboratories, Ishiharasangyo Kaisha, Ltd., Nishishibukawa, Kusatsu 525, Japan

** 九州大学農学部 Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

ある。

抗菌物質の調製 寒天濃度1.5%の YPDA 培地：ペプトン0.6g, デキストロース3g, 酵母エキス3g, 寒天15g, 蒸留水1 liter, pH 7.2 (以下1.5% YPDA 培地と略称, YPD 培地は寒天を含まないもの) の平板上で, 30°C, 48時間培養した *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株を蒸留水に懸濁し, 100°C, 30 分間熱処理⁹⁾ したのち, 約 35,000×g, 30分間遠心して細菌細胞ならびに菌体破片を除去した上清を抗菌物質原液とした。

抗菌活性の検定 下層に1.5% YPDA 培地を流し込み, その上層に, 溶かして45~47°Cに保った0.5% YPDA 培地と指示菌 *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株 (約 10⁷ cells/ml) とを混ぜたものを重層し, その上にベニシリンカップを置き, カップ中に0.2ml ずつ被検液を入れた。30°C, 48時間培養後形成される阻止帯の巾を計測することにより抗菌活性を比較検討した。

抗菌物質の性質の検討 (1) 透析性 抗菌活性の検定の項で述べた方法で重層した指示菌の平板上に抗菌物質を入れたビスキングチューブ (18/32) を置き, そのチューブの周辺に阻止帯ができるかどうかにより透析性を調べた。対照としては蒸留水を入れたビスキングチューブを用いた。(2) 酵素処理 凍結乾燥した抗菌物質を0.01M りん酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かし, DNase DN-25, RNase TYPE I-A, トリプシン (以上 Sigma) およびプロナーゼ (科研化学) をそれぞれ 100μg/ml または 1mg/ml となるように加え, 30°C または 37°C で 60分間, 静かに振とうしたのち, すぐに氷冷し, 酵素処理の抗菌活性に及ぼす影響をみた。対照として, 無処理の抗菌物質および酵素液のみの抗菌活性を検討した。

有機溶媒による沈澱 抗菌物質の原液に-20°C のアセトン, エタノール, メタノールをそれぞれ 25, 50, 75 および 90% になるように攪拌しながら加え, 4°C で 60分間静置した。約 7,000×g で, 30分間遠沈し, 沈澱部と上清から溶媒を蒸発除去後, それぞれの抗菌活性を検討した。また, 75% メタノールで沈澱する物質を除いたのち, その上清にエチルエーテルを 1:1, 1:3, 1:9 (v/v) になるように加えることによって抗菌物質が沈澱するかどうかを検討した。沈澱物の抗菌活性と原液の活性の比から沈澱した抗菌物質の割合を推定した。

抗菌物質の精製 抗菌物質の純化を目的として各種のクロマトグラフィーを試みた。

(1) 活性炭カラムクロマトグラフィー 有機溶媒 (メタノール+エチルエーテル) 処理後遠沈して得た

試料を蒸留水にとかし, クロマト用活性炭 (和光純薬) をつめたカラムに吸着させ, 水, 10, 15, 20, 25, 30% のエタノールで順次溶出した⁸⁾。エタノールの濃度は溶出された液のアンスロン反応の変化をみながら, 反応がピークを過ぎたところで, 次の濃度へとあげていった。また, 各フラクションの活性はエタノールを蒸発除去したのち, 蒸留水で一定の量にしてその活性を比較した。

(2) セファデックス G-25 による分画 有機溶媒沈澱分画および活性炭カラムクロマトにおける活性分画を減圧下で濃縮したのち, セファデックス G-25 にかき, 蒸留水で溶出し, その抗菌活性とアンスロンおよびオルシノールによる呈色反応, 260nm における紫外線吸収を調べた。

(3) 薄層クロマトグラフィー^{11,16)} 有機溶媒で沈澱させ, さらに活性炭カラムクロマトで分画した試料を薄層で展開した。供試した展開溶媒は下記のとおりである。n-ブタノール：酢酸：エーテル：水 (9:6:3:1), n-ブタノール：ピリジン：酢酸：水 (15:10:3:12), n-ブタノール：酢酸：水：ピリジン：N, Nジメチルホルムアミド (37:19:6:13:15), メタノール：ホルマリン：アセトン：アンモニア水 (42:16.5:25:16.5), 酢酸エチル：酢酸：メタノール：水 (60:15:15:10), ピリジン：酢酸エチル：酢酸：水 (36:36:7:21), 酢酸エチル：イソプロパノール：ピリジン：水 (50:22:14:14), イソプロパノール：ピリジン：酢酸：水 (40:32:2:24), イソプロパノール：酢酸：水 (2:1:1), n-プロパノール：アンモニア水：水 (40:60:5), n-ブタノール：アセトン：水 (4:5:1), n-ブタノール：ピリジン：水 (1:1:1), n-プロパノール：酢酸エチル：水 (7:1:2), クロロホルム：アセトン (9:1), クロロホルム：メタノール (9:1)。

固定相にはワコーゲル B-10 (和光純薬) および Avicel SF (フナコシ薬品) を 250μm の厚さの薄層にして用いた。スポットの検出には硫酸 (シリカゲルの場合), ニンヒドリン および ナフトレゾルシンを用いた。スポット相当部をかきとり, 水で溶出し, 抗菌活性の有無を調べた。

抗菌物質の作用機作の検討 抗菌物質の作用機作を検討するため, 活性炭カラムクロマトグラフィーの活性分画を 0.2μ のミリポアフィルターで除菌して供試した。供試した抗菌物質の濃度はアンスロン反応により計測し, グルコース相当量として表示した。

(1) 液体培地中の菌に対する作用 YPD 培地 で

30°C, 24時間振盪培養した *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101, Ku 7101-1, N 6101-1, *E. carotovora* N 7131 を YPD 培地で希釈して、それぞれを Biolog II (日本分光) の2本のセルに入れ、その一方に抗菌物質を加え、他方には、等量の殺菌水を加えて対照としながら培養を続け、抗菌物質の影響をみた。抗菌物質の濃度は糖含量で $20\mu\text{g/ml}$ (6mm巾の阻止帯を形成する液の100分の1量) または $150\mu\text{g/ml}$ (17mm巾の阻止帯を形成する液の100分の1量) とした。

(2) 緩衝液中の菌に対する作用 YPD 培地で 30°C, 16時間振盪培養した *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101株を0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で遠心洗浄したのち、Biolog II の2本のセルにいれ、一方に糖含量で $20\mu\text{g/ml}$ または $150\mu\text{g/ml}$ になるように抗菌物質を加え、他方を対照として、それぞれ培養し、抗菌物質の影響をみた。

電子顕微鏡観察 抗菌物質を $150\mu\text{g/ml}$ になるように加えた培地で、30°C, 17時間振盪培養した *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株を 0.2μ のミリポアフィルター上で蒸留水を用いて洗浄し、コロジオン膜をはった銅製のシートメッシュ上にのせ、自然乾燥したのち白金パラジウムでシャドウイングし、JEL7-A 型電子顕微鏡 (日本電子) で観察した。

結 果

抗菌物質の性質

X. campestris pv. *citri* Ku 7101 株を YPDA 平板培地を用いて、30°Cで培養し、一定時間毎

に熱処理して抗菌物質の産生量を検討した結果、抗菌物質は培養48時間後にもっとも多量に産生され、96時間以後は産生量が減少した。さらに、この物質は菌体を80°C以上で熱処理した場合には、無処理または60°C以下で熱処理をした場合よりも多く菌体外に産生された。この抗菌物質はトリプシン、プロナーゼ、DNase, RNase により全く影響を受けず、透析膜 (Visking) を通過した。また、120°C, 30分間の熱処理によっても不活化されず、pH4~10の範囲で安定であった。

有機溶媒による水溶液からの沈澱

本物質はアセトン50%では全く沈澱せず、75%で14%, 90%で83%が沈澱した。エタノールでは75%まで全く沈澱せず、90%で33%が沈澱した。メタノールでは90%でも全く沈澱しなかった。メタノールを75%になるように加えてできた沈澱 (抗菌活性なし) を取り

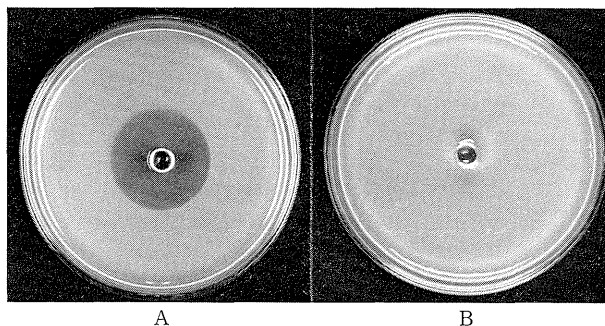


Fig. 1. Inhibition zone shown by the substance precipitated with 90% diethyl ether from the supernatant after 75% methanol precipitation Indicator:

A) *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101

B) *X. campestris* pv. *campestris* X 1-1-1

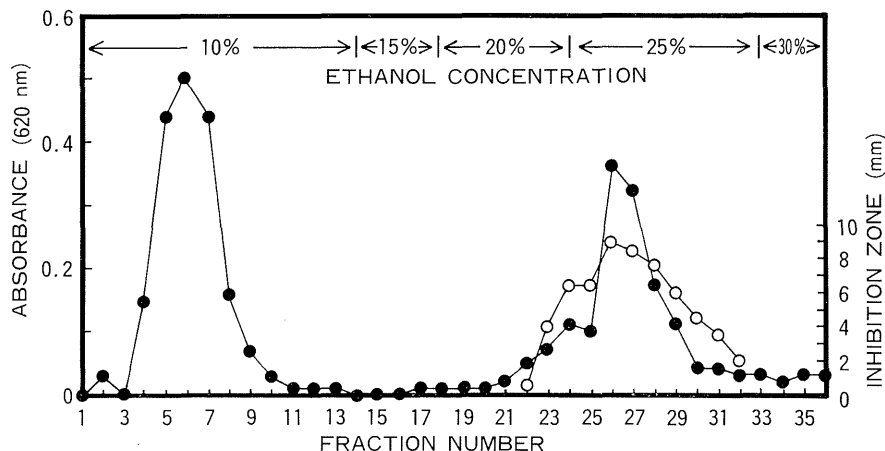


Fig. 2. Active carbon column chromatography of the antibacterial substance Column: 1.7×24 cm, Flow rate: 150ml/hr, Fraction volume: 25 ml

●—●: Anthrone reaction ○—○: Inhibition zone

除いた上清に 1:1, 1:3 (v/v) になるようにエチルエーテルを加えると、それぞれ、24%, 62%の抗菌物質が沈澱し、1:9の添加によってほぼ完全に沈澱した。

細菌細胞を 100°C, 30 分間熱処理し、有機溶媒で沈澱させることによって調製したこの物質は産生菌である *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株に対してだけ抗菌作用を示し、*X. campestris* pv. *campestris* X 1-1-1 に対する抗菌作用は示さなかった (Fig. 1)。

活性炭カラムクロマトグラフィー

エタノール濃度10%で溶出される分画と、20%からゆるやかに溶出されはじめ25%で急速に溶出される分画にアンスロン反応が認められた。それらの分画のうち抗菌活性は20~25%分画にみられ、活性とアンスロンによる呈色反応とはほぼ一致した (Fig. 2)。さらに、このカラムから、50%エタノール:2%酢酸およびエタノール:ピリジン:水 (2:1:2) で溶出するこ

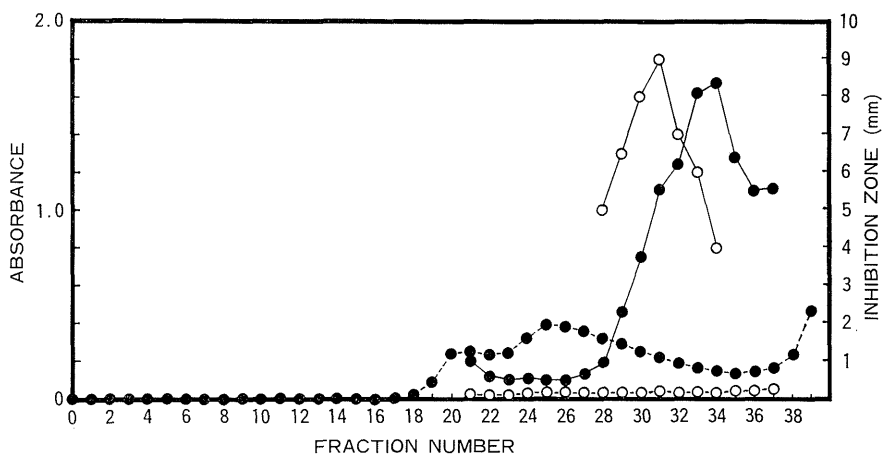


Fig. 3. Fractionation by Sephadex G-25

Column: 2.5×42 cm

Flow rate: 80 ml/hr

Fraction volume: 4 ml

○—○: Inhibition zone
●—●: Anthrone reaction
●—●: UV absorbance at 260 nm
○—○: Orcinol reaction

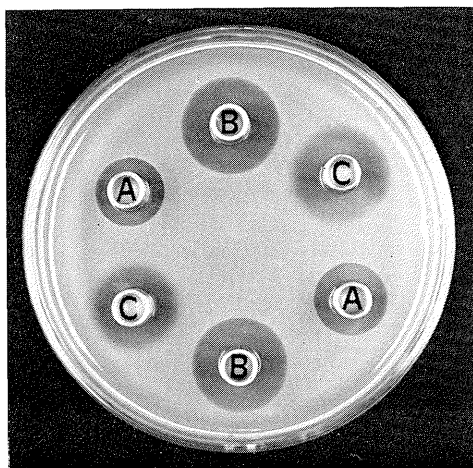


Fig. 4. Antibacterial activity of anthrone positive fractions separated by Sephadex G-25

A: Front part of the peak (Fraction No. 28-32)

B: Peak (No. 33-34)

C: Rear part of the peak (No. 35-37)

とを試みたが、アンスロン反応陽性の物質は溶出されなかった。

セファデックス G-25 による分画

有機溶媒により沈澱した分画を蒸留水に溶かしたのち、セファデックス G-25 で分画すると、Fig. 3 のようにアンスロン反応の強さおよび260nmにおける紫外線吸収のピークと活性のピークとが一致せず、また活性炭カラムにおける活性分画をセファデックス G-25 によって分画しても、同様に、アンスロンおよび260nmにおける吸収と活性のピークは一致しなかった。しかも、活性分画の阻止帯の鮮明度に差が認められた。すなわち、活性のピーク前からピークにかけての分画によって生じた阻止帯は、非常に鮮明であるのに対し、ピークの後の分画では不鮮明となった (Fig. 4)。

ピーク前からピークにかけての分画を集めて再びクロマトグラフィーをおこなったが、同様の結果であった。また、熱処理をおこなわず、クロロホルム処理により細胞からとり出した物質も同様の結果を示した。

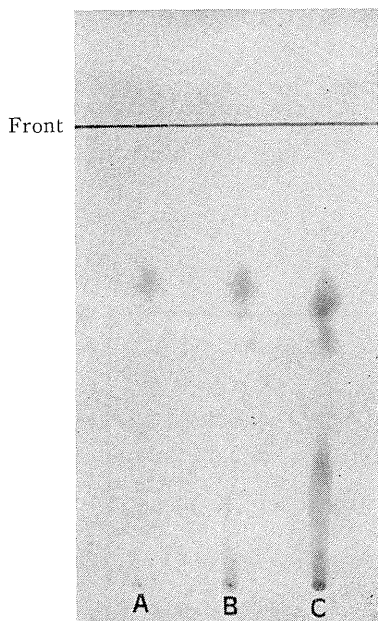


Fig. 5. Silica gel thin layer chromatography of the antibacterial substance

A: Active fraction obtained by active carbon column chromatography

B: Active fraction obtained by Sephadex G-25 column chromatography

C: Active fraction precipitated by organic solvents

Developing solvent: isopropanol-pyridine-acetic acid-water (40:32:2:24)

Color reagent: naphthoresorcinol

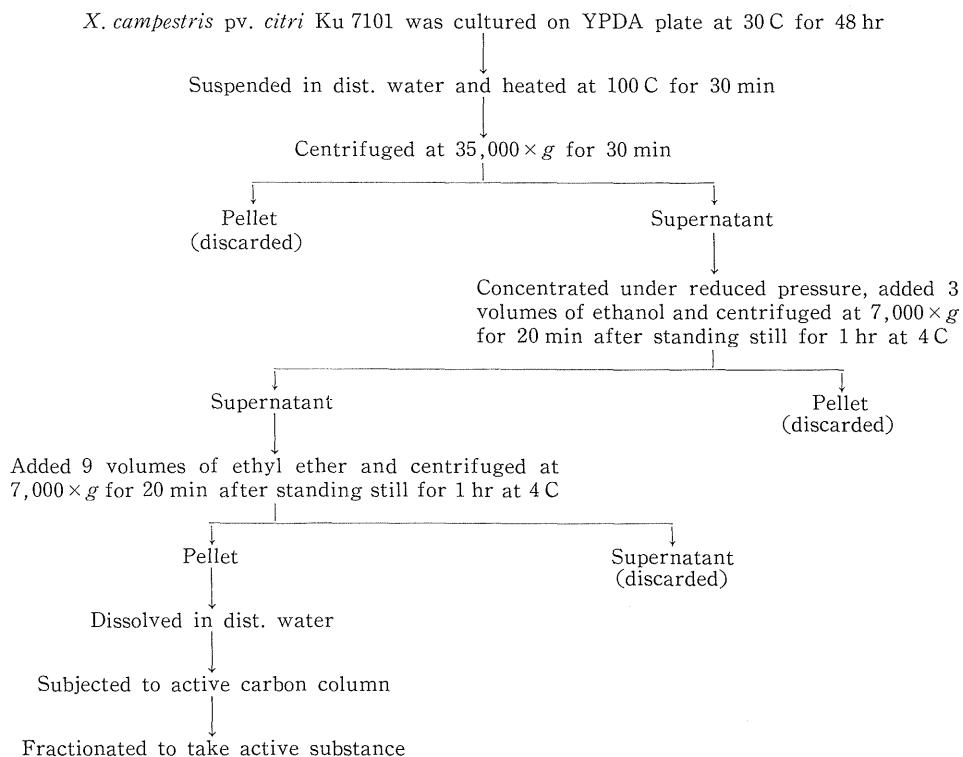


Fig. 6. Purification of the antibacterial substance produced by *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101

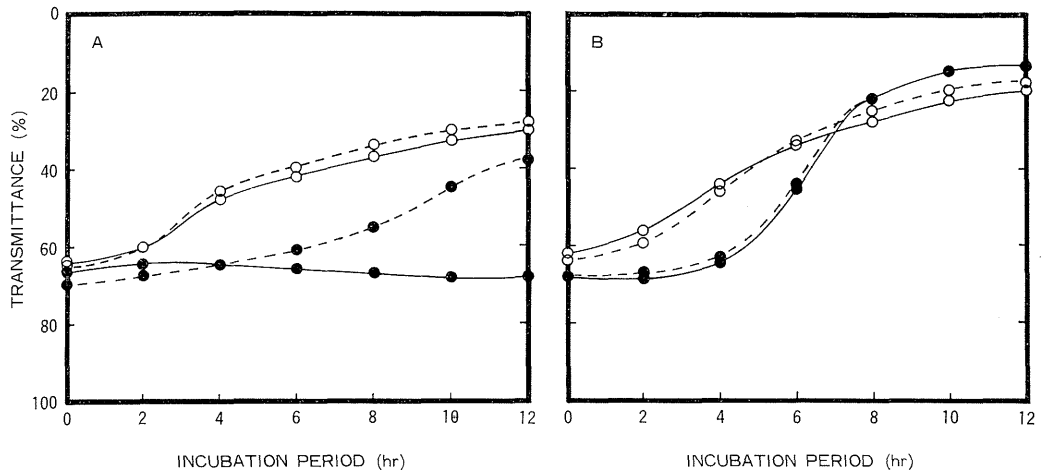


Fig. 7. Effect of the antibacterial substance on the growth of xanthomonads

- A ●—●: *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101, added with the substance
 ●.....●: Do., check
 ○—○: *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101-1, added with the substance
 ○.....○: Do., check
 B ○—○: *X. campestris* pv. *citri* N 6101-1, added with the substance
 ○.....○: Do., check
 ●—●: *E. carotovora* N 7131 added with the substance
 ●.....●: Do., check

薄層クロマトグラフィー

有機溶媒によって沈澱した抗菌物質をイソプロパノール：ピリジン：酢酸：水(40：32：2：24)で展開し、ナフトレゾルシンで発色すると、数個のスポットが検出された (Fig. 5-C)。また、活性炭カラムのピーク分画は Rf 値 0.75 に単一スポットとして認められ、活性もその部位に認められた (Fig. 5-A)。このスポットはニンヒドリン反応陰性であり、硫酸およびナフトレゾルシン陽性であった。Avicel 薄層を使用した場合も同様の結果が得られた。また、他の展開溶媒によっても、活性炭カラム分画後の試料は単一スポットとして検出された。

抗菌物質の精製

以上の実験結果から、*X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 菌株を熱処理またはクロロホルム処理することによって産生される抗菌物質は Fig. 6 に示す方法によって精製できることが明らかになった。

抗菌物質の細菌に及ぼす影響

糖含量 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように抗菌物質を加えて、液体培養すると、*X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株ではわずかに増殖が抑えられるのに対し、*X. campestris* pv. *citri* Ku 7101-1, N 6101-1, *E. carotovora* N 7131 ではほとんど影響がみられなかった。糖含量 150 $\mu\text{g}/$

ml の抗菌物質を作用させると、*X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 の生育は一時的に抑制されたが、以後徐々に、増殖した。しかしながら、*X. campestris* pv. *citri* Ku 7101-1, N 6101-1, *E. carotovora* N 7131 はほとんど作用を受けなかった (Fig. 7)。

また、作用を受けた *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 株を電子顕微鏡で観察すると、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合はやや長くなった細胞が時々みられる程度で対照と顕著な差は認められなかったが、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように抗菌

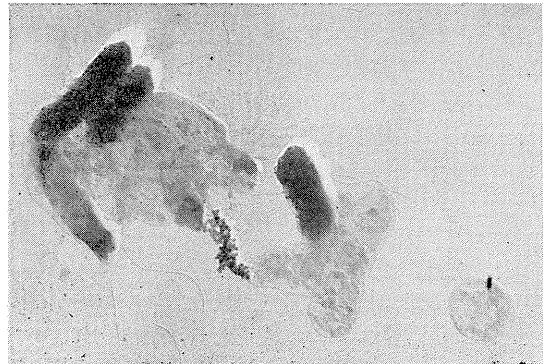


Fig. 8. Electron micrograph of the cells of *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101 treated with antibacterial substance

物質を加えた場合には *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101株は崩壊して内容物が漏出したような形態を示すものが高頻度に認められた (Fig. 8)。緩衝液中の菌に作用させた場合は、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においても全く溶菌的な作用は認められなかった。

考 察

X. campestris pv. *citri* Ku 7101 株のコロニーをクロロホルム蒸気または53~55°Cで処理した時に産生される抗菌物質は homologous な菌株の外 *X. campestris* pv. *campestris* X1-1-1 に対しても抗菌性を示した。ところが、産生菌を100°C、30分間熱処理した場合に産生される抗菌性物質を有機溶媒で沈澱させると自分自身に対して抗菌作用を示すが、*X. campestris* pv. *campestris* X1-1-1 に対しては抗菌作用を示さなくなった。これらのことから *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101の産生する抗菌物質には少なくとも2種類あり、一方は *X. campestris* pv. *campestris* X1-1-1 に作用し、100°C、30分間の熱処理で不活化されるものであり、他方は耐熱性で *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101のみに作用する物質であることが考えられた。Homologous な菌に作用する抗菌物質はニンヒドリン反応は陰性であるが、アンスロン反応は陽性であり、260nmにおける紫外線吸収がないことから考えると、核酸などを含まず、主として、糖を含む物質と思われる。自己分解酵素⁷⁾などを除くと、細菌が産生する物質のうち、産生菌と homologous な菌に対して溶菌作用を示す物質は未だ報告されていないことから、この物質は未知物質である可能性がある。

この物質は活性炭カラムで精製することにより薄層クロマトグラフィー上では単一のスポットを示した。しかしながら、活性炭カラムにおける活性分画をセファデックス G-25により分画するとアンスロン反応と活性のピークにはわずかのずれがみられた。その原因が類似物質の共存のためか、あるいは、精製する過程で分解されて活性物質の一部が欠失したためかは現在

のところ不明である。

この抗菌物質は DEAE 陰イオン、CM 陽イオン交換セルロースには吸着せず、イオンの中性であると思われた。また、ビスキングチューブを通過すること、セファデックス G-25 上での挙動などから推測すると分子量は5,000以下と考えられる。

増殖中の細菌にこの物質を作用させて、細菌の形態的变化を電子顕微鏡で観察すると、細胞内容物が漏出しゴースト化した細胞が多数観察された。しかし、この物質を緩衝液中の菌に作用させても濁度に影響がないことから、この物質は増殖中の菌に対してのみ作用を示すものと思われる。

この抗菌物質による溶菌現象の生物学的な意義はまったく不明であるが、自然界における増殖を自己制御し、自分自身を一定の細胞数に保つ働きをしているとも考えられ、その意味では自己分解酵素と違った新しい自己制御機構として生物的に興味ある現象である。

摘 要

Xanthomonas campestris pv. *citri* Ku 7101 株はクロロホルムまたは熱によって処理されると、自分自身に抗菌作用を示す物質を産生する。この物質は透析膜を通過し、DNase, RNase, トリプシン, プロナーゼなどの作用を受けず、120°C、30分間の熱処理に対して安定であった。また、活性炭カラムクロマトグラフィーでは20~25%のエタノールで溶出され、その活性はアンスロン反応の強さと一致した。この活性分画を濃縮し10種以上の展開溶媒により薄層クロマトグラフィーを行うと活性を示す単一のスポットのみが検出された。この物質はナフトレゾルシノール、濃硫酸により発色し糖を含むことが示された。本物質を液体培地で増殖中の *X. campestris* pv. *citri* Ku 7101株の細胞に作用させると著しく生育を抑制し、多数のゴースト化した細胞を生じた。しかし緩衝液中で休止細胞に作用させた場合には全く影響がみられなかった。

引 用 文 献

1. Endo, H., Ayabe, K., Amako, K. and Takeya, K. (1965). Virology 25: 469-471.
2. Fredericq, P. (1957). Ann. Rev. Microbiol. 11: 7-22.
3. 福井作蔵 (1974). 還元糖の定量法 (生物化学実験法). 東京大学出版会, 東京.
4. Halke, H., Starke, R., Jacob, H.E. and Köhler, W. (1974). J. Med. Microbiol. 7: 367-374.
5. Ivánovics, G. (1962). Bacteriol. Rev. 26: 108-118.
6. 景山 真・大隅萬里子 (1974). 生化学 46: 149-164.
7. 日下 巖 (1972). 蛋白質核酸酸素 17: 581-587.

8. 松田和雄・渡辺敏幸 (1968). 蛋白質核酸酵素 別冊糖質研究法 39-48.
9. 松尾憲総・脇本 哲 (1977). 日植病報 43: 9-14.
10. Nomura, M. (1967). Ann. Rev. Microbiol. 21: 257-284.
11. 岡田正志・松井道夫 (1964). 薄層クロマトグラフィー第1集 (化学の領域 増刊 No.59). 南江堂, 東京.
12. Reeves, P. (1972). The Bacteriocins. Springer-Verlag, Berlin • Heidelberg • New York.
13. Ryan, F. J., Fried, P. and Mukai, F. (1955). Biochim. Biophys. Acta 18: 131.
14. Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. and Gray, E. D. (1973). J. Exp. Med. 138: 1168-1183.
15. Tagg, J. R., Read, R. S. D. and McGiven, A. R. (1973). Antimicrob. Agents Chemother. 4: 214-221.
16. 友田正司 (1968). 蛋白質核酸酵素 17: 581-587.