

ノリに緑斑病様障害をおこす細菌の粗酵素による葉体崩壊

| | |
|-------|------------|
| 誌名 | 日本水産學會誌 |
| ISSN | 00215392 |
| 著者 | 藤田, 雄二 |
| 巻/号 | 39巻8号 |
| 掲載ページ | p. 911-915 |
| 発行年月 | 1973年8月 |

ノリに緑斑病様障害をおこす細菌の粗酵素 による葉体崩壊*

藤田 雄二
(1973年5月1日受理)

Maceration of Laver Frond by Enzymes of Bacteria Causing Green Spot Rotting-Like Deterioration

Yuji FUJITA**

Collapse of the laver frond by enzymes of bacteria, *Vibrio* sp. strain V7 and *Pseudomonas* sp. strain N9 which cause "green spot rotting-like deterioration", was investigated to elucidate the action of these bacteria on laver.

The crude extracellular enzyme of each strain macerated frond pieces. Degradation of the acidic polysaccharide, porphyran, in intercellular space was recognized in the macerated parts of frond pieces. The activities of crude enzymes which macerate frond pieces had high values at pH 6.2-8.3 at temp. 30-40°C for strain V7 and at pH 5.4-8.0 at temp. 35-40°C for strain N9. The change in the frond pieces due to enzymatic treatment was similar not only to the phenomenon observed *in vitro* but also to the symptom *in situ* in the occurrence of plasmoptysis from liberated cells.

先に著者らはノリ罹病葉体から緑斑病様の障害をおこす細菌を分離し、その分泌酵素が葉体の崩壊に関係すると推察した¹⁾。そこで、これらの細菌の分泌酵素によるノリ葉体の崩壊を確かめるために、培養液から調製した粗酵素液を用いノリ葉体の崩壊について試験した。その結果、葉体組織は酵素作用によつて崩壊し、緑斑病にはこれらの病害関連細菌の分泌酵素が関与していることを立証することが出来たので報告する。

実験方法

供試細菌 この実験には既報^{1,2)}の緑斑病様の障害を与える菌株のうち、*Vibrio* sp. V7株と *Pseudomonas* sp. N9株の2菌株を用いた。前培養には ZoBELL 2216E 培地の寒天斜面を用い、保存には同半流動培地を使用した。培養はすべて 25°C で行ない、保存は 5°C で行なつた。

粗酵素液調製のための培養法 葉体崩壊力が強い培養液を得るために、培地組成ならびに培養条件を検討し、次の方法を採用した。培地組成は硝酸アンモニウム 1g, リン酸二カリウム 0.1g, 塩化第二鉄 0.6mg, トリサミノメタン 1g, 75% 貯蔵海水 1l とし、pH 7.5 に調整した。この培地に市販アサクサノリを乾燥粉末とし、別に滅菌して 0.2% 添加した。多量培養には 5l の培養瓶に培地 4l を入れ、これに 2 日間前培養した一定量の細菌を接種し、25°C で 5 日間通気し、その後 2 日間は静置した。

粗酵素液の調製 セライト (スタンダードスーパーセル) でろ過・除菌した培養液に硫酸アンモニウムを飽和し、冷蔵庫 (5°C) に一夜放置した後、セライトを用いてろ過しそのケーキ上に沈殿を集めた。沈殿は 2.5% 塩化ナトリウム水溶液 130 ml に溶かし、セロファンチューブ (Visking 社) を使用し 2.5% 塩化ナトリウム水溶液 4l を外液として、5°C で 36 時間透析した。これを粗酵素液とし、蛋白質の測定はゼラチンを標準として、LOWRY 法³⁾の方法によつた。なお透析外液に 2.5% 塩化ナトリウム水溶液を使用した

* この研究の概要は昭和 47 年度日本水産学会秋季大会において講演した。

** 長崎大学水産学部 (Fac. Fish., Nagasaki Univ., Nagasaki, Japan)

のは、蒸留水透析では酵素が失活するためである。

粗酵素の葉体崩壊力の測定法 粗酵素液の作用基質にはスサビノリ *Porphyra yezoensis* の健全葉体の切片 (2×2 mm) を使用した。反応系は試験用ノリ切片 3 枚、緩衝液 2 ml、粗酵素液 2 ml および 1% アジ化ナトリウム溶液 0.1 ml とした。緩衝液は 0.2 M 酢酸・酢酸ナトリウム (pH 4)、0.05 M トリスアミノメタン・マレイン酸 (pH 5-8.5) および 0.05 M トリスアミノメタン (pH 9) の各緩衝液を使用し、いずれも 2.5% 塩化ナトリウム水溶液で調製した。反応液は L 字型試験管 (内径 16 mm, 水平部長さ 138 mm) に入れ、モノ型振盪機を用い一定条件で作用させた。葉体崩壊力は、作用前後の健全部の面積を簡易培養顕微鏡でマイクロメーターを使用して測定し、原面積に対して減少した面積を崩壊率 (%) で示した。対照は粗酵素液の代りに 2.5% 塩化ナトリウム水溶液を用いた。

ノリ葉体の組織染色検査 組織の染色には過ヨウ素酸-シッフ反応 (PAS 反応)⁴⁾ による多糖検出法、トルイジンブルー溶液⁴⁾ ならびにニュートラルレッド溶液⁵⁾ による酸性多糖の検出法およびメチレンブルー染色法を採用した。

粗酵素によるノリ葉体中の酸性多糖分解試験 生ノリ葉体の細片 10 g (水分 53.3%) に、緩衝液 (pH 7.0) 50 ml、粗酵素液 50 ml およびアジ化ナトリウム 1 g を加え、37°C で 50 時間反応させた。反応液は 25 時間経過後に新しく交換した。反応後に残留葉体は分別し、これに 200 ml の蒸留水を加え、2 時間宛 3 回加熱抽出を反復した。全抽出液中の酸性多糖は、LLOYD ら⁶⁾ が海藻の硫酸多糖に採用した方法で処理し、ポルフィラン (ノリから REES & CONWAY⁷⁾ の方法で調製したものを、LLOYD ら⁶⁾ の方法により精製) を標準にしてリバノールで比濁定量した。対照試験は前同様にした。

実験結果

ノリ葉片に粗酵素液を作用させると、切断部である縁辺から軟化してくる。この軟化部分は緑色化しており、未作用部分とは明瞭に識別される (Fig. 1. a, b)。そして軟化部分では組織の諸所に裂開がおき、細胞は単一あるいは細胞集団として遊離するが、クチクラ層は残留する。また軟化部分の個々の細胞は膨潤・変形し、内部構造は次第に不明瞭になり、小顆粒が見えるようになる (Fig. 1. c, d)。遊離した細胞では、希に原形質吐出が認められる場合もあつた。

次に V7 と N9 両菌株の粗酵素によるノリ葉体崩壊と温度および pH の関係を試験し、その結果を Fig. 2 に示す。ノリ葉体の崩壊率は、V7 株粗酵素では pH 6.2-8.3、温度 30-40°C、また N9 株粗酵素では pH 5.4-8.0、温度 35-40°C の範囲で高い値を示した。

さらに酵素作用によるノリ葉体の崩壊過程を染色反応により組織学的に検討し、Table 1 の結果を得た。生ノリ葉片では細胞膜の部分のみが PAS 反応陽性を示し、細胞内容および細胞間隙はトルイジンブルー、ニュートラルレッドおよびメチレンブルーの各塩基性色素によつて染色された。一方、酵素液で処理した葉片の緑色・軟化部分および遊離細胞集団においては、細胞膜部分は PAS 反応陽性を示し、その染色性に変化は認められなかつた。しかしこれらの細胞間隙はいずれの塩基性色素によつても染色されず、細胞内容および細胞膜の周囲が僅かに染色されるのみであつた (Fig. 1. e, f)。

次に酵素処理と化学的処理の効果を染色試験によつて比較してみた (Table 1)。化学処理は FREI & PRESTON⁸⁾ が *Porphyra umbilicalis* のクチクラ層・細胞遊離に応用した方法に準じた。ノリ葉片は熱水処理 (100°C, 12 時間) 後にはいずれの塩基性色素によつても細胞間隙の染色性は弱くなり、さらに亜塩素酸処理 (0.8% 酢酸含有 9.4% 亜塩素酸ナトリウム水溶液, 25°C, 20 時間) ではその染色性は全く認められず、葉体は軟化した。さらに 4% 水酸化カリウム処理 (25°C, 20 時間) ではクチクラ層の剝離が認められた。すなわち酵素処理は、これらの化学処理に相応した効果を示した。

また、V7 と N9 両菌株の粗酵素処理によつて、ノリ葉体中の酸性多糖は、対照に比べて明らかに減少した (Table 2)。

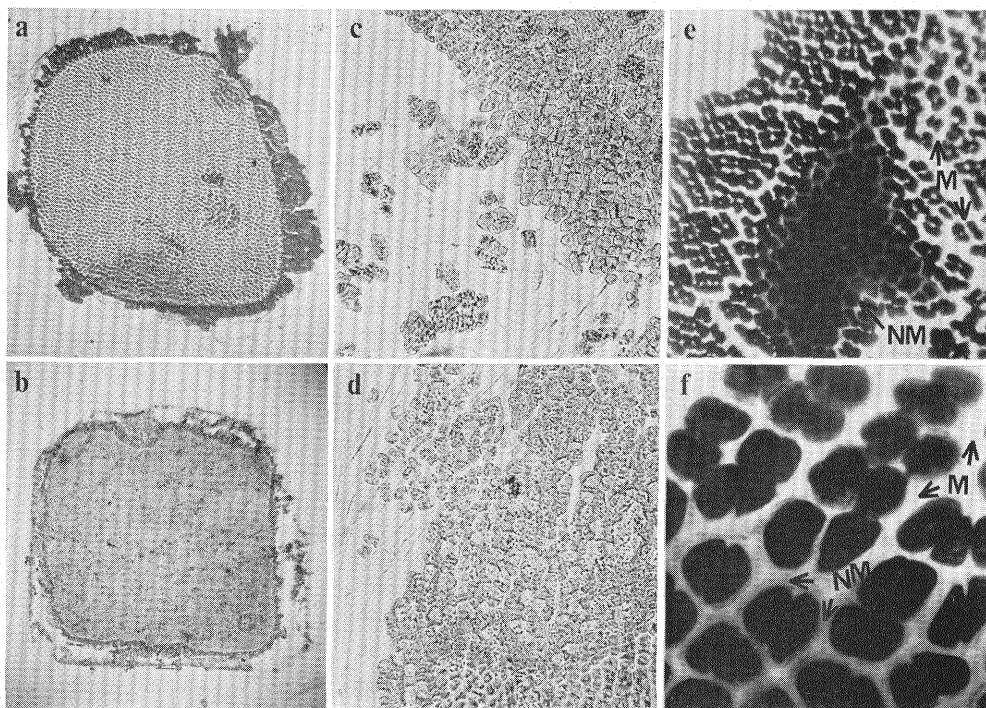


Fig. 1. Maceration of test pieces of laver frond by bacterial enzymes.

a and b: maceration of frond pieces. (a: $\times 32$, b: $\times 16$)

c and d: liberation of cells from frond tissue. ($\times 110$)

e and f: staining with toluidine blue. Intercellular space in unmacerated portion (NM) showing reddish purple metachromasia but non stainability in macerated portion (M). (e: $\times 110$, f: $\times 450$)

Upper; strain V7, and lower; strain N9.

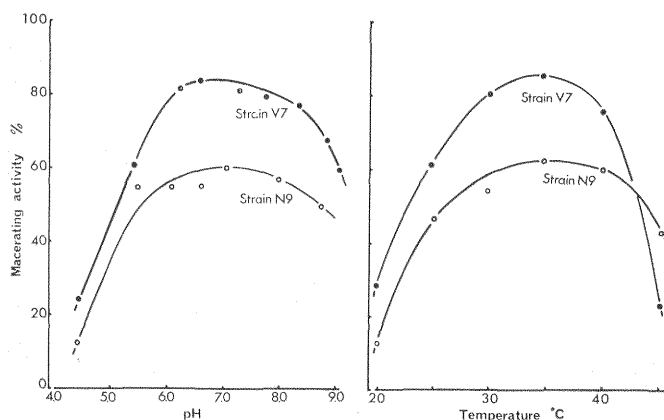


Fig. 2. Effects of pH and temperature on maceration of laver frond by bacterial enzymes. Effects of pH at 35°C and of temperature at pH 7.0 were tested respectively. Reaction time: 3 hrs for strain V7 and 4 hrs for strain N9. Crude enzyme solution: strain V7, 280 μg protein/ml and strain N9, 170 μg protein/ml. Macerating activity (%) is shown in the ratio of macerated area to the initial area of test pieces. Macerated area in control was subtracted.

Table 1. Changes in stainability of *Porphyra* tissue after enzymatic or chemical treatments.

| Treatment | Stainability | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------|-------------|-----|----------------|-----|
| | Toluidine blue | | Neutral red | | Methylene blue | |
| | C | S | C | S | C | S |
| 1. Crude enzyme, strain V7 | +B | — | ±R | — | +Gb | — |
| 2. " " , strain N9 | +B | — | ±R | — | +Gb | — |
| 3. Hot water extraction | ##B | +B | ##Rb | +Rb | ##B | +B |
| 4. Chlorite extraction after 3 | +B | — | +Rb | — | +B | — |
| 5. 4% KOH extraction after 4 | +B | — | +Rb | — | +B | — |
| 6. Untreated control | ##B | ##Rv | ##R | ##R | ##B | ##B |

C: interior of cell, S: intercellular space.

Stainability: ## # + positive grades, ± negligible, — negative.

B: blue, R: red, Gb: greenish blue, Rb: reddish brown, Rv: reddish violet.

Table 2. Degradation of acidic polysaccharide in frond by enzymatic treatment.

| Treatment | Polysaccharide mg per frond | |
|-------------------------|-----------------------------|---------|
| Crude enzyme, strain V7 | 37.4 | (9.2%) |
| Crude enzyme, strain N9 | 142.8 | (35.0%) |
| Control | 408.5 | (100 %) |

Ten gram of frond was treated at the initial stage, and acidic polysaccharide determined at the final stage is shown as porphyran.

考 察

粗酵素によるノリ葉体組織の崩壊状況は、細菌接種試験の場合の状況と一致し、さらに緑斑病の病徴⁹⁾である原形質吐出も認められた。したがって、緑斑病におけるノリ葉体の崩壊は、病害関連細菌の分泌酵素作用によることは明らかである。

ノリ葉体中の細胞を連結し組織を構成するには、キシラン・マンナン・ポルフィランなどの多糖類や蛋白などが関与している。酵素作用によつて崩壊した部分では、トルイジンブルーで染色される細胞間物質が消失しており、これは酸性多糖類の分解によるものである。このことはリバノールにより沈殿する酸性多糖の減少によつても確認された。アマノリ属の酸性多糖の主なるものはポルフィランであつて細胞壁および細胞間隙に存在している¹⁰⁾から、酵素作用によるノリ組織崩壊の一因子として、ポルフィランの分解が関与しているものと考えられる。

終りに、終始懇篤な指導を賜つた長崎大学水産学部銭谷武平教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 中尾義房・小野原隆幸・松原孝之・藤田雄二・銭谷武平: 本誌, **38**, 561-564 (1972).
- 2) 藤田雄二・銭谷武平・中尾義房・松原孝之: 本誌, **38**, 565-569 (1972).
- 3) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 4) 佐野 豊: 組織学研究法, 南山堂, 東京, 1965, pp. 455-460.
- 5) T. SUGIYAMA: *Acta Path. Jap.*, **14**, 413-433 (1964).
- 6) A. G. LLOYD, K. S. DODGSON, R. G. PRICE and F. A. ROSE: *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 108-115 (1961).
- 7) D. A. REES and E. CONWAY: *Biochem. J.*, **84**, 411-416 (1962).

- 8) E. FREI and R. D. PRESTON: *Proc. Roy. Soc.*, **B 160**, 314-327 (1964).
- 9) 須藤俊造・斎藤雄之助・秋山和夫・梅林 修: 東海区水研業績 E 18 号, 16-18 (1972).
- 10) E. Percival and R. H. McDowell: *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press, London and New York, 1967, pp. 127-137.