

蚕に寄生するAspergillus 属菌ホルムアルデヒド抵抗性に関する研究I

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	柳田, 健郎 西城, 澄雄
巻/号	46巻4号
掲載ページ	p. 347-352
発行年月	1977年8月

蚕に寄生する *Aspergillus* 属菌のホルムアルデヒド 抵抗性に関する研究 I. 本属菌のホルム アルデヒド酸化作用について

柳田 健郎・西城 澄雄

熊谷市・埼玉県蚕業試験場 (〒360)
(1977年1月17日受理)

Takeo YANAGITA and Sumio SAIJO : Studies on the formaldehyde resistance of *Aspergillus* fungi attacking the silkworm larvae I. The oxidizing action of formaldehyde by *Aspergillus* spp.

カイコに寄生性を示す *Aspergillus* 属菌の中に、ホルムアルデヒドに特異的な抵抗性を示す菌種が存在することは古くから知られていたが(門平, 1950), これは特殊の菌株による突発的な発現現象によるものとして深い考察を行うに至らなかった。その後この抵抗性はカイコに対する病原性と平行的な関連を有することが明らかになり(河上・三国, 1969; 西城, 1970), しかもホルムアルデヒド接触を繰り返すことにより抵抗性を増していくと同時に菌の生理作用にも影響をおよぼし, またカイコに対する病原力も著しい発達を示すことも次第に判明した(西城, 1970)。さらに酵素学的見地から検討すると, 菌の産生するアミラーゼおよびプロテアーゼ活性はホルムアルデヒド抵抗性と密接な関連を有し(西城ら, 1971), さらにホルムアルデヒド添加培地における継代培養によって, ホルムアルデヒド抵抗性の増加と共に菌の産生する酵素等に著しい変化を示すことが明らかになってきた(柳田・西城, 1975)。

このようなことから本属菌の薬剤耐性機作を明確にすることは, 本病防除の面からも非常に重要なことであるため, 多数の研究者によって検索が続けられてきたが, いまだその全貌を解明するに至っていない。著者らはホルムアルデヒド添加培地に本属菌を培養した場合, 菌の発育によって培地中のホルムアルデヒドが著しく減少することを認めた(柳田・西城, 1973)。ひき続いてこれらの事実を明らかにするため培養菌体の抽出液を用いて検討した結果,

菌体の抽出液によるホルムアルデヒドの酸化は温度および金属イオンによって選別的阻害を受けることがわかり, ホルムアルデヒドに対して活性を有する酵素の存在が推察されたので, 種々検討を加えたところ酵素学的に2, 3の知見を得たので報告する。

本文にはいるに先立ち, ご校閲をいただいた東京大学吉武成美教授に謝意を表する。

材料と方法

1. 供試菌および培養法

Aspergillus flavus-oryzae 系菌株のうち, ホルムアルデヒド抵抗性の強い菌株 (No. 1366, No. 1398) および弱い菌株 (No. 907, No. 1016) をそれぞれえらび(柳田・西城, 1976) 供試菌とした。ホルムアルデヒド添加培地による継代法は既報(柳田・西城, 1976) のとおりであり, いずれもツァベック培地を基礎培地として 30°C で培養を行った。

2. 培地中のホルムアルデヒドの測定

糖を除いたツァベック寒天培地 9 ml に 0.1% ホルムアルデヒド液 1 ml を混合し全量 10 ml としてシャーレン内で培養し, 経時的に培養した培地に 40 ml の蒸留水を加え磨砕し, 遠沈上清を検体として培地内に残存するホルムアルデヒド量を測定した。

3. 菌体抽出液および培養液の採取法

ツァベック寒天培地 10 ml で 4 日間培養し, これに 25 ml の蒸留水を加え磨砕し, 遠沈上清を菌体抽出液とした。また菌体および培養液のホルムアル

デヒドに対する作用にはツァペック液体培地 500 ml を 2 l 三角フラスコにとり、30°C で 7 日間培養した後、濾過によって菌体および濾液に分離した。濾液はそのまま培養濾液として供試したが、菌体は石英砂を混合して乳鉢で磨砕し、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を菌体 30 g 当り 100 ml 加え、6,000 rpm で 30 分間遠沈を行い、上清を菌体抽出液として供試した。この菌体抽出液はギ酸の生成測定およびキサンチンに対する作用の検討にも使用した。なおすべての操作は温度による変性を防ぐためアイス・バスの中で行った。

4. 抽出液および濾液のホルムアルデヒドに対する作用の測定

菌体抽出液のホルムアルデヒドに対する作用は、抽出液 5 ml、蒸留水 5 ml、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 2 ml および 0.1% ホルムアルデヒド溶液 1 ml を混合し、37°C に保護し経時的に変動するホルムアルデヒド量を測定した。

菌体抽出液の温度処理は 5 ml の抽出液を試験管にとり、それぞれの温度で 5 分間処理を行い、速やかに冷水中で冷却し供試した。

金属イオンの接触方法は 10 ml の菌体抽出液に種々な濃度の金属溶液 1 ml を混合し、30°C で 30 分間保護した後、ホルムアルデヒドに作用させ、ホルムアルデヒド量の変動を測定した。

菌体および培養濾液に分離した抽出液のホルムアルデヒドに対する作用は、抽出液 7 ml、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 3 ml および 0.01% ホルムアルデヒド溶液 5 ml を混合し、37°C で作用させ経時的に 1 ml 中のホルムアルデヒド量の変動を測定した。

5. 抽出液のキサンチンに対する作用の測定

菌体抽出液のキサンチンに対する作用は、抽出液 10 ml、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 4 ml、蒸留水 10 ml および 1% キサンチン溶液 1 ml を混合し、37°C で反応させ、経時的にキサンチン量の変動を調査した。キサンチン量は反応液 1 ml を Folin phenol 試薬で発色させ 660 nm の吸光度で測定し (赤堀, 1956)、同時に Folin-Denis 試薬で尿酸の生成を定性的に調査した (上代, 1955)。

6. 菌体抽出液によるホルムアルデヒドの酸化とギ酸の生成

0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 60 ml 中に 0.01

%ホルムアルデヒド 20 ml および菌体抽出液 (No. 1366) 20 ml を加え、30°C で反応させ経時的にホルムアルデヒド量の減少とギ酸の生成を調査した。

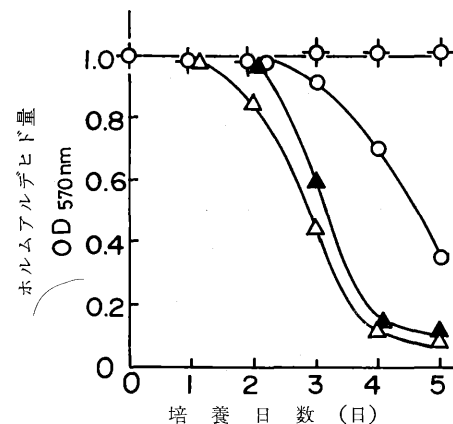
ギ酸は薄層クロマトグラフィー (溶媒: ピリジン/石油エーテル, 1:2; 発色試薬: 0.04% ブロムクレゾールパープル, pH 9.0) により定性的に確認し、定量は酢酸と塩酸の混合液中、塩化第 2 水銀を用いてギ酸を脱炭酸し、生成した塩化第 1 水銀をガラスフィルターで濾過して集め、標準沃素液で還元し、過剰沃素を標準チオ硫酸ナトリウムで滴定した (沼沢ら, 1974)。

なおホルムアルデヒド量の測定はいずれもクロマトロブ酸法 (藤林, 1968) によった。

結果と考察

1. 培養および菌体抽出液によるホルムアルデヒドの酸化

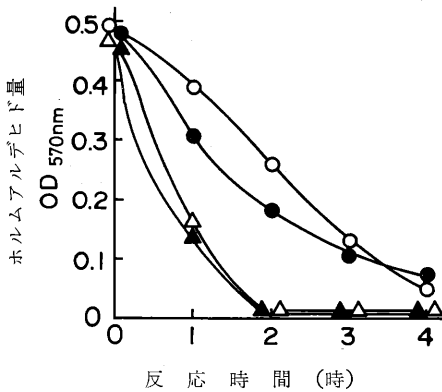
供試菌をホルムアルデヒドを添加した培地に培養した場合、菌の発育に伴って変動する培地中のホルムアルデヒド量について検討した (第 1 図)。その結果、発育初期においていずれもホルムアルデヒド量の著しい減少が認められた。その後、時間の経過とともに菌は急激に増殖するが、この増殖様態は菌株によって特徴的で、特にホルムアルデヒド抵抗性の強い菌株では顕著な発育を示した。さらに、菌体抽出液のホルムアルデヒドに対する作用を比較する



第 1 図 培養による培地中のホルムアルデヒド量の消長

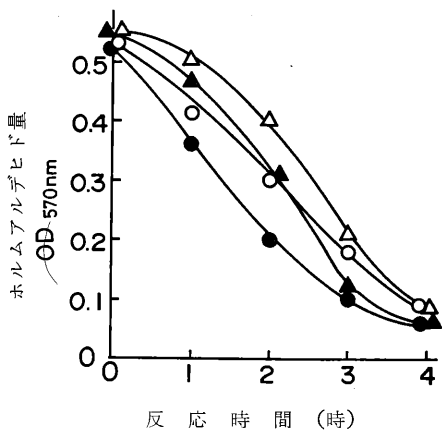
○—○: 培養なし ○—○: No. 1016
△—△: No. 1366 ▲—▲: No. 1398

と(第2図), 培養によるホルムアルデヒド量の消長と同様, 抵抗性の強い菌体の抽出液が著しくホルムアルデヒドを酸化した。これらの結果から, *Aspergillus* 属菌のホルムアルデヒド抵抗性は, 培養や菌体の抽出液によるホルムアルデヒド酸化作用と平行的関係にあると推察される。



第2図 菌体抽出液によるホルムアルデヒド量の消長

○—○ : No. 907 ●—● : No. 1016
△—△ : No. 1366 ▲—▲ : No. 1398



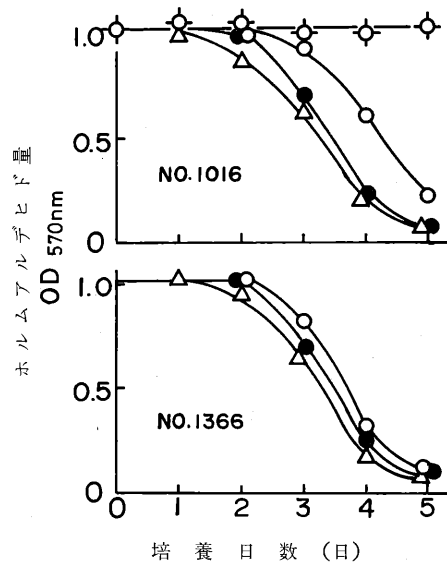
第3図 ホルムアルデヒド培地による菌体抽出液のホルムアルデヒド量の消長

○—○ : No. 1366 对照
●—● : No. 1366 ホルムアルデヒド培地に培養
△—△ : No. 1398 对照
▲—▲ : No. 1398 ホルムアルデヒド培地に培養

2. ホルムアルデヒド接触および継代培養によるホルムアルデヒド酸化作用の変化

ホルムアルデヒド添加培地で培養した菌の抽出液を用いてホルムアルデヒドの酸化を調べた結果(第3図), ホルムアルデヒドの酸化作用は著しく強まることが認められた。しかも, この作用はホルムアルデヒド添加培地で継代を繰り返すことによって明らかに強まり(第4図), 10代さらに20代と継代を重ねるほどホルムアルデヒドの酸化作用は増加する傾向を示した。特に, この現象は抵抗性の弱い菌株ほど顕著であった。さらに, 継代した菌株の菌体抽出液によるホルムアルデヒドの酸化作用を比較したところ(第5図), 抵抗性の弱い菌株では10代継代でホルムアルデヒド酸化作用は明らかに強くなったが, 抵抗性の強い菌株では変化はみられず, 20代継代に至ってはじめて酸化作用の増加が認められるようになった。

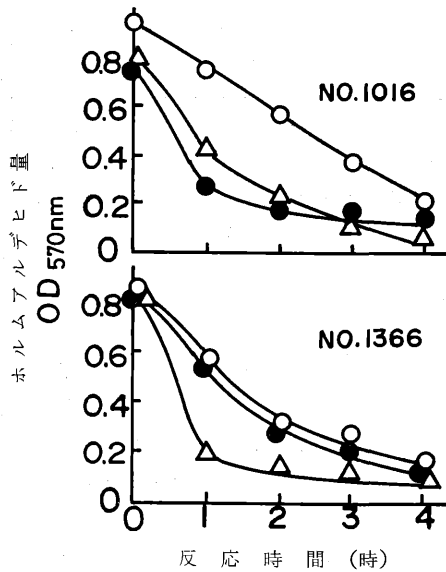
既報(柳田・西城, 1973)において, 本属菌を炭素源を除いた培地に少量のホルムアルデヒドを添加した場合, 無添加区より生育が優れることから, 本属菌はホルムアルデヒド資化性を有することを推察した。また, これらの作用はホルムアルデヒド抵抗



第4図 ホルムアルデヒド培地継代菌による培地中のホルムアルデヒド量の消長

○—○ : 培養なし ●—● : 10継代
○—○ : 对照(継代なし) △—△ : 20継代

性と平行的であり、ホルムアルデヒド添加培地による継代培養を重ねることによって抵抗力を強化するとともに(柳田・西城, 1976), 第4図および第5図に示したように次第にホルムアルデヒド酸化作用も増加する。このことから, *Aspergillus* 属菌のホルムアルデヒド抵抗性並びに酸化作用はホルムアルデヒド添加培地による継代培養によって増大するも

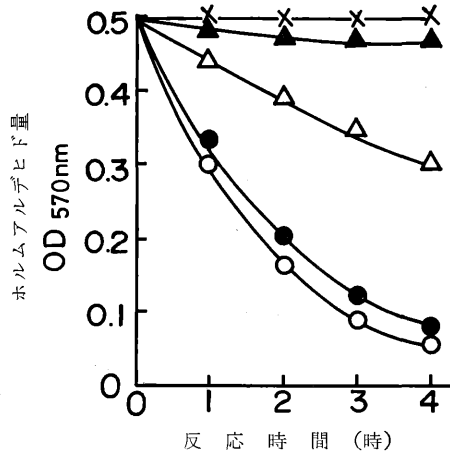


第5図 ホルムアルデヒド培地継代菌の菌体抽出液によるホルムアルデヒド量の消長
○—○: 対照(継代なし) ●—●: 10継代
△—△: 20継代

のと推察される。

3. 菌体抽出液の温度処理および金属イオンによるホルムアルデヒド酸化作用の阻害

菌体抽出液 (No. 1366) を温度処理し, ホルムアルデヒド酸化作用を比較した (第6図)。45°C 処理ではまったく変動は認められなかったが, 50°C 処理から急速に酸化作用は低下し, 60°C, 5 分間処理でホルムアルデヒド酸化作用は完全に消失した。併せて, 金属イオンによる阻害を検討したところ (第1表), CaCl_2 , CuSO_4 , LiSO_4 , Na_2SO_4 および



第6図 温度処理した菌体抽出液のホルムアルデヒド量の消長

○—○: 対照(処理なし) ●—●: 45°C 処理
△—△: 50°C 処理 ▲—▲: 55°C 処理
×—×: 60°C 処理

第1表 金属によるホルムアルデヒド量減少作用の阻害

濃度(モル)	金属					
	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	5×10^{-6}	5×10^{-7}	0
BaCl_2	—	0.40	0.40	0.41	0.39	0.41
CaCl_2	—	0.29	0.20	0.31	0.40	0.40
CuSO_4	0	0.07	0.26	0.35	0.34	0.34
FeSO_4	—	0.37	0.41	0.39	0.36	0.41
LiSO_4	0.03	0.28	0.31	0.45	0.43	0.45
MgSO_4	—	0.45	0.44	0.42	0.44	0.45
MnSO_4	—	0.39	0.39	0.37	0.34	0.41
Na_2SO_4	—	0.11	0.10	0.17	0.23	0.41
ZnSO_4	0.10	0.12	0.28	0.40	0.39	0.41

濃度: 反応液中の最終濃度。

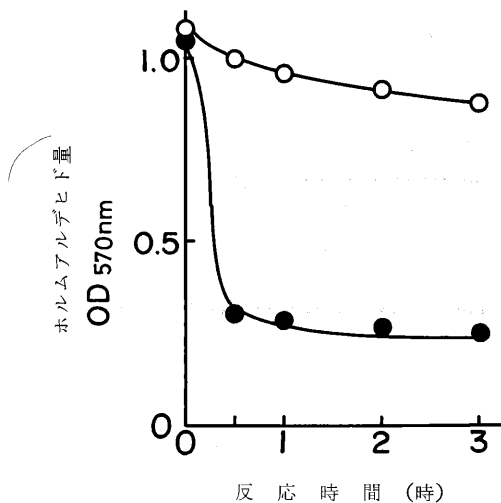
測定値: 反応液中のホルムアルデヒドの減少量を OD 570 nm の変化量で示す。反応時間 4 時間。

ZnSO₄ では著しい阻害が認められたが、BaCl₂、FeSO₄、MgSO₄ および MnSO₄ による阻害は認められなかった。

このように、温度処理および金属イオンによるホルムアルデヒド酸化作用の阻害が選択的であることから、この作用には何らかの酵素が関与していることが推察される。従来、アルデヒドに作用する酵素としてアルデヒド脱水素酵素 (KING・CHELDLIN, 1956; SEEGMILLER, 1955)、キサンチン酸化酵素 (KIELLEY, 1955) およびキサンチン脱水素酵素 (林, 1962; REMY ら, 1955) などが知られている。供試菌 (No. 1366) の菌体抽出液をキサンチンに作用させ、キサンチン量の変動と尿酸の生成について検討した結果、キサンチン量の変動も尿酸の生成もまったく認められなかった。

4. 培養液および菌体抽出液によるホルムアルデヒド酸化作用

培養液および菌体抽出液 (No. 1366) をホルムアルデヒドに作用させると (第7図)、培養液ではホルムアルデヒド量の減少は非常に微弱であったが、菌体抽出液では著しい減少が認められた。このことからホルムアルデヒド酸化作用は菌体内に内在し、しかも、培養によって培地中のホルムアルデヒド量が著しく減少することから、菌自体積極的に体内に吸収しているものと推察される。



第7図 培養液および菌体抽出液によるホルムアルデヒド量の減少

○—○：培養液
●—●：菌体抽出液

内に吸収しているものと推察される。

5. 菌体抽出液によるホルムアルデヒドの減少とギ酸の生成

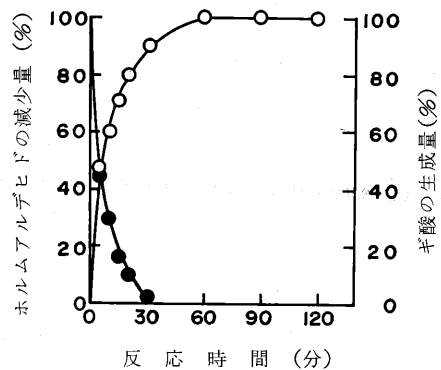
菌体抽出液をホルムアルデヒドに作用させると (第8図)、ホルムアルデヒド量が著しく減少し、それともなってギ酸が生成することは薄層クロマトグラフィーによって定性的に確認した。また、ホルムアルデヒド量の急速な減少ともなって、ほぼ定量的にギ酸が生成された。この結果から本属菌によるホルムアルデヒド量の減少はホルムアルデヒドがギ酸に酸化されるためと考えられる。

摘 要

Aspergillus flavus-oryzae 系菌種の中からホルムアルデヒド抵抗性を異にする菌株を選び、培養による培地中のホルムアルデヒドの消失および菌体抽出液によるホルムアルデヒド酸化作用とホルムアルデヒドに対する抵抗性の関係を調べ、次の結果を得た。

1. 供試菌をホルムアルデヒド添加培地に培養すると菌の発育に伴って培地中のホルムアルデヒド量が著しく減少した。また、菌体抽出液を作用させてもホルムアルデヒド量の著しい減少が認められた。この現象は菌株間のホルムアルデヒド抵抗性と平行的であった。

2. 菌体抽出液によるホルムアルデヒドの酸化はホルムアルデヒド添加培地による培養によって著しく増加し、抵抗性の弱い菌株ほど顕著であった。



第8図 菌体抽出液によるホルムアルデヒド量の減少とギ酸の生成

○—○：ギ酸の生成量
●—●：ホルムアルデヒドの減少量

3. 菌体抽出液によるホルムアルデヒド酸化作用は50°Cの温度処理によって著しい減少が認められ、60°C, 5分間処理で完全に消失した。

また、金属イオンによる菌体抽出液のホルムアルデヒド酸化作用は CaCl_2 , CuSO_4 , LiSO_4 , Na_2SO_4 および ZnSO_4 によって著しく阻害された。

4. 培養液および菌体抽出液によるホルムアルデヒド酸化作用を比較した結果、培養液による作用は微弱であったが、菌体抽出液では著しく強い酸化作用が認められた。

5. 菌液抽出液をホルムアルデヒドに作用させると、ホルムアルデヒド量の減少にもなって、定性あるいは定量的にもギ酸の生成が認められた。

文 献

- 赤堀二郎編 (1956) : 酵素研究法II, pp. 471-472, 朝倉書店, 東京.
- 藤林園子 (1968) : 糖質実験法, 蛋白質核酸酵素編集部編, pp. 139-140, 共立出版社, 東京.
- 林 幸之 (1962) : 日蚕雑, **31**, 32-37.
- 門平潤一郎 (1950) : 埼玉蚕試報, **30**, 67-84.
- 上代皓三 (1960) : 生化学実習, 193 pp., 技報堂, 東京.
- 河上 清・三国辰男 (1969) : 蚕試報, **23**, 327-370.
- KIELLEY, R. K. (1955) : J. Biol. Chem., **216**, 405-412.
- KING, T. E. and V. H. CHELDELIN (1956) : J. Biol. Chem., **220**, 177-191.
- 沼沢亮三・渡部一穂・富金原 考 (1974) : 醸工, **52**, 799-804.
- REMY, C. N., D. A. RICHERT, R. J. DOISY, I. C. WELLS and W. W. WESTERFELD (1955) : J. Biol. Chem., **217**, 293-305.
- 西城澄雄 (1970) : 日蚕雑, **39**, 43-50.
- 西城澄雄・月田嘉辰・柳田健郎 (1971) : 埼玉蚕試要報, **43**, 92-95.
- SEEGMILLER, J. E. (1953) : J. Biol. Chem., **201**, 629-637.
- 柳田健郎・西城澄雄 (1973) : 埼玉蚕試要報, **45**, 66-70.
- 柳田健郎・西城澄雄 (1975) : 埼玉蚕試研報, **47**, 68-71.
- 柳田健郎・西城澄雄 (1976) : 埼玉蚕試研報, **48**, 33-37.