

ナス科青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) が生産する  
細胞外多糖物質の萎凋誘導活性と構成成分

谷川元一・浅尾浩史・岡山健夫

Wilt-inducing Activity and Components of Exopolysaccharide Produced by a Virulent  
*Pseudomonas solanacearum*

Motokazu TANIGAWA, Hiroshi ASAO, and Ken'ō OKAYAMA

Summary

The exopolysaccharide (EPS) produced by a virulent *Pseudomonas solanacearum* was extracted, and the characteristics were investigated. A new assay for Wilt-inducing activity (WIA) has been developed. There was the linear between Wilt-inducing time and dilution times of EPS. When EPS was boiled, degraded with pronase, and treated by 1N hydrochloric acid and 1N sodium hydroxide, WIA was steady. The results suggested that the appearance of wilting symptom arose from the polysaccharide chain but not from peptide.

**Key words:** *Pseudomonas solanacearum*, exopolysaccharide, wilt-inducing activity, assay

緒 言

ナス科青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) はナス科作物を始め、多くの作物に甚大な被害を引き起こしている。県下では中・北部地域を中心として、半促成、夏秋栽培のトマトおよびナスに多発しており、難防除病害の一つになっている。青枯病菌は根から侵入して、作物中の導管部で増殖し、作物を萎凋させる。この菌は細胞外多糖物質 (Exopolysaccharide: EPS) を生産することが報告されており<sup>11, 51, 71</sup>、この EPS が青枯病菌による作物の萎凋症状の発現に大きな役割を果たしていると考えられている<sup>15)</sup>。

筆者らはこれまでトマト、ナスの青枯病による被害を回避するため、EPS による萎凋誘導活性の機作の解明に取り組んできた<sup>12), 13)</sup>。今回、EPS の萎凋誘導活性の新しい測定法の開発により EPS の萎凋誘導活性および構成成分に関する知見がいくつか得られたので報告する。

材料および方法

1. 青枯病菌

供試した青枯病菌は、1987年に奈良県磯城郡田原本町のナス青枯病発生圃場から発病株を採取し、常法により純粋分離した菌株を用いた。

2. EPS の抽出

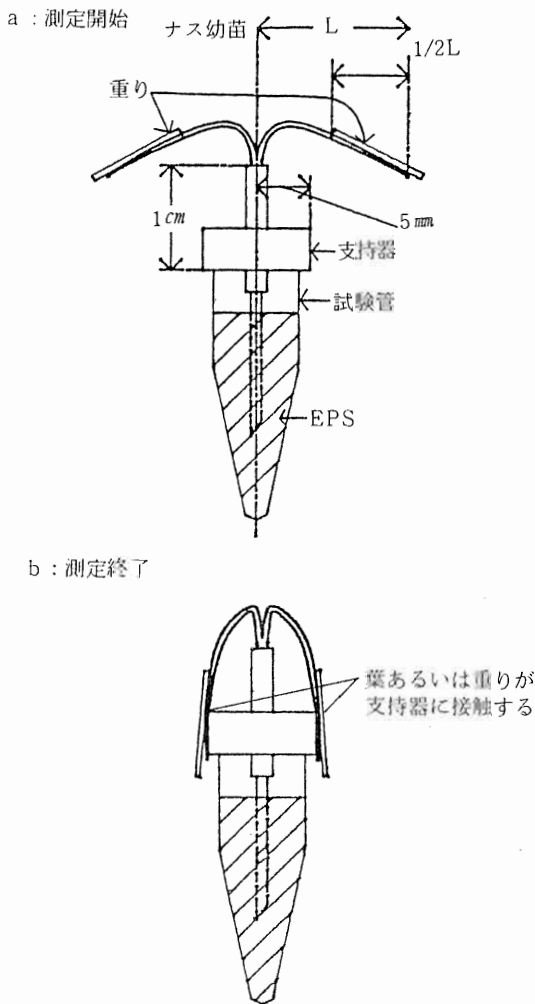
EPS の抽出は Gowda と Vittal Rai<sup>5)</sup> の方法を一部改変して行った。

青枯病菌を TZC の培地 200 ml (グルコース 1 g、シュークロース 1 g、ペプトン 2 g、カザミノ酸 0.2 g を含む) で 25℃、5 日間振とう培養した。培養液を 11,000 G で 10 分間遠心分離し、得られた上澄液に飽和塩化カルシウム溶液 2 ml と 4 倍量のメタノールを添加し、2 時間放置した後、4,000 G で 10 分間遠心分離して沈澱を得た。この沈澱を水に懸濁して、1 晩セロファンチューブで透析を行い、塩化カルシウムとメタノールを除去した。セロファンチューブの内容物を 11,000 G で 10 分間遠心分離し、得られた上澄液を菌体を除去した培養液の体積 (136 ml) まで定容し、EPS 画分とした。萎凋誘導物質の回収率を調査するために、随時、凍結乾燥法により重量を測定した。なお、抽出操作は培養過程を除き、全て 0℃ の条件下で行った。

3. 萎凋誘導時間の測定

第 1 図に萎凋誘導時間の測定法を示した。ナスの品種は (*Solanum melongena*, “千両二号” : タキイ種苗) を用いた。種子をパーミキュライトに播種した後、25℃ で 3,000lx、16 時間の日長条件下で、12 日から 18 日間生育させた。導管を閉塞させないように鋭利なナイフでナス幼苗の茎最下部から切断し、茎を支持器で固定し

た。次に、粘着性のテープ (ScotchMark 256 White Paper Tape, 19mm幅) 20mgを重りとして子葉の先端から1/2の位置に付加し、水に約1時間浸漬してコンディショニングを行った。萎凋誘導の測定はナス幼苗の茎をEPSに浸漬した時を開始とし(第1-a図)、終了時は萎凋の終了をはっきりさせるため、葉が萎凋症状により茎から5mmの位置に垂れ下がった時とした(第1-b図)。測定にはナス幼苗10個体を用い、半数の5個体が萎凋した時間をEPSの萎凋誘導時間とした。EPSは測定に供する容積の確保と、萎凋誘導時間を延長し測定しやすい時間にするため、適時蒸留水を用いて希釈した。測定は室温で行った。



第1図 萎凋誘導時間の測定法  
Fig. 1 The assay for Wilt-inducing activity of EPS  
(a) shows the start of the assay, and (b) shows the end.

#### 4. EPSの構成成分の検討

##### 1) アミノ酸の定性およびタンパク質、糖の定量

アミノ酸はニンヒドリン反応で調べた。タンパク質についてはLowry法によって測定した。グルコースおよびガラクトースの定量はアンスロン硫酸法で行った。ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミンはLudwig-Benmmaman法<sup>9)</sup>で測定した。

##### 2) EPSの熱処理

EPS 5 mlを試験管 (16×180mm) に入れてガラス玉でふたをし、沸騰湯浴中に30分間保った。水で急冷した後、10倍に希釈して萎凋誘導時間を測定した。

##### 3) EPSのpronase処理

10倍に希釈したEPS液2 mlに、pronase溶液0.2 ml (0.2 mgのpronaseを含む。1 mgのpronaseは1分間に1 mgのタンパク質を加水分解する活性を持つ)を加え、25℃で60分間作用させた。反応を停止させるため、100℃で3分間の熱処理を行い、水冷した後、萎凋誘導時間を測定した。

##### 4) EPSの酸、アルカリ処理

EPS中の濃度が1 Nになるように6 N塩酸を添加し、60分間放置後、6 N水酸化ナトリウム溶液で中和した。これをもとのEPSの体積の10倍になるように、希釈して萎凋誘導時間を測定した。アルカリ処理は6 N水酸化ナトリウム溶液をEPS中の濃度が1 Nになるように添加した後、60分間放置後6 N塩酸で中和した。また、酸、アルカリ溶液を中和して生じる0.2 M塩化ナトリウム溶液について、これを10倍に希釈して萎凋誘導時間を測定した。

### 結 果

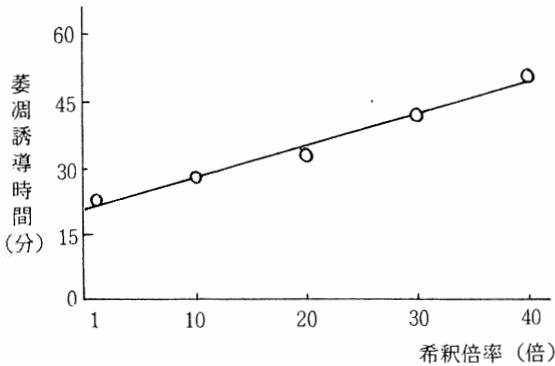
#### 1. EPSの希釈倍率と萎凋誘導時間の関係

EPSを希釈して萎凋誘導時間を測定し、その関係を第2図に示した。EPSを希釈すると、萎凋誘導時間はEPSの希釈倍率とともに増加し、その間には直線関係がみられた。

#### 2. 萎凋誘導活性の回収率

第1表に、EPSの抽出過程における乾燥重量と萎凋誘導物質の回収を示した。EPSの重量は、菌体を除去した培養液画分の約97% (390mg)であった。また、EPSの萎凋誘導時間は、菌体を除去した培養液画分と同じ51分であり、青枯病菌の菌体を除去した培養液中の萎凋誘

導物質はメタノールを用いた沈澱法によりほぼ100%回収されていた。また、対照の菌体を添加していない培養液画分は浸漬して3時間経過してもナス幼苗を萎凋させることができなかった。



第2図 EPSの萎凋誘導時間と希釈倍率との関係

Fig. 2 The relation between Wilt-inducing time and dilution times of EPS

第1表 萎凋誘導物質の回収率

Table 1 Recovery of EPS

試料	体積 (ml)	乾燥重量 (mg)	萎凋誘導時間 (分)
青枯病菌培養液 *1			
菌体を除去した培養液画分	186	402	51
EPS 画分	186	390	51
対照培養液 *2	200	82 *3	— *4

- \*1 青枯病菌を培養液に加えて培養した画分。
- \*2 青枯病菌を加えていない培養液のみの画分。
- \*3 EPS画分と同じ操作を行って得られた画分の重量。
- \*4 萎凋誘導時間の測定開始3時間後も萎凋しなかった。

### 3. EPSの構成成分

#### 1) アミノ酸の定性およびタンパク質、糖の定量

第2表に、EPSの構成成分について検討した結果を示した。EPSを凍結乾燥させると、1 ml当り2.16 mgの重量が得られた。EPSはニンヒドリン反応に陽性であったが、Lowry法によるタンパク質の測定では、痕跡であった。また、グルコース、ガラクトースも、それぞれ、全体の6.7%、5.7%の割合しか検出されなかった。ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミンを標準品にしたLudwig-Benmmaman法による測定では、それぞれ、12.4%と49.5%の構成割合になった。

第2表 EPSの構成成分

Table 2 The component of EPS

試料	測定法	重量 (mg/ml)
乾燥重量	凍結乾燥法	1.05
アミノ酸	ニンヒドリン反応	陽性
タンパク質	Lowry法	trace
糖類		
グルコース	アンスロン硫酸法	0.07
ガラクトース		0.06
ガラクトサミン	Ludwig-Benmmaman法	0.13
N-アセチルガラクトサミン		0.52

#### 2) EPSの熱処理

熱処理をしたEPSの萎凋誘導時間は33分で、無処理のEPSの32分とほとんど差がなく、EPSの萎凋誘導活性は熱処理に対し安定であった(第3表)。

第3表 熱処理がEPSの萎凋誘導時間に及ぼす影響

Table 3 The effect of heat treatment on EPS

試料	萎凋誘導時間 (分)
熱処理をしたEPS *1	33
無処理のEPS *1	32

\*1 EPSは10倍希釈して測定した。

#### 3) EPSのpronase処理

pronaseを処理したEPSの萎凋誘導時間は25分で、無処理の24分とはほぼ同じであり、EPSの萎凋誘導活性はpronase処理に対し安定であった(第4表)。また、pronase酵素液にナス幼苗を浸漬した場合、測定開始3時間後も萎凋しなかった。

第4表 pronase処理がEPSの萎凋誘導時間に及ぼす影響

Table 4 The effect of pronase degradation on EPS

試料	萎凋誘導時間 (分)
pronase処理をしたEPS *1	25
無処理のEPS *1	24
pronase液 *1 *2	— *3

- \*1 10倍に希釈して測定した。
- \*2 酵素液だけを供試した。
- \*3 萎凋誘導時間の測定開始3時間後も萎凋しなかった。

4) EPSの酸、アルカリ処理

酸で処理したEPSの萎凋誘導時間は29分、アルカリ処理では35分であり、無処理の萎凋誘導時間の36分とあまり差はなかった(第5表)。中和して生じる塩化ナトリウム液にナス幼苗を浸漬すると85分間で萎凋したが、無処理、酸、アルカリ処理による萎凋誘導時間とは大きく離れていた。

第5表 酸、アルカリ処理がEPSの萎凋誘導活性に及ぼす影響

Table 5 The effect of treatments of acid and alkaline on EPS

試料	萎凋誘導時間(分)
酸処理をしたEPS	29
アルカリ処理をしたEPS	35
無処理のEPS	36
塩化ナトリウム液*1	85

\*1 中和して生じる0.2M塩化ナトリウム溶液を10倍希釈して萎凋誘導活性を測定した。

考 察

青枯病は土壌伝染性の細菌病であり、ナス科作物に大きな被害を及ぼす難防除病害である。青枯病は作物を急激に萎凋させるが、この萎凋症状の発現に対し、EPSが大きな要因を果たしていると考えられている<sup>16)</sup>。このため、EPSに関して多くの研究がされてきた。これまでの研究から、EPSを構成する物質は、(1)ガラクトサミン<sup>3), 4), 14)</sup>、(2)N-アセチルガラクトサミン<sup>1), 2)</sup>、(3)グルコース<sup>7)</sup>、(4)グルコース、マンノース、ガラクトースなど<sup>5)</sup>の四つに大別されるが、これらの相違が培養条件によるものか、菌のレースによるものか明かにされていない。一方で、EPSにアミノ酸が含まれていることから、グルコペプチドとする報告もある<sup>4), 5)</sup>。本実験に用いた青枯病菌のEPSからは、グルコース、ガラクトースはほとんど検出されず、構成物質の約半分はガラクトサミンとN-アセチルガラクトサミンであると考えられた。また、ニンヒドリン反応に陽性であったため、アミノ酸を含んでいるものと思われた。

萎凋誘導活性の発現がEPSの糖画分によるものか、アミノ酸(ペプチド)画分によるものなのか問題となるが、その研究例はない。その理由の一つとして、青枯病菌の生産するEPSの萎凋誘導活性を定量的に測定す

る方法がなかったことがあげられる。今回、EPSの萎凋誘導活性を定量的に測定するために、ナス幼苗を利用した測定方法を考案した。この方法によって、EPSの萎凋誘導時間と希釈倍率との間に直線的な関係があることが明らかになり、EPSを定量的に測定することが可能になった。また、従来、萎凋誘導活性を測定するために数時間かかっていたのが<sup>1), 8)</sup>、短時間に測定することが可能になった。この方法を用いて、EPSの熱処理、pro-nase処理、酸・アルカリ処理による萎凋誘導時間の変化を測定した結果、EPSの萎凋誘導活性はこれらいずれの処理に対しても安定であることがわかった。このため、萎凋誘導活性の発現にはこれらの処理により分解あるいは変性するペプチド画分は関係がなく、これらの処理に安定な糖画分が大きく関与していることが示唆された。

青枯病菌が作物を萎凋させる原因として次の3つが考えられている。(1)導管で増殖した青枯病菌の菌細胞が導管を閉塞させ、根部からの水分移動を妨げる。(2)青枯病菌が生産するEPSによって導管が閉塞する<sup>15)</sup>。(3)青枯病菌によって生産され細胞外に出されるEPSあるいは酵素によって作物の組織が破壊される<sup>8), 11)</sup>。今回のナス幼苗を用いた実験で、萎凋している途中の段階で茎をEPSから水に替えて浸漬すると、ナス幼苗は元の状態に回復した。この萎凋現象の可逆性を考えると、作物の体内中に吸収されたEPSの消長に興味もたれる。また、EPSによる萎凋誘導が短時間におこることから、EPSによる気孔の開閉調節機構への影響も考えられる。

青枯病菌の病原性とEPSの生産量との関係に関する研究は、2つに分かれている<sup>3), 10), 16)</sup>。すなわち、関係ある<sup>3), 10)</sup>とするものと、関係ない<sup>16)</sup>とするものである。Xuら<sup>16)</sup>は、病原性の青枯病菌の遺伝子にTn-5を導入することにより遺伝子を人為的に変異させ、病原性とEPSの生産量を調査した。この結果、両者の間には関係がないと報告している。これに対し、Drigues<sup>3)</sup>らは、病原性の青枯病菌の生産するEPSと非病原性の青枯病菌の生産するEPSの構造は異なると報告している。また、Sequeira<sup>10)</sup>らは病原性とレクチンによる菌の凝集との関係をジャガイモを用いて調べ、非病原性の菌がレクチンにより凝集しないのは、細菌の回りのEPSによるものであると報告している。このように、青枯病菌の生産するEPSと病原性の関係は十分に解明されていないが、青枯病の発病機作を明らかにする上で非常に重要であり、今後の課題としたい。

## 摘 要

*Pseudomonas solanacearum* の培養液から萎凋誘導活性を有する細胞外多糖物質を抽出し、その性質を調べた。

1. ナス幼苗の子葉の両端に重りを付け、萎凋時間を測定する方法により、EPSの萎凋誘導活性を定量的に測定することができた。
2. EPSの萎凋誘導活性は熱処理、pronase 処理、酸・アルカリ処理のいずれに対しても安定であった。このことから、EPSの萎凋誘導活性の発現にはこれらの処理に安定な糖画分が大きく関与していることが示唆された。

## 引 用 文 献

1. AKIYAMA, Y., EDA S., NISIKAWAZI, S., OHNISHI A., and TANAKA, H. 1986. Comparison of extracellular polysaccharide produced by 17 virulent strains of *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Phytopath. Japan 52(5) 741-744
2. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_, 1986. Extracellular polysaccharide produced by a virulent strain (U-7) of *Pseudomonas solanacearum*. Agric. Boil. Chem. 50(3) 747-751
3. DRIGUES, P., D-LAFFORGUE, D.A., DUPIN, P., SAMAIN, D. and ASSELINEAU, J. 1985. Comparative Studies of Lipopolysaccharide and Exopolysaccharide from a Virulent Strain of *Pseudomonas solanacearum* and from Their Avirulent Mutants. J. Bacteriology 162 504-509
4. DUDMAN, W.F. 1959. Comparison of slime from tomato and banana strains of *Pseudomonas solanacearum*. Nature 184 1969-1970
5. GOWDA, S.S. and VITTAL RAI, P. 1980. Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum*. Phytopath. Z. 98 68-75
6. \_\_\_\_\_, and. 1980. Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum* II. Phytopath. Z. 98 76-81
7. HUSAIN, A. and KELMAN, A. 1958. Relation slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 48 155-165
8. \_\_\_\_\_, and 1958, The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 48 377-386
9. 福井作蔵 1982. 生化学実験法 I 還元糖の定量法 学会出版センター. 128-129.
10. L. SEQUEIRA and T.L. GRAHAM 1977. Agglutination of avirulents of *Pseudomonas solanacearum*. Physiological Plant pathology 11 43-54
11. SCHELL, M. 1987. Purification and characterization of an endoglucanase. Appl Environ Microbiol 53 2237-2241
12. 谷川元一, 浅尾浩史, 岡山健夫, 1988. ナス科作物青枯病の萎凋誘導物質の定量法 関西病虫研報 30 112.
13. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, 1988 ナス科青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) が産生する萎ちよう誘導物質の性質 日植病報 55 104.
14. WHATELY, M.H., HUNTER, N., CANTRELL, M.A., HENDRICK, C., KEEGSTR, K. and SEQUIRA L. 1980. Lipopoly-saccharide comparison of the wild pathogen *Pseudomonas solanacearum*. Plant Physiology 65: 557-559
15. WALLIS, F.M., and S.J. TRUTER. 1978. Histopathology of tomato plants infested with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. Physiol Plant Pathol. 13 307-317
16. XU, P., LEONG, S., and SEQUEIRA, L. 1988. Molecular cloning of genes that specify virulence in *Pseudomonas solanacearum*. J. Bact. 170 617- 622