

ナガイモ病原性糸状菌 (*Fusarium oxysporum* , *Fusarium solani*) の細胞壁溶解酵素に関する基礎的研究 I

北里大学獣医畜産学部 動物資源科学科 太田達郎 外山幸一 大堀 均

1. はじめに

これまでの研究で、当地域のナガイモ連作障害は *Fusarium oxysporum* 、 *Fusarium solani* などの病原性糸状菌によるものであることを明らかにしてきた。これらの糸状菌は細胞壁がキチンにより構成されていることが知られているので、キチン分解能のある微生物をコロイダルキチンを含む平板培養で選び出し、その菌を用いてナガイモ連作障害防除効果を検討してきた。しかし、あまり有効な成果が得られていない。そこで、本年度は糸状菌細胞壁の構成を再検討し、糸状菌を溶解するに値する酵素について検討することにした。

2. 実験材料および方法

①糸状菌細胞壁の調製 : *F. oxysporum* (ナガイモ病斑由来) および *F. solani* (IFO 保存標準株) を使用し、I. Larena らの方法に従って調製した。*F. oxysporum* あるいは *F. solani* を PDA 培地上で 3 日間培養し、これを液体培地 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g , KH_2PO_4 1.0g , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.3g , CaCl_2 0.1g , Yeast extract 5.0g , ペクチン 0.4g , スクロース 5.0g , プロテオースペプトン 3.0g , 蒸留水 1000ml) を入れたシャーレに植え (静置培養する 振盪培養では孢子が多くできて菌糸がうまくとれない)、 24°C 、6 日間培養し、菌糸をふやした。これをブフナーロート (No. 1 ろ紙使用) で吸引ろ過して液体培地を取り除き、糸状菌菌体を蒸留水に懸濁し、ワーリングブレンダー (17,000 rpm , 10 min , 0°C) で糸状菌を細断したのち超音波破碎機で 3 分間処理、1 分間休憩 (0°C) を繰り返し、糸状菌内部がクマーシーブリリアントブルー (CBB) 染色液で染まらなくなるまで処理をした。これを蒸留水で 2 回洗浄し、遠心 (3,000 rpm , 10 min , 4°C) し、さらにエタノールで 2 回洗浄、遠心を行ったのち、アセトンに懸濁し、一晚静置し、その後にアセトンを吸引ろ過して除去し、蒸留水に懸濁して遠心し、沈澱させたものを凍結乾燥して、白色の細胞壁を得た。シャーレ 10 枚から約 0.2g が得られる。

②コロイダルキチンおよびコロイダルキトサンの調製 : 大宝らの方法に従って調製した。

③酵素活性の測定 : 細胞壁を 0.2M トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH}7.6$) に懸濁し、超音波破碎機で 3 分間処理 (20KHz) して均一に分散させ、この懸濁液に酵素液 (キチナーゼ、キトサナーゼあるいはプロテアーゼを使用) を加え、振盪することなく反応させ、660 nm における吸光度の減少を経時的に測定した。