

マツノザイセンチュウから単離したバクテリアの 生育と毒素生産に及ぼすリン酸塩の影響

多田幹郎・大水章正・白石正英
(生物化学研究室)

Received November 1, 1980

Effect of Phosphate on the Growth and Toxin-Producing Ability of a Bacterium Isolated from Nematode *Bursaphelenchus lignicolus*

Mikiro TADA, Akimasa OMIZU and Masahide SHIROISHI
(Laboratory of Biological Chemistry)

The synthetic basal medium for a bacterium isolated from the nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, responsible for the rapid wilting of Japanese pines, was established. By use of the medium, the effect of phosphate on the growth and toxin-producing ability of the bacterium was investigated.

1) High concentration of the inorganic phosphate was required for the growth of the bacterium. Optimal concentration for the growth was 100 mM. Glucose-1-phosphate could substitute for the inorganic phosphate, but ATP could not.

2) The toxin-producing ability of the bacterium was lost when incubated on Bouillon medium. On the other hand, when incubated on the synthetic medium containing high concentration of the inorganic phosphate or glucose-1-phosphate, the toxin-producing ability of the bacterium was induced.

3) The filtrate of pine leaf homogenate was essential for the production of toxin by the bacterium, but the bacterium could not multiply on the filtrate.

These results suggest that in the body of nematode, the bacterium multiplies by using a certain phosphorous compound as the growth factor, and also obtains toxin-producing ability, and that in the pine, the bacterium released from nematode converts a specific compound into the pine wilt toxin.

緒 言

関東南部以西の、主として太平洋沿岸の広域にわたり、疫病的に蔓延した激害型マツ枯損は、懸命の防除にもかかわらず、その流行範囲は拡大しつつある。

この激害型マツ枯損の原因はマツクイムシによるものとされていたが、農林水産省林業試験場を中心とする協同研究の結果、マツノザイセンチュウ（以下センチュウと云う）がその病原体であることが明らかにされ、その行動と生活史の詳細な研究結果に基づき、今日の防除法が確立された。

このセンチュウによるマツの枯損機構について、真宮らは^{5,6)}、センチュウによる直接的な細胞破壊と、直接的な破壊がかかわらない生理反応による細胞の変性を観察した。その後、奥らは^{1,2)}、センチュウの代謝毒素が急激なマツ枯損に重要な役割を果していることを報告した。

さらに奥らは³⁾、この代謝毒素の生産がセンチュウによるものではなく、センチュウに寄生しているバクテリアによることを認めて速報した。

筆者らは、病原性のセンチュウから単離されたバクテリア（以下単にバクテリアと云う）

の生育生理を調べ、センチウとのかかわり、毒素生産機構の解明を目的とした研究に着手した。この報告では、バクテリアの生育にリン酸又はリン酸化合物が重要な役割を果していることの可能性を見出したので、その結果を述べる。

材料及び方法

1. 供試バクテリア

奥ら³⁾によってマツノザイセンチウより単離され、*Pseudomonas* 属と同定された菌株を譲り受けて供試した。この菌株は、単離直後には毒素生産能を有していたが、ブイヨン寒天培地で2ヶ月間継代培養が続けられ、入手した時には毒素生産能を失っていた³⁾。

2. 培養方法

保存培養は普通ブイヨン寒天（水1 l 中に肉エキス5 g, ペプトン10g, 食塩5 g と寒天15g を含む）の斜面上に接種し、26°Cで行い、約1週間毎に新しい培地に殖え替えた。なお、実験の後半には、実験結果に基づき、リン酸添加ブイヨン培地（前述の組成にさらに第一リン酸カリを5 g 添加した）を使用した。実験培養は液体振とう培養によった。菌体の増殖の程度は660nmにおける吸光度の測定に基づいた。吸光度の測定には分光光度計 Spectronic 20（島津）を使用した。

3. バクテリアの病原性、毒素の検定法

奥ら²⁾によって考案されたマツの幼苗を用いる方法に準じて行った。バクテリアは滅菌水にけん濁して、その20 μ l を接種した。毒素の場合は、河津ら⁴⁾によって、その有用性が確かめられている、10%エタノール水溶液に溶解又はけん濁し、その20 μ l を使用した。これらの接種後、2日以内に幼苗に萎凋が認められるか否かによって検定した。

4. 薄層クロマトグラフィーによる毒素の検出法

毒素の検出供試液をシリカゲルプレート（60-F₂₅₄, メルク製）にスポットし、クロロホルム：エタノール（19：1）または酢酸エチルで展開した後、*Cladosporium herbarum* の孢子を少量の養分（0.2%シュクローズ, 0.1%酵母エキス, 0.1%寒天）と共にプレート上に噴霧して、25°Cの湿室に2日間保つ。毒素が存在しない部分は孢子が発芽して菌体の生育のため黒色になるが、毒素の部分は*C. herbarum* の孢子発芽が阻止されるために、白色の生育阻止域として検出されることが奥ら¹⁾によって報告されている。

結果と考察

1. 生育条件の検討

A. 温度の影響

温度勾配培養装置（東洋科学, TN-3）と普通ブイヨン液体培地を用い、22°Cから40°Cまでの範囲について、バクテリアの増殖を調べた。その結果はFig. 1に示す。このバクテリアの生育における最適温度は30~32°Cであり、より高温では著しい増殖抑制が認められた。しかし、より低温においては、幾分増殖抑制が認められるもののその程度は低い。

B. pHの影響

普通ブイヨン液体培地のpHを塩酸及び苛性ソーダで3~11に調節し、30°Cで培養し、20時間後の菌体濃度を調べた結果をFig. 2に示した。始発pHが5.5~9.5では全て顕著な増殖が認められるがそれよりも酸性側でも塩基性側でも増殖は全く認められなかった。

C. マツの水抽出液における増殖

バクテリアのマツにおける生育を調べる目的で、マツの葉をホモジナイズし、濾過して得た濾液（20g生葉/100ml）を調製した。この抽出液のpHは3.8であり、そのまゝでは菌体

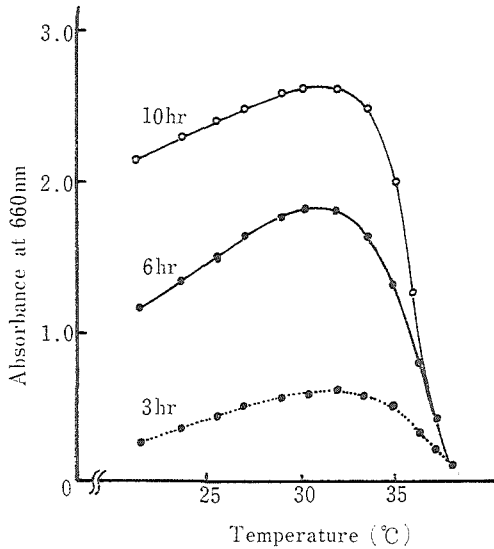


Fig. 1 Effect of temperature on growth of the bacterium.

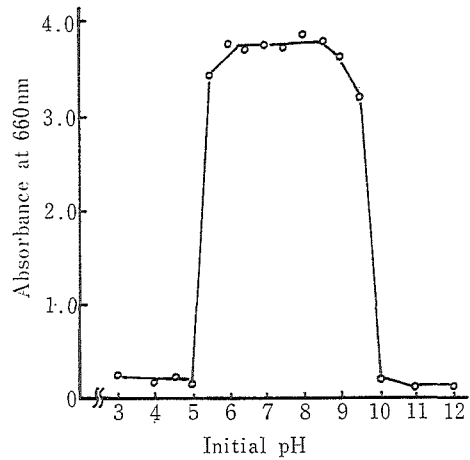


Fig. 2 Effect of the initial pH on growth of the bacterium.

の増殖は期待できず（実験的にも確かめた）pH を7.5に調節した後、バクテリアを接種し、30°C で培養したが、増殖は認められなかった。しかしながら10日間の培養後の菌体濃度はほとんど減少していなかった。また枝についても同様な実験を試みた。枝の水抽出液の pH は4.6であり、pH 調節の有無に関係なく、バクテリアは増殖しなかった。さらに水抽出液に炭素源、窒素源および種々の無機塩類を単独または組合せて添加したが、いずれもバクテリアの増殖は認められなかった。この結果は、水抽出液中に増殖を阻害する物質が存在するか、このバクテリアの生育を支配する特殊な物質が欠乏しているかどちらかであると考えられる。

D. 完全合成培地組成

バクテリアの生育を栄養生理の点から解明するために、完全合成培地の作成を試みた。炭素源、窒素源、各種無機塩類の質と量について、多くの組合せを検討した結果、Table 1 に示す組成培地が、普通ブイヨン培地にほぼ匹敵する増殖を示すことを認めた。

この組成の特徴は無機リン酸塩の濃度が異常に高いことである。Fig. 3にバクテリア増殖のリン酸依存性を示したが、最高の増殖には約100mM のリン酸を必要とし、20mM 以下では増殖は認められず、160mM 以上では濃度による阻害が認められる。この実験には第一リ

Table 1 Composition of the synthetic basal medium

Glucose	2.0	%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	%
KH ₂ PO ₄	25	mM
K ₂ HPO ₄	75	mM
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.05	%
MnSO ₄ •7H ₂ O	0.013	%
NaCl	0.01	%
FeCl ₃	0.1	mg %

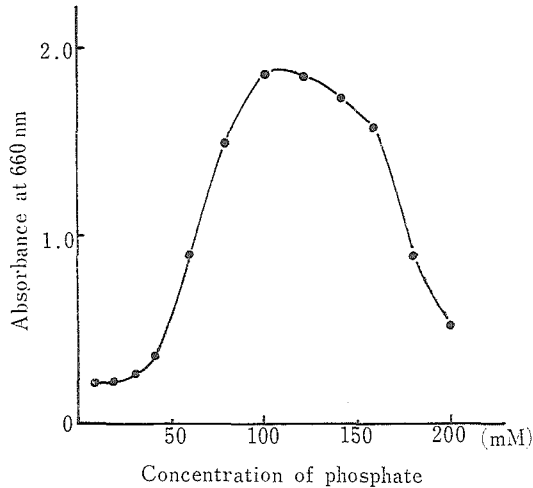


Fig. 3 Dependence of concentration of potassium phosphate in the synthetic basal medium for growth of the bacterium.

ン酸カリを使用した。リン酸ナトリウム及び塩化カリウムを用いての実験によって、カリウムではなくリン酸が関与することを確認した。このような高濃度のリン酸はバクテリア体内でのリン酸化反応に利用されると考えられる。しかし、バクテリアの生活環境であるマツの組織またはセンチウ体内において、このような高濃度のリン酸は期待できない。従って、バクテリアは、それらの生体中のリン酸化合物を利用していると推察される。

E. ATP の利用

合成培地のリン酸の全部または一部を ATP に換えて、バクテリアの増殖を調べた結果、リン酸の効果を ATP 代用することは出来なかった。

F. リン酸化糖の利用

合成培地のリン酸濃度を 10mM とし、グルコースの代わりに、グルコース-1-リン酸 (G-1-P)、グルコース-6-リン酸 (G-6-P)、フラクトース-1,6-二リン酸 (F-1,6-P) を加えて、増殖を調べた結果、G-1-P では十分な増殖が認められたが、他の二者での増殖は非常に低いものであった。上述の ATP での実験結果から、バクテリアは ATP を体内に取り込むことは出来ないが、特定のリン酸化合物を体内に取り込み、これを利用することによって増殖するものと考えられる。この観点から、G-1-P がセンチウとバクテリアの寄生を仲介する物質として機能することは充分にありうると考えられる。

2. 毒素生産条件の検討

本実験の供試バクテリアは、前述したように、センチウより単離した直後には毒素生産能を有していたが、普通ブイオン寒天で培養を続ける過程において、その能力を無くしたものである。この現象から、バクテリアの毒素生産能は、センチウの体内に存在するある種の物質によって誘導されるが、普通ブイオン培地中にはその物質が存在しないため、生産能を失うと考えられる。さらに、この毒素生産能を誘導する物質は、バクテリアの生育を支配するリン酸化合物であることも予想される。従って、筆者らはこの観点に基づいて、毒素生産とリン酸との関係について調べた。

A. バクテリアの病原性の検定

Table 2 に 4 種の異った培地で培養した菌体を発芽後 4 週間のマツの幼苗に $10^6 \sim 10^{10}$ コ

Table 2 Determination of pathogenicity of the bacterium cultured in different media

Medium	Number of bacterium inoculated				
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰
	Pine seedlings wilted*				
Bouillon medium	0 %	0 %	20 %	60 %	100 %
Bouillon medium added potassium phosphate	0	0	40	100	100
Synthetic medium	0	20	40	100	100
Synthetic medium replaced phosphate and glucose by G-1-P	0	20	60	100	100

* Five seedlings were used for one experiment.

接種し、48時間後の萎凋を調べた結果を示した。期待した程の明確な差は生じなかったが明らかにリン酸又はG-1-Pによって、毒素生産能が誘導されていることが認められた。

B. 薄層クロマトグラフィーによる毒素の検出

マツの葉の水抽出液（マツ20g/100mlに相当）100mlに4種の異なる培地で培養した菌体を10¹²コ接種し、26°Cで2日間培養したのち、その培養濾液から酢酸エチル抽出物を集め、それをシリカゲルプレートにスポットし、酢酸エチルで展開した。そのクロマトグラムをFig. 4に示した。病原性を示したバクテリアはいずれもRf 0.75に明確な*C. herbarum*の生育阻止斑を呈したが、普通ブイヨン培地に生育したものにはそのスポットが認められなかった。このRf 0.75に認められるスポットは、奥らによって検出された毒性を示すRf 0.38とは著しく異っており、別の物質と考えられるが、このRf 0.75の物質を多量に調製し、毒素の検定を試みた結果、1本のマツの幼苗に、10 μ gを接種すると、24時間以内に100%の萎凋が観察された。なお、菌体の増殖に用いた培養液について、毒素の検出を試みたがいずれの培地からも毒素検出できず、毒素の生産にはマツの水抽出物が必要であることが判明した。

これら病原性と毒素の検出結果から、リン酸またはリン酸化合物は、バクテリアの毒素生産に重要な役割を果すことが推察された。また、この実験において誘導によって生産した毒素が、奥らの検出した毒素と異なることに関しては、今後の研究に待たねばならないが、その原因の一つには、用いたマツ葉の成分の差に由来すると考えられる。

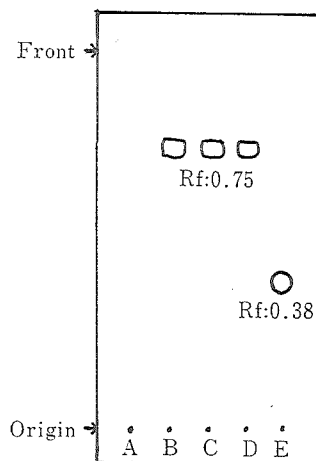


Fig. 4 Thin layer chromatogram of toxin produced by the bacterium grown in the different media.

- A : Bouillon medium
- B : Bouillon medium added potassium phosphate (100 mM)
- C : Synthetic medium
- D : Synthetic medium replaced phosphate and glucose by G-1-P
- E : Toxin detected by Oku³⁾

摘 要

病原性を有するマツノザイセンチュウから単離したバクテリアの完全合成培地を確立し、生育と毒素生産について検討した。

1) バクテリアの生育には、高濃度の無機リン酸塩が必要であり、最適濃度は100mMであった。この無機リン酸塩はATPでは代用できなかったが、G-1-Pは十分な増殖をもたらした。

2) バクテリアの毒素生産能は、普通ブイオン培地で培養すると消滅するが、高濃度のリン酸塩を含有する培地で培養すると誘導される。

3) 毒素生産にはマツの水抽出液が必須であり、毒素の前駆体はマツの体内に存在すると考えられた。

以上の学験結果から、バクテリアは、マツノザイセンチュウの体内でその代謝中間体である、ある種のリン酸化合物を栄養源として増殖し、さらに毒素生産能を獲得した後、マツの材中に放出され、特定の成分を毒素に変換することが推察される。

謝 辞

本研究において、バクテリアを快く提供され、多くの適切な助言を下された当学部植物病学研究室の先生方ならびに、多くの手法を御教授下さった当学部農産製造学研究室の河津助教授に心から感謝します。

なお、本研究の一部は、社団法人ゴルファーの緑化促進協力会の助成金に拠った。

文 献

- 1) OKU, H., T. SHIRAIISHI and S. KUROZUMI: *Naturwissenschaften* 66 (S), 210 (1979)
- 2) 奥八郎・白石友紀・黒住繁久・大田宏: *森林防疫* 29 (1), 3-6 (1980)
- 3) OKU, H., T. SHIRAIISHI, S. OUCHI, S. KUROZUMI and H. OHTA: *Naturwissenschaften* 67 (S), 198 (1980)
- 4) 未発表
- 5) 真宮靖治: *86回日林講* 285-286 (1975)
- 6) 真宮靖治: *植物防疫* 28, 120-124 (1976)

正誤表 (Errata)

頁 (Page)	行 (Line)	誤 (Erratum)	正 (Correct)
目次	6	温原正高	湯原正高
19	10	その節囲に	その範囲に
31	12	脱水温度減	脱水温度域
35	41	バクテリア	バクテリア
38	8	ATP代用	ATPで代用
〃	12	G-I-P	G-1-P
40	10	学験結果	実験結果
〃	〃	マツノザイセンチュウ	マツノザイセンチュウ