

細胞性粘菌の作物病害微生物に対する抑制作用

川上 新一 a)

筑波大学 大学院生命環境科学研究科

[〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1]

Growth-suppressing effects of dictyostelid cellular slime molds against phytopathogenic bacteria and fungi

Shin-ichi KAWAKAMI a)

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1. 目的

細胞性粘菌は腐植土中に広く生息し、アメーバとして増殖しながら細菌などを捕食する原生生物であるが、餌がなくなると集合して菌類のような子実体を形成する相も生活環の中に有している。このうちのキイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*) は、分子生物学、遺伝学、発生学などにおけるモデル生物として盛んに研究されている (前田, 2000 ; 漆原, 2006) が、細胞性粘菌全般に関する分類や生態の研究はこれまであまり進んでいない。

一方、細胞性粘菌の分泌する物質が、他の細胞性粘菌の増殖を阻害したり (Hagiwara and Someya, 1992)、大腸菌に対して強い抗菌作用を示したりする場合があること (川上, 未発表) が明らかになっている。このような抗菌性の分泌物質は、農作物の病原微生物に対しても効果を示す可能性が考えられる。また、細胞性粘菌は細菌などを直接的に捕食することから、その行動と分泌物質の相乗効果による病原微生物の効果的な増殖抑制も期待される。さらに、この分泌物質が特定され、その作用機序が明らかになれば、新たな防除薬剤の開発などへも応用できる可能性がある。このような応用面へ研究を展開する上で、細胞性粘菌の各菌種がどのような範囲の病原微生物に対して効果を示すのかについて検討し、それぞれの作用スペクトルを把握するとともに、より効果の高い系統を選抜することが重要である。そのためには、来歴の異なる多数の系統を探索・収集し、コレクションを充実させることが求められている。

本研究では、各地で分離した細胞性粘菌の分類上の所属を明らかにした上で、各分離株の植物病原細菌に対する捕食性について調査するとともに、その分泌物質が植物病原細菌および糸状菌に対

a) (現所属) 山形県立博物館 Yamagata Prefectural Museum [〒990-0826 山形市霞城町 1-8]

して抗菌作用を示すかどうかについても検討した。

2. 探索概要

平成 21 年 7 月から 11 月にかけて、鹿児島県垂水市、北海道夕張市、礼文島、利尻島、および新潟県弥彦山、佐渡島を探索し、主に森林土壌を対象として 6 か所（表 1、図 1・4）の収集地点を選び、その土壌サンプルを採取して細胞性粘菌の分離に供した。

表 1. 探索・収集日程

年月日	行程	行動内容
H21.7.24	つくば市→垂水市	移動（陸路，空路）
25	垂水市	鹿児島大学農学部附属高隅演習林内を探索
26	垂水市	鹿児島大学農学部附属高隅演習林内を探索
27	垂水市→つくば市	移動（空路）
H21.9.10	つくば市→千歳市→夕張市→札幌市	移動（空路，陸路），夕張市内を探索
9.11	札幌市→稚内市→礼文町	移動（陸路，海路），礼文島東海岸沿いを探索
9.12	礼文町→利尻富士町→稚内市	利尻島の北海岸沿いを探索
9.13	稚内市→札幌市→つくば市	移動（陸路，空路）
H21.11.2	つくば市→三条市→佐渡市	移動（陸路，空路），三条市弥彦山中の探索
11.3	佐渡市→三条市→つくば市	移動（陸路，空路），佐渡島の里山地域を探索



図 1. 鹿児島県における探索収集地



図 2. 北海道における探索収集地点



図 3. 新潟県における探索収集地点



図 4. 新潟県佐渡島での土壌採取

3. 収集成果

細胞性粘菌の餌となる *Klebsiella aerogenes* の懸濁液を稲わら煮出し汁寒天培地（滅菌水 1l に対して稲わら 5g を加えて煮出した後、その煮汁に寒天 15g を添加した）の平板全面に塗布し、その上に採取した土壌を約 1 cm³ 播き、20°C で 1 週間培養した (Kawakami and Hagiwara, 2008)。子実体が形成された場合は、その孢子塊を竹串の先端で採取し、無栄養寒天培地に移植した後、*K. aerogenes* の懸濁液を滴下して 3-10 日間、20-25°C で培養して子実体を再び形成させた。

鹿児島、北海道および新潟で採取した土壌サンプルから、それぞれ 30 株、34 株および 23 株の細胞性粘菌を分離することができた。これら 87 株のほとんどは良好な子実体形成を示した。子実体の色や大きさ、輪生枝の有無、アメーバの集合様式などにより同定を行ったところ、以下の 2 属 8 種（種群含む）が認められた：*Dictyostelium brefeldianum* complex [子実体の大きさが中型。今回得られた分離株は *D. brefeldianum* に似るが、このグループは形態変異が大きく分類が混乱している（後述）]、*D. macrocephalum*（子実体柄の長さが短いわりに大きな孢子塊を形成）、*D. minutum*（子実体が小型、特徴的なアメーバの集合様式）、*D. polycephalum*（子実体が束生）、*D. firmibasis*（大型で白色の子実体を形成）、*D. purpureum*（大型で紫色の子実体を形成）、*Polysphondylium pallidum*（白色の子実体で、輪生枝を形成）、*P. violaceum*（紫色の子実体で、輪生枝を形成）。

4. 特性評価

1) 評価方法

細胞性粘菌が植物病原細菌を捕食するか否かについては、以下のようにして調べた。細胞性粘菌としては子実体形成の比較的良好な 9 株（表 2）を用い、植物病原細菌としては表 3 に示した 4 株を供試した。これらの細菌を PDA 培地（6 cm シャーレ）を用いて 30°C で培養し、2 日後に菌体をかき取って 1 ml の滅菌水に懸濁した。それを無栄養寒天培地に 40 μl 滴下し、乾燥後に細胞性粘菌

の胞子を接種して、20℃下で5日間にわたって経過を観察した。

細胞性粘菌の分泌物質が糸状菌の増殖に影響を及ぼすか否かについては、以下のように調査した。すなわち、細胞性粘菌9株を *K. aerogenes* の懸濁液に接種し、7日間20℃で振盪培養した後、その培養上清を採取した。つぎに、96穴プレートの各ウェルにアンピシリンを添加した HL5 溶液 200 µl を分注した後、20 µl ずつ病原糸状菌（表3）の菌糸懸濁液を加え、さらに30 µl の細胞性粘菌の培養上清を加えた。これを20℃で培養し、3日および10日後に糸状菌の生育の有無を観察した。HL5 溶液の組成は次のとおりである：グルコース 14 g、酵母エキス 7 g、プロテオースペプトン 14 g、HL5 バッファー11 (Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.26 g、KH₂PO₄ 5 g)、1% アンピシリン。

さらに、細胞性粘菌の培養上清の増殖抑制効果を検討するために、以下のような試験も実施した。すなわち、PDA 培地（6 cm シャーレ）全面に植物病原細菌を塗抹し、細胞性粘菌の培養上清 40 µl

表2. 特性評価に供試した細胞性粘菌

株名	種名	分離場所	MAFF 番号
KTK02B21	<i>Polysphondylium pallidum</i>	鹿児島県垂水市	275060
KTK05B11	<i>P. pallidum</i>	鹿児島県垂水市	275057
T0811	<i>P. violaceum</i>	鹿児島県垂水市	275061
T1702	<i>P. pallidum</i>	鹿児島県垂水市	275059
K1302	<i>P. violaceum</i>	鹿児島県垂水市	275058
HY031	<i>Dictyostelium minutum</i>	北海道夕張市	—
HRI022	<i>D. discoideum</i>	北海道利尻富士町利尻島	—
NSS0921	<i>P. pallidum</i>	新潟県佐渡市佐渡島	—
NSS1002	<i>P. pallidum</i>	新潟県佐渡市佐渡島	—

表3. 特性評価に供試した植物病原微生物

微生物の種類	学名	MAFF番号	病害の名称
細菌	<i>Ralstonia solanacearum</i>	211267	青枯病
細菌	<i>Ralstonia solanacearum</i>	211557	青枯病
細菌	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	106567	軟腐病
細菌	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	301394	軟腐病
糸状菌	<i>Calonectria ilicicola</i>	102001	ダイズ黒根腐病
糸状菌	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	103036	トマト萎凋病
糸状菌	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	103038	トマト萎凋病
糸状菌	<i>Sclerotium rolfsii</i>	306493	白絹病
糸状菌	<i>Sclerotium rolfsii</i>	328247	白絹病
糸状菌	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	305955	菌核病
糸状菌	<i>Pythium ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	239199	ダイコン等腐敗病
糸状菌	<i>Verticillium dahliae</i>	236190	半身萎凋病
糸状菌	<i>Verticillium dahliae</i>	305563	半身萎凋病

をしみこませた濾紙パッドを平板培地の中央に置いた。一方、病原糸状菌の場合は、平板培地の一点に供試糸状菌を接種し、そこから 1 cm の距離に培養上清をしみこませた濾紙パッドを置いた。いずれの場合も、22°Cで 5 日間培養した後、病原微生物の生育の有無を調査した。

2) 結果

細胞性粘菌の捕食能について検討した結果、いずれの粘菌についても、供試した植物病原細菌 4 株のうち 3 株 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* MAFF 106567, 301394, および *Ralstonia solanacearum* MAFF 211267) を捕食し、増殖することが認められた。すなわち、培養 5 日後にはこれらの細菌のコロニーが消滅し、その場所に粘菌の子実体が形成された。一方、*R. solanacearum* MAFF 211557 は、いずれの粘菌によってもほとんど捕食されなかった。

細胞性粘菌の分泌物質が病原糸状菌の増殖に影響を及ぼすか否かについて HL5 液体培地を用いて調べたところ (表 4)、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* HRI022 の培養上清が *Calonectria ilicicola* MAFF 102001 の増殖を抑制することが明らかとなった。一方、それ以外の粘菌と病原糸状菌の組合せでは、培養上清の増殖抑制効果は認められなかった。

PDA 培地上に細胞性粘菌の培養上清をしみこませた濾紙パッドを置き、培養上清の増殖抑制効果を調べたところ (表 5)、*Polysphondylium pallidum* KTK02B21 の培養上清は *R. solanacearum* 2 株の増殖に一定の影響を与えることが認められた (図 5)。また、*C. ilicicola* MAFF 102001 に対して *P. pallidum* KTK05B11 および *D. discoideum* HRI022 の培養上清を用いた場合、*S. rolfsii* MAFF 328247 に対して *P. violaceum* T0811 と *P. pallidum* T1702 の培養上清を用いた場合において、各病原糸状菌の増殖が抑制された。

表 4. 粘菌培養上清の病原糸状菌に対する増殖抑制 (HL5 液体培地)

病原菌 株名	細胞性粘菌の培養上清									滅菌水
	KTK 02B21	KTK 05B11	T0811	T1702	K1302	HY031	HRI022	NSS 0921	NSS 1002	
MAFF	275060	275057	275061	275059	275058	—	—	—	—	
102001	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○
103036	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
103038	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
306493	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
305955	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
239199	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
236190	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
305563	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

○：増殖あり； ×：増殖なし

表5. 粘菌培養上清の病原細菌および糸状菌に対する増殖抑制（PDA平板培地）

病原菌	細胞性粘菌の培養上清									滅菌水
株名	KTK 02B21	KTK 05B11	T0811	T1702	K1302	HY031	HRI022	NSS 0921	NSS 1002	
MAFF	275060	275057	275061	275059	275058	—	—	—	—	
211267	△*	○	○	○	○	○	○	○	○	○
211557	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○
102001	○	×	○	○	○	○	×	○	○	○
328247	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○

○：増殖あり； △：濾紙パッド周辺のコロニーが小さい；
△*：コロニーが全くない領域が認められる； ×：増殖なし。

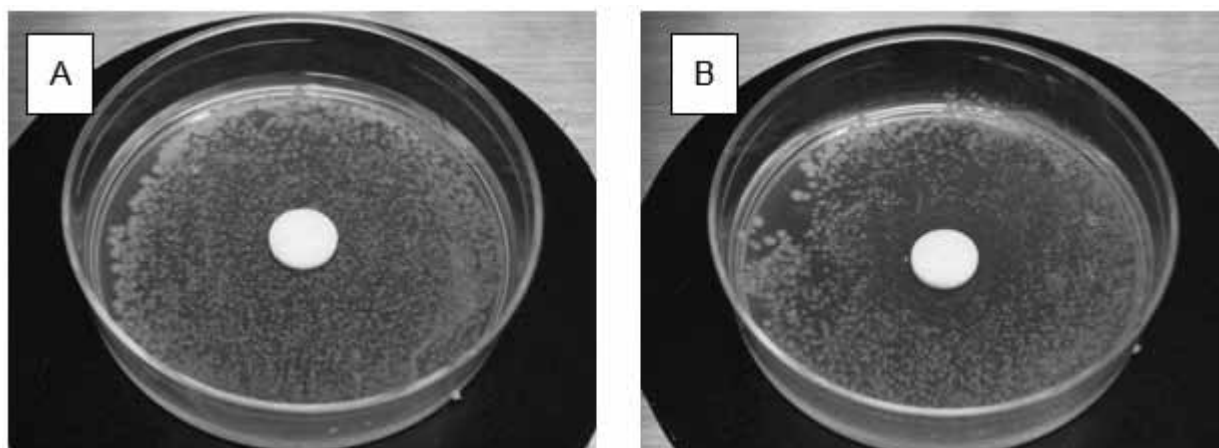


図5. *Ralstonia solanacearum* の増殖に対する滅菌水 (A) と *Polysphondylium pallidum* KTK 02B21 の培養上清 (B) の阻害効果

4. 所感

本研究では、粘菌が分離された記録のない場所での探索・収集を試みた。その結果、新種に相当するような株を得ることはできなかったが、既存種の分布域を確認する上で有意義な成果を上げることができた。なお、*Dictyostelium brefeldianum* complex については、形態の異なる隠蔽種が多数含まれていることが想定されている(Hagiwara 1989)ため、今後 *D. brefeldianum* の種概念を整理するべく、タイプ株や多くの分離株を用いた分類学的再検討が必要である。

粘菌による植物病原細菌の捕食については今のところほとんど報告がないので、今回の研究成果は大変意義深いものである。さらに多くの病原細菌に対する効果を調査することが望まれる。粘菌の分泌産物による病原糸状菌の増殖抑制効果についても一定の成果を得ることができたことから、これを踏まえてさらに特性評価を行い、分泌物質の特定やその作用機序について明らかにすることが望まれる。なお、表4と5とで結果の異なる粘菌と病原微生物の組合せがあることから、試験方法について比較検討し、至適化する必要がある。

5. 謝辞

筑波大学大学院生命環境科学研究科橋本哲男博士には、本研究に対してご助言、実験機器の使用の便宜を図っていただくなどのご支援をいただいた。深く感謝申し上げます。

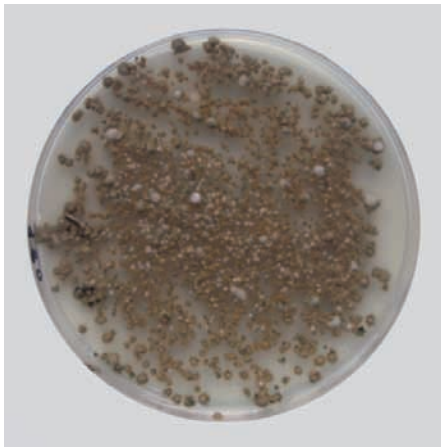
6. 参考文献

- 1) 前田靖男編 (2000). モデル生物：細胞性粘菌. p. 386. アイピーシー, 東京.
- 2) 漆原秀子 (2006). 細胞性粘菌のサバイバル. p. 136. サイエンス社, 東京.
- 3) Hagiwara, H. and Someya, A. (1992). Killer activity observed in dictyostelid cellular slime molds. Bull.Natn.Sci.Mus.,Tokyo, Ser. B. 18(1) : 17-22.
- 4) Hagiwara, H. (1989). The taxonomic study of Japanese dictyostelid cellular slime molds in Japan. National Science Museum. p. 131.
- 5) Kawakami, S. and Hagiwara, H. (2008). A taxonomic revision of two dictyostelid species, *Polysphondylium pallidum* and *P. album*. Mycologia 100(1) : 111-121.

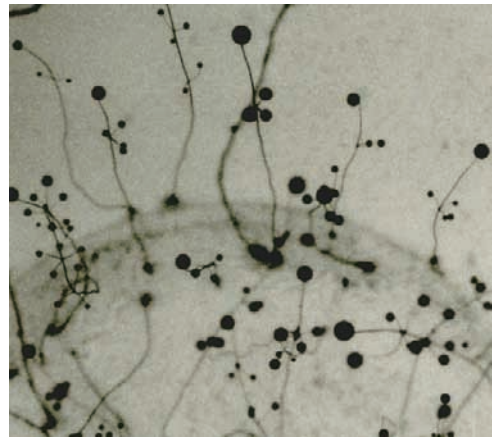
Summary

Dictyostelid cellular slime molds (DCSMs) are one of model organisms for researching cell differentiation, cell motility and so on. On the other hand, their taxonomical and ecological aspects are not investigated in detail. In this study, we used 9 isolates of DCSMs from Japan and investigated interaction of these DCSMs with phytopathogenic bacteria and fungi to evaluate applicability of DCSMs to disease control. As a result, all DCSMs used in this study fed two *Ralstonia* strains and one *Erwinia* strain. In addition, it was suggested that the substances secreted by five strains of DCSMs suppressed the growth of some bacteria and fungi. More data to confirm the effects of DCSMs against several phytopathogenic bacteria and fungi will be necessary.

微生物遺伝資源の調査プロフィール



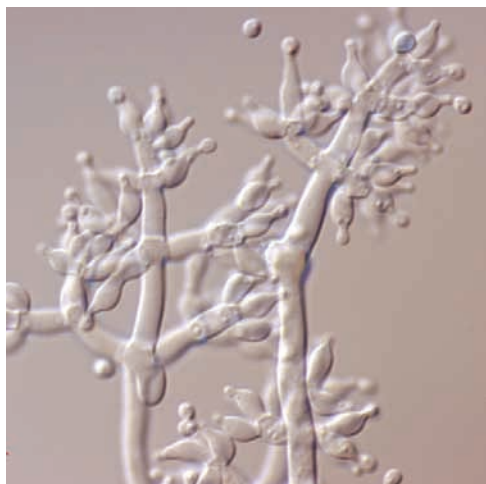
トマト葉かび病菌 (*Passalora fulva*) のコロニー (飯田)



細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の子実体 (川上)



Corynespora cassiicola の分生子 (下元)



キクラゲ栽培菌床用木片から分離された *Trichoderma* sp. 5 (奥田・五十嵐)



褐色 *Trichoderma* cf. *pleuroticola* MAFF 242460 のコロニー (奥田・五十嵐)