

マツノザイセンチュウ, *Bursaphelenchus xylophilus* に 随伴する松萎凋性細菌の単離とその毒性代謝物質

河津 一儀・山下 秀昭^{a)}・小林 昭雄^{b)}・神崎 浩
(生物資源開発学講座)

Isolation of Pine-wilting Bacteria Accompanying Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and Their Toxic Metabolites

Kazuyoshi Kawazu, Hideaki Yamashita, Akio Kobayashi,
and Hiroshi Kanzaki
(Department of Bioresources Chemistry)

Based on the observation that ray parenchyma cell death took place prior to nematode population increase in pine wood, the authors suspected that any microorganisms carried by pathogenic nematodes would be involved in the pathogenic process. The authors screened pathogenic nematode-accompanying microbes for their toxicity against cultured cells of *Pinus thunbergii* and isolated and identified 3 toxic strains, *Bacillus cereus* HY-3, *B. subtilis* HY-16, and *B. megaterium* HY-17, whose toxic products were identified as phenylacetic acid. Inoculation of pine seedlings with the toxic bacterium alone did not cause the seedling to wilt, but inoculation of pine seedlings with the toxic bacterium carried by weakly pathogenic nematodes wilted the seedling as much as strongly pathogenic nematodes. These results suggested that phenylacetic acid-producing bacteria could invade pine trees by accompanying pine wood nematodes, and produce phenylacetic acid, a toxic metabolite, in the wood.

Key words : pathogenic bacteria, phenylacetic acid producer,
nematode-accompanying bacteria, fluorescence microscopic analysis, pine wilt disease

緒 言

我国のみにとどまらず、広く太平洋を取り巻く温帯地域に蔓延、被害の甚大なマツ材線虫病は、マツノザイセンチュウ（以下、ザイセンチュウと略す）の侵入による萎凋病といわれている。しかし、その発病機構の詳細については、いまだ不明な点が多い。著者らは、3年生クロマツ苗木において、ザイセンチュウを接種後24時間以内に、安息香酸が生成し、直ちにグルコースエステルに解毒されること、その生成が解毒機構を上回ると遊離の安息香酸の蓄積が始まりその頃からザイセンチュウも急増することを見いだした^{1,2)}。

しかるに、植物毒であるシクロヘキシミドや、枯損原因として提案された³⁾セルラーゼなどを投与したり、あるいは水分欠乏によって萎凋させた場合には、この両化合物の生成と蓄積は、甚だ微量であり、ザイセンチュウ接種の場合とは著しく異なっていた。そこで、この両化合物の生成と蓄積は、マツ材線虫病の特徴であり、本病発病の化学診断とすることができると結論した^{1,2)}。

ところで、本病の初期症状である樹脂道エピソード

Received October 1, 1997

a) 現在、テルモ株式会社 技術開発部

b) 現在、大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻

ウム細胞や周辺柔細胞の変性は、ザイセンチュウのその場への到着および増殖に先行して起こる^{4,5)}ことから、ザイセンチュウに随伴する微生物が発病に関与しているのではないかと推論した。そこで、本研究では、病原性ザイセンチュウから微生物を数株単離し、クロマツ培養細胞に対する毒性を指標にして毒性物質生産菌を探索した。さらに、この毒性代謝物質を単離同定し、この毒性化合物が本病発病の原因毒素であると推定した。

材料と方法

化学分析条件

核磁気共鳴スペクトルは、Varian社 VXR-500 NMR 分析装置で、 CDCl_3 溶液として、測定した。質量スペクトルは、日本電子 JMS-D300質量分析計で、電子衝撃型イオン源で直接導入で測定した。赤外吸収スペクトルは、KBr 錠剤として、Nicolet 710 FT-IR で、紫外吸収スペクトルは、メタノール溶液として、島津 UV-3000で測定した。フェニル酢酸の定量は、Unisol 400を、5%保持させた Uniport S (80/100メッシュ)を充填したガラスカラム($\phi 3 \times 1500\text{mm}$)を装着したガスクロマトグラフ島津 GC-4CMを用い、水素炎イオン化により検出した。

窒素の流量は毎分40ml, 注入口, カラムの温度は、それぞれ240°C, 190°Cとした。

供試ザイセンチュウ

農林水産省森林総合研究所 真宮靖治博士から分譲して戴いた押麦培地で培養してある強病原性ザイセンチュウ S 6-1 を、滅菌水に懸濁し、微生物の分離に用いた。さらに、1989年9月および11月に、岡山大学半田山自然教育研究林の枯損松の幹よりハンドドリルを用いて採取した松チップからベールマンろと法により集めたザイセンチュウを、0.1% merthiolate で表面殺菌し、滅菌水の懸濁液として微生物の分離に用いた。微生物の分離および培養用培地として、次のものを用いた。

1. Czapek Dox agar 培地 (agar 1.5%)
2. Nutrient broth agar 培地 (agar 1.5%)
3. Sabouraud agar 培地 (agar 1.5%)
4. Potato sucrose malt extract (PSM) agar 培地 (agar 1.5%)

蛍光測光法を用いる植物細胞毒性試験

蛍光色素の1つである fluorescein diacetate (以

下、FDAと略記する)は、それ自体は蛍光をもたないが、細胞内に取り込まれ、加水分解酵素による水解を受けて、fluorescein になると無傷細胞から漏出できず、細胞内に蓄積され、蛍光を発し、これによって無傷細胞は蛍光を発する。すなわち FDA を用いて、加水分解酵素の活性の強さに比例する蛍光強度を指標とすれば、細胞の生存率を定量的に測定することが可能である。

染色液の調製 FDA 0.5 g をアセトン50mlに溶解し冷凍庫中で保存する。必要時にこれを蒸留水で50倍に希釈して使用する。ただし、蒸留水で希釈後は数時間しか使用に耐えない。

クロマツ培養細胞の継代培養 2, 4-D 1 ppm, NAA 1 ppm, Kinetin 0.1 ppm を含む Mura-shige & Skoog 培地100mlを、500ml容の三角フラスコに分注し、オートクレーブ(1kg/cm², 121°C, 20 min)で滅菌する。これに培地の約1/5程度の量の培養細胞を移植し、継代培養する。FDA 染色に用いる培養細胞としては、細胞塊になっているものよりも単細胞群となっているものの方が適している。この点、クロマツ培養細胞は比較的柔らかく、細胞塊が細かいので、単細胞群をつくり出すための特別な操作を特に必要としない。ただ、継代培養のための移植時には、なるべく培地上澄の細かい細胞塊を移植する。

分離した微生物培養液の毒性検定のための試料溶液の調製 当該微生物を分離した培地で往復振とう培養して得た培養液25mlに、セルロースパウダーを約0.75mg加え、凍結乾燥する。試料を含んだセルロースパウダーにメタノールを加え、よく混和させて抽出し、吸引ろ過する。ろ液のメタノールを留去した後、滅菌水を2ml加え懸濁させたものを試料溶液とする。精製段階における毒性検定では、試料が水溶性の場合は濃縮乾固後2mlの滅菌水に溶解させる。試料が非水溶性の場合には、1%でも毒性のない DMSO 100 μl に溶解後、滅菌水で2mlに定容した。

FDA 染色試験 (Fig. 1) 100ml容三角フラスコにアルミホイルで蓋をして、オートクレーブで滅菌する。冷却後、上で調製した試料溶液2mlと約1万個/mlに調整したクロマツ培養細胞18mlとを合わせる。試験期間中は細胞懸濁液を5°Cで静置し、24時間おきに三角フラスコから懸濁液を1滴とり、スライドグラス上で0.01% FDA 溶液1滴と混和させて5分間染色する。染色終了後、蛍光顕微鏡下で細胞の蛍

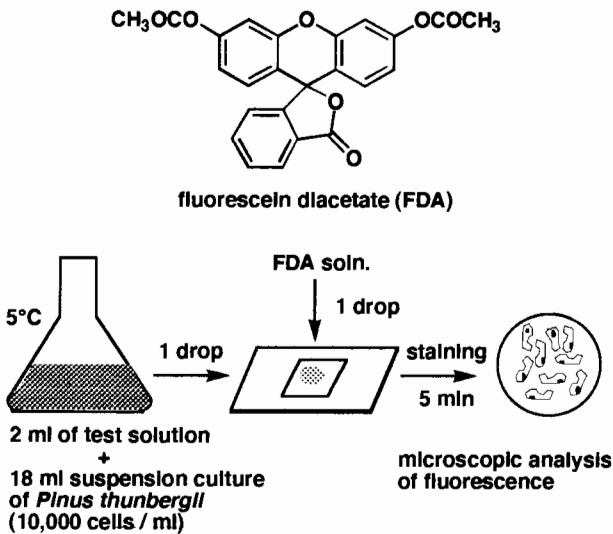


Fig. 1 A fluorescence microscopic assay for toxicity against pine cells using FDA.

光強度を測定する。試験期間は3日間を目安にして行った。蛍光顕微鏡は、オリンパスBH2-QRFLを用い、倍率は100倍、excitation V, barrier filter 530 nm, sensitivity 600で行った。蛍光強度200以上を生存細胞とし、生存率は次の式で求めた。

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{蛍光強度200以上の細胞数}}{\text{計測細胞数}} \times 100$$

アカマツ実生を用いたの萎凋性判定試験

供試実生の栽培 アカマツ種子3～5 g程度を1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に5分間浸漬後、滅菌水で数度洗浄、ガラス瓶中で滅菌水に24時間浸漬した種子を、プラスチック製バット中に敷いた脱イオン水で湿らせた一層の脱脂綿上に蒔く。26°C、16時間照明の600lxの人工気象器中で栽培し発芽しかけた種子を別のバットに並べた水で湿らせた一層の四角の脱脂綿(18mm×18mm)上に置く。同じ条件で、続けて栽培し第2葉が展開するまでの状態の実生苗を試験に供する。

袋かけによる試験法 刃渡り5mmのカミソリ(両刃カミソリを切ったもの)を70%エタノールをしみ込ませたキムワイプで拭き、素早く火炎のなかを通過させ滅菌し、子葉の基部の下3mm～8mmの部分(5mm)の中央を縦貫し、接種用の傷をつける。パラフィルム(12mm×8mm)を二つ折りにしたもので、この傷口を包みパラフィルムの両端および底の部分、

胚軸周辺を圧着する。パラフィルム袋の液受けの上部をピンセットで広げ、供試液25 μ l(センチウ懸濁液の場合は、500頭/25 μ l)をオートピペッターで注入する。シャーレ内に立てて、上記と同じ条件で栽培する。萎凋症状の観察は、1週間毎日と、10日、14日に行い、記録する。通常、この方法によって、ザイセンチュウの病原性の強弱を検定する。

判定表示 萎凋症状の表示には、以下の記号を用いている。

++：葉はヤブレガサ状で、接種部は強く萎凋している状態。
+：葉は垂れさがっていないが、接種部は強く萎凋している状態。
×：葉は垂れさがっていないが、接種部は強く萎凋し、接種部から折れている状態。
±：上記以外の何らかの症状を示している状態(葉先がちじれる、葉が萎凋している、接種部に若干の萎凋が認められるものなど)。
-：健全な状態。

本試験においては、1試験区に5本の実生苗を用い、++、+、×が過半数の場合は病原性が強いとし、半数以下の場合を弱、0の場合を病原性なしと判定する。

点滴による試験法 滅菌水で軽く湿らせた乾熱滅菌綿球で、傷をつける部分のワックスを拭きとる。袋かけ法のとくと同様に傷をつける。傷口が上向きで水平になるように、実生を寝かせ、傷口にオートピペッターで、供試液またはセンチウ懸濁液(500頭/10 μ l)を、10 μ l点滴する。傷口の液が吸収されるまで、根を湿らせたトイレットペーパーで覆い、乾燥するのを防ぎ放置する。液が吸収された後、実生をシャーレに立て袋かけ法と同条件で栽培し、萎凋症状を観察記録する。

結果と考察

ザイセンチュウからの微生物の分離 (Fig. 2)

森林総合研究所から分譲をうけた強病原性線虫S6-1からは、NB培地で、12種類の細菌を分離し、HY-1～HY-12と仮称した。1989年9月に半田山自然教育研究林の枯損松から得たザイセンチュウからは、2種類の細菌をNB培地上で分離した。この2菌株をHY-13、HY-14と称した。また、1989年11月に、同研究林の枯損松から得たザイセンチュウからは、NB培地上で2種類、PSM培地上でさらに2種類の細菌を分離した。この4菌株をHY-15～HY-18とした。

分離した細菌培養液のクロマト培養細胞に対する毒性

上記の細菌18菌株の培養液の凍結乾燥物のメタノール抽出物について、クロマト培養細胞に対する毒性を試験した結果、クロマト細胞に毒性を示したのは、HY-3, HY-16, HY-17の3菌株であった(Fig. 3)。これらの菌株の同定を The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (Scotland, UK) に依頼し、それぞれ *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* であることが、明らかになった。

3菌株HY-3, HY-16, HY-17が生産する植物毒性物質の単離

上記3菌株をそれぞれ、NB培地で振盪培養し、クロマト培養細胞に対する毒性を指標としながら、溶媒により分画した。活性は、酢酸エチル可溶部に認められ、培養液25ml相当で活性を示した。酢酸エチル可溶部をシリカゲル、ODSカラムで分画精製し、活性物質を得た(Fig. 4)。

本化合物は、シリカゲルTLC[ベンゼン-酢酸エチル(8:2)]で、Rf=0.5付近に紫外吸収をもつテーリングスポットを示した。クロマト細胞に対しては、投与3日後における半数致死濃度は、25µg/mlであった。

単離した活性化合物の同定

本化合物は、TLC上、プロモクレゾールグリーンで発色することから有機酸と考えられた。メタノール溶液の紫外吸収スペクトルは、247, 253, 258, 264 nm にベンゼン環の極大吸収を示した。赤外吸収(KBr)スペクトルは、3500~2500cm⁻¹, 1700cm⁻¹に

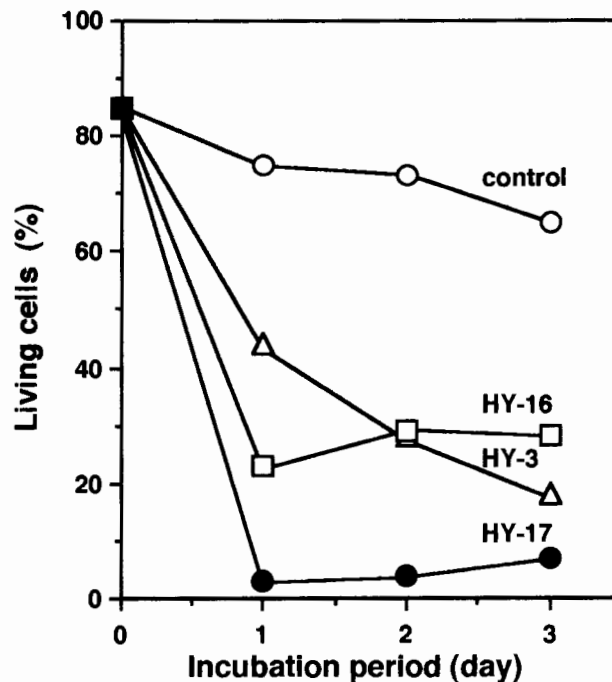
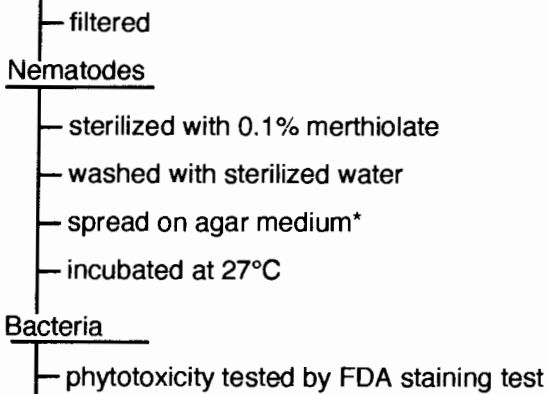


Fig. 3 Toxicity of the 3 strains of isolated bacteria against pine cells.

Tips of wilted pine



*; Nutrient broth
Czapek-Dox
Sabouraud
Potato-sucrose-malt extract

Fig. 2 Scheme of isolation of microbes from nematodes.

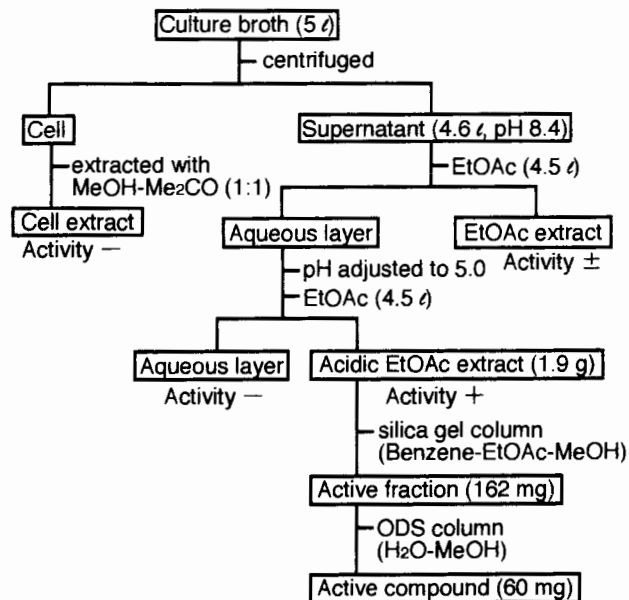


Fig. 4 Scheme of isolation of the active product from the toxic broth.

カルボン酸の吸収および750, 700 cm^{-1} に一置換ベンゼンの吸収を示した。核磁気共鳴吸収の結果 [δ_{H} 3.63 (2 H, s), 7.30 (5 H, m), 10.5 (1H, bs); δ_{C} 41.1(CH₂), 127.3(benzene C), 128.6(benzene C) \times 2, 129.3 (benzene C) \times 2, 133.3 (benzene C), 178.0 (COOH)] をも総合して、本化合物をフェニル酢酸と同定した。ベンジルシアニドから加水分解によって調製した標品と融点 (76.5 $^{\circ}\text{C}$) および総てのスペクトルが一致した。

フェニル酢酸の植物毒性

フェニル酢酸は、クロマツ培養細胞に対して25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で毒性を示し (Fig. 5), 安息香酸, シクロヘキシミドと比較してそれぞれ, 2倍, 1/50の強さであった。また, アルファルファ種子の発芽に対する阻害の最小有効濃度は, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で, 安息香酸の2倍, シクロヘキシミドの1/30程度であった。

フェニル酢酸のアカマツ実生に対する萎凋活性

アカマツ実生を用いて点滴法で萎凋活性を試験したところ, 1.25 μg で活性を示した。この値は, 安息香酸の約4倍の強さである。

上記3株およびこれらの株と同種の *Bacillus* sp. のフェニル酢酸生産能

上記3株のフェニル酢酸生産菌と同種の *Bacillus* sp. のフェニル酢酸生産量を調べるにより, マツ

ノザイセンチュウから分離した菌が特殊なものであるかどうかの知見を得ようとした。NB培地を10 ml 分注した ϕ 25 \times 200 mm 試験管5本を, 27 $^{\circ}\text{C}$, 暗黒下で中2日往復振盪培養した。培養開始時の植菌量を一定にするため, あらかじめNB培地10 ml を分注した ϕ 25 \times 200 mm 試験管で, 27 $^{\circ}\text{C}$, 暗黒下で中2日往復振盪培養したものを種母として0.5 ml ずつ植菌した。同種の *Bacillus* sp. としては, 次の5株 *B. cereus* (AKU 233) 株, *B. cereus* (AKU 234) 株, *B. subtilis* (IFO 3013) 株, *B. subtilis* (IFO 3009) 株, *B. megaterium* (AKU 203) 株を用いた。

フェニル酢酸の定量

当該細菌の培養ブrossを, 遠心分離 (RP 20-2, 15,000rpm \times 10min), 菌体の細胞重量 (湿重量) を測定した。上澄 (50 ml) は, pH測定後, 1N HCl でpH4.0に調整し, 酢酸エチルで抽出, 酸性酢酸エチル層を濃縮後, 酢酸エチル1 ml に定容した。そのうち4 μl を, GLCの絶対検量法によってフェニル酢酸を定量した。菌体湿重量, 培養液pHおよびフェニル酢酸含量をTable 1に示す。試験したすべての株がフェニル酢酸を生産したが, フェニル酢酸のクロマツ培養細胞に対するMIC (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$) の値を越えているのは, HY-3, HY-16, HY-17株以外には203株のみであった。このことから, フェニル酢酸を生産する菌は, かなり普遍的に存在するが, 生産量に大きい差があることが明らかとなった。長瀬産業株式会社研究開発センター卯津羅健作博士の協力を得て, 著者らが保有する弱病原性ザイセンチュウOKD-1からフェニル酢酸生産性を指標にして10種のフェニル酢酸生産菌を単離したが, いずれもそのフェニル

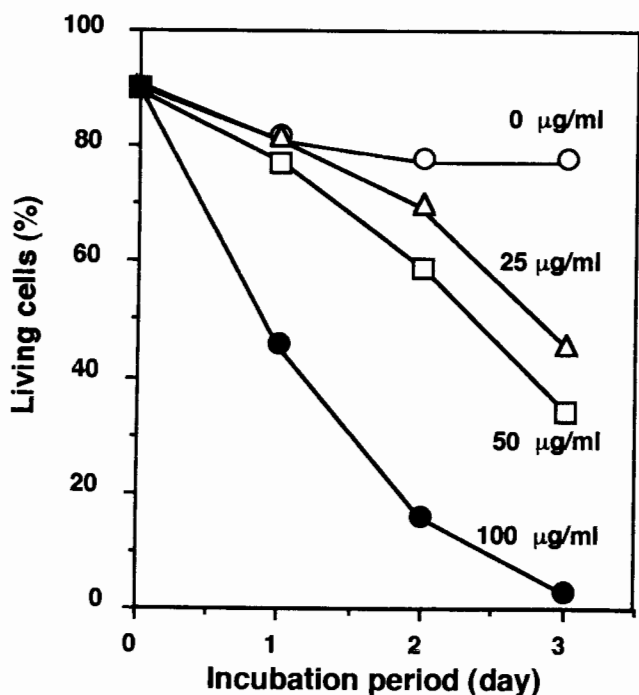


Fig. 5 Toxicity of phenylacetic acid against pine cells.

Table 1 Phenylacetic acid productivity of nematode-accompanying bacteria and other strains of the same species

strain	weight of wet cell (g)	pH	PA content ($\mu\text{g}/\text{ml}$ broth)
HY-3	0.97	8.2	48.60
HY-16	0.65	8.1	70.80
HY-17	0.86	8.2	60.10
203	0.18	8.2	39.45
3013	0.40	8.60	4.46
3009	0.75	8.65	11.38
233	0.66	8.62	7.87
234	0.51	8.50	10.70

酢酸生産性は、大きいものではなかった。

HY-3 株洗浄生菌体のアカマツ実生への接種

φ25×200mm試験管に NB 培地10mlを分注し、オートクレーブしたものにフェニル酢酸生産菌として、HY-3 株を選び、スラントから1白金耳植菌し、27°C、暗黒下、中2日往復振盪培養した。遠心分離(RP-2, 3,000rpm×5min)によって菌体を集め、これに蒸留水10mlを加えて菌体懸濁液とした。その一部を取り、ヘマトメーターで菌体数を計測調整し、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 cells/10 μ lの懸濁液を調製した。別に、弱病原性ザイセンチュウ、OKD-1の100頭/ μ lの懸濁液を調製し、この液10 μ lとHY-3株懸濁液10 μ lとを混和し、1時間静置してザイセンチュウへの細菌の付着を助長した。この混合液を実生1本当たり10 μ lずつ点滴法により接種した。また、濃度 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 cells/10 μ lのHY-3株懸濁液、500頭/10 μ lの強病原性ザイセンチュウ懸濁液、500頭/10 μ lの弱病原性ザイセンチュウ懸濁液、および蒸留水、それぞれ10 μ lを接種して比較した。1試験区につき実生5本を使用した。

Table 2に示すように、HY-3株菌体のみでは病原性を示さないが、弱病原性ザイセンチュウに保持させることにより、弱病原性ザイセンチュウが強い病原性を有するようになった。このことから、病原性発現にはザイセンチュウと、フェニル酢酸生産菌の双方の協力が必要であることが明らかになった。細菌の侵入のみによって、萎凋が起こるのでなく、ザイセンチュウにより伝播されてはじめて萎凋が起

こると考えれば、抗ザイセンチュウ剤の本病防除効果を、よく理解できる。

以上の結果から、マツ材線虫病の真の病原体は、フェニル酢酸生産菌であり、それが、ザイセンチュウによって松樹体内を運搬され、ザイセンチュウの屍体に由来する動物栄養分によって増殖し、病原毒素フェニル酢酸を生産するものと推論する。

要 約

マツ材線虫病の初期症状である樹脂道エピセリウム細胞や周辺柔細胞の変性は、マツノザイセンチュウのその場への到着および増殖に先行して起こることから、マツノザイセンチュウに随伴する微生物が発病に関与しているのではないかと推論し、本研究では、クロマツ培養細胞に対する毒性を指標にして強病原性マツノザイセンチュウから毒物質生産細菌を数株単離した。さらに、この毒性代謝物質を単離し、フェニル酢酸と同定した。フェニル酢酸生産細菌は、普遍的に存在するが、フェニル酢酸生産性には、大きい差があることを確認した。

このフェニル酢酸生産細菌のみを接種しても、アカマツ実生は萎凋しなかったが、弱病原性マツノザイセンチュウに保持させて接種すると、ザイセンチュウの病原性が強くなった。このことから、フェニル酢酸生産細菌は、マツノザイセンチュウに運搬されて松樹体内を移動し病原毒素フェニル酢酸を生産するものと推論した。

謝 辞

本研究の一部は、平成8年度日本生命財団研究助成金によって行われた。ここに、同財団に対して深謝する。

強病原性ザイセンチュウS6-1を分譲して下さった農林水産省森林総合研究所(現在 玉川大学農学部教授)真宮靖治博士に深甚なる謝意を表す。実験に協力して下さった長瀬産業株式会社研究開発センター卯津羅健作氏に深謝する。NMRおよびマススペクトルは、それぞれ、岡山大学超伝導核磁気共鳴実験室および、農学部質量分析計にて測定した。ここに、感謝の意を表す。

参 考 文 献

- 1) 河津一儀・尾崎益教・藤原正美・小林昭雄：松枯れ病発病初期の樹体成分変化の追跡による発病機構の検討。昭和61年度岡山大学教育研究学内特別経費研究成果報告書 都市近郊林(半田山)の自然特性およびその環境保

Table 2 Pine seedling-wilting activity of *Bacillus cereus* HY-3

	ratio of wilting seedling			
	1	3	5	7 (day)
OKD 3 ^{a)}	0/5	1/5	3/5	3/5
OKD-1 ^{a)}	0/5	0/5	0/5	0/5
HY-3 10 ⁶ cells ^{b)}	0/5	0/5	0/5	1/5
HY-3 10 ⁵ cells ^{b)}	0/5	0/5	0/5	0/5
HY-3 10 ⁴ cells ^{b)}	0/5	0/5	0/5	0/5
OKD 1 with HY-3 10 ⁶ cells ^{b)}	0/5	2/5	3/5	4/5
OKD-1 with HY-3 10 ⁵ cells ^{b)}	0/5	0/5	0/5	0/5
OKD-1 with HY-3 10 ⁴ cells ^{b)}	0/5	0/5	0/5	0/5
H ₂ O only (control)	0/5	0/5	0/5	0/5

a) 500 nematodes/seedling

b) bacterial cells/seedling

- 全機能に関する研究 (I), pp. 81-86, 岡山大学農学部 (1989)
- 2) 河津一儀: マツノザイセンチュウ感染による樹体成分の変動. 日本農芸化学会誌, **64**, 1262-1264 (1990)
- 3) Odani, K., S. Sasaki, Y. Nishiyama, and N. Yamamoto: Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematodes-cellulase as possible candidate of the pathogen. J. Jpn. For. Soc., **67**, 366-372 (1985)
- 4) 真宮靖治: Inoculation of the first year pine (*Pinus densiflora*) seedlings with *Bursaphelenchus lignicolus* and the histology of diseased seedlings, 日本線虫研究会誌, **62**, 176-183 (1980)
- 5) Mamiya, Y.: Pine wilt and pine wood nematodes: histological aspects of disease development. In Resistance to Disease and Pests in Forest Trees (Heyerock, H. M. *et al.* eds), pp. 153-160, Wageningen, Hol. PUDOC. (1982)