

ヒラタケ腐敗病細菌 *Pseudomonas tolaasii* の毒素生産菌株

A toxin producing strain of *Pseudomonas tolaasii*, the
Pathogen of Bacterial Rot of Cultivated Oyster Mushroom

蚕糸昆虫農業技術研究所・桑病害研究室
白田 昭

微生物学名
MAFF登録番号

Pseudomonas tolaasii Paine 1919
MAFF 810051

1) 被害と分離源

近年、キノコの人工栽培に伴って病害の被害も多くなり、产地の崩壊が問題になっている。*Pseudomonas tolaasii* によるヒラタケの被害は福島、神奈川、山梨、埼玉、千葉の各県でも認められている。1985年、新潟県南蒲原郡のキノコ栽培農家の罹病ヒラタケから *P. tolaasii* を分離し、病原性の強い菌株 S8501 (MAFF 810051) を選抜した。

2) 病名と病原性

S8501 菌株は、ヒラタケ、エノキタケなど多くのキノコに病原性を示す。ただ、ブナシメジは抵抗性が強くほとんど発病しない。*P. tolaasii* による病名はキノコの種類によって異なり、日本では陶山らによつてヒラタケ腐敗病、エノキタケ黒腐病、マッシュルーム褐変病、シイタケ黒腐病と命名されている^{2, 3)}。

3) 接種法と病徵

直接接種法：市販の人工栽培キノコの傘と柄に、 10^{7-9} cfu/ml の濃度に調整した S8501 菌株懸濁液を筆で塗布接種する。接種キノコを湿った紙を敷いたプラスチック箱の中に入れ、20°C に 2 ~ 4 日間保つと病徵が発現していく。病徵はヒラタケでは黄褐色の腐敗症、エノキタケでは黒褐色の腐敗症（写真 1），マッシュルームでは傘は灰褐色変症、傘の裏や柄は黒褐色変症となる。

間接接種法：蓋付きプラスチックケースの中に S8501 菌株接種ヒラタケを小型シャーレに入れて置き、2 日後に新鮮なヒラタケを 2 ~ 3 cm 離して小型シャーレに入れて置く。2 ~ 4 日経ると、新鮮なヒラタケは腐敗症を起こし、子実体上に各種細菌の集落が形成される。これは、揮発性毒素の影響を見る方法である。

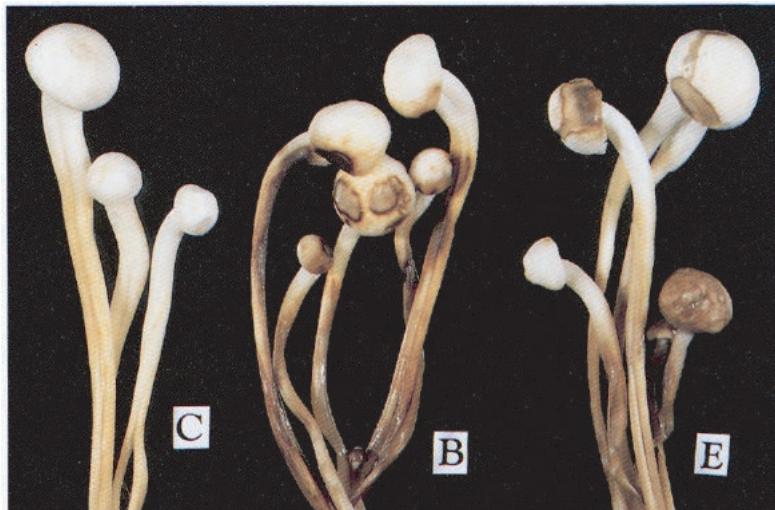


写真 1 エノキタケの病徵および毒素斑

C : 無処理

B : *Pseudomonas tolaasii* 接種

E : 培養ろ液（毒素含有無菌液）の処理

4) 培地と集落

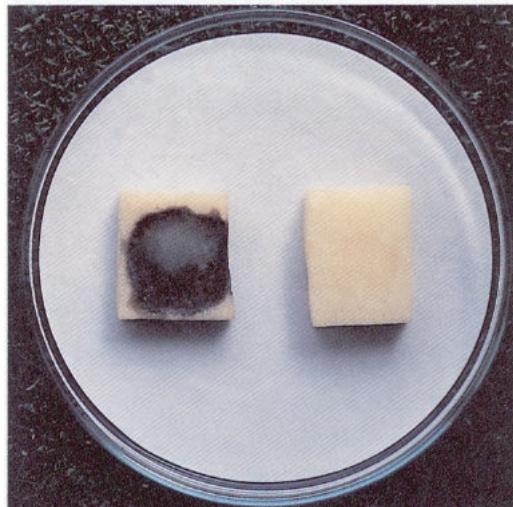
キングB培地（KB培地：プロテオースペプトンNo.3 20g, K₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄·7H₂O 1.5g, グリセリン 10ml, 寒天 15g, 水 1,000ml）が良いが、PDAなど多くの培地でも増殖する。KB培地上では乳白色・不透明・円形・湿光をおびた集落を形成する。

5) 細菌学的性質

グラム反応は陰性で、蛍光色素を生産し、アルギニンジドロラーゼ活性を持ち、35°Cでは生育せず、ジャガイモを腐敗せずに黒褐変させる（写真2）。

また、S8501菌株をKB平板培地上で東京農業大学の陶山氏分離菌株 *Pseudomonas* sp.818と対峙培養したところ、ホワイトライン（WL）を形成した。WLは *P. tolaasii*に特異的に認められることから、有効な同定手段と考えられている。

写真2 ジャガイモスライスの黒変
左：*Pseudomonas tolaasii*接種
右：無接種



6) 生産毒素の種類

ア. 非揮発性毒素：イギリス産の *P. tolaasii*は、病原因子としてトラシンI,II（Tolaasin I,II）を生産することが報告されている¹⁾。日本産のS8501菌株はトラシンI, IIのほか6種の類似毒素を生産するが、主たる毒素はトラシンIである（図1）。トラシンは熱安定性で、エーテルとアセトンには難溶性、メタノールと水には易溶性のもので、ヒラタケの子実体を黄褐変し、生育を阻害する⁴⁾。

イ. 挥発性毒素：S8501菌株はトラシンのほか揮発性毒素を生産する。本毒素はトブシン（tovsin）と命名されたが、その実態はトリメチルアミンとアンモニアの混合物である。発病したヒラタケではトブシンが生産される。トブシンは拡散し、近くの健全子実体に腐敗などを誘発する⁵⁾。

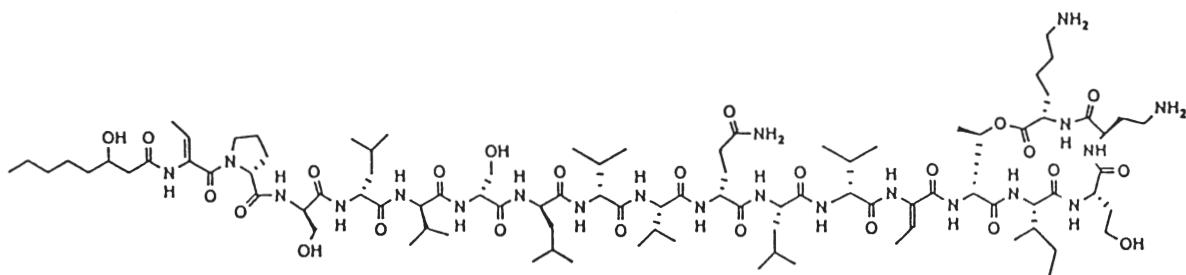


図1 毒素トラシンIの化学構造

7) 毒素の生物検出法

ア. トラシンの検出

毒素液の調製：S8501菌株を20°Cで3日間振とう培養し、遠心機（10,000rpm, 10分間）で除菌した後、上清液をミリポアフィルター（0.45 μm）でろ過し除菌液とする。

毒性検定：キノコおよび植物に、毒素液を滅菌筆で塗布あるいはマイクロピペットで滴下し、保湿条件下に1～2日保持後、誘導された毒素斑の大きさを調べる。エノキタケ、ジャガイモスライスは64

倍の毒素液にも感受性であるだけでなく、黒変するため判定が容易で検定生物として適している。

抗菌検定：細菌あるいは糸状菌の胞子を含む平板培地上に毒素液を $10\mu l$ 滴下し、2日後に菌の生育阻害を調べる。*P. syringae* pv. *coronafaciens* は高度感受性で、毒素原液から32倍希釈までの倍数と阻止円直径には直線関係が認められる。

イ. トブシンの検出

分画シャーレの1室にS8501菌株を接種したヒラタケを入れる、あるいはトラップ液を入れる。他室には、湿ったろ紙を敷きその上にレタス種子を置く。1～2日後に種子の発芽阻害程度を調べる。なお、活性が強い場合は種子は黒変する。

8) 毒素生産性

ア. トラシンの生産性：

培地：毒素の生産性は1%プロテオースペプトン、ヒラタケ煎汁、乾燥桑葉煎汁、キングB培地、変法キングBの各培地で良く、特に後2者で良好である。グルコースの添加は菌の増殖を高めるが、毒素の生産を抑える。

培養温度：S8501菌株は10～32°Cで増殖し、最適温度は25～31°Cである。それに対し、毒素は10～28°Cで生産され、最適温度域は10～25°Cである。毒素は、増殖最適温度の29～31°Cではほとんど生産されない。

イ. トブシンの生産性：

生産性は*P.tolaasii*を接種するキノコや培地の種類によって著しく異なる。ヒラタケでは良く生産されるがエノキタケではほとんど生産されない。ペプトン液では良く生産されるがPDAでは生産されない。グルコースの添加は生産性を著しく阻害する。

9) 毒素の抽出とトラップ法

ア. トラシンの部分純化法

- ① 振とう培養液を遠心分離で除菌後、凍結する。
- ② 融解後、不溶性沈殿物をろ過し濃縮する。
- ③ 濃縮液中の脂質を酢酸エチルで抽出除去し、水層から毒素をブタノールで抽出して乾涸する。
- ④ この粗抽出物を40%メタノール水溶液に溶解し、RP-18 カートリッジ (HPLC前処理カラム) を通す。色素を含む抽出物の大部分は40%メタノールで溶出されるが、毒素はカラムに吸着される。
- ⑤ 吸着された毒素を0.1% TFA含有メタノールで溶出すると、比較的きれいに純化されたものが得られる。

イ. トブシンのトラップ法

100ml三角フラスコにヒラタケを10gずつ入れ、これに約 10^9 CFU/mlに調整したS8501菌株懸濁液1mlを接種し、20°Cで数日間培養する。この三角フラスコを、-20°Cのエタノールに浸した空の三角フラスコとチューブでつなぎ、小型ポンプで両フラスコの空気を循環させると、数時間後に揮発性成分が凍結状態で捕捉される。これを溶解して揮発成分の水溶液とする。これはアルカリ性で、刺激臭がある熱安定性の成分である。

10) 変異性

S8501菌株を25°C以上の温度で培養すると、トラシンを生産しない非病原性変異菌が高頻度で誘導される。変異菌集落は、KB培地上で多少大き目で透明度が高いコロニーとなるため、変異前のS8501菌株のコロニーとは区別が可能である。S8501菌株は変異しやすいが、安定な菌株（東京農業大学、陶山814株）もある。

11) 病原性に関する遺伝子

S8501菌株は、トラシン生産や病原性の発現に関するrtpA遺伝子(required for tolaasin production)

and other pleiotropic traits) をもつ。塩基配列に基づいて推定される産物蛋白 *RtpA* は、百日咳病原細菌の病原性をつかさどる 2 成分制御調節遺伝子 *BbgS* の保存領域と高い相同意を有する。培養中に出現する非病原性変異菌株は本遺伝子によって病原性およびコロニー特性を回復する⁶⁾。

12) 菌の取り扱い方

培地、培養法、保存法は常法に準じてよく、問題はないが、S8501 菌株は変異しやすいので注意を要する。20°C以下で培養することが望ましい。25°C以上で培養すると極めて高い頻度で非病原菌変異株が出現し、28°Cで液体培養すると 1 週間後にはほとんどが非病原性となる。

参考文献

1. Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Johnstone, K. and Williams, D. H. (1991). Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodesipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2621-2627.
2. 陶山一雄 (1987). 人工栽培キノコの細菌病. 文部省科学研究費補助金一般(C) 研究成果報告書 1-23.
3. 陶山一雄・藤井 淳 (1993). 栽培キノコに発生した細菌病. 東農大農学集報 38: 35-50.
4. 白田 昭・菅谷和寿・高杉光雄・門出健次(1995). 栽培ヒラタケに腐敗病を起こす日本産 *Pseudomonas tolaasii* の產生する毒素とその生物活性. 日植病報 61:493-502 .
5. 白田 昭 (1995). *Pseudomonas tolaasii* による揮発性成分の生産とその毒性. 日植病報 62:185-193.
6. Murata, H., Tsukamoto, T. and Shirata, A. (1998). *RtpA*, a gene encoding a bacterial two-component sensor kinase, determines pathogenic traits of *Pseudomonas tolaasii*, the causal agent of brown blotch disease of a cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. (in a contribution)

(発行)

農林水産省農業生物資源研究所

National Institute of Agrobiological Resources

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan

生物研資料 9-(19)

平成10年3月

March, 1998