Pseudomonas tolaasii による揮発性成分の生産とその毒性

白田 昭*

Akira SHIRATA* : Production of Volatile Components by *Pseudomonas tolaasii* and Their Toxic Activity

Abstract

It has been reported that *P. tolaasii* S 8501 isolated in Japan caused bacterial rot of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*, Japanese name : 'Hiratake') and produced 8 kinds of toxin as pathogenic factor. Tolaasin I, the main toxin, plays an important role in the development of the symptom on the fruit bodies of 'Hiratake' and *Flammulina velutipes* ('Enokitake'). *P. tolaasii* S 8501 was found to produce volatile components on 'Hiratake' after inoculation. These components were different from the above toxins, and induced rot to the fruit body of 'Hiratake'. As it is considered that they are one of the pathogenic factors of *P. tolaasii*, the volatile components were named tentatively as "tovsin" in this report. Tovsin caused browning and rotting to mushrooms, and inhibited germination of plants' seeds and growth of phytopathogenic fungi such as *Rosellinia necatrix*, but showed little growth inhibition to bacteria. The intensity of tovsin activity was determined based on its degree of inhibition to the germination of lettuce seeds within one or two days. Quantity of tovsin produced by *P. tolaasii* depends on the mushroom species and media : a large quantity is produced on 'Hiratake' but a little on 'Enokitake', and also more can be produced on King's medium B but little on PDA medium. Production of tovsin was inhibited by addition of glucose. Tovsin could be trapped at 0 and -20°C , was basic, with stimulating smell, stable at 100°C , and induced or produced many crystals in King's medium B. These results suggest that tovsin promote the disease of 'Hiratake' in cultivating rooms and in packs after harvest.

(Received September 5, 1995; accepted December 27, 1995)

Key words : *Pseudomonas tolaasii*, oyster mushroom, volatile components, toxic activity.

緒 言

Pseudomonas tolaasii は、諸外国においてマッシュルームの brown blotch 病を起こす病原細菌として知られている。本菌は tolaasin I, II などの毒素を病原因子として生産することが報告されており^{3,5)}、1990 年代になると毒素の研究が盛んに行われた^{1,2,7,8)}。

日本において、*P. tolaasii* が各種栽培きのこに被害を与えていることがわかったのは、比較的新しいことである^{9,15,16,18)}。陶山・藤井¹⁷⁾ は 1993 年、本菌によるきのこの病名をヒラタケ腐敗病 (bacterial rot)、エノキタケ黒腐病 (bacterial black rot)、マッシュルーム褐変病 (bacterial brown blotch)、シイタケ黒腐病 (bacterial black rot) と提案した。筆者らは、ヒラタケから分離した日本産 *P. tolaasii* が病原因子として 8 種の毒素を生産していることを報告し^{9,10,13,14)}、特に生産量の多い tolaasin I がヒラタケやエノキタケなどにおける病徴発現に重要な役割を果たしていると推論した¹³⁾。

これらの研究を進める過程で、著者らは *P. tolaasii* の病

原性をみるために数種の方法でヒラタケへの接種を試みた。その中で、接種したヒラタケと同じケースに入れておいた無接種きのこは、別ケースの無接種きのこより早く腐敗することに気付いた。そこで、腐敗化現象の原因について追究した結果、ヒラタケに接種した *P. tolaasii* が揮発性成分を生産し、その揮発性成分がきのこに腐敗や褐変を誘発していることが明らかになった。この揮発性成分はまだ未同定であるが、*P. tolaasii* の病原因子の一つと考えられたので報告する。なお、研究内容の一部はすでに発表している^{11,12)}。

材料および方法

供試菌 日本で栽培されているヒラタケの罹病組織から分離・同定した *Pseudomonas tolaasii* S 8501 菌株¹³⁾ を用いた。本菌株はヒラタケやエノキタケに病原性を示し、tolasin I, II 等 8 種の毒素を生産することが確かめられており^{12,14)}、蚕糸・昆虫農業技術研究所桑病害研究室に保存されている。なお、細菌は供試する 1~2 日前に前培養した。

培地 キング B 培地 (プロテオースペプトン No. 3 20

* 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba 305, Japan

g, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, グリセリン 10 ml, 寒天 15 g, 水 1 l) を基礎培地とした。また、毒素の生産性を調べるために供試した平板培地は、キング B 培地のほかに ①変法キング B 培地 (キング B 培地から K_2HPO_4 と $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を除去したもの), ②PPGA (西山培地)⁶⁾, ③ジャガイモ・グルコース・寒天培地 (PDA), ④ジャガイモ・スクロース・寒天培地 (PSA), ⑤ジャガイモ半合成寒天培地 (脇本培地)⁶⁾ である。液体培地としては ⑥ヒラタケ, エノキタケ, マッシュルーム, シイタケ, ブナシメジ子実体の各煎汁液 (10 g/100 ml), ⑦ジャガイモ煎汁液 (20 g/100 ml), ⑧酵母エキス液 (2%), ⑨ペプトン液 (2%) であり, 各液体培地にグルコースを 2% になるように添加した液体培地も用いた。また, きのこ子実体を生のまま, あるいはオートクレーブで 121°C, 20 分間処理, -30°C で 1 日凍結処理したものも用いた。

接種 きのこに接種する場合は, 10^{8-9} cfu/ml 濃度に調整した *P. tolaasii* 懸濁液を用いて, 子実体全体に筆で塗布接種あるいは浸漬接種した。培地に接種 (移植) する場合は, 菌体を 1 白金耳として培地全面に画線した。

活性検定 揮発性成分の活性を調べるために, 揮発性成分の発生源 (*P. tolaasii* を接種したきのこ類や培地) と検定生物 (きのこ, 植物種子, 微生物) が直接触れないようにして検定した。具体的には次の 3 種の方法により行った。なお, 接種後および検定生物をセット後は 20~23°C に保持し, きのこ (子実体) は市販のものを用いた。

(1) ケース法

a) きのこの腐敗誘導: 蓋付きプラスチックケースの中に, *P. tolaasii* を接種したヒラタケを蓋のない小型シャーレに入れて置き, 2 日後に新鮮なヒラタケを 3~4 cm 離して小型シャーレに入れ, 経時的に新鮮なヒラタケの腐敗あるいは細菌集落の出現を観察した (Plate I-1)。

b) 種子の発芽阻害: *P. tolaasii* を接種して 1 日経過したヒラタケを入れた蓋なしの 9 cm シャーレ 1 個を, 大型の蓋付きプラスチックケースの中央に置いた。ガーゼを敷きそこに種子と水を入れた蓋なしの 4 cm シャーレを 9 cm シャーレの周りに並べ, 2, 4, 6 日後に各種子の発芽阻害程度を対照区の発芽程度と比較して調べた。供試した種子は, レタス, ゴボウ, キャベツ, ハクサイ, カブ, ダイコン, パクチョイ, シュンギク, ダイズ, インゲン, サヤエンドウ, トマト, ホウレンソウ, キュウリ, メロン, イネ, トウモロコシ, コムギの 18 種である。

(2) 分画シャーレ法

a) きのこ腐敗・種子発芽阻害: 分画シャーレの 1 室にヒラタケを入れて *P. tolaasii* を接種し, 他室には湿ったろ紙を敷き, その上にきのこあるいは植物の種子を置き, 数日後にきのこの褐変や腐敗状況あるいは種子の発芽阻害を調べた (Plate I-2)。対照としては, 無接種のきのこを入

れた区あるいは素寒天を流し込んでシャーレ内の湿度を保った区を設けた。なお, 仕切板と蓋との間には 5 mm の隙間があり, 揮発性成分は 2 室間を流通できる状態になっている。

b) 抗菌活性: 分画シャーレの 1 室にヒラタケ等を入れて *P. tolaasii* を接種した。他室には, 検定生物が糸状菌の場合には PSA 培地を流し込んで菌叢小片を置き, 細菌の場合には KB 培地を流し込んで約 10^9 cfu/ml 濃度に調整した検定細菌液を培地上に 1 cm ほど画線接種し, 2~6 日後に各微生物の生育阻害程度を調べた (Plate I-3・4)。検定菌としてはきのこ糸状菌 2 種 (*Pleurotus ostreatus* = ヒラタケ, *Flammulina velutipes* = エノキタケ), 植物病原糸状菌 5 種 (*Bipolaris leersiae*, *Colletotrichum dematium*, *Diaporthe nomurai*, *Fusarium lateritium*, *Rosellinia necatrix*), 昆虫病原糸状菌 2 種 (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*), 植物病原細菌 6 菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas mori*, *Xanthomonas campestris*), 枯草菌 1 種 (*Bacillus subtilis*) を用いた。

(3) シャーレ法

a) 大小組合せ法: 直径 9 cm シャーレの中に 4 cm シャーレの身を入れて, その内部には検定するレタス種子やヒラタケ, エノキタケの子実体を置き, 大小シャーレ間のドーナツ型の空間に *P. tolaasii* を接種したヒラタケを入れた。9 cm シャーレの蓋をして 2~6 日間保った後, 検定生物の変化を調べた (Plate I-6)。なお, 9 cm シャーレの蓋と 4 cm シャーレとの間には隙間があり, 揮発性成分は流通可能であった。

b) 簡便法: 直径 4 cm シャーレの中に, きのこや培地を入れ *P. tolaasii* を接種する, あるいは揮発性成分含有水溶液 (捕捉液) を入れる。シャーレの蓋を裏返しにして直径 8 mm のろ紙を敷きレタスの種子を 5 粒のせ十分に水を与え, 再び裏返して元通りに蓋をする。すなわち, シャーレの蓋にレタスの種子が逆さに付着した状態にする。数日後, 種子の発芽 (発根) の程度を調べた。

活性程度の評価 揮発性成分の活性をレタス種子の発芽阻害程度で示した。評価は, Fig. 1 に示したように発芽の

Fig. 1. Intensity of inhibition of lettuce seeds' germination by the volatile components were classified into five.

障害程度から「強・中・弱・微・無」の5段階とした。「中」は発芽しないが種子の変色は伴わないもの、「強」は発芽しないだけでなく黒変したものである。なお、「中」から「強」にかけては、活性の強さに比例して緑から黒まで段階的な変色を呈した。また、活性が極めて強い場合は、種子は膨潤して丸みを帯び光沢のある黒色を呈した。

揮発性成分の捕捉 複数の100 ml 三角フラスコにヒラタケを10 g ずつ、ついで約 10^9 cfu/ml に調整した *P. tolaasii* 懸濁液1 ml を入れて振とう接種し、20°C に静置した。経時的に接種ヒラタケの入った三角フラスコを、-20°C のエタノールに下部3/4 を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た。数時間後には数 ml の揮発性成分が-20°C のフラスコに凍結状態で捕捉されるので、これを溶解して活性成分を含む水溶液とし、上述の方法に準じて活性の測定を行った。なお、0°C での捕捉も試みた。

結 果

揮発性成分によるきのこの腐敗誘導

揮発性成分によるヒラタケの腐敗誘導をケース法により調べた。その結果、セット2~3日後から健全ヒラタケに腐敗が認められ、症状は徐々に進展し、6日後には明瞭な腐敗・収縮状となった (Plate I-1)。特に、接種ヒラタケに近い側面では激しい症状を発現した。セット3~4日後からは、きのこ組織に細菌集落の形成も認められた。なお、*P. tolaasii* を接種したヒラタケは、強い刺激臭を発していた。

分画シャーレ法およびシャーレ法でも同様な結果が得られた。すなわち、ヒラタケに *P. tolaasii* を接種し、翌日、新鮮なヒラタケとエノキタケをセットし、経時的に変化を観察した。その結果、2日後には腐敗や褐変がみられ、3日後には細菌の集落が形成され (Plate I-5)、6日後には激しい腐敗・収縮症を呈した (Plate I-2・6)。無接種ヒラタケあるいは素寒天を流し込んだ対照区では、腐敗や細菌集落の形成は認められなかった。ただし、健全なきのこでない場合には、4~8日後に無接種きのこにも腐敗や細菌集落の形成が認められることがあった。条件によっては、対照区のヒラタケに白い菌糸が認められたが (Plate I-2)、これは子実体を温室に保持することによって生じてくるヒラタケ自身の菌糸であり、異常ではなく、むしろ害を受けていないことを示している。

揮発性成分による種子発芽阻害

揮発性成分によるレタス種子の発芽阻害を、分画シャーレ法およびシャーレ法で調べた。その結果、*P. tolaasii* 接種ヒラタケ区ではレタス種子の発芽は阻害され、黒変した。対照の素寒天区および無接種ヒラタケ区では発芽阻害は認められなかった (Plate I-2・6)。

次に、18種の種子を供試し、ケース法で発芽阻害を調べ

た。その結果、全種子で発芽が阻害された。発芽の阻害例 (ダイズ、ネギ、カブ) を Plate I-7 に示す。ダイズだけは発芽が認められたが、その発芽ダイズも数日以内に死滅した。なお、レタス種子は著しく黒変したが、他の種子では激しい変色はみられなかった。

揮発性成分による抗菌活性

糸状菌および細菌に対する生育阻害を分画シャーレ法によって調べた。*P. tolaasii* の接種対象としてはヒラタケ、エノキタケ、キング B 培地の3種を用い、検定菌としては糸状菌9種、細菌7種を用いた。その結果、3日および4日目の観察では、糸状菌の場合、エノキタケやキング B 区では生育阻害がほとんど認められなかったが、ヒラタケ区では全種の生育が完全に阻害された (Table 1, Plate I-3)。それに対して細菌の場合は、ヒラタケ区で *B. subtilis* や *C. michiganensis* の増殖がわずかに抑制されたものの、全体的には増殖阻害はほとんど認められなかった (Table 1, Plate I-4)。

なお、各区の培地上では *P. tolaasii* の集落形成はみられず、接種した *P. tolaasii* が検定菌室へ飛散することはないと判断された。

以上の結果から、揮発性成分は、きのこを含む糸状菌には強い抗菌活性を示すが細菌には弱い活性しか示さないこ

Table 1. Antimicrobial spectra of the volatile components produced by *P. tolaasii*

Microorganisms	<i>P. tolaasii</i> was inoculated on		
	'H' ^{a)}	'E' ^{a)}	KB ^{a)}
<i>Pleurotus ostreatus</i> ('H')	++ ^{b)}	—	—
<i>Flammulina velutipes</i> ('E')	++	—	±
<i>Bipolaris leersiae</i>	++	—	—
<i>Colletotrichum dematium</i>	++	—	—
<i>Diaporthe nomurai</i>	++	±	—
<i>Fusarium lateritium</i>	++	—	—
<i>Rosellinia necatrix</i>	++	±	±
<i>Beauveria bassiana</i>	++	—	—
<i>Metarhizium anisopliae</i>	++	—	—
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	±	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	+	—	—
<i>Clavibacter michiganensis</i>	±	—	—
<i>Erwinia carotovora</i>	—	—	—
<i>Pseudomonas cichorii</i>	±	—	—
<i>Pseudomonas mori</i>	—	—	—
<i>Xanthomonas campestris</i>	±	—	—

a) 'H': Hiratake, 'E': Enokitake, KB: King's medium B. The fruit bodies and the mycelial colony were used for inoculation and assay, respectively.

b) One day after inoculation of *P. tolaasii*, the microorganisms were transferred onto the medium in the other room of separated petri dishes, and the activity was investigated 3 days after transfer. ++, strong; +, middle; ±, weak; —, no.

と、また、揮発性成分の生産性はヒラタケで高く、エノキタケやキング B 培地では低いことが判明した。

揮発性成分の生産に及ぼすきのこ培地の影響

P. tolaasii を接種する対象物によって、揮発性成分の生産性が著しく異なることがわかったので、各種きのこおよび培地における生産性を分画シャーレ法により比較した。

きのこ 2 種、培地 6 種に *P. tolaasii* を接種し、翌日にレタス種子および新鮮なエノキタケとヒラタケをセットし、3 日後に発芽阻害およびエノキタケ褐変とヒラタケ腐敗の程度を調べた。その結果を Table 2 に示す。発芽阻害、褐変、腐敗は接種ヒラタケ区では強く誘導されたが、接種エノキタケ区や変法キング B 区では弱く、他の接種培地区では誘導されなかった。なお、接種区で発生する刺激臭の強さは、揮発性成分の活性程度と比例する傾向がみられた。

5 種のきのこにおける揮発性成分の生産性を、シャーレ法で調べた。すなわち、生および 121°C 処理の子実体に *P. tolaasii* を接種し、2 日後にレタス種子をセットし 1~2 日後に発芽阻害を観察した。その結果、揮発性成分の生産性

はきのこの種類によって異なり、阻害程度で比較すると、「強」がヒラタケ、「中」がマッシュルームとシイタケ、「無あるいは微」がエノキタケとブナシメジであった。また、121°C 処理きのこでの生産性は、生きのこでの生産性に比較して多少劣る傾向がみられた。

各種液体培地における揮発性成分の生産性を、同様にシャーレ法で調べた。その結果、「強」がペプトン液、「中」が酵母エキス液とヒラタケ煎汁液、「微」がジャガイモ煎汁液であり、他の培地は「無」であった。グルコース添加培地では全区で発芽阻害がみられず、揮発性成分の生産はグルコース添加によって著しく抑制された。*P. tolaasii* の生育は、マッシュルーム煎汁液（グルコース無添加）では不良であったが、グルコース添加液および他の液体培地では良好であった。

次に、各培地における揮発性成分の経時的な生産をシャーレ法で調べた。活性はレタス種子の発芽阻害で判定した。ただし、種子セット 2 日後に阻害程度を調べたため、阻害活性は調査開始日（種子セット日）から判定日までの 2 日間の累積結果を示している。すなわち、調査 0 日の活性は、菌接種当日の活性ではなく、0~2 日にわたって生産された揮発性成分の及ぼす経時的影響の合計を意味している。供試した培地は、生ヒラタケ、ヒラタケ煎汁、変法キング B、キング B、PSA、PDA であり、生ヒラタケの他はすべて寒天平板培地とした。30 日間にわたって調べた結果を Table 3 にまとめた。早い時期から強い活性がみられたのは生ヒラタケであり、ついでヒラタケ煎汁と変法キング B であった。キング B での生産は生ヒラタケに比べて 4 日程遅れたが、強い活性がみられた。PSA では 0~20 日にかけて若干の活性がみられたが、PDA では検出できなかった。揮発性成分の活性は 10~20 日後でも維持されたが 20~30 日後には低下がみられた。これは活性を調べるため 2 日おきに蓋を開けて新しい種子をセットし直したが、そのたびに揮発性成分の一部が蒸発・飛散したために活性が低下したものと推察される。なお *P. tolaasii* の生育は PSA を除いて良好であった。

Table 2. Production of the volatile components on various mushrooms and media, and their toxic activity

Mushrooms media ^{a)}	Inhibition of germination of lettuce	Browning of 'Enokitake'	Rotting of 'Hiratake'
'Hiratake'	++ ^{b)}	++	++
'Enokitake'	+	±	±
King's B	—	—	±
Modified KB	±	±	±
PPGA	—	—	—
PDA	—	—	—
PSA	—	—	—
Wakimoto	—	±	±

a) Composition of each medium was shown at the method section.

b) *P. tolaasii* was inoculated on the mushrooms and the media in one room of separated petri dishes, and the indicative samples were set in the other room on next day. Activity was observed 3 days after setting. ++, strong; +, middle; ±, weak; —, no.

Table 3. Changes in the activity of the volatile components with time on the various mushrooms and media

Mushrooms and Media ^{a)}	Setting days of seeds after inoculation							
	0	1	2	4	6	10	20	30
'Hiratake'	+++ ^{b)}	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Decoction of 'H'	+	++	++	+++	+++	+++	++	+
Modified KB	+	++	++	+++	+++	+++	++	+
KB	—	±	++	+++	+++	+++	+++	++
PSA	±	±	±	±	±	±	±	—
PDA	—	—	—	—	—	—	—	—

a) Composition of each medium was shown at the method section.

b) Intensity of toxic activity was classified into five (+++~—) based on the degree of inhibition to the germination of lettuce seeds.

Table 4. Effect of the trapped volatile components on germination of lettuce seeds

Concentration of trapping liquid ^{a)}	Days after inoculation on 'Hiratake'							
	Fresh 'H'				120°C pre-treated 'H'			
	0	2	4	6	0	2	4	6
1/1	— ^{b)}	±	+++	+++	—	±	+++	+++
1/5	—	±	+++	+++	—	—	+	++
1/25	—	—	±	±	—	—	—	—
pH	9.7	9.6	9.9	10.0	9.3	8.7	9.9	9.9

a) The volatile components were trapped from 'Hiratake' at -20°C on the 0, 2, 4 and 6th day after inoculation of *P. tolaasii*, and diluted solution of the trapped liquid were tested for assay.

b) Activity was observed 2 days after setting. Inhibitive intensity to lettuce seeds' germination was scored as follows: +++: very strong, ++: strong, +: middle, ±: weak, —: no.

揮発性成分の捕捉とその活性

生および 121°C 処理したヒラタケに, *P. tolaasii* を接種して 20°C に保ち, 経時的に揮発性成分を -20°C で捕捉した。捕捉液およびその 5 倍および 25 倍希釈液の活性について, レタス種子の発芽阻害を指標にしてシャーレ法で調べた (Table 4)。その結果, 生ヒラタケ区の場合, 活性成分の生産は接種 2 日後に認められ, 4 日後にはピークに達した。希釈したときの活性をみると, 5 倍希釈では「強」を示したが, 25 倍希釈にすると「微」程度まで減少した。 121°C 処理ヒラタケ区の場合は, 揮発性成分の生産が生ヒラタケ区より 2 日程遅れ, 最大活性も劣る傾向がみられた。なお, -30°C 処理によって殺したヒラタケを用いて同様の試験を行ったところ, 生ヒラタケ区とほぼ同様の結果であった。

捕捉温度について検討したところ, 揮発性成分は 0°C でも -20°C の場合と同程度に捕捉され, 必ずしも凍結状態で捕捉する必要はないことがわかった。捕捉液の活性程度は, 捕捉液をミリポアフィルター ($0.45\ \mu\text{m}$) を通しても変わらなかった。

捕捉液の pH は, 接種 0 日後 (接種数時間後) が $9.3\sim 9.7$ であったが, 活性がピークに達した 4, 6 日後には $9.9\sim 10.0$ とさらに高い値を示したことから (Table 4), 活性成分はアルカリ性と推定された。

捕捉液の活性は 100°C , 10 分間処理によっても低下せず, 熱安定性であった。密閉状態で 5°C に保存した場合の活性は, 10 カ月後でもほぼ同程度を維持していた。しかし, 捕捉液をシャーレに入れて蓋をしない状態に置くと, 活性は 3~4 時間で消失した。

次に, 捕捉液とレタス種子との接触 (曝露) 時間が発芽阻害に及ぼす影響をシャーレ法で調べた。捕捉液と種子とが直接接触しないように特に注意した。揮発性成分に種子を各時間接触させた後, その種子を温室に移して 1~2 日間保持し, レタス種子の発芽阻害の程度を調べた。その結果, 阻害程度は両者の接触時間によって異なり, 5 分の場合は「無」, 10 分では「微」, 15, 30, 60 分では「中」, 2 時間で

Fig. 2. Formation of crystals in King's medium B by the volatile components 3 days after setting. Right: magnification of the crystal.

は「強」であり, 4, 8 時間では 1~2 日接触区と同程度の阻害を示した。このことから, レタス種子によって活性の検定を行う場合の接触時間は, 2~4 時間が必要であり, またそれで十分であると判断された。

キング B 培地における結晶の形成

抗菌活性を調べる試験の中で, 検定細菌を移植したキング B 培地に多くの結晶が形成 (誘導・析出) される現象がみられた。そこで, 分画シャーレ法およびシャーレ簡便法で結晶の形成に及ぼす揮発性成分の影響を調べた。その結果, ヒラタケに *P. tolaasii* を接種し, ただちにセットした場合, 結晶はセット 3 日目から出現し始め, 4 日後にはかなり多く認められた。活性の高い捕捉液を用いた場合は, セット 1 日後には多数の結晶が形成された (Fig. 2)。キング B 培地中における結晶の形成は, 接種ヒラタケあるいは捕捉液に近い部位ほど顕著であり, 離れるほど形成は遅れた。なお, この結晶化現象はキング B 培地で顕著であり, PSA や PDA では認められなかった。

考 察

P. tolaasii はきのこ類に褐色斑や腐敗を引き起こす細菌

で、日本ではきのこ人工栽培の普及と共にその被害が問題になっている^{16,17)}。本菌の培養ろ液は、菌体接種による病徴と同じ症状をヒラタケやエノキタケに誘導するが^{9,13)}、この病斑類似斑の形成には毒素 tolaasin が関与しており、特に多量に生産される tolaasin I が重要な役割を果たしている¹³⁾。Tolaasin I および II の化学構造は Nutkins らによって決定され⁷⁾、tolasin の作用機構もかなり解明されてきた^{1,3,8)}。さらに、毒素の生産制御遺伝子の研究も行われている²⁾。このように *P. tolaasii* の主たる病原因子は tolaasin であることが定説となってきたが、本菌が tolaasin 以外の病原因子を有するか否かについては不明であった。

今回の試験において、*P. tolaasii* の接種したヒラタケを供試し、その菌体や浸出液とは接触せず空中を移動する揮発成分だけと接触する実験系を用い、接種ヒラタケから得る成分について、検定生物に対する影響を調べた。その結果、*P. tolaasii* は刺激臭のある揮発性成分を生産すること、その成分はヒラタケやエノキタケに腐敗や褐変症状を引き起こすだけでなく、植物の種子発芽を阻害し、糸状菌の生育を著しく阻害することなどが判明した。

病原微生物の生産する生理活性成分あるいは毒素が、その宿主の病原因子であるというためには、① その病原微生物が宿主で毒素を生産し、② その毒素は感染と類似症状を宿主に引き起こす、の2条件を満たす必要がある。今回得られた揮発性成分についてみると、① 病原細菌 *P. tolaasii* は宿主ヒラタケで多量に生産し、② その成分はヒラタケに感染症状と同じ腐敗や収縮症状を引き起こした。本揮発性成分は2条件を満たしていることから、病原因子（病原毒素）の一種であると判断された。そこで、*P. tolaasii* の生産するこの揮発性毒素 (volatile toxin) を、本論文では tovsin と仮称することにした。上記毒素の tolaasin はジャガイモ切片を著しく黒褐変する作用を有するが、tovsin は切片をほとんど褐変せず、作用機作の点でも両者は異なる。tolasin はヒラタケ褐色斑を形成するのが主たる役割で、tovsin は腐敗を引き起こすのが主とも考えられるが、この点については今後の研究課題であろう。

栽培現場において、tovsin がヒラタケ腐敗病の発病に関与しているかどうかは不明である。しかし、人工栽培環境下では、発病部で生産された揮発性成分が隣接ヒラタケの抵抗性を弱め、感染を拡大している可能性も考えられる。また、収穫して市販用にパック詰めした場合、感染ヒラタケが混入していればパック内全体に汚染を広める危険性もある。いずれにしろ、感染ヒラタケの除去は、病害拡大防止の観点から重要であろう。時としてヒラタケの栽培農家で大きな被害がみられるが、その原因の一つに感染ヒラタケから発生する揮発性毒素の関与が考えられる。しかし、これらは推論であり、揮発性毒素と被害拡大の関連性につ

いては、詳細な調査と解析が必要である。

Tovsin の活性は非特異的であった。すなわち、ヒラタケやエノキタケに毒性を示しただけでなく、植物種子の発芽や糸状菌の生育を強く阻害した。このことは、細菌の増殖をほとんど阻害しなかったことと考え合わせると、tovsin の生産が *P. tolaasii* に特異的なものではなく、多くの細菌類に共通する現象である可能性も考えられる。現在この点を検討中である。

今回の試験では、新鮮なきのこを tovsin に曝すことによって、内在あるいは付着している細菌が集落として出現してきた (Plate I-2・5 参照)。このことは、通常の方法では検出しにくい潜在感染細菌や共生細菌などの検出に、tovsin が有効であることを示している。本法によってヒラタケから細菌の誘導分離を試みたところ、*P. tolaasii* の発病を強く抑制する細菌が得られた (未発表)。分離菌は *P. tolaasii* に抗菌活性を示さないので、現在その作用機構を究明中である。

Tovsin は植物種子の発芽を著しく阻害した。そこで tovsin の検出に、種子の発芽阻害作用を利用する方法が考えられた。今回得られた試験からは、レタス種子が優れているものと判断された。その理由は、① レタス種子は感受性が高く、活性の程度を5段階で評価できる、② 発芽が早い、ため、1~2日で判定が可能である、③ 小粒なので少量の検出にも適している、などである。問題点は、発芽阻害作用ときのこに対する褐変・腐敗誘導作用が同じ成分に由来しているのか不明なことである。この点を明らかにするには、揮発性成分を単離し、各成分ごとの作用を調べなければならない。しかし、今回の試験においてレタス種子の発芽阻害程度ときのこへの褐変・腐敗誘導程度とは、全例においてほぼ一致していた。このことは、同一成分による可能性が高いことを示唆している。

Tovsin の生産性は、接種するきのこや培地によって著しく異なり、ヒラタケではよく生産され、エノキタケではほとんど生産されなかった。ヒラタケの熱水抽出物やメタノール抽出物が tovsin の生産性を高めることから (未発表)、ヒラタケに含まれる極性の高い成分が生産性に関与していると考えられる。また、培地の中ではキング B 培地、変法キング B 培地、ペプトン液、酵母エキス液でよく生産されたことから、アミノ酸などの関与も推察された。予備的実験ではアスパラギン酸 (K 塩) が生産性を高めたが (未発表)、化学成分と生産性との関係については今後さらに明確にしていく必要がある。

Tovsin の合成系路は解明されていないが、グルコースを添加した培地では生産性が著しく抑制された。グルコースの添加は細菌を増殖させたが、もし、増殖を多少なりとも抑制し、tovsin の合成系路を完全に阻害する物質が検索されれば、新しい病害防除法の開発にもつながるであろう。

また, tovsin は 0°C または -20°C で捕捉されたことから, 気体成分ではなく揮発性成分と判断された。捕捉液はアルカリ性で刺激臭を有し, 熱安定性で, キング B 培地中に結晶を誘導あるいは形成した。これらのことから, 本成分はアミン類である可能性が考えられる。現在, 化学構造の解明をめざして研究を進めている。

摘 要

日本の栽培ヒラタケから分離されたヒラタケ腐敗病細菌 *Pseudomonas tolaasii* S 8501 菌株は, 病原因子として毒素 tolaasin を生産することが確かめられている。この菌株を供試して tolaasin とは異なる病原性因子の検索を試みたところ, 本菌は毒性活性を有する揮発性成分を生産することが判明した。この揮発性成分は接種ヒラタケ上で多量に生産され, 隣接する新鮮ヒラタケに腐敗を誘導することから, 病原因子の一つであると判断された。そこで, この揮発性毒素を tovsin と仮称した。tovsin は植物種子の発芽を阻害し, この糸状菌や植物, 昆虫の病原糸状菌の伸長を阻害したが, 細菌の増殖はあまり阻害しなかった。tovsin の活性の検出にはレタス種子の発芽阻害が適しており, 1 日で判定できた。また, tovsin の生産性は *P. tolaasii* を接種するきのこや培地の種類によって著しく異なり, ヒラタケでは良く生産されたがエノキタケではほとんど生産されず, ペプトン液やキング B 培地では比較的良く生産されたが PDA では生産されなかった。グルコースの添加は生産性を著しく阻害した。Tovsin は 0°C や -20°C で捕捉され, アルカリ性で, 刺激臭があり熱安定性であった。また, 人工栽培室や収穫後詰められたパックの中に罹病ヒラタケが混在した場合, そこで tovsin が生産され発病を助長する可能性のあることを指摘した。

引用文献

1. Brodey, C.L., Rainey, P.B., Tester, M. and Johnstone, K. (1991). Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 407-411.
2. Grewal, S., Han, B. and Johnstone, K. (1994). Regulation of toxin synthesis and phenotypic variation in *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Adv. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact.* 3: 25-32.
3. Hutchison, M.L. and Johnstone, K. (1973). Evidence for involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 373-384.
4. 村田 仁・陶山一雄 (1995). 増殖過程およびヒラタケ子実体中に存在する物質に制御されたキノコ病原細菌 *Pseudomonas tolaasii* 814 菌株 (PT 814) による毒素生産. *日植病報* 61: 258 (講要).
5. Nair, N.G. and Fahy, P.C. (1973). Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 509-512.
6. 西山幸司 (1978). 植物病原細菌簡易同定法の試案. *植物防疫* 32: 283-288.
7. 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 lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2621-2627.
8. Rainey, P.B., Brodey, C.L. and Johnstone, K. (1991). Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 57-70.
9. 白田 昭 (1987). ヒラタケ病原細菌 *Pseudomonas tolaasii* による毒性因子の生成. *日植病報* 53: 72 (講要).
10. 白田 昭・菅谷和寿・高杉光雄 (1994). *Pseudomonas tolaasii* の産生する毒素とその抗菌性. *日植病報* 60: 371 (講要).
11. 白田 昭 (1995). *Pseudomonas tolaasii* の産生する揮発性成分とその活性. *日植病報* 61: 258 (講要).
12. Shirata, A. and Yoshida, S. (1995). The volatile component produced by *Pseudomonas tolaasii* and its toxic activity. 5th International Conference on *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, Berlin, p. 86 (Abstr.).
13. 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* の産生する毒素とその生物活性. *日植病報* 61: 493-502.
14. 菅谷和寿 (1992). ヒラタケ病原細菌の産生する毒素の研究. 北海道大学理学部修士論文, pp. 1-33.
15. 陶山一雄・河原林主一・根岸寛光・藤井 溥 (1987). White line 形成法による各種キノコからの *P. tolaasii* の検出. *日植病報* 53: 72 (講要).
16. 陶山一雄 (1987). 人工栽培キノコの細菌病. 文部省科学研究補助金一般 (C) 研究成果報告書, pp. 1-23.
17. 陶山一雄・藤井 溥 (1993). 栽培キノコに発生した細菌病. *東農大農学集報* 38: 35-50.
18. 矢沢敏美・後藤正夫・武田和男・中村公義 (1987). *Pseudomonas tolaasii* の一系統によるエノキタケの細菌病について. *日植病報* 53: 72 (講要).

Plate I

Explanation of plate

Plate I Toxic activity of the volatile components produced by *P. tolaasii*.

1. Induction of rotting on *Pleurotus ostreatus* (Japanese name : 'Hiratake') by the volatile components produced by *P. tolaasii* on the fruit body of 'Hiratake'. The inoculated fruit body (right) was placed in the plastic case and 2 days later another freshly tested fruit body (left) was placed about 4 cm distance from the inoculated one. The case was kept at 20-23°C for 6 days. The tested fruit body has been rotted from right side near to the inoculated fruit body.
2. Induction of rotting, browning and germinative inhibition by the volatile components produced by *P. tolaasii* on the fruit body of 'Hiratake' (right). Seeds of lettuce, fruit bodies of 'Hiratake' and *Flammulina velutipes* (Japanese name : 'Enokitake') were set in upper room of separate petri dishes a day after inoculation with *P. tolaasii* on 'Hiratake' in lower room, and the dishes were kept at 20-23°C for 5 days. As control, agar was poured into the lower room of a left petri dish for regulating humidity. Formation of hyphae on 'Hiratake' fruit body (left) originated from itself and was a normal phenomenon. As central wall is lower than peripheral wall, the volatile components can pass through the central wall easily.
3. Antifungal activity of the volatile components. In the lower rooms of separated petri dishes, *P. tolaasii* was inoculated on 'Hiratake' (left) and was cultured for the production of the volatile components. After 1-2 days, small pieces of various kinds of fungi were placed on PDA medium in the upper rooms. The growth of these fungi were observed 4 days after setting. Names of the fungi on the upper line from left to right are *Colletotrichum dematium*, *Fusarium lateritium*, *Diaporthe nomurai*, and on the lower line are *Bipolaris leersiae*, *Rosellinia necatrix*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*.
4. Antibacterial activity of the volatile components. In the lower rooms of the separated petri dishes, *P. tolaasii* was inoculated on 'Hiratake' (left) and agar was poured into the lower room of the right dish as control. One day after cultivation, each bacteria suspension (10^9 cfu/ml) was transferred onto King's medium B. The petri dishes were kept at 20°C for 4 days. Names of bacteria on the upper line from left to right are *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas mori*, *Pseudomonas cichorii*, and on the lower line are *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*.
5. Appearance of bacterial colony on the fruit bodies of 'Hiratake' (left) and 'Enokitake' (right) 3 days after exposure to the volatile components produced by *P. tolaasii*.
6. Two petri dishes, small size (4 cm ϕ) and middle size (9 cm ϕ), were used for assay of the volatile components. Non-inoculated (upper) and inoculated (lower) 'Hiratake' were placed in the spaces between the small and middle dishes. Lettuce seeds, 'Hiratake' and 'Enokitake' were then placed in the small dishes for assay. The photograph shows the condition of the set-up after 4 days. The produced volatile components could invade the spaces in both the middle size and small size dishes.
7. 'Hiratake' inoculated with *P. tolaasii* was put in middle petri dish and it was placed in the center of covered plastic case. Various seeds of plants were put in small dishes with water and placed around the middle petri dish. After 5 days, germination was observed. The germination of seeds from all the eighteen plant species tested were inhibited. Three samples were shown here. The upper ones are untreated seeds or control and the lower ones are treated. From left to right the seeds are soybeans, Welsh onions and turnips.