

特集：SS リーグ研究報告

変形菌モジホコリの「生きていく戦略」とは～負の走化性は変形体にどのような意味があるのか～

吉橋 佑馬（兵庫県立三田祥雲館高等学校 2年）

■背景

◇これまでの研究

変形菌モジホコリ *Physarum polycephalum* の変形体がある種の食品に対し阻止円を作ることに着目し、その負の走化性要因について 2006 年より研究を続けてきた結果、以下のことが判明した。

- 1) 阻止円形成には、塩分とある種の酸が関係し、反応には濃度が重要である。
- 2) 酸性物質には、「反応する酸」と「反応しない酸」がある。
- 3) 酸性物質の分子量の違いは反応に関与していない。
- 4) 微生物との競争関係では、機動性を有する変形体が優位になりやすい。

◇先行知見

過去の文献(参考文献[1]、[2]、[3]、[4])により、以下の内容が報告されている。

- 1) 変形体は糖やアミノ酸に対して正の走化性を示す。
- 2) pH4~7 の溶液には誘引されるが、それ以外は忌避する。
- 3) 変形体はバクテリアを体内に巻き込んでいることが経験的に知られている。
- 4) 変形菌と近縁な細胞性粘菌の中には、エサのバクテリアを体内に備蓄して運び、移動先で散布、エサにする原始的農業と呼べる共生を行なっているものが存在する。

■目的

変形菌モジホコリ *Physarum polycephalum* の変形体は、忌避物質に対して阻止円を形成し回避行動をとる。この負の走化性は、他の微生物との相互作用に必要な性質だと推定し、化学的観点から阻害要因を分析するとともに、生物学的観点からその意義の解明を目的とし、変形菌の「生きていく戦略」を明らかにする。

■阻止円形成要因の化学分析(負の走化性要因)

変形体の負の走化性要因を明らかにするため、これまでの研究を進展させ、次の 2 点からの解明を試みた。

- ①塩基性物質に対する反応
- ②酸性物質に対する濃度以外の要因

1) 塩基性物質に対する反応

変形体は pH7 以上の溶液を忌避するという先行知見[3]があるが、pH は溶液濃度に関係なく同じ値を示すことがあることから、濃度条件を加え塩基性物質に対する反応を検証した。

1-1) 重曹に対する反応

重曹(炭酸水素ナトリウム NaHCO_3)の 1~10%溶液に対する変形体の反応を 48 時間観察したところ 3%以上の溶液に反応したが、ナトリウムイオンに反応している可能性も考えられる。

1-2) 炭酸水素カリウムに対する反応

炭酸水素ナトリウム溶液に反応したが、水酸化物イオンに反応しているか、ナトリウムイオンに反応しているか不明なため、炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3)の Na を K にした炭酸水素カリウム(KHCO_3)を用い、どちらに反応しているかを検証した。水溶液中の金属イオン濃度を揃えるためモル濃度で溶液を作り 0.1mol~1.0mol 濃度の溶液に対する反応を 48 時間観察した。0.6mol 以上の溶液に反応したことから、変形体は塩基性物質も忌避し、酸同様、濃度が重要であると言える。

2) 酸性物質に対する濃度以外の要因

2-1)構造の違い

低級分岐脂肪酸主要 3 成分(イソ吉草酸、イソ酪酸、2-メチル酪酸)に対する反応では、同濃度の 0.3%溶液であってもイソ酪酸にしか反応しない。イソ酪酸、イソ吉草酸はともに分岐鎖を持つカルボン酸だが構造が若干異なる。この違いが反応の相違ではないかと考え、酸の影響を無視できるナトリウム塩を使って検証。＜イソ酪酸ナトリウム・イソ吉草酸ナトリウム・酪酸ナトリウム・2-メチル酪酸ナトリウム・プロピオン酸ナトリウム＞の 0.3%溶液に対する変形体の反応を観察したところ、すべての溶液に反応した。構造の違いが反応の相違に関係しているかは不明である。

2-2) 腐食性と側鎖の大きさの違い

化学的性質の違いに着目すると、反応した酸には腐食性があり、反応しなかった酸には腐食性がない(表 1)。また、側鎖の炭素数に着目すると、反応した酸の炭素数は 3 だが、反応しなかった酸は 4 で反応したものに比べて長い。これらが反応の違いを生んだのではないだろうか。変形体は側鎖の炭素数が 3 までの酸や腐食性を持つ酸に対して負の走化性を示すのではないかと考えられる。

表 1：腐食性と側鎖の炭素数

物質名	炭素数	腐食性	阻止円
プロピオン酸	2	有り	形成
イソ酪酸	3	有り	形成
酪酸	3	有り	形成
イソ吉草酸	4	ほぼない	反応せず
2-メチル酪酸	4	ほぼない	反応せず

■他の微生物との関係性

自然界の中での他の微生物との相互作用についてより深く理解するため、競争関係の検証を進展させるとともに、新たに共生関係についても検証した。

- ①競争関係 ②共生関係

1) 他の微生物との競争関係

＜比較検証した微生物＞

カビ : アオカビ *Penicillium roqueforti*,
クサレケカビ *Mortirella elongata*,
キコウジカビ *Aspergillus oryzae*,
ヒゲカビ *Phycomyces nitens*

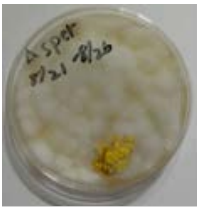
バクテリア : 枯草菌 *Batillus subtilis*

1-1) 培養時間による反応の違い

培地(培養環境)による違いを検証した実験では、成長速度の速い変形体が圧倒的な優位性を示した。そこで、微生物と変形体の移植に時間差を設けた。5種の微生物をそれぞれ5日間・10日間培養した後、変形体を移植。その後、48時間観察した。

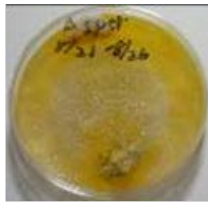
＜結果＞5日間培養するとカビはシャーレを占拠するまで成長する(図1)。だが、この状態から変形体を移植してもカビは4種とも変形体に捕食された(図2)。唯一、枯草菌に対しては阻止円を形成し勢力関係が拮抗する状態となった(図3)。10日間培養でも勢力関係は変わらなかった。枯草菌に対して阻止円を形成したのは、枯草菌が低級分岐脂肪酸を生産するためと考えられる。変形体にとってマイナス因子となるのは、微生物の量ではなく、低級分岐脂肪酸のような阻害物質を生産するかどうか、つまり負の走化性要因が重要と考えられる。

図1:



5日間培養・実験開始
(キコウジカビ)

図2:



5日間培養・結果
(キコウジカビ)

図3:



5日間培養・結果
(枯草菌)

2) 共生関係

変形体が微生物を保持していることは経験的に知られている。これまででは培養時のコンタミネーションの原因として、除去に関心が向いていたが([4][5])、微生物の保持が常態ならば、そのこと自体が何らかの機能を果たしているのではと考えた。

2-1) 微生物の単離

変形体が保持している微生物の種類を検証するため単離を試みた。滅菌水に変形体のみを溶かし、CM+培地と、MEA培地に変形体を塗ったものをコロニー出現まで観察し、発生したコロニーをMEA培地上に移植した。コロニーがいくつも確認されたが種類ごとに単離できず、同定できなかった。

2-2) 変形体の阻害物質を生産するバクテリアの存在

変形体が保持しているバクテリアの中に、変形体の阻害物質を作るものが存在することに気づいた。このバクテリアは変形体をMEA培地上に移植すると、変形体から滲みだすように増殖して変形体を死滅させるが、体内に保持しているときには無害であると考えられる。そこで、増殖が阻害物質生産のスイッチであるかを検証するとともに、当該阻害物質の分析を試みた。

2-2-1) 阻害物質を生産するバクテリアに対する反応

変形体の周囲に発生したコロニーからバクテリアをMEA培地上に分離・培養して十分な量に増やす。観察用のMEA培地上に極少量を移植すると同時に変形体を移植し、48時間観察した。＜結果＞極少量であれば変形体が捕食したことから、増殖が阻害物質生産の誘引因子であることが立証できた。また、他の実験でコンタミネーションしたときには、早いものだと24時間後には2~3cmほどのコロニーに成長していたにもかかわらず、本実験においては移植した地点からほとんど広がらなかった。変形体が持つ何らかの物質が増殖因子になっている可能性が考えられる。

2-2-2) 阻害物質の分析

阻害物質を特定するため、培地から物質を抽出し分析した。MEA培地と標準寒天培地でバクテリアを培養した後、培地上の物質をメタノール、酢酸エチル、水で抽出しTLCで展開した。＜結果＞MEA培地で培養すると酸性物質を生産していたにもかかわらず、普通寒天で培養すると塩基性を示した。酸性物質も塩基性物質も酢酸エチルでは抽出されなかったことから、水溶性物質であると考えられるが物質の特定には至らなかった。

2-3) 這い跡に発生するバクテリアの分離

変形体の培養中、這い跡に紫の色素を有するバクテリアがよく発生する。変形体を他の培地に移植しても這い跡に発生することから、変形体が保持している可能性が高い。顕微鏡観察で桿菌とわかるだけである。経験から主に這い跡に発生するが、変形体の這い跡がないと発生しないかについては不明である。そこで、MEA培地と変形体を培養に使用している寒天培地ごとメタノール抽出したものを混ぜた培地で培養できるか検証した。＜方法＞紫のバクテリアのコロニーだけをMEA培地と変形体の抽出液で作製した培地に移植。観察期間は3日間設けた。＜結果＞いずれの培地でも培養できなかった。抽出液を入れた後、オートクレーブで滅菌した際に物質の構造が壊れたからだと考えられる。MEA培地で培養できなかったことから、富栄養環境も適していないのかもしれない。変形体の這い跡に含まれる物質か、変形体の分泌物が増殖因子もしくは成長する際に必須の栄養になっていると考えられる。這い跡に発生するので、変形体の食胞に取り込まれないと分裂しない可能性も考えられる。

■考察と結論

変形体の「生きていく戦略」について、以下の点を解明できた。

- 1)塩分・酸・塩基のいずれにも負の走化性を示し、反応には濃度が重要である。
- 2)腐食性や側鎖の炭素数は負の走化性要因となる。
- 3)微生物との競争関係では、機動性を有する変形体が優位になりやすく、変形体に対する阻害物質の有無(負の走化性要因)が重要である。
- 4)変形体の「動く」という機能を利用し共生しているバクテリアが存在する。

変形体には自らの薄い細胞膜とポリガラクトース以外に外界と細胞質を隔てる防御壁が存在しないため、その構造は外的刺激に対して脆弱である。変形体が自らpH調整をしていないとすると、酸に対する防御は水素イオンを能動輸送によって運び出す以

外に方法がない。そのため腐食性を有す、あるいは側鎖の炭素数が 3 以下の有機酸は脅威となる。塩基は表在タンパク質など細胞膜に直接作用するので危険要因となる。

他の微生物との競争関係において、変形体は機動性を生かして素早く攻撃・捕食することで優位に立つが、忌避物質の影響を受ける。これまでの阻止円観察の経験から、変形体は忌避物質に対して阻止円を形成するが、そこからすぐに退避するのではなく、むしろ酸性物質に誘引されるかのように境界でとどまる傾向が認められた。バクテリアは周囲の他のコロニーを攻撃するために酸性の阻害物質を生産することがある。変形体は餌であるバクテリアが出している阻害物質を頼りに餌を探しているのではないだろうか。一見するとリスクの高い行動のように思えるが、酸性の阻害物質が中和されることなくゆっくり拡散する寒天培地のような環境は、本来、変形体が生息する水分の多い自然環境とは著しく異なる特殊な状態であるといえる。水分が多いと、水溶性の忌避物質は早く拡散し、濃度が低くなる。むしろ忌避物質をたどっていったほうが確実にバクテリアのコロニーに遭遇することができ、結果として阻害を受けない。また、微生物が多糖類を分解して作った単糖類も容易に拡散する。糖に対し正の走化性を示すのも、変形体が単糖類そのものを栄養として使うことに加え、微生物を探す道しるべにするためとは考えられないだろうか。広い地中や倒木の中での餌の確保には有効な手段といえる。忌避物質を避けるだけでなく、餌となるバクテリアへの道しるべとして利用する。つまり、これが変形菌の「生きていく戦略」ではないだろうか。

今回の検証で、変形体は内部にバクテリアを保持していることが判明した。このバクテリアは MEA 培地で旺盛に生育し、その場合には、変形体の阻害物質を生産する。この培地環境には、変形体が正の走化性を示す糖が多く含まれている。つまり、このバクテリアは変形体の戦略をうまく利用していることになる。バクテリアの立場から考えると、ほとんど動くこともできず、胞子も作らないバクテリアにとって、変形体の体内に保持されることは広範囲に分布を広げるチャンスである。現段階では、このバクテリアが変形菌に及ぼす害あるいは利は確認できず、これらの関係は、相利共生や寄生ではなく片利共生と言える。

本研究を通して、変形体は自ら動いて忌避物質を避けるだけでなく、危険因子にあえて近づくことで餌を手に入れるという戦略を取っていると結論づけられる。また、この性質を利用するバクテリアもいると結論付けられた。

本研究において着手した微生物と変形菌との相互作用については、これまではコンタミネーションの原因として除去する方向でしか論じられてこられなかった。滅菌したシャーレ内ではなく、多様な自然界で生きる変形菌の存在意義を考えると、変形体が内部にバクテリアを保持していることがどういう機能を果たしているのかを検証することは、学問的に意味のあることと考える。今後の課題として、変形体がなぜそのような微生物を保持しているのか、またそのことが変形体にとってどのような利益があるのかについて検証していきたい。また、地中での酸性物質の拡散の仕方も検証していきたいと考えている。

■謝辞

最後に、多くの先生方にご指導とご協力をいただきました。心から感謝申し上げます。

○筑波大学生命環境系（菅平高原実験センター）

出川 洋介助教

○筑波大学生命環境学群生物学類 4 年菌学研究室

岩本 祥明さん

○元京都大学化学研究所

中村 薫 先生

○姫路獨協大学薬学部有機化学研究室

山中 理央講師

■参考文献

1. Kincaid RL, Mansour TE, 1978. Chemotaxis toward carbohydrates and amino acids in *Physarum polycephalum*. *Experimental Cell Research* 116: 377-385.
2. 高橋一成, 2012. 粘菌変形体の化学走性を利用した高校生物実験の開発. *Naturalistae* 16: 29-38.
3. Hirose T, Ueda T, Kobatake Y, 1982. Changes in intracellular pH accompanying chemoreception in the plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Journal of General Microbiology* 128: 2647-2651.
4. Schroeder HR, Fergus CL, Mallette MF, 1974. Culture of *Physarum gyrosium*. *Mycologia* 66: 349-354.
5. Henney HR, Henney MR, 1968. Nutritional requirements for the growth in pure culture of the myxomycete *Physarum rigidum* and related species. *Journal of General Microbiology* 53: 333-339.
6. Brock DA, Douglas TE, Queller DC, Strassmann JE, 2011. Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature* 469: 393-396.

Communicated by Yosuke Degawa, Received Oct 03, 2013.