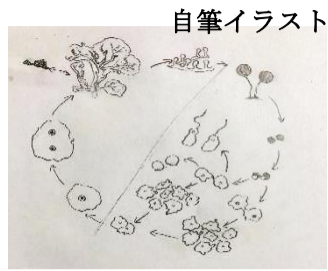


粘菌(フィザルム)の培養と機能性探索

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部
塚田 麗

1. はじめに

フィザルムいわゆる真性粘菌に興味があり、2020年9月から部活動で培養を試みた。フィザルムの生活史の体現と機能性探索を目的とした。生活史を辿る実験では容易なルートと困難なルートが判明し、抗菌性においてはコクリア菌に特異的に活性を有することも分かった。多くの課題が残されたが、はじめてフィザルムを扱って、ますます謎多き生命体の感を強くした。



2. フィザルムの培養

(生活史を辿って)

1) 準備

市販フィザルムの変形体と菌核を入手し(図1)、蒸留水(溶媒)に2%寒天培地を滅菌した。又、餌としてオートミールも用意した。



図1 フィザルム変形体(左) 菌核(右)

2) 変形体の継代培養と観察

方法はタピオカストローでくりぬいた変形体を寒天中央に置きオートミールをランダムに散りばめた。暗黒下20℃で培養すると増殖がみられ簡単に培養できた(図2)。変形体の観察はSEM(走査電子顕微鏡)を使用した(図3)。250倍、2500倍の観察画像から、移動痕跡部やコア部にさまざまな形の粒子集塊が存在しており、細胞や生産物、栄養成分などが考えられる。

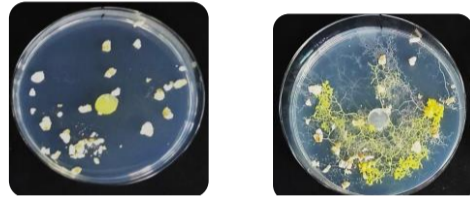


図2 中央に変形体→増殖した変形体(5日後)

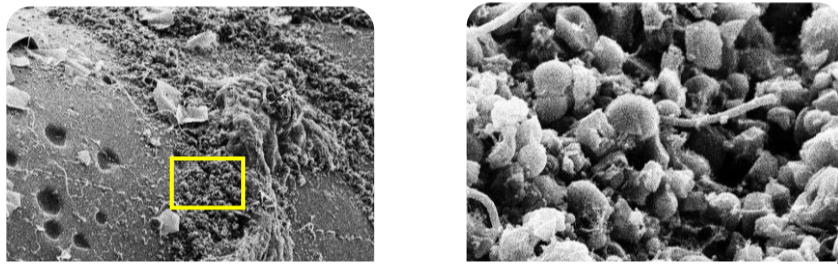


図3 フィザルム変形体(×250) → 拡大像(×2.5 K)

3) 菌核の培養

菌核を寒天培地に貼付し、暗黒下20℃で培養した。翌日には変形体(図4)に、さらにその次の日には子実体と化した。この変化の速さと分かりやすさには大変驚愕した。オートミールの餌を与えず培養すると老化が早いと考えられる。孢子、子実体の観察は実体顕微鏡とSEM(走査電子顕微鏡)を使用した(図5)。子実体は孢子の集塊でそのスケールは8.45μmであった。

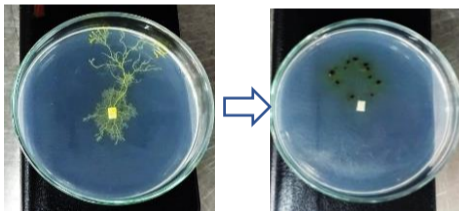


図4 変形体形成(1日後) → 子実体形成(2日後)

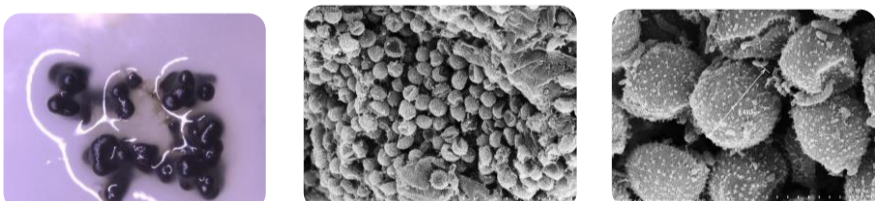


図5 子実体外観(×10) → 孢子集塊(×1.0 K) → 孢子スケール(×5.0 K)

4) 子実体からアメーバー細胞

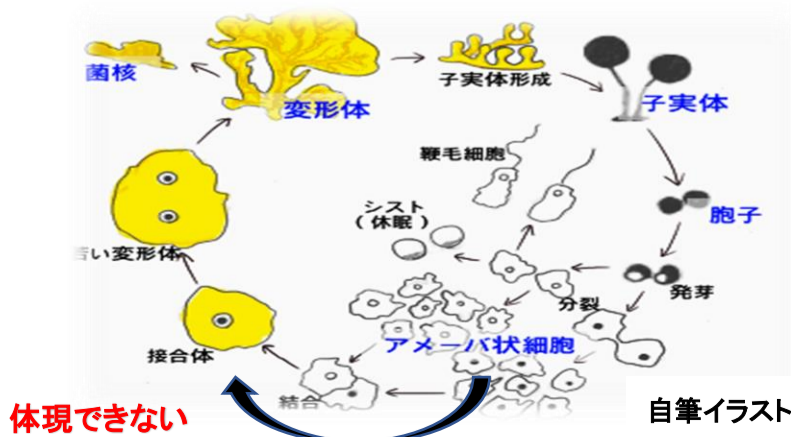
LP培地(乳糖主成分)を作成し子実体を培地に塗抹し暗黒下20℃で培養した(図6)。形成されたアメーバー体をLP培地に継代し培養(7日サイクル)を試み変形体移行をめざしたが体現できていない。



図6 アメーバー体形成(2日後)

5) まとめ

変形体から子実体、子実体の孢子発芽からアメーバー体は容易に変化した。アメーバー体から変形体への変化は成功していない。



3. フィザルムの機能性(抗菌性、抗酸化性)探索

真性粘菌などの変形菌は大腸菌など細菌を餌にして培養する実験が多く紹介されているが、抗菌性の実験例は少ない。専門科目実験で抗生物質や香料などの抗菌活性試験をおこなった経験を生かして実験を組み立てた。又、機能性のひとつである抗酸化性についてもその活性を測定した。

1) 抗菌活性試験

試料作成:フィザルム以外に餌として与えたオートミールも比較として試料とした。変形体1g、オートミール粉体1gを10mMリン酸バッファー(pH 7.0)5mlに懸濁し振とう機で24時間振とう抽出した。振とう液を遠心分離(15K rpm)し、その上清を無菌濾過(0.45μmフィルター)し作成した(図7)。

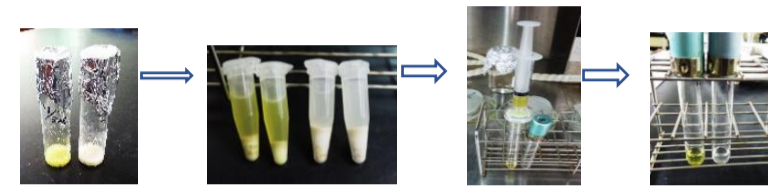


図7 試料作成工程
変形体(左) 遠心分離 無菌濾過 作成試料
オートミール(右)

図7 試料作成工程

方法:検定菌(NBRC標準株)をコクリア菌、大腸菌、枯草菌の前培養液を検定培地(ミューラーヒントン寒天)に塗抹し、検液(変形体抽出エキス、オートミール抽出エキス)30μlを寒天穿孔(φ5mm)に注入し、24時間、37℃で培養した。

結果・考察:培養後の結果(図8)から形成された阻止円の直径を測定した(表1)。

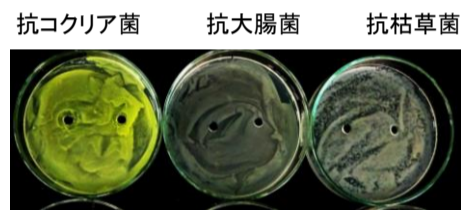


図8 フィザルムの抗菌活性試験

試料左に変形体エキス、右にオートミールエキス

表1 変形体の抗菌活性試験

阻止円有無(+、-)、直径(mm)

試料(抽出液)	検定菌	コクリア菌	大腸菌	枯草菌
変形体		+12	—	—
オートミール		+7	—	—

2) 抗酸化活性測定(ABTS法)

方法:検定試料(変形体抽出エキス、オートミール抽出エキス)30μlと酸化物質であるABTS(アジノービス)活性液3mlを混合し4分後の青色消失度合を734nm吸光度を測定し数値化した。尚、コントロールは抽出バッファーを測定し比較した。

結果・考察:反応後の結果、反応液は変形体エキスの方がオートミールエキスより青色が消失していた(図9)。吸光度測定値からABTS消去率求め表2に纏めグラフ化した(図10)。消去率は(C-S)÷C×100で計算した。

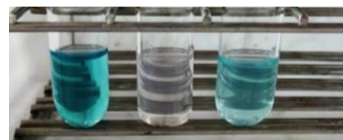


図9 変形体の抗酸化活性試験

試験管左はコントロール(C)、中央は変形体エキス(S1)、右はオートミール(S2)

表2 変形体の抗酸化活性試験

(ABTS法・734nm)

試料	吸光度(abs)	吸光度差(abs)	消去率(%)
		C - S	
C	0.700		
S1	0.215	0.485	73.0
S2	0.490	0.210	30.0

オートミール抽出成分にも弱い抗酸化性がみられるが、変形体抽出成分の方がより高い活性を有することが判明した。変形体細胞成分や生産物に抗酸化物質の存在が示唆される。変形体成分の抽出は約5倍量のリン酸バッファーを使用した。他溶媒(80%エタノールなど)による抽出成分の活性を調べたい。

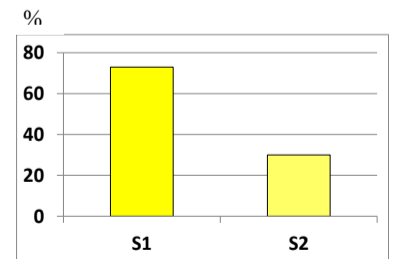


図10 フィザルム変形体のABTS消去率

4. フィザルム研究の今後について

(Labo 実験)・生活史の体現化(アメーバー細胞から変形体のルート)
・迷路実験による粘菌の行動探索
・機能性(抗菌性、抗酸化性)の条件検討(抽出条件の最適化)
(フィールドワーク)・学校、地域に生息する粘菌の分離と同定

5. 参考文献

ねん菌(へんけい菌):一般社団法人 農山漁村文化協会
新しい創薬資源としての変形菌に関する研究:千葉大学大学院 石橋正巳