

# 植物ウイルスの感染阻害物質に関する研究

第12報 ショウリョウバッタ及びヤマトシジミに含まれる TMV 感染阻害因子の性状

奥山 哲・河又 仁・阿久津克己

## 緒 言

著者らは先に、ウイルス感染に及ぼす昆虫、蛛形、甲殻、唇脚並びに倍脚の各綱所属節足動物15目66科185種の抽出液の影響を調べ、これら節足動物なかんずく昆虫綱には、TMVやCMVに対する強力な感染阻害因子が広く存在することを報告した<sup>13)</sup>。そこでさらに、この種因子の性状や作用機構等に関する情報を得るため、その抽出液が顕著な阻害作用を有し、しかも入手が比較的容易なショウリョウバッタ (*Acrida turrita* Liné) とヤマトシジミ (*Zizeeria maha argia* Ménét-riès) について、TMV-*Chenopodium amaranticolor* 系で検討を進めた。実験は主として1982年度に行ったものであるが、得られた諸結果のうち、当該阻害因子の性状にかかわる部分を、ここに取りまとめ報告する。

なお、本研究を遂行するに当たり、種々ご助力いただいた当学部の関係各位に対し衷心より感謝の意を表する。

## 実験材料及び方法

実験に供した2種の昆虫、すなわち直翅目のショウリョウバッタと鱗翅目のヤマトシジミは、前報<sup>13)</sup>と同じく茨城県稲敷郡阿見町の当学部温室周辺で採集したものであり、いずれも若い成虫である。また、用いたTMVの系統は、当学部植物病理学研究室で、先にウツギ (*Deutzia crenata* Sieb. et Zucc.) から分離し<sup>17)</sup>、タバコ (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi) で維持・保存している ordinary strain である。これら両種昆虫の抽出液並びにTMV液の調製は、前報<sup>13)</sup>に準じて行った。

さらに、検定植物 *C. amaranticolor* Coste et Reyn. の育成・管理、これを用いての検定法及び感染阻害度の算出法等も前報<sup>13)</sup>並びに前々報<sup>15)</sup>に準じた。

なお、試みた各種実験は、すべて1~2回の予備実験の後2~3回反復した。その他実験の詳細は、本文中でその都度述べることにする。

## 実 験 結 果

### 1. 熱及び希釈処理

感染阻害作用に及ぼす熱並びに希釈の影響をみるため、供試2種昆虫10倍抽出液の50~100℃各10分の加熱と殺菌水を用いての $10^2 \sim 10^6$ 倍希釈の処理を施した。処理後それぞれ等量のTMV液に混合・かくはんし、10分後 *C. amaranticolor* に接種して、生ずる病斑数より感染阻害度を求めた。なお、対照に無処理の10倍抽出液と殺菌水を充て、実験は2回反復した。得られた結果は第1表の通りである。

第1表より、ショウリョウバッタ抽出液の作用は、70~90℃の加熱または $10^2 \sim 10^4$ 倍希釈で処理度に応じた減退がみられ、100℃もしくは $10^5 \sim 10^6$ 倍希釈でそれぞれ消失した。一方ヤマトシジミ抽出液の場合、70~80℃加熱、 $10^2 \sim 10^4$ 倍希釈でその作用が次第に低下し、90℃または $10^5$ 倍希釈の処理で消滅した。なおここで、 $10^6$ 倍希釈液の作用が、阻害から促進に転換する傾向を示したのが注目される。

### 2. 保存処理

両種昆虫10倍抽出液をそれぞれ滅菌試験管にとり、密栓を施して0℃の暗所に0~180日間保存した。所定期間ごとに一定量取り出して等量のTMV液と混合し、その感染阻害度を常法によって調べた。結果は第2表に

第1表 ショウリョウバッタ及びヤマトシジミ抽出液の熱並びに希釈処理試験結果

処理	ショウリョウバッタ						ヤマトシジミ					
	実験 I			実験 II			実験 I			実験 II		
	対照	処理	阻害率	対照	処理	阻害率	対照	処理	阻害率	対照	処理	阻害率
	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率
熱処理												
無処理	539	7	98.7	571	4	99.3	497	3	99.4	544	6	98.9
50℃	483	30	93.8	637	37	94.2	477	52	89.1	586	73	87.5
60℃	466	69	85.2	606	88	85.5	459	78	83.0	516	91	82.4
70℃	541	149	72.5	634	156	75.4	383	125	67.4	548	153	72.1
80℃	537	238	55.7	623	305	51.0	513	362	29.4	528	365	30.9
90℃	515	364	29.3	642	461	28.2	480	406	15.4	572	494	13.6
100℃	472	457	3.2	597	617	-3.4	559	536	4.1	557	548	1.6
希釈処理												
10 <sup>-1</sup>	582	2	99.7	549	5	99.1	556	7	98.7	637	4	99.4
10 <sup>-2</sup>	650	154	76.3	545	141	74.1	526	98	81.4	559	129	76.9
10 <sup>-3</sup>	588	191	67.5	520	172	66.9	579	298	48.5	654	374	42.8
10 <sup>-4</sup>	546	260	52.4	576	322	44.1	563	397	29.5	599	438	26.9
10 <sup>-5</sup>	555	439	20.9	562	449	20.1	538	506	5.9	641	651	-1.6
10 <sup>-6</sup>	569	541	4.9	598	565	5.5	601	619	-3.0	626	758	-21.1

注) 負号の数値は、病斑数が増加した率を示す

第2表 ショウリョウバッタ及びヤマトシジミ抽出液の保存処理試験結果

保存期間 (日)	ショウリョウバッタ						ヤマトシジミ					
	実験 I			実験 II			実験 I			実験 II		
	対照	処理	阻害率	対照	処理	阻害率	対照	処理	阻害率	対照	処理	阻害率
	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率
0	588	7	98.8	561	9	98.4	640	8	98.8	519	5	99.0
30	635	92	85.5	565	69	87.8	703	301	57.2	576	194	66.3
60	562	217	61.4	611	180	70.5	500	346	30.8	541	315	41.8
90	595	411	30.9	765	441	42.4	660	555	15.9	446	372	16.6
120	631	592	6.2	684	557	18.6	563	526	6.6	619	630	-1.8
150	529	540	-2.1	571	605	-6.0	630	574	8.9	480	475	1.0
180				678	609	10.2				474	480	-1.3

注) 負号の数値は、病斑数が増加した率を示す

掲げた。

第2表にみられるように、ショウリョウバッタ、ヤマトシジミの場合ともその作用は保存期間が長くなるに従

い低減し、前者は90~120日、後者では60~90日で消滅したものの、いずれも保存性は比較的高く、かなり安定であることを示した。

3. 透析処理

透析膜 (Visking Company) に供試両虫の各 10 倍抽出液を所定量とり、蒸留水に対して 48 時間透析した。その後透析に伴う希釈の調整を行い、常法に従って TMV 感染阻害作用変化の有無をみた。対照には、試験管にとり同じ蒸留水中に同時間保持した各 10 倍抽出液と殺菌

水を充てた。実験の結果は第 3 表の通りである。

第 3 表より、供した二者いずれの抽出液にも、透析による阻害度の有意な変化が認められなかった。よって、両者の当該阻害因子は、透析膜を通過できない高分子の物質と推定される。

第 3 表 ショウリョウバッタ及びヤマトシジミ抽出液の透析処理試験結果

処 理	シ ョ ウ リ ョ ウ バ ッ タ						ヤ マ ト シ ジ ミ					
	実 験 I			実 験 II			実 験 I			実 験 II		
	対 照	処 理		対 照	処 理		対 照	処 理		対 照	処 理	
	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率
無 透 析	512	6	98.8	472	8	98.3	398	7	98.2	468	5	98.9
透 析	493	12	97.6	501	15	97.0	410	16	96.1	443	18	95.9

4. 活性炭処理

供試虫 10 倍抽出液 10 ml に活性炭を 1 g の割合に添加し、室温で 0.5 もしくは 12 時間処理した。その後ろ紙でろ過して活性炭を除去し、このろ液について、無処理の 10 倍抽出液及び殺菌水を対照に、TMV 感染阻害度を調べた。

実験を 3 回反復して求めた無処理 - 0.5 時間処理、無処理 - 12 時間処理各区それぞれの平均阻害率は、ショウリョウバッタの場合 98.9% - 32.1%, 98.1% - 30.8%, ヤマトシジミでは 99.2% - 31.9%, 99.0% - 29.7% であった。

この結果は、両昆虫に存在する感染阻害因子が活性炭

第 4 表 ショウリョウバッタ及びヤマトシジミ抽出液の水素イオン処理試験結果

pH	シ ョ ウ リ ョ ウ バ ッ タ						ヤ マ ト シ ジ ミ					
	実 験 I			実 験 II			実 験 I			実 験 II		
	対 照	処 理		対 照	処 理		対 照	処 理		対 照	処 理	
	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率	総病斑数	総病斑数	阻害率
2	483	462	4.3	432	389	10.0	487	436	10.5	625	548	12.3
3	542	169	68.8	517	127	75.4	608	487	19.9	528	460	12.9
4	563	37	93.4	602	26	95.7	606	167	72.4	544	138	74.6
5							663	50	92.5	492	29	94.1
6	602	24	96.0	536	27	95.0	619	26	95.8	469	31	93.4
7	554	21	96.2	582	16	97.3	584	26	95.5	588	19	96.8
8	570	41	92.8	561	45	92.0	642	45	93.0	600	28	95.3
9							575	116	79.8	547	89	83.7
10	579	82	85.8	574	103	82.1	643	312	51.5	534	290	45.7
11	508	294	42.1	593	286	51.8	628	565	10.0	518	431	16.8
12	536	518	3.4	511	492	3.7	632	593	6.2	509	472	7.3

によく吸着され、しかもこの吸着は、混合後速やかに起ることを示すと考えられる。

#### 5. 水素イオン処理

両虫抽出液の阻害作用に及ぼす水素イオン濃度の影響をみるため、0.01～1NのHClもしくはNaOHで両者10倍抽出液のpHをそれぞれ2～12に調整し、10℃の暗所に48時間静置した。その後各区のpHを7に再調整し、さらに殺菌水でHClあるいはNaOH添加に伴う希釈の調整をした後、同じように処理した殺菌水を対照に、TMVに対する感染阻害度変化の有無をみた。結果は第4表に掲げた。

第4表より、ショウリウソウバッタにおいてその阻害度は、pH4から10では有意な変化を示さなかったが、pH3もしくは11で減退し、pH2または12で消滅した。一方ヤマトシジミの場合、pH5～8の域ではその作用に有意な変動がみられなかったが、pH4もしくは10で明らかに低下し、pH3または11で消失することが判明した。

#### 6. 硫酸アンモニウム処理

硫酸アンモニウムを両供試虫10倍抽出液にそれぞれ1/2飽和になるよう添加し、室温で48時間処理した。次いで、生じた沈殿を遠心分離によって集め、残存する硫酸アンモニウムを透析で除いた後元の量に調整し、常法によってTMV感染阻害度を求めた。実験は3回反復した。

その結果、得られた無処理と処理各区の平均阻害率は、ショウリウソウバッタの場合99.4%、72.2%、ヤマトシジミでは99.1%、83.8%であった。以上から、この種要領による硫酸アンモニウム処理で、両者当該阻害因子の少なくとも一部は沈殿すると思われる。

#### 7. エタノール処理

供試両虫の10倍抽出液にエタノールを50%もしくは90%濃度になるよう加えてかくはんし、室温で24時間静置した。ここで生じた沈殿を上記硫酸アンモニウム処理の場合に準じて分離・調製し、TMV感染に対する作用をみた。

実験を2回反復して得た無処理、エタノール50%、90

%濃度各区それぞれの平均阻害率は、ショウリウソウバッタにおいては99.1%、80.2%、79.8%、ヤマトシジミの場合90.0%、72.2%、72.0%であった。この結果は、両虫抽出液に含まれる阻害因子が、エタノール処理で一応沈殿することを示すと考える。

## 考 察

従来、各種植物由来の植物ウイルス感染阻害物質として、たんぱく質<sup>5), 6), 11), 12), 14), 19), 22~24), 29)</sup>、多糖類<sup>8), 27), 28)</sup>、タンニン<sup>2), 3), 26)</sup>、フェノール性物質<sup>7), 9), 10), 25)</sup>、アルカロイド<sup>20)</sup>などが報告されている。しかるに、一部特殊な事例<sup>4)</sup>を除いて動物なかんずく昆虫については、この種物質の性状に関する研究は少なく、Black<sup>1)</sup>が clover leaf hopper (*Aceratagallia sanguinolenta* Prov.) で、たんぱく性物質を示唆しているのとどまる。

本実験のショウリウソウバッタ並びにヤマトシジミに存在するTMV感染阻害因子は、高温または強度の酸性もしくはアルカリ性処理ではじめてその活性を喪失した。また、当該因子は数か月の保存に耐え、非透析性で活性炭に吸着され、硫酸アンモニウムあるいはエタノール処理で少なくとも一部が沈殿・分画された。さらに、別に前報<sup>16) 18)</sup>に準じて予備的に試みた当因子のペプシン及びトリボヌクレアーゼ処理において、後者の場合一定の結果が得られなかったが、前者では、処理に伴い阻害作用が減退する傾向がうかがえた。この解釈は慎重を要し、なお検討が必要であるが、以上の結果を総合的にみて、供試2種昆虫の当該因子は、いずれも安定な、高分子のたんぱく性物質と推定される。

ところで、試みた各種実験の低度処理の段階では、供試両虫抽出液間に阻害度の有意な差がなく、また、処理度が進むにつれて作用の低下・消失するパターンは両者ほぼ同じで、大きなずれも認められなかった。しかし、その作用消失の限界は、ショウリウソウバッタの場合がヤマトシジミより若干高い傾向を示した。このような結果は、両虫において阻害に関与する主要因子は複数でなく、しかも両者間に当該因子の量的差異はあっても、質的に

大きな相違のないことをうかがわせるものであろう。この点今後さらに検討を重ねたい。

なお、当該因子の作用機構については改めて報告の予定であるが、本実験で、ヤマトシジミ抽出液の作用が単なる希釈で阻害から促進に転化する傾向をみせたのは、当該因子の作用点がウイルスよりは宿主にある可能性を示唆<sup>21)</sup>するものとして興味深い。

## 摘 要

シヨウリョウバッタ並びにヤマトシジミに存在するウイルス感染阻害物質の性状の若干を、TMV-C. *amaranticolor* 系で検討し、以下の結果を得た。

シヨウリョウバッタ、ヤマトシジミ各抽出液のTMV感染阻害作用は、加熱または希釈に伴い減退し、前者は90～100℃ 10分、 $10^5 \sim 10^6$ 倍希釈、後者は80～90℃ 10分、 $10^4 \sim 10^5$ 倍希釈でそれぞれ認められなくなった。

保存(0℃)により両虫抽出液の阻害作用は次第に低下し、シヨウリョウバッタでは90～120日、ヤマトシジミでは60～90日で消滅した。

両供試虫抽出液の作用は、48時間の透析で有意な変化を示さなかったが、活性炭による0.5または12時間処理では著しく低減した。

pH2～12各48時間処理において、シヨウリョウバッタ抽出液の作用は、pH3あるいは11で低下し、pH2または12で消滅した。一方ヤマトシジミの場合、pH4あるいは10で減退し、pH3または11で消失した。

両虫抽出液の硫酸アンモニウム1/2飽和48時間及びエタノール50%もしくは90%24時間の各処理で、当該阻害因子の少なくとも一部は沈殿・分画された。

以上の結果に基づいて、これら供試両虫抽出液に含まれるTMV感染阻害因子は、いずれも安定で、高分子のたんぱく性物質であろうと推論した。

## 文 献

1) Black, L. M. : *Phytopathology*, **29**, 321 (1939)

2) Cadman, C.H. : *J. gen. Microbiol.*, **20**, 113 (1959)

3) Cheo, P.C. and R. C. Lindner : *Virology*, **24**, 414 (1964)

4) Chester, K. S. : *Phytopathology*, **26**, 949 (1936)

5) Choi, J.-K. and O. H. Jung : *Korean J. Plant Protection*, **23**, 137 (1984)

6) Ebrahim-Nesbat, F. and F. Nienhaus : *Phytopathol. Z.*, **73**, 235 (1972)

7) Fischer, H. and F. Nienhaus : *Ibid.*, **78**, 25 (1973)

8) Gillaspie, A. G. Jr., C. A. Thomas and B. Prescott : *Ibid.*, **102**, 107 (1981)

9) Hampton, R. E. and R. W. Fulton : *Virology*, **13**, 44 (1961)

10) Harrison, B. D. and W. S. Pierpoint : *J. gen. Microbiol.*, **32**, 417 (1963)

11) Irvin, J. D. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 522 (1975)

12) Kassanis, B. and A. Kleczkowski : *J. gen. Microbiol.*, **2**, 143 (1948)

13) 河又 仁・奥山 哲・阿久津克己 : 茨大農学術報告, No. **32**, 1 (1984)

14) Kuntz, J. E. and J. C. Walker : *Phytopathology*, **37**, 561 (1947)

15) 奥山 哲・堀江寿人 : 茨大農学術報告, No. **30**, 15 (1982)

16) 奥山 哲・堀江寿人・阿久津克己 : 同上, No. **33**, 21 (1985)

17) 奥山 哲・北川 守 : 同上, No. **22**, 1 (1974)

18) 奥山 哲・竹見一洋・坂ひとみ : 同上, No. **26**, 49 (1978)

19) Ragetli, H. W. J. and M. Weintraub : *Virology*, **18**, 232, 241 (1962)

20) Roychoudhury, R. and P. K. Basu : *Indian J. Exptl. Biol.*, **21**, 212 (1983)

- 
- 21) Simons, J. N., R. Swidler and L. M. Moss : *Phytopathology*, **53**, 677 (1963)
- 22) Singh, I. and J. P. Varma : *Indian Phytopathology*, **34**, 452 (1981)
- 23) Smookler, M. M. : *Ann. appl. Biol.*, **69**, 157 (1971)
- 24) Stirpe, F., D. G. Williams, L. J. O'nyon, R. F. Legg and W. A. Stevens : *Biochem. J.*, **195**, 399 (1981)
- 25) Tavantzis, S. M. and S. H. Smith : *Phytopathology*, **72**, 619 (1982)
- 26) Thresh, J. M. : *Ann. appl. Biol.*, **44**, 608 (1956)
- 27) Wood, F. A., R. P. Singh and W. A. Hodgson : *Phytopathology*, **61**, 1006 (1971)
- 28) Worms, G. and F. Nienhaus : *Phytopathol. Z.*, **82**, 224 (1975)
- 29) Wyatt, S. D. and R. J. Shepherd : *Phytopathology*, **59**, 1787 (1969)

## Studies on Inhibitors of Plant Virus Infection

### XII. Some properties of inhibitors of tobacco mosaic virus in *Acrida turrita* and *Zizeeria maha argia*

SATOSHI OKUYAMA, HITOSHI KAWAMATA and KATSUMI AKUTSU

Inhibitors from two insect species, *Acrida turrita* Linné and *Zizeeria maha argia* Ménétrès, both of which previously had been demonstrated to cause a 98% or greater reduction in TMV infectivity, were studied in some detail. They were found to be thermolabile at high temperature, and nondialyzable. Their inhibitory activity was lost by dilution greater than 1 : 10<sup>5</sup>, by incubation in highly acid or alkaline solutions, and after storage for several months at 0°C. Further, the active molecules were adsorbed on activated carbon and partially purified by 1/2 saturated ammonium sulfate, and by 50% or 90% ethanol.

From these results, it is suggested that the inhibitors concerned may be substances of large molecular weights, and proteinaceous in character.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.34, 1 ~ 6, 1986)