

担子菌類子実体抽出液の抗植物ウイルス性

日本専売公社中央研究所 とまる けい いち う だ がわ あきら 晃*

菌類培養液あるいは菌体抽出物の抗植物ウイルス活性については、これまで数多くの検討がある。担子菌についても最近 WIGGS (1968)⁹⁾, SIGNORET ら (1969)³⁾ の報告がある。一方、子実体抽出物の動物における抗腫瘍活性も報告されている^{1,2,4,5)}。

筆者らは天然物からの抗植物ウイルス物質検索に関する研究の一環として、1969~70 年に神奈川県秦野市付近特に丹沢山麓で採集した担子菌子実体を中心として、抽出液の抗植物ウイルス活性について検討した。ここにその研究結果の概要を報告する。本研究は、1969~71 年にわたって旧秦野たばこ試験場で行い、結果の概要は昭和 46 年度植物病理学会大会で発表した⁸⁾。

I 実験材料及び方法

秦野市付近で採集された担子菌 43 種及びハラタケ、ハナビラタケ及び *Trichoderma virdii* 培養株（いずれも青島清雄氏より分与）、*Helminthosporium* 菌產生の生理活性物質（安松範郎氏より分与）、タバコ赤星病菌のトキシンである tenuazocic acid（三上洋一氏より分与）などを供試した。これらの供試試料を一括して第 1 表に示した。担子菌の同定は今関六也氏、青島清雄氏をはじめ菌学会の方々によった。担子菌子実体は採集後乾燥して保存し、隨時供試したが、一部生体のまま供試したものもある。

子実体は細切して蒸留水中で 8 時間以上煮沸し、ガーゼでろ過後、低速遠心し、上清を抽出液として用いた。抽出液の濃度は子実体重量の 20~60 倍、pH は 4.3~5.5 であった。

供試ウイルスとしてタバコモザイクウイルス普通系 (TMV-OM) 及びキュウリモザイクウイルス黄斑系 (CMV-Y) を用い、前者は純化試料 (0.25~0.5 μg/ml), 後者は特に述べない限り、感染タバコ葉搾汁液 (25~50 倍) を用いた。これらはいずれも 0.1M, pH 7.0 のリン酸緩衝液に懸濁した。

TMV では *Nicotiana glutinosa*, CMV ではササゲを検定植物とし、前者では半葉法、後者では初生葉を用いた対葉法⁷⁾により、生じた局部病斑数によって感染阻止率を次式に従って算出した。

$$\text{感染阻止率} (\%) = [(\text{対照区病斑数} - \text{処理区病斑数}) / \text{対照区病斑数}] \times 100$$

* 現 神奈川県農業総合研究所

第 1 表 供 試 材 料

1	ハラタケ*	26	キヌカラカサタケ
2	ヤナギマツタケ	27	ホコリタケ sp.
3	タマゴタケ	28	ヒメスミゾメシメジ
4	ツルタケ	29	スッポンタケ
5	ナラタケ	30	キツネノタイマツ
6	ヤマドリタケ	31	ベニチャワソタケ
7	ミヤマトンビマイタケ	32	ヤケイロタケ
8	ノウタケ	33	サジタケ
9	ツエタケ	34	アラゲカラタケ
10	エノキタケ	35	カカラタケ
11	ハチノスタケ	36	スギエダタケ
12	ヒメヒロヒダタケ	37	サビヒラタケ
13	コフキサルノコシカケ	38	オオベニタケ
14	チャツムタケ	39	スエヒロタケ
15	ヒメシロカイメンタケ	40	ハナビラタケ*
16	シシガシラ	41	チャウロコタケ
17	ミドリタケ	42	キウロコタケ
18	ニガクリタケ	43	サビウロコタケ
19	ウスバシハイタケ	44	シメジ
20	ハツタケ	45	ヒメカバロタケ
21	ツチカブリ	46	<i>Trichoderma virdii</i> *
22	シイタケ	47	<i>Helminthosporol</i>
23	カイガラタケ	48	" -acid
24	エゴノキタケ	49	Tenuazocic acid
25	チャカイガラタケ	50	シイタケ RNA

* 培養菌体（青島清雄氏より分与）

(対照区病斑数) × 100

検定は主として供試抽出液をウイルス液と等量混合して接種する方法（混合法）及び葉裏に抽出液を絵筆で塗布し、24 時間後に葉表にウイルスを接種する方法（葉裏塗布法）の両者によった。試験によっては葉表塗布のち 24 時間後に葉表接種する方法（葉表塗布法）も用いた。葉裏塗布法は抗ウイルス活性の葉組織内浸透移行性を見るためである。1 回の検定には 8 枚以上の葉を用い、葉裏塗布の効果がある程度得られたもの多くは 2 回以上繰り返して検定し、その平均値を算出した。また、作用機作についてシイタケ抽出液を用いて検討を行ったが、実験法はそれぞれの項で述べる。

II 実験結果

1 抽出液の TMV 及び CMV に対する感染阻止作用

第 2 表に結果をまとめて示した。TMV-*N. glutinosa* では供試した担子菌のすべてが、混合法によって 95% 以上の感染阻止効果を示した。CMV-ササゲでは効果の変動が大きく、混合法で 80% 以上の阻止率を示したもののはハラタケほか 14 種類、30~79% の阻止率ではヤナギマツタケほか 23 種類、その他は効果が認められなかった。

第2表 担子菌類抽出液のウイルス感染阻止作用

ウイルス-検定植物	感 染 阻 止 率 区 分	菌 株
TMV- <i>N. glutinosa</i>	I 混 合 法 >95%	全供試菌株
	II 葉裏塗布法 29~64%	2, 6, 11, 14, 20, 21, 33, 37
	III 葉裏塗布法 <28%	II以外の全菌株
CMV-ササゲ	I 混 合 法 >80%	1, 5, 9, 13, 16, 17, 22, 28, 32, 34, 37, 39, 40, 45, 46
	II 混 合 法 79~30%	2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 33, 36, 38, 41, 42, 43, 44
	III 混 合 法 <29%	I, II以外の全菌株
	IV 葉裏塗布法 28~31%	28, 31, 32, 43
	V 葉裏塗布法 <27%	IV以外の全菌株

菌株は整理番号(第1表参照)で示した。

葉裏塗布法では TMV-*N. glutinosa* でヤナギマツタケ, ハチノスタケ, ヤマドリタケ, チャツムタケ, ハツタケ, ツチカブリ, サジタケなど8菌株が 29~64% の阻止率を示したほかはすべて 28% 以下であった。

上記の8種類のうちヤマドリタケは5回の実験のうち3回で 50~78% の阻止率を示したが, タバコ(Holmes' Samsum)を用いた2回の実験では効果は認められなかった。

CMV-ササゲではヒメスマゾメシメジ, ベニチャ万タケ, ヤケイロタケ, サビウロコタケの4種類が 28~31% の阻止率を示したほかはすべて効果は見られなかった。

T. viridii の培養菌体抽出液は, 混合法では TMV の 100%, CMV 98% の高い阻止率を示したが, 葉裏塗布法ではいずれも無効であった。Helminthosporol 及び acid は混合法では TMV に対して 42~74% の阻止率を示したが, CMV では無効であった。葉裏塗布法ではいずれも効果は認められなかった。また, *tenuazooic acid* はいずれも有意な効果は示さなかった。シイタケ子实体からフェノール法によって抽出した RNA 成分について TMV-*N. glutinosa* 及び CMV-ササゲを用い, 葉裏塗布後 1, 3, 6, 7 日目の感染阻止率を調べた結果, いずれも効果は認められなかった。

2 感染阻止効果の作用機作

混合法による検定では TMV に対しては全菌株, CMV に対しては供試菌株の約 1/3 が 80% 以上の阻止率を示した。これらの阻止効果についてその作用機作に関する 2, 3 の実験をシイタケ抽出液を用いて行った。

(1) 抽出液の希釀と病原性

抽出液とウイルスとの混合液を水で希釀することによって病原性の回復が見られるか否かについて検討した。結果を第3表に示した。リン酸緩衝液で同率希釀液とし対照接種液による病斑数で混合接種希釀液の病斑数を

第3表 シイタケ抽出液とウイルスの混合液の希釀と病原性の回復

希釀倍率	TMV			CMV		
	混合液(A)	対照液(B)	A/B %	混合液(A)	対照液(B)	A/B %
1	4 ^{a)}	2,538 ^{a)}	0.2	80 ^{b)}	520 ^{b)}	15.4
4	14	3,533	0.4	26	70	37.1
16	16	2,024	0.8	13	38	34.2
64	15	542	2.8	17	50	34.0
256	31	253	12.3	28	32	87.5

a) *N. glutinosa* 10半葉の合計病斑数, 対照接種液は TMV 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

b) ササゲ 14葉の合計病斑数, 対照接種液は CMV 感染葉搾汁液.

除した値は, TMV, CMV ともに希釀によって上昇した。この事実は希釀によって混合接種液の病原性の回復があったものと考えられ, 抽出液の感染阻止効果はウイルスの不可逆的不活化ではないことが明らかである。

(2) 各種検定植物における感染阻止効果

N. glutinosa のほかタバコ(Xanthi nc, Ky 57), インゲンなどを用いて混合法と葉表塗布法により TMV に対する感染阻止効果を調べた。結果を第4表に示した。タバコ, インゲンのいずれも処理法にかかわらず効果が認められた。

(3) ウィルス接種前後における処理の影響

TMV-*N. glutinosa* を用い, ウィルス接種後のシイタケ抽出液による処理の影響を調べた結果, 感染阻止効果は, 時間の経過とともに急激に低下し, 5分後以降では有意な阻止作用は示さなかった。また, 別の実験で接種前 24, 48 時間の抽出液による葉表塗布によって 95% 以上の高い阻止効果が得られた。

(4) CMV 精製ウイルスと感染葉搾汁液との接種による阻止効果の差異

担子菌類抽出物の感染阻止効果は精製ウイルスを用い

第4表 シイタケ抽出液の各種検定植物における TMV 感染阻止効果^{a)}

検定植物	抽出液希釈度	混合法			葉表塗布		
		処理	対照	阻止率	処理	対照	阻止率
<i>N. glutinosa</i>	100	65	168	61%	181	275	34%
タバコ (Xanthi nc)	100	482	806	40	333	658	49
タバコ (Ky 57)	100	325	512	37	305	693	56
インゲン ゲン	100	—	—	—	62	284	78
インゲン ゲン	1	73	369	80	—	—	—

a) *N. glutinosa*, タバコでは各 8 半葉, インゲンでは各 10 半葉の病斑数の合計, 対照接種液は TMV 0.25 μg/ml

た TMV では変動が少なく、感染葉汁液を用いた CMV では混合法による阻止率に各菌株によって大きな差異があり、同一の実験の繰り返しでも変動が大きかった。そこでシイタケ抽出液の効果を精製 CMV 及び CMV 汁液で調べた。精製 CMV は TAKANAMI ら (1970)⁶⁾ の方法によって得られたものである。混合法及び葉表塗布法のいずれも精製ウイルスで高く、また、安定した阻止効果が得られる傾向が示された。

III 考察

WIGGS (1968)⁹⁾ はアメリカ・ノースカロライナで得られたハラタケ、ナラタケなど 32 種類の担子菌子実体について、水抽出液と TMV 液の混合液の接種によってその多くが感染阻止作用をもつことを示した。また、SIGNORET ら (1969)³⁾ もフランスにおいてキノコの水抽出物に植物ウイルスの阻止物質があることを報告している。彼らはこの阻止物質は検定植物の葉の主脈を越えて拡散、浸透すると述べている。

筆者らの実験でも供試した 43 種の担子菌子実体、2 種の培養菌体抽出液のすべてが混合法によって TMV に阻止効果を示し、CMV に対してもその多くが有効であった。しかし、葉裏塗布—葉表接種では確かな効果を示すものは見当たらなかった。この有効物質の植物体における浸透移行性については、有効物質の濃度との関係もあると思われるので更に検討が必要であろう。また、CMV では供試ウイルスが精製あるいは粗汁液であるかによって効果に差が見られた。これは粗汁液中のウイルス以外の物質と抗ウイルス物質との作用が、抗ウイルス性に影響をもたらすものと考えられる。

シイタケ抽出液を用いた実験で、抗ウイルス性の作用機作として、ウイルス粒子の不可逆的不活化でなく、接

種後の処理ではその効果が急激に低下することから、この作用は感染のごく初期、すなわちウイルスの表皮細胞への吸着の段階に関与していることが推察された。

SHIBATA ら (1968)²⁾、IKEKAWA ら (1968)¹⁾ はキノコ抽出物の動物における抗腫瘍活性について報告し、また、鈴木ら (1969, 1970)^{4,5)} はシイタケから抽出された二重鎖 RNA のインターフェロン誘起性を報告している。シイタケからフェノール法によって抽出した RNA 成分について TMV-*N. glutinosa* の系を用いた筆者らの予備的検討では処理後数日間にわたる検定で感染阻止効果は認められなかった。これら担子菌子実体の抗ウイルス成分の化学的検討を含めて今後の研究が必要と思われる。

担子菌の同定及び実験遂行について、御指導及び援助をいただいた今関六也氏、青島清雄氏及び菌学会の関係各位、供試品を分与いただいた安松範郎氏、三上洋一氏、また、本実験に終始協力をいただいた岡本美代子氏に深く感謝いたします。

引用文献

- IKEKAWA, T. et al. (1968) : Gann 59 : 155~157.
- SHIBATA, S. et al. (1968) : ibid. 59 : 159~161.
- SIGNORET, P. A. et ALLIOT, B. (1969) : Ann. Phytopathologie 1 : 533~539.
- 鈴木富士夫ら (1969) : ウィルス 19 : 223.
- ら (1970) : 同上 20 : 183~184.
- TAKANAMI, Y. and TOMARU, K. (1969) : Virology 37 : 293~295.
- 都丸敬一・日高 醇 (1960) : 日高他編、植物ウイルス病—実験法と種類—153~159. 朝倉書店.
- 宇田川 晃ら (1971) : 日植病報 37 : 208.
- WIGGS, D. N. (1968) : Plant Dis. Rep. 52 : 528~529.