昆虫病原性糸状菌の多糖抗原の抽出とその血清学的性状

清水 進¹⁾・鮎沢 啓夫

九州大学農学部

Serological Properties of Polysaccharides from Several Entomopathogenic Fungi Imperfecti. Susumu SHIMIZU²⁾ and Keio AIZAWA (Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* 31: 41-45 (1987)

Six entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana* (serotype B₁), *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus* and *Nomuraea rileyi*) were grown in L-broth. Antigens were extracted from acetone-dried cells with 1/15 M phosphate buffer, pH 7.0, at 130°C for 5 hr. Crude polysaccharides of *B. bassiana* (serotype B₁), *P. fumosoroseus*, and *P. lilacinus*, respectively, were extracted obtained by ethanol precipitation and purified by gel filtration on Sephadex G-100. A single peak of polysaccharides was obtained from each fungus and this fraction was further separated into 2 fractions (Fr. 1 and Fr. 2) by DEAE-cellulose column chromatography. In the agar-gel diffusion test, Fractions 1 and 2 of *B. bassiana* (serotype B₁) or *P. fumosoroseus* gave a single precipitin line against the anti *B. bassiana* (serotype B₁) serum. However, Fractions 1 and 2 of *P. lilacinus* did not react with the anti *B. bassiana* (serotype B₁) serum. In the agar-gel diffusion test, polysaccharides obtained from *B. bassiana* (serotype B₁), *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus* or *P. farinosus* gave a single precipitin line against the anti *B. bassiana* (serotype B₁) serum. On the other hand, polysaccharides obtained from *N. rileyi* or *P. lilacinus* did not react with the anti *B. bassiana* (serotype B₁) serum. Accordingly, the six fungi were classified into two groups: *B. bassiana*-*B. brongniartii*-*P. fumosoroseus*-*P. farinosus* group and *P. lilacinus*-*N. rileyi* group.

昆虫病原性糸状菌の blastospore は抗 blastospore ウサギ血清ならびに抗分生子血清によって凝集され、各糸状菌間には強い交差反応が認められる。交差反応は加熱処理 blastospore を抗原に用いたときにも認められるので、blastospore には耐熱性の共通抗原が存在する (SHIMIZU and AIZAWA, 未発表)。これらの共通抗原は菌糸の表層にも存在することが蛍光抗体法によって確かめられたので、数種の昆虫病原性糸状菌の菌体 (blastospore および菌糸) より共通抗原を抽出し、その血清学的性状を調査した。

材料および方法

1. 供試菌

Beauveria bassiana 血清型 B₁ F-1 株 *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces farinosus* および *Nomuraea rileyi* の6種糸状菌を供試した。

2. 抗原の抽出法

まず、*B. bassiana* 血清型 B₁ F-1 株について抗原の抽出法を検討した。分生子を 28°C、5 日間振とう培養後、培養液を遠心 (3,000 rpm, 20 分) し、菌体および培養濾液に分画した。菌体を生理食塩水で数回遠心洗浄し、アセトンで脱脂したのち乾燥した。脱脂乾燥菌体 10 g から次の方法により抗原を抽出した。1) 酸性抽出: a) 0.01 N 酢酸, 90°C, 1 時間抽出 (FREEMAN, 1942), b) 0.01 N 硫酸, 100°C, 1 時間抽出, c) 90% フェノール, 80°C, 30 分抽出 (鈴木ら, 1966), d) 0.25 N トリクロル酢酸, 0°C, 3 時間抽出。2) 中性抽出: a) 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 130~140°C, 5 時間抽出 (武田・鈴木, 1974), b) 蒸留水, 100°C, 5 時間抽出。3) アルカリ抽出: 0.25 N NaOH, 50°C, 5 時間抽出。4) 溶媒抽出: 50% ピリジン, 37°C, 24 時間抽出 (AZUMA et al., 1968)。これらの方法で抽出後、遠心 (3,000 rpm, 20 分) 上清を蒸留水に対して 4°C で透析し、抗原液量を 10 ml とした。なお、他菌株については、*B. bassiana*

1) 現在 京都工芸繊維大学繊維学部

2) Present address: Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1986年7月28日受領 (Received July 28, 1986)

F-1 株で最も良好な結果が得られた 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 130~140°C, 5 時間抽出の方法によって抗原の抽出を行った。

3. 多糖抗原の分離精製

抽出液を減圧濃縮し Visking チューブ (18/32) に入れ、蒸留水に対して 4°C で 1 昼夜透析した。透析内液に冷トリクロール酢酸を最終濃度 10% になるように加え、4°C で 48~72 時間攪拌後、遠心 (3,000 rpm, 20 分) して不溶物を除去した。上清を蒸留水に透析した後、3 倍量のエタノールで多糖分画を沈殿させた。

次に *B. bassiana* 血清型 B₁ *P. fumosoroseus* および *P. lilacinus* の多糖分画を蒸留水に溶解 (1 g/10 ml) し、その 5 ml を Sephadex G-100 (カラムサイズ 2×40 cm) でゲル濾過を行った。分画後、糖は Anthron 法 (TRVE-LYAN and HARRISON, 1952), 蛋白は 280 nm の吸収で定量した。

抗原性を示すゲル濾過分画を濃縮し、DEAE-cellulose (カラムサイズ 2×20 cm) で分画した。溶出液は 0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (pb と略す), pb+0.1 M NaCl および pb+0.5 M NaCl の順に行った。pb で溶出される分画を Fr. 1, pb+0.1 M NaCl および pb+0.5 M NaCl で溶出される分画をそれぞれ Fr. 2, Fr. 3 とよび Anthron 法による O.D_{620nm} が 1.0 になるように調整した。

4. 抗血清

B. bassiana 血清型 B₁ の分生子を L-broth で振とう培養 (28°C, 8 日間) 後、培養液を 1,000 rpm, 5 分遠心し、上清をさらに 3,000 rpm, 20 分遠心した。沈殿を生理食塩水に再浮遊させ、脱脂綿で濾過し精製度 99% 以上の blastospore を調製した。精製 blastospore をホルマリン処理 (HCHO, 4%, 37°C, 60 分) 後、遠心洗浄を 3 回反復し blastospore 死菌液を調製した。

死菌液を抗原として、4 日間隔で 10 回ウサギに静脈注射し抗血清を調製した。

5. 沈降反応

沈降管中で抗血清 (10 倍希釈) に多糖分画 (0.85% NaCl で希釈) を重層し、37°C, 2 時間後、沈降物の形成される最終希釈倍数を抗原価とした。

6. 寒天ゲル内二重拡散反応

OUCHTERLONY and NILSSON (1967) 法によって行った。寒天濃度は 1.5% で、多糖抗原は生理食塩水で 0.1 溶液とした。

7. 蛍光抗体法

蛍光抗体による染色は間接法により行った。すなわち

加熱処理 (100°C, 60 分) した菌糸をスライド上に塗抹、風乾後、抗 *B. bassiana* 血清型 B₁ blastospore 血清で 37°C, 1 時間反応させ、NaCl (0.85%) を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) (PBS と略す) で 30 分間振とうして洗浄し、次いで二次血清で 37°C, 1 時間反応させて同様に洗浄を行った。二次血清には Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識-抗ウサギ IgG-ヤギ血清 (Miles-Yeda Ltd., F/P=3.3) を使用した。観察はオリンパス BHF 蛍光顕微鏡で行い、対照としては一次血清を正常血清で置き換えて操作したものをを用いた。

実験結果

数種の昆虫病原性糸状菌 blastospore に存在する耐熱性の共通抗原が菌糸の表層にも存在することを蛍光抗体法により確かめた。すなわち、加熱処理した *B. bassiana* 血清型 B₁ の菌糸を抗 *B. bassiana* 血清型 B₁ blastospore 血清で処理後、さらに二次血清で処理すると強い特異蛍光が認められ、blastospore と菌糸間には耐熱性の共通抗原が存在することが確認された (Fig. 1)。そこで blastospore および菌糸間に存在する耐熱性の共通抗原の抽出には菌体 (blastospore および菌糸) を用いて行った。

B. bassiana 血清型 B₁ の菌体から種々の方法で抽出した抗原の抗原価を Table 1 に示す。1/15 M リン酸緩衝液を用いた場合、抽出液の抗原価は 128 倍で最も高かった。また各抽出液を寒天二重拡散法で検討した結果、各抽出液と抗血清の間に形成された沈降線は単一で、各抽出液間でスパーの形成は認められなかった。したがって、各種の方法で抽出された物質の抗原性に特異性は認められなかった。

Fig. 1. Detection of blastospore antigens on mycelium of *B. bassiana* by fluorescent antibody technique. Primary antibody: anti *B. bassiana* blastospore rabbit serum. Secondary antibody: FITC-labeled anti-rabbit globulin goat serum.

B. bassiana 血清型 B₁, *P. fumosoroseus* および *P. lilacinus* の粗多糖分画については Sephadex G-100 によるゲ

Table 1. Extraction of antigens from *B. bassiana* (serotype B₁) strain F 1

Procedure of extraction			Antigenic titers of extraction ^{a)}
0.01 N acetic acid	90°C	1 hr	32 ^{b)}
0.01 N sulfuric acid	100°C	1 hr	8
90% phenol	80°C	0.5 hr	2
0.25 N trichloro acetic acid	0°C	3 hr	4
1/15 M phosphate buffer (pH 7.0)	130-140°C	5 hr	128
Distilled water	100°C	5 hr	16
0.25 N sodium hydroxide	50°C	5 hr	2
50% pyridine	37°C	24 hr	16

a) Extracts from 10 g dry mycelia were adjusted to 10 ml.

a) Reciprocal of the dilution of extracts.

Antiserum: anti *B. bassiana* (serotype B₁) strain F1 rabbit serum.

Fig. 2. Gel-filtration of crude polysaccharide fraction of *B. bassiana* strain F1, *P. fumosoroseus*, or *P. lilacinus* on Sephadex G-100. Column size: 2×40 cm, flow rate: 10 ml/hr, fraction: 5 ml, eluted with distilled water, OD_{620m}: ANTHRONS method.

ル濾過を行い、多糖および蛋白質の流出パターンを調べた (Fig. 2)。その結果、供試菌 3 種の多糖は第 1 分画に溶出された。

次に、ゲル濾過第 1 分画について DEAE-cellulose カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行った。0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (pb と略す), pb+0.1 M NaCl および pb+0.5 M NaCl で溶出し、多糖および蛋白質の溶出パターンを調べた (Fig. 3)。その結果、0.005 M リン酸緩衝液で溶出される分画 (Fr. 1) は多糖, pb+0.1 M NaCl で溶出される分画 (Fr. 2) は多糖および蛋白質, pb+0.5 M NaCl で溶出される分画 (Fr. 3) は蛋白質であった。

Fr. 1 および Fr. 2 分画には抗原性が認められたが、Fr. 3 分画は抗原性を示さなかった。そこで供試菌の各抗原の性状を寒天二重拡散法によって比較検討した (Fig. 4)。*B. bassiana* 血清型 B₁ blastospore 血清に対し

Fig. 3. Chromatography of gel-filtrated polysaccharide fraction of *B. bassiana* strain F1, *P. fumosoroseus*, or *P. lilacinus* on DEAE-cellulose. Gel-filtration polysaccharide fraction: Polysaccharide fraction of Fig. 2. Column size: 2×20 cm, flow rate: 10 ml/hr, fraction: 5 ml. Stepwise elution with 0.005 M phosphate buffer (pH 7.0) (pb) (Fr. 1), pb+0.1 M NaCl (Fr. 2) and pb+0.5 M NaCl (Fr. 3). OD_{620m}: ANTHRONS method.

Fig. 4. OUCHTERLONY's double diffusion test. (A) Antiserum against blastospores of *B. bassiana* strain F1, (1) Fr. 1 of *B. bassiana* strain F1, (2) Fr. 2 of *B. bassiana* strain F1, (3) Fr. 1 of *P. fumosoroseus*, (4) Fr. 2 of *P. fumosoroseus*, (5) Fr. 1 of *P. lilacinus*, (6) Fr. 2 of *P. lilacinus*.

Fig. 5. OUCHTERLONY's double diffusion test. (A) Antiserum against blastospore of *B. bassiana* strain F1 and polysaccharides of (1) *B. bassiana* strain F1, (2) *B. brongniartii*, (3) *P. fumosoroseus*, (4) *P. lilacinus*, (5) *N. rileyi*, and (6) *P. farinosus*.

て *B. bassiana* 血清型 B₁, *P. fumosoroseus* の Fr. 1, Fr. 2 分画は同一の沈降線を形成したが, *P. lilacinus* の Fr. 1 および Fr. 2 分画は反応しなかった。また *B. bassiana* 血清型 B₁, *P. fumosoroseus* の Fr. 1 および Fr. 2 分画間ではスパーの形成は認められなかった。

次に, 抗 *B. bassiana* 血清型 B₁ blastospore 血清に対する *B. bassiana* 血清型 B₁, *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *P. farinosus*, *N. rileyi* の各粗多糖分画の抗原性を検討した結果を Fig. 5 に示す。抗 *B. bassiana* 血清型 B₁ blastospore 血清に対し *B. bassiana*, 血清型 B₁, *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus*, *P. farinosus* の粗多

糖は同一の沈降線を形成したが, *P. lilacinus* および *N. rileyi* においては沈降線の形成が認められなかった。

考 察

B. bassiana 血清型 B₁ の blastospore および菌糸に存在する耐熱性の共通抗原の抽出法を検討した結果, 1/15 M リン酸緩衝液, 130~140°C, 5 時間処理が最も良好であった。精製多糖抗原を寒天二重拡散法によって検討した結果, *B. bassiana* 血清型 B₁, *P. fumosoroseus* の Fr. 1, Fr. 2 には共通抗原が存在することが明らかになった。また硬化病菌の粗多糖抗原について検討した結果, 抗原性からみて *B. bassiana* 血清型 B₁, *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus* 群と *P. lilacinus*, *N. rileyi* 群とに大別することができた。*Paecilomyces* 属の *P. fumosoroseus*, *P. farinosus* が *Beauveria* 属の *B. bassiana*, *B. brongniartii* との間に共通抗原が認められる一方, 同じ *Paecilomyces* 属の *P. lilacinus* の多糖抗原の性状が前 2 種と異なったが, 今後さらに *Paecilomyces* 属の菌種を増やし, それらの多糖抗原の性状を比較検討したい。

Candida 属では耐熱性表層抗原の特異性は多糖の特異性に起因することが, 多糖の沈降反応における特異性と PMR スペクトルパターンから裏づけされている(篠田, 1972)。硬化病菌 blastospore 抗原も耐熱性であるが, その特異抗原ならびに所在については今後の検討を必要とする。

摘 要

Beauveria bassiana 血清型 B₁ 菌体から種々の方法で抗原を抽出した結果, 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 130~140°C, 5 時間の加熱による抽出物が沈降反応において最も高い抗原価を示した。*B. bassiana* 血清型 B₁, *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces farinosus* および *N. rileyi* の菌体からも上述の方法で抗原を抽出することができた。*B. bassiana* 血清型 B₁, *P. fumosoroseus* および *P. lilacinus* からはさらに Sephadex G-100 によるゲル濾過, DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにより抗原の精製を行ったが, これらの抗原は多糖であった。抗 *B. bassiana* 血清型 B₁ blastospore 免疫血清に対する反応から供試糸状菌 6 種は *B. bassiana* 血清型 B₁, *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus*, *P. farinosus* 群と *P. lilacinus*, *N. rileyi* 群とに大別することができた。また, 菌糸には blastospore と共通の抗原が存在することを蛍光抗体法によって確かめた。

引用文献

- AZUMA, I., H. KIMURA and Y. YAMAMURA (1968) Purification and characterization of an immunologically active glycoprotein from *Aspergillus fumigatus*. J. Bacteriol. **96**: 272—273.
- FREEMAN, G.G. (1942) The preparation and properties of a specific polysaccharide from Bact. *tryphosum* Ty₂. Biochem. J. **36**: 340—356.
- OUCHTERLONY, Ö. and L.A. NILSSON (1967) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of Experimental Immunology. (D.M. WEIR, ed.), Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publication, pp.

655—706.

- 篠田孝子 (1972) *Candida* 多糖体の P.M.R. スペクトルと免疫学的特異性に関する研究. 日細菌雑 **27**: 27—34.
- 鈴木益子・鈴木茂生・横田勝司・坂口 平 (1966) 真菌の生化学的免疫化学的研究 (第 5 報). *Aspergillus fumigatus* 菌体抗原の化学的性状. 日細菌雑 **21**: 114—118.
- 武田則行・鈴木茂生 (1974) 黒色分芽菌症の免疫化学的研究 I. 3 種の *Hormodendrum* 属糸状菌, *Hormodendrum pedrosoi*, *H. compactum* および *H. dermatitidis* の菌体および培養濾液から抗原活性多糖類の分離精製. 日細菌雑 **29**: 369—378.
- TRVELYAN, W.E. and J.S. HARRISON (1952) Studies on yeast metabolism 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. Biochem. J. **50**: 298—303.

時 報

日本農学大会ご案内

日 時: 昭和 62 年 4 月 6 日 (月) 午前 10 時より

会 場: 東京大学山上会館

1. 日本農学賞授与式, 2. 読売農学賞授与式, 3. 受賞者講演, 4. シンポジウム, 5. 祝賀会

昭和 62 年度 シンポジウム: 先端技術による日本農業の展開—開発応用の現状—

ランドサット利用による土壌の情報化とその応用

日本土壌肥料学会 福原道一

レーザービーム測定の大区画圃場整備への応用

農業土木学会 山路永司

農業機械における新技術利用

農業機械学会 田中 孝

植物組織培養における環境調節

日本農業気象学会 古在豊樹

受精卵移植技術の普及に伴う肉牛生産構造の変化

—予測的検討を中心に—

日本畜産学会 栗原幸一

第 1 回国際野生動物保護会議開催

1987 年 7 月 14—19 日 北京市の Great Wall Sheraton ホテルで上記国際会議が開催されます。

主催者は中国科学技術国際会議センター, 中国フィルム株式会社 (香港)。

公用語は英語で発表論文は, 主として次の 5 テーマに限られます。1) 絶滅危機種, その習性と環境, 2) 種の保存と経済発展, 3) 合理的利用と保存, 4) 公衆の教育, 5) 管理と行政。

連絡先: The Conference Secretariat, Sino Films (China) Ltd.

Suite 708-9, Block B, Watson's Estate North Point, Hong Kong

Tel. 5-663113, Telex 63175 SINOI HX