トマト葉に存在するミナミキイロアザミウマの摂食阻害物質

——単離と同定——¹⁾

平野千里・八隅慶一郎²⁾・伊藤栄治・金 哲史・堀池道郎

高知大学農学部

A Feeding Deterrent for *Thrips palmi* KARNY (Thysanoptera: Thripidae) Found in Tomato Leaves: Isolation and Identification. Chisato HIRANO, Keiichiro YASUMI,³⁾ Eiji ITOH, Chul-Sa KIM and Michio HORIIKE (Bioactive Resources Research Laboratory, Kochi University, Nankoku-shi, Kochi 783, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **38**: 109–120 (1994).

Despite its polyphagous nature, *Thrips palmi* does not really attack tomato plants. In efforts to elucidate the chemical basis responsible for the tomato's resistance, a crystalline compound possessing strong antifeeding activity for this insect species was isolated from tomato leaves by means of methanol extraction, water/butanol partition, silica gel chromatography, and preparative high-performance liquid chromatography. According to responses to certain test reagents, qualitative and quantitative LC profiles of component sugars, melting point, specific rotation, UV-, IR-, MS-, ¹H-NMR- and ¹³C-NMR-spectra, the compound was identified as α -tomatine, a known steroidal glycoalkaloid in tomato plants. The immunity of tomato plants to *T. palmi* is explained solely by the occurrence of α -tomatine, because *T. palmi* does not use airborne information (attractants/repellents) to avoid tomato leaves, and tomato leaves apparently provide the required phagostimulants and nutrients.

Key words: *Thrips palmi*, host selection, tomato plant, α -tomatine, antifeedant

緒 言

ミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* KARNY は典型的な広食性害虫であるが、例外的にトマトを加害しない。その理由を寄主選択論的に解析する一連の研究で、本種は遠距離からの寄主探索行動において植物起源の情報によって寄主植物とトマトとを識別していないこと(平野ら, 1990)、近距離からの寄主探索においても植物起源の情報によってトマトを識別していないばかりか、植物と非植物の間さえ識別していないらしいこと(HIRANO et al., 1993)、圃場でトマト葉への産卵がほとんどみられない理由として、葉上に生息する虫数が極端に少ない上、積極的な産卵阻害作用の存在も推定されること(平野ら, 1991)、トマト葉には生存を抑制する作用があること(八隅ら, 1991 a)などが明らかになった。

このうち、トマト葉に存在する生存抑制作用は極めて強力で、本種がトマトを攻撃できない主要な原因になっている。八隅ら(1991 b)はこの生存抑制作用について検討を加え、(1) 活性はトマト茎葉からメタノールで抽出され、抽出物を水に懸濁して各種有機溶媒と振ると、特異的にブタノール層に分配されること、および(2) 活性の発現は強力な摂食阻害作用によることを明らかにした。

その後の実験で、この摂食阻害作用を示す成分が単離され、その化学構造も明らかになったので、ここに報告する。

実験にあたり種々ご便宜をはかられた日本植物防疫協会研究所高知試験農場、塩野義製薬株式会社中央研究所および同社油日ラボラトリーズの各位に厚くお礼申しあげる。

1) 本文の一部は日本昆虫学会四国支部第 30 回大会(1991 年 6 月, 香川県高瀬町)および日本昆虫学会第 51 回大会・日本応用動物昆虫学会第 35 回大会合同大会(1991 年 10 月, 静岡市)で発表した。

2) 現在 塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズ

3) Present address: Aburahi Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Koka-cho, Shiga 520-34, Japan.

1993 年 11 月 16 日受領 (Received 16 November 1993)

1994 年 1 月 29 日登載決定 (Accepted 29 January 1994)

材料および方法

1. 摂食阻害物質の単離

供試虫および供試植物：実験に用いたミナミキイロアザミウマは日本植物防疫協会研究所高知試験農場のナス圃場から採取した雌成虫である。トマト(品種：桃太郎)は高知大学農学部構内で栽培し、適宜供試した。

生物検定法：精製段階の各画分、単離成分あるいは標準化合物の摂食阻害活性は、八隅ら(1991 b)にしたがって、つぎのように評価した。被検液は原則として1 g当量の被検体(新鮮トマト葉1 gに由来する被検体)を1 ml メタノールに溶解して調製した。その0.05 mlをペーパーディスク(厚手濾紙、直径8 mm)に浸みこませ、風乾後3% ショ糖水溶液0.05 mlを浸みこませた。処理ペーパーディスクをポリエチレンカップ(上部直径68 mm, 下部直径48 mm, 高さ36 mm)の底におき、雌成虫5頭を入れ、蓋をして温度 $24.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 、明期16時間/暗期8時間の条件下で7日間飼育した。ペーパーディスクは毎日更新し、その際に生存頭数を記録した。対照として、水あるいは3% ショ糖水溶液をそれぞれ0.05 ml ずつ浸みこませたペーパーディスクをポリエチレンカップに入れて、雌成虫に与えた(水対照区および3% ショ糖水溶液対照区)。検定は原則として各区20反復(20カップ)おこなった。

粗活性成分の調製：新鮮なトマト葉1 kgを80% メタノール5 lに浸漬し、3日間室温下暗所においた。濾過後、浸出液を 40°C 減圧下で約300 mlまで濃縮し、石油エーテル(200 ml×3回)、ジエチルエーテル(200 ml×3回)、酢酸エチル(200 ml×4回)および水飽和ブタノール(200 ml×5回)で順次抽出した。活性をもつ水飽和ブタノール画分をブタノール飽和水200 mlで3回洗浄した後、減圧で濃縮乾固した。

シリカゲルカラムによる精製：粗活性成分をメタノール20 mlに溶解し、その4 ml(200 g当量)を5 gのシリカゲル(Wako-gel C-300)に吸着させた。減圧下でメタノールを除き、ガラスカラム(直径24 mm×300 mm)に充填したシリカゲル40 gの上におき、各200 mlのクロロホルム、クロロホルム/メタノール(7:3)、クロロホルム/メタノール(1:1)およびメタノールを順次流した。各溶出画分を減圧濃縮し、1 g当量/mlになるようメタノールに溶解して生物活性を調べた。

高速液体クロマトグラフ(HPLC)による分析：シリカゲルカラムで精製した活性画分をHPLCで分析した。カラムはCapcell Pak C-18 S-5 μm (直径4.6 mm×250

mm), 溶媒はアセトニトリル/0.1 N 酢酸アンモニウム水溶液(37.5:62.5), 流速は毎分1 ml, 検出器はWaters R-401 示差屈折計であった。

イオン交換樹脂による補助成分の分画：シリカゲルカラムからクロロホルム/メタノール(7:3)およびメタノールで溶出した画分を合わせ、水に溶解し、陰イオン交換樹脂(Dowex 1×8, 200~400 メッシュ, ギ酸型)を充填したガラス管(直径12 mm×40 mm)に注ぎ、水20 mlおよび濃ギ酸(98%)30 mlで溶出した。水溶出部を中性・塩基性部、ギ酸溶出部を酸性部とし、それぞれ減圧下で濃縮乾固した後、1 g当量/mlになるようメタノールに溶解し、活性成分に加えて生物活性を調べた。

pHの測定：新鮮なトマト葉100 gをジュースァーで磨砕し、吸引濾過して搾汁を得、その水素イオン濃度を日立-堀場pHメーターF-7によって測定した。

有機酸の分析：新鮮なトマト葉100 gをジュースァーで磨砕し、水200 mlを加えて吸引濾過し、濾液に水を加えて400 mlに定容した。その5 mlをいったんSep-Pak C18(Waters製)に保持させた後、水5 mlで溶出し、HPLCで分析した。カラムはCapcell Pak C-18 S-5 μm (直径4.6 mm×250 mm), 溶媒は5 mM リン酸アンモニウム水溶液(pH 2.5), 流速は毎分1 ml, 検出器は日立L-4000 紫外吸収検出計(波長:210 nm)であった。有機酸標準物として和光純薬工業より入手した特級試薬を使用した。

2. 摂食阻害成分の同定

α -トマチン標準物およびトマチジン標準物：Sigma Chem. Co.より購入した。

加水分解物の調製(呈色/沈澱テストおよびスペクトル測定用)：被検結晶および α -トマチン標準物それぞれを各120 mgとり、0.55 N 硫酸11 ml中で24時間加熱還流した。冷却後炭酸水素ナトリウム飽和水溶液で中和し、クロロホルムで抽出した。抽出画分をアグリコン部として、各種テストおよびスペクトル測定に使用した。また水層について糖(還元力)の検出をおこなった。

加水分解物の調製(糖分析用)：結晶1 mg, 1 N 塩酸0.5 mlおよび水2 mlをテフロン製バイアルに入れ、密閉した後、マイクロウエーブ(ナショナル電子レンジNE-A-435, 500 W)を3分間照射した。

呈色/沈澱テスト：結晶とその酸加水分解物について、常法により各種のテストをおこなった。使用した試薬/反応は2,4-ジニトロフェニルヒドラジン、ニンヒドリン、Bouchardat 試薬(ヨウ素ヨウ化カリ)、Dragendorff 試薬(ヨウ化カリピスマス)、Mayer 試薬(ヨウ化

水銀ヨウ化カリ), Fehling 反応, Liebermann-Burchard 反応, Molisch 反応, Salkowski 反応であった。

融点測定: Yanako 微量融点測定器 (熱板法) で測定し, 未補正值で示した。

旋光度測定: 試料 11 mg をピリジン 2 ml に溶解し, 堀場高感度旋光度計 Sepa-200 で測定した。

糖の分析: マイクロウエーブ照射により得られた酸加水分解物を Dionex Ion Exchanger System (分析用) に導入し, 標準単糖類と保持時間およびピーク面積を比較した。カラムは Carbpac-PAI Bio-LC (直径 9 mm × 250 mm), 溶媒は 0.1 N 水酸化ナトリウム, 流速は毎分 2 ml, 検出器は Pulsed Amperometric Detector, 検出電位は E1 + 0.1 V, E2 + 0.6 V, E3 - 0.8 V であった。

紫外吸収スペクトル (UV): 日立分光光度計 150-20 型を用い, メタノール溶液で測定した。

赤外吸収スペクトル (IR): 島津 FTIR-4300 を用い, KBr 錠剤法 (試料 2 mg + KBr 200 mg) で測定した。

質量スペクトル (MS): 日立 M-80 質量分析計を用い, 結晶および α -トマチン標準物については SIMS モード (マトリックス: グリセリン) で, また調製したアグリコンおよびトマチジン標準物については EI モード (70 eV) で測定した。

^1H 核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR): 被検結晶および α -トマチン標準物は重メタノール中で, またそれぞれのアグリコンは重クロロホルム中で, TMS を内部標準として Jeol GSX-270 により測定した。

^{13}C 核磁気共鳴スペクトル (^{13}C -NMR): 被検結晶および α -トマチン標準物は重ピリジン中で, またそれぞれのアグリコンは重クロロホルム中で, TMS を内部標準として Jeol GSX-270 により測定した。

3. α -トマチンの生物活性と分布

α -トマチン標準物およびその関連化合物: Sigma Chem. Co. より購入した。

供試植物: トマト (品種: 桃太郎), ナス (千両) およびジャガイモ (男爵) は高知大学農学部構内で栽培し, 適宜採取して供試した。

供試虫および生物検定法: 前実験と同様である。ただし α -トマチンは塩酸塩として 3% ショ糖水溶液に溶解し, 雌成虫に与えた。また各種関連化合物 (配糖体およびアグリコン) の活性を比較する実験では, それぞれの溶解特性が異なるため, 各 1.5 mg をメタノール 1 ml に溶解し, これにナス葉のメタノール抽出物/ブタノール画分 2 g 当量を加えて, 被検液とした。

α -トマチンの定量: 植物体のメタノール抽出物/ブタノール画分を 10 g 当量/ml になるようメタノールに溶解し, HPLC で定量した。HPLC 運転条件は, カラム: Capcell Pak C-18 SG120 Å (直径 4.6 mm × 150 mm), 溶媒: アセトニトリル/0.1 N 酢酸アンモニウム水溶液 (37.5: 62.5), 流速: 毎分 0.5 ml, 検出器: Waters R-401 示差屈折計であった。

結 果

1. 摂食阻害物質の単離

トマト葉のメタノール抽出物/ブタノール画分に存在する摂食阻害成分を, シリカゲルクロマトグラフィおよび高速液体クロマトグラフィによって精製し, 結晶として単離した。また活性発現に関与する補助成分の存在ならびに活性成分の溶解性について検討した。活性成分の抽出分画化手順を Fig. 1 に示す。

(1) シリカゲルカラムによる精製

トマト葉 1 kg のメタノール可溶画分を水飽和ブタノールで抽出し, 乾物 1,250 mg を得た。この抽出物は Fig. 2 に示すように, 雌成虫にたいして強い摂食阻害活性をもつ。その 200 g 当量をシリカゲルカラム (クロロホルム/メタノール系溶媒) で分画し, 4 画分を得た (溶出順に A, B, C, D 画分と呼ぶ)。各溶出画分についてその生物活性を調べたが, 強い活性はどの画分にもみられなかった (Fig. 2)。そこで三つの画分を組合せて雌成虫に与えたところ, C 画分を含む組合せのみに活性が認められた (Fig. 3)。この結果から, 1) 活性は複数成分によって発揮されること, 2) 活性の主成分は C 画分に存在すること, 3) 補助成分は必ずしも特定の化合物である必要はないと推定されること, などが明らかになった。

活性の主成分が含まれる C 画分は, 乾物として 110 mg (新鮮茎葉の 0.055%) 得られた。

(2) HPLC 分取による活性成分の単離

活性成分を含む C 画分は, HPLC で主要な 1 ピーク以外に微量の数ピークを与えた (Fig. 4)。そこで最初に溶出する区分, 主要ピークの区分, および遅れて溶出する区分の三つに分取した (それぞれ C-1, C-2, C-3 画分と呼ぶ)。溶媒を留去し, Sep-Pak C18 で脱塩し, 所定濃度のメタノール溶液として, 生物活性を検定したところ, 何れの画分も活性を示さなかった。しかしそれぞれに, 前記シリカゲルカラムからの B 画分および D 画分を加えると, C-2 画分との組合せのみに活性が認められた (Fig. 5)。この結果から, 主要ピークが活性成分と判

Fig. 1. Extraction and fractionation procedure for feeding deterrent in tomato leaves.

Fig. 2. Survivorship curves for female *T. palmi* on filter paper discs containing 3% aqueous sucrose solution and silica gel column-fractions of MeOH/BuOH extract of tomato leaves. ●: crude MeOH/BuOH extract of tomato leaves, □: fraction A, eluted from silica gel column with chloroform, ▲: fraction B, eluted with chloroform/MeOH 7:3, ■: fraction C, eluted with chloroform/MeOH 1:1, ○: fraction D, eluted with MeOH.

Fig. 3. Survivorship curves for female *T. palmi* on filter paper discs containing 3% aqueous sucrose solution and mixtures of fractions A, B, C and D. □: mixture of fractions A, B and D, ▲: mixture of fractions A, C and D, ○: mixture of fractions B, C and D, ●: mixture of fractions A, B, C and D.

断された。またこの段階で、活性成分は水不溶の白色結晶として析出し、メタノールから再結精製された。

(3) 補助成分の検討

活性成分は結晶として単離されたが、活性発現には補助成分が共存しなければならない。必ずしも特定の化合物である必要はないと考えられる補助成分は、どのような条件を満たす物質であるのか、検討した。

前記シリカゲルカラムで分画されたB画分とD画分(いずれも補助成分としての活性がみられる)を合わせ、

イオン交換樹脂で酸性部および中性・塩基性部に分け、それぞれを活性成分に加えて雌成虫に与えたところ、酸性部を加えた場合のみ活性が認められた (Fig. 6)。この結果から補助成分であるための条件は、酸性物質であると考えられた。

(4) 活性成分の溶解性

摂食阻害活性の主成分として単離された結晶は水に不溶性である。しかし吸汁摂食性の本種にたいして活性を示す以上、吸汁対象の細胞液中では溶解していなければならない。そこで、活性を示すために必要な補助成分の

役割との関連も考慮し、活性成分の存在する環境としてのトマト葉搾汁について検討を試みた。

トマト葉の搾汁について水素イオン濃度を測定したところ、pH 5.72 (16.4°C) であった。また主要な遊離有機酸として、HPLC 分析によってクエン酸 (1.73 mg/g)、コハク酸 (1.36 mg/g)、L-リンゴ酸 (1.55 mg/g) および痕跡量の酒石酸、 α -ケトグルタル酸、マロン酸が検出された。

Fig. 4. HPLC (ODS column) elution profile of fraction C.

Fig. 5. Survivorship curves for female *T. palmi* on filter paper discs containing HPLC-fractions of fraction C, 3% aqueous sucrose solution and fractions B and D. ●: fraction C-1, eluted earlier from HPLC column than main constituent (Fig. 4), ■: fraction C-2, consisting of main constituent, ○: fraction C-3, eluted later than main constituent.

Fig. 6. Survivorship curves for female *T. palmi* on filter paper discs containing HPLC-fraction C-2 crystal and 3% aqueous sucrose solution, with acidic fraction (●) or neutral/basic fraction (■) of combined fractions B and D.

Fig. 7. Survivorship curves for female *T. palmi* on filter paper discs containing indicated organic acids and 3% aqueous sucrose solution, with (●) or without (○) fraction C-2 crystal.

試みに活性成分の結晶 1 mg (約 1 g 当量) を、クエン酸標準物の 1% 水溶液 1 ml に投入したところ、容易に溶解した。この溶液を所定濃度のショ糖水溶液とともにペーパーディスクに浸みこませ、雌成虫に与えたところ、強い生物活性を示した (Fig. 7)。結晶はクエン酸水溶液ばかりでなく、コハク酸あるいは L-リンゴ酸の 1% 水溶液にもよく溶解し、それぞれ生物活性を示した。もちろんこれらの有機酸は単独では活性をもたなかった。以上の結果から、トマト葉中の有機酸が共存すれば、活性成分は水に溶解して強い活性を示すことが確認された。酸性の補助成分は活性本体の水溶性を高める役割を果たす成分であったと推定される。

なお水不溶性の結晶が、酸性下で容易に水に溶解したことは、活性成分が塩基性化合物であることを示唆している。

2. 摂食阻害物質の同定

結晶として単離された摂食阻害成分の化学構造を明らかにするため、各種呈色／沈澱テスト、融点、旋光度ならびに各種スペクトルの測定をおこなった。

(1) 呈色／沈澱テスト

結晶は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンおよび Fehling テストには反応しなかったが、Molisch テストには反応し、配糖体と推定された。そこで酸加水分解産物について各種のテストをおこなった。結果を Table 1 に示す。水層は強い還元力 (Fehling テスト) を示した。またアグリコン部の反応は Liebermann-Burchard テスト、ニンヒドリンおよび Dragendorff 試薬には陰性であったが、Salkowski テスト、Bouchardat 試薬および Mayer 試薬には陽性であった。以上から結晶がアルカロイド配糖体である可能性が推定された。

トマトの既知アルカロイド配糖体である α -トマチンおよびそのアグリコンであるトマチジンについて上記呈色反応を試みた結果、被検結晶およびその酸加水分解産物から得られたアグリコンの反応と、それぞれ完全に一致した。

Table 1. Responses of acid-hydrolysate of fraction C-2 crystal to selected chemical tests

Test	Responses
Fehling test for reducing sugars	+
Liebermann-Burchard test for Δ^5 steroid	—
Salkowski test for steroid	+
Bouchardat test for alkaloid	+
Dragendorff test for alkaloid	—
Mayer test for alkaloid	+
Ninhydrin test for primary amines	—

(2) 融点および旋光度

融点 (分解点) は 265~267°C で、 α -トマチンについての文献値 263~267°C (Fontaine et al., 1948) あるいは 260~265°C (Schreiber, 1964) と一致し、さらに α -トマチン標準物と混融しても融点の降下はみられなかった。

比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は -29.09° (ピリジン中) で、 α -トマチンについての文献値 -30° (Kuhn und Low, 1948) あるいは -29.5° (Schreiber, 1964) と近く、また α -トマチン標準物の比旋光度と完全に一致した。これらの結果は、被検結晶が α -トマチンであることを強く支持している。

(3) 糖の同定

呈色／沈澱テストから、活性成分分子中に糖の存在一配糖体として一が強く示されたので、糖成分の同定を試みた。その結果、酸加水分解物中からガラクトース、グルコースおよびキシロースが検出され、それらの濃度比はほぼ 1 : 2 : 1 であった (Fig. 8)。構成糖の種類および濃度比は α -トマチンのそれと一致し (Kuhn et al., 1950)、また α -トマチン標準物の水解物についての分析

Fig. 8. HPLC (Carbopac-PAI Bio-LC column for sugars) elution profile of acid hydrolysate of fraction C-2 crystal. The superimposed chromatogram is of a 1 : 2 : 1 mixture of authentic galactose (peak 1), glucose (peak 2) and xylose (peak 3).

Fig. 9. IR spectrum of fraction C-2 crystal.

Fig. 10. Mass spectrum of fraction C-2 crystal.

結果とも一致した。糖成分に関する情報も、被検結晶が α -トマチンである可能性を否定しない。

(4) 各種のスペクトル

被検結晶, α -トマチン標準物, それぞれの酸加水分解

物から得たアグリコンおよびトマチジン標準物について, UV, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ の各スペクトルを測定比較した。

被検結晶および α -トマチン標準品はともに, UV 領

Fig. 11. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of fraction C-2 crystal.

Fig. 12. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of fraction C-2 crystal.

域に最大吸収をもたなかった。IR は $3,430\text{ cm}^{-1}$ 付近にみられた OH 基の強い吸収をはじめ、全領域で α -トマチン標準品のそれとよく一致した (Fig. 9)。MS は α -トマチン標準品と一致し、それぞれ分子イオン、トマチジン+ヘキソース、トマチジンおよびトマチジン- CH_3 と推定される m/z 1034, 578, 416, 401 が認められた (Fig. 10)。被検結晶と α -トマチンの ^1H -NMR および ^{13}C -NMR もそれぞれよく一致した (Fig. 11, Fig. 12)。

被検結晶および α -トマチン標準物の酸加水分解物から得たアグリコン、ならびにトマチジン標準物についての IR, MS, ^1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトルも、それぞれ互いによく一致した。一例として ^{13}C -NMR の化学シフトを Table 2 に掲げる。

以上の結果から、被検結晶は α -トマチンと同定された。

Table 2. ^{13}C -NMR chemical shifts of aglycons prepared from fraction C-2 crystal and authentic α -tomatine, and of authentic tomatidine (ppm, in deuterized chloroform)

C-atom position	Hydrolysate of Fr. C-2 crystal	Hydrolysate of authentic α -tomatine	Authentic tomatidine	Reference (BIRD et al., 1979)
C1	37.0	37.0	37.0	37.1
C2	31.5	31.5	31.4	31.6
C3	71.3	71.3	71.2	71.2
C4	38.2	38.2	38.1	38.3
C5	44.8	44.8	44.8	44.9
C6	28.6	28.6	28.6	28.7
C7	32.3	32.3	32.3	32.3
C8	35.1	35.1	35.0	35.1
C9	54.4	54.4	54.4	54.5
C10	35.6	35.6	35.5	35.6
C11	21.1	21.1	21.0	21.1
C12	40.2	40.2	40.2	40.3
C13	40.9	40.9	40.9	41.0
C14	55.8	55.8	55.7	55.9
C15	32.7	32.7	32.6	32.7
C16	78.5	78.6	78.6	78.5
C17	62.0	62.0	61.9	62.1
C18	16.9	16.9	16.9	17.0
C19	12.4	12.4	12.3	12.4
C20	43.0	43.0	42.9	43.1
C21	15.9	15.9	15.8	15.9
C22	99.1*	99.1*	99.0	99.1
C23	26.6	26.6	26.6	26.7
C24	28.6	28.6	28.6	28.7
C25	30.9	31.0	30.9	31.0
C26	50.2	50.2	50.1	50.3
C27	19.3	19.3	19.3	19.4

* Faint signal.

3. α -トマチンの生物活性と分布

トマト葉から得られた摂食阻害活性をもつ結晶は α -トマチンと同定された。この化合物は FONTAINE et al. (1948) がトマトから抗菌性成分として単離したステロイドアルカロイドの配糖体であるが、多種類の関連化合物が各種のナス科植物に分布している。 α -トマチン標準物およびその関連配糖体について摂食阻害活性を検討するとともに、数種植物におけるそれらの分布を調査した。

(1) α -トマチンの生物活性

α -トマチン標準物 (塩酸塩) はトマトから単離した結晶と同レベルの強い摂食阻害活性を示した (Fig. 13)。

Fig. 13. Survivorship curves for female *T. palmi* on filter paper discs containing 3% aqueous sucrose solution and α -tomatine · HCl at different concentrations. ○: α -tomatine · HCl, 0.08 mg/ml, ▲: α -tomatine · HCl, 0.16 mg/ml, ●: α -tomatine · HCl, 0.8 mg/ml, □: sucrose solution.

Fig. 14. Survivorship curves for female *T. palmi* on filter paper discs containing 3% aqueous sucrose solution and some steroid glycoalkaloids or their aglycons. ●: α -tomatine, ○: α -solanine, △: α -chaconine, ▲: solanidine, □: solasodine, ■: demissidine.

しかし *Solanum* 属植物から知られている関連配糖体 α -ソラニンおよび α -チャコニンの活性はごく弱かった。またステロイドアルカロイドのソラソジン、ソラニジン、デミンジンはまったく活性をもたなかった (Fig. 14)。

(2) α -トマチンの分布

まずトマト葉の粗活性画分 (メタノール抽出物/ブタノール画分) をメタノールに溶解し (10 g 当量/ml), α -トマチン濃度を HPLC で定量したところ, 10.7 mg/ml であった。トマト葉中の濃度に換算すると 1.07 mg/g, すなわち 0.107% である。

つぎに本種の寄主であるジャガイモおよびナスの葉について粗画分を調製し, HPLC で分析したが, α -トマチンはまったく検出されなかった。なお α -トマチン分析の HPLC 条件下で, α -トマチン関連化合物としてジャガイモ葉から α -ソラニンおよび α -チャコニンが検出された。

考 察

トマトがミナミキイロアザミウマに対して, 免疫性ともいえる強力な抵抗性を示すことはよく知られている。この抵抗性機構を解明する過程で, トマト葉は本種にたいして強い生存抑制作用をもっていることが判った (八隅ら, 1991 a)。八隅ら (1991 b) は生存抑制作用について検討を加え, この作用が摂食阻害作用であること, 活性成分はメタノールで容易に抽出されること, 水/ブタノール分配によって部分的に精製されることなどを明らかにした。

本研究では, 部分的に精製した摂食阻害成分をシリカゲルカラムクロマトグラフィおよび高速液体クロマトグラフィで精製単離し, 白色の結晶を得た。呈色テストの結果から, この結晶はアルカロイド配糖体と推定され,

トマトの既知配糖体である α -トマチンが一候補化合物として浮かびあがった。融点および比旋光度の測定結果は, いずれも α -トマチンについての文献値あるいは α -トマチン標準物の測定値と一致した。また加水分解物について糖成分を調べた結果, グルコース:ガラクトース:キシロースが約 2:1:1 の比率で認められ, α -トマチンを構成する糖成分と定性的定量的に一致した。さらに結晶およびその酸加水分解物のアグリコン部分について UV, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ の各スペクトルを測定したところ, すべてが α -トマチン標準物あるいはそのアグリコンであるトマチジンのスペクトルと一致した。

さらに α -トマチン標準物について生物活性を調べたところ, トマトから単離した結晶と同レベルの強い活性を示した。以上から, ミナミキイロアザミウマに対して強力な摂食阻害活性をもつトマト葉起源の結晶を, α -トマチン (Fig. 15) と同定した。

なお, 遊離の α -トマチンは水にほとんど溶解しない。このため, メタノール溶液としてペーパーディスクに浸み込ませシヨ糖水溶液で湿らせる通常の活性検定法では摂食阻害作用を示さない。しかし弱酸水溶液中では塩 (イオンペア) を形成してよく溶解し, 強い摂食阻害活性を発揮する。トマト葉の細胞液はクエン酸, リンゴ酸, コハク酸などの有機酸を含有するため弱酸性 (pH 5.72) であり, α -トマチンはよく溶解し, 摂食阻害活性を示すものと理解される。コロラドハムシ幼虫にたいする各種アルカロイドの生物活性を検討した BUHR et al. (1958) も, トマチンをクエン酸塩として供試している。

α -トマチンは FONTAINE らによってトマトに含まれる抗フザリウム菌成分として発見され, KUHN 一派らによってその構造が決定されたステロイドアルカロイド配糖体である (RODDICK, 1974)。昆虫に対する作用としては類縁化合物であるデミシンやレプチンと同様に, コロラドハムシ (*Lepitotarsa decemlineata*) の摂食を阻害すること (BUHR et al., 1958; KUHN et al., 1950; SCHREIBER, 1958; STURCKOW und Low, 1961) や, ヒメヨコバイ (*Empoasca fabae*) の吸汁を阻害して結果的に死亡率を高めること (DAHLMAN and HIBBS, 1967) が報告されている。またタバコガ (*Heliothis zea*) やシロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*) の幼虫生育を抑制することも知られている (BLOEM et al., 1989; ELLIGER et al., 1981)。

ジャガイモの害虫として著名なコロラドハムシはジャガイモと同属の *Solanum demissum* を摂食できない。ジャガイモの葉には α -ソラニンが, また *S. demissum* にはデ

Fig. 15. α -Tomatine.

ミシンが、というように、ナス科植物には各種のステロイドアルカロイド配糖体が含まれている。そしてこれら一連のステロイドアルカロイド配糖体の構造とコロラドハムシにたいする摂食阻害活性との間には興味ある関係—アグリコン部分のステロイド骨格に二重結合がなく、糖部分がキシロースを含む4個の単糖からなる配糖体、たとえば α -トマチンやデミシンは強力な摂食阻害活性をもつのにたいし、ステロイド骨格の5位に二重結合をもち、糖部分がキシロース以外の3個の単糖からなる配糖体、たとえば α -ソラニンや α -チャコニンは摂食阻害作用をもたない—がある (SCHREIBER, 1958)。

ミナミキイロアザミウマに対する α -トマチンおよび関連化合物の生物活性をみると、 α -トマチンは強力な摂食阻害作用をもつが、 α -ソラニンおよび α -チャコニンの活性はごく弱い。興味あることに、この摂食応答は、コロラドハムシでみられた構造-活性相関とかなりよく一致している。本種の摂食応答については供試した化合物数が少ないため、最終的な結論を下す段階ではないが、全く異なった2種類の昆虫間で、もしも共通の構造-活性相関が認められれば、味覚生理学的にも興味あるテーマとなるであろう。

昆虫の寄主選択において、摂食阻害物質が重要な役割をはたしている例は多い。たとえば、コロラドハムシにたいする一連のナス科ステロイドアルカロイド配糖体、トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*) にたいするタイヌビエ (*Echinochloa crus-galli* var. *oryzicola*) の (E)-アコニット酸 (KIM et al., 1976), 同じくシコクビエ (*Eleusine coracana*) のリンゴ酸, イソクエン酸, *p*-ヒドロキシ安息香酸, ヴァニリン酸など多数の酸性成分 (金, 1992), トノサマバッタ (*Locusta migratoria*) やムギミドリアブラムシ (*Schizaphis graminum*) にたいするソルガム (*Sorghum bicolor*) の耐虫性品種に含まれる青酸配糖体ズーリン, プロシアニジン, および *p*-ヒドロキシベンズアルデヒド (DREYER et al., 1981; WOODHEAD and BERNAYS, 1978) などである。本研究で明らかにされたミナミキイロアザミウマに対するトマトの α -トマチンも、その好例であろう。

最後に、本研究の結果をふまえて、広食性昆虫であるミナミキイロアザミウマがトマトを加害できない理由、言い替えればトマトの示す強力なミナミキイロアザミウマ抵抗性の機構について、言及しておきたい。ミナミキイロアザミウマの寄主選択に関連して検討した限り、誘引、忌避、定着、産卵刺激、摂食刺激などの諸因子、あるいは栄養価や有毒成分の有無については、トマトと寄

主となりうる他の植物との間に明瞭な差異を認めることができなかった (平野ら, 1990, 1991; HIRANO et al., 1993; 八隅ら, 1991 b)。寄主植物の探索、発見あるいは定着の段階で、寄主非寄主の識別のために植物起源の情報を利用しないミナミキイロアザミウマは、偶然到着した植物にたいして無差別に吸汁を試みると考えられる。寄主となり得る植物葉では、寄主寄生者関係の成立に否定的に働く要因はなく、アザミウマは継続的な吸汁をおこなひ、やがて産卵も開始するのであろう。一方、トマト葉では、存在する摂食阻害物質 α -トマチンのため吸汁できない。その結果アザミウマはトマト葉上に定着することなく徘徊しつづけ、ついにはトマト植物体から離脱していくと推定される。トマト葉上にアザミウマが生息しない理由として、とくに積極的な移動促進因子の存在を考える必要はない。

摂食阻害物質とは別に、トマト葉の産卵抑制作用も示唆されているが、トマトのアザミウマ抵抗性を構成する要素としてはそれほど重要ではないと考えられる (平野ら, 1991)。野外のトマト葉に産卵がみられない主因は、産卵抑制作用によるというよりも、本種がトマト葉上に生息しない (できない) ためである。以上のようにトマトのアザミウマ抵抗性は、摂食阻害作用をもつ α -トマチンの存在だけで完全に説明できる。

摘 要

ミナミキイロアザミウマに対して強力な摂食阻害作用をもつ成分をトマト葉からメタノールで抽出し、水/ブタノール分配で部分的に精製した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィおよび高速液体クロマトグラフィによって白色の結晶として単離した。

呈色/沈澱テストの結果から、この結晶はアルカロイド配糖体と推定された。融点および比旋光度の測定結果は、いずれも α -トマチンのそれと一致した。加水分解物の糖成分はグルコース、ガラクトースおよびキシロース (2:1:1) で、 α -トマチンを構成する糖成分と定性的定量的に一致した。結晶本体およびその酸加水分解物のアグリコン部分について、各種スペクトルを測定したところ、すべて α -トマチン標準物あるいはそのアグリコンであるトマチジンのスペクトルと一致した。

α -トマチン標準物およびトマト葉から単離した結晶は、いずれも水に溶解せず、摂食阻害作用を示さない。しかしトマト葉汁液に存在するクエン酸、リンゴ酸、コハク酸の水溶液中ではイオンペアーを形成してよく溶解し、いずれも強い摂食阻害活性を発揮した。

以上の結果から、ミナミキイロアザミウマに対して強力な摂食阻害活性をもつトマト葉起源の結晶を、 α -トマチンと同定した。トマトの示す強力なミナミキイロアザミウマ抵抗性は α -トマチンの摂食阻害作用のみによってよく説明される。

引用文献

- BIRD, G.J., D.J. COLLINS, F.W. EASTWOOD and R.H. EXNER (1979) Assignment of the ^{13}C -N.M.R. spectra of some 22,26-epimincholestanes, 22,26-epimincholest-22(*N*)-enes and some 3β -amino steroidal alkaloids. *Aust. J. Chem.* 32: 797—816.
- BLOEM, K.A., K.C. KELLEY and S.S. DUFFEY (1989) Differential effect of tomatine and its alleviation by cholesterol on larval growth and efficiency of food utilization in *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Chem. Ecol.* 15: 387—398.
- BUHR, H., R. TOBALL und K. SCHREIBER (1958) Die Wirkung von einigen Pflanzlichen Sonderstoffen, insbesondere von Alkaloiden, auf die Entwicklung der Larven des Kartoffelkaefers (*Leptinotarsa decemlineata* SAY). *Entomol. Exp. Appl.* 1: 209—224.
- DAHLMAN, D.L. and E.T. HIBBS (1967) Responses of *Empoasca fabae* (Cicadellidae: Homoptera) to tomatine, solanine, leptine I; tomatidine, solanidine, and demissidine. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60: 732—740.
- DREYER, D.L., J.C. REESE and K.C. JONES (1981) Aphid feeding deterrents in sorghum. Bioassay, isolation and characterization. *J. Chem. Ecol.* 7: 273—284.
- ELLIGER, C.A., Y. WONG, B.G. CHAN and A.C. WAISS, Jr. (1981) Growth inhibitors in tomato (*Lycopersicon*) to tomato fruitworm (*Heliothis zea*). *J. Chem. Ecol.* 7: 753—758.
- FONTAINE, T.D., G.W. IRVING, Jr., R. MA, J.B. POOLE and S.P. DOOLITTLE (1948) Isolation and partial characterization of crystalline tomatine, an antibiotic agent from the tomato plant. *Arch. Biochem.* 18: 467—475.
- 平野千里・神保 豊・八隅慶一郎・堀池道郎 (1990) トマト栽培ハウス内へのミナミキイロアザミウマの飛び込み. 四国植防 25: 53—55.
- 平野千里・神保 豊・伊藤栄治・八隅慶一郎・堀池道郎 (1991) ミナミキイロアザミウマのトマトへの産卵性. 四国植防 26: 81—83.
- HIRANO, C., E. ITOH, K. YASUMI and M. HORIIKE (1993) Short-distance walking responses of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) to tomato leaves. *Appl. Entomol. Zool.* 28: 233—234.
- KIM, M., H.-S. KOH, T. OBATA and H. FUKAMI (1976) Isolation and identification of trans-aconic acid as the anti-feedant in barnyard grass against the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (STAL) (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 11: 53—57.
- 金 哲史 (1992) ウンカ類の寄主選択に關与する植物成分の研究. 高知大学農学部紀要 58: 1—76.
- KUHN, R. und I. LOW (1948) Notiz über ein Alkaloidglykosid aus den Blättern einer Wildtomate. *Chem. Ber.* 81: 552—553.
- KUHN, R., I. LOW und A. GAUHE (1950) Über das Alkaloid-Glykosid von *Lycopersicum esculentum* var. *pruniforme* und seine Wirkung auf die Larven des Kartoffelkaefers. *Chem. Ber.* 83: 448—452.
- RODDICK, J.G. (1974) The steroidal glycoalkaloid α -tomatine. *Phytochemistry* 13: 9—25.
- SCHREIBER, K. (1958) Über einige Inhaltsstoffe der Solanaceen und ihre Bedeutung für die Kartoffelkaferresistenz. *Entomol. Exp. Appl.* 1: 28—37.
- SCHREIBER, K. (1964) *Solanum*-Alkaloide, XXXVII. Über die Alkaloidglykoside von *Solanum polyadenium* GREENM. *Liebig's Ann. Chem.* 674: 168—175.
- STURCKOW, B. und I. LOW (1961) Die Wirkung einiger *Solanum* Alkaloidglykoside auf den Kartoffelkafer, *Leptinotarsa decemlineata* SAY. *Entomol. Exp. Appl.* 4: 133—142.
- WOODHEAD, S. and E.A. BERNAYS (1978) The chemical basis of resistance of *Sorghum bicolor* to attack by *Locusta migratoria*. *Entomol. Exp. Appl.* 24: 123—144.
- 八隅慶一郎・少前保博・堀池道郎・平野千里 (1991 a) 数種植物葉上でのミナミキイロアザミウマの生存. 四国植防 26: 77—79.
- 八隅慶一郎・篠原寿文・堀池道郎・平野千里 (1991 b) ミナミキイロアザミウマの生存に及ぼすトマト葉成分の影響. 応動昆 35: 311—316.