帽菌類の鋸屑培地培養物抽出液 のタバコモザイクウイルス 感染阻止効果

高 木 康 至*・島 田 和 純*

Yasushi TAKAGI and Kadzuyoshi SHIMADA : Inhibitory Effect of Aqueous Extracts from the Saw Dust-Rice Bran Media with Grown Mycelia of Hymenomycetes on Tobacco Mosaic Virus Infection.

Abstract

Aqueous extracts from the saw dust-rice bran media with grown mycelia of Hymenomycetes (*Lentinus edodes* or *Flammulina velutipes*) strongly inhibited tobacco mosaic virus (TMV) infection. The saw dust-rice bran media with grown mycelia were good sources to obtain virus inhibitor from Hymenomycetes.

帽菌類抽出液の抗植物ウイルス作用については多くの報告があり、子実体抽出液^{1,2,3)}、培養菌糸体抽出液⁴⁾および培養液⁴⁾のいずれにもその作用が認められている。このことから、筆者らは、菌糸培養中に菌体外へ放出される作用物質の回収と菌糸体からの抽出を同時に行なえば効率よく抗植物ウイルス物質を得ることができるのではないかと考え、帽菌類の鋸屑培地での培養物を抽出材料とすることに着目した。今回はこの抽出液のタバコモザイクウイルス (TMV) に対する感染阻止作用を検討した結果を報告する。

供試菌は シイタケ, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. および エノキタケ, *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. の 2 種である。

ブナ鋸屑 4 重量部と米ぬか 1 重量部を混合して水分 70%とし、これを 500ml の広口瓶に約 200g 詰め、加圧滅菌して培地を調製した。本培地に供試菌を接種し、27°C で 58 日間培養したものを抽出材料とした。すなわち、培養物を細かくほぐし、これに 2 重量部の脱イオン水を加えて加熱し、汙紙による汉過と遠心分離（

3000rpm, 30分）によって沈殿物をのぞき、これを被検液とした。

ウイルス 感染阻止作用は TMV 普通系とタバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc) との系で半葉法⁵⁾により検定した。検定は TMV (2.5μg/ml) と被検液を 1 : 1 に混合して接種する方法により、1 試料についてタバコ 1 個体 (6 葉) を用いて 3 回反復した。感染阻止率 (%) は次式により算出した。感染阻止率 = $(1 - x/y) \times 100$ 。ただし、 x および y はそれぞれ処理区および対照区各 6 半葉の総病斑数である。

まずシイタケの鋸屑培養物を用いて抽出条件 (処理の温度と時間) を検討した。結果は Fig. 1 に示した。抽出液の褐変度 (OD 470nm) は処理温度の上昇と処理時間の延長にともなって増大したが、pH の変化はほとんど認められなかった。抽出液の TMV 感染阻止作用はオートクレーブを用いて加圧抽出することにより増大したが、処理時間を 20 分以上延長してもそれ以上の増大は認められなかった。したがって 120°C、20 分間の処理が効率的であると考えられる。

* 大塚化学薬品 (株) 技術部

Department of Technology, Otsuka Chemical Co. Ltd. Naruto, Tokushima, Japan.

1) Wiggs, D. N. (1968). Plant Dis. Rep. 52 : 528-529. 2) Signoret, P. A. et Alliot, B. (1969). Ann. Phytopathologie 1 : 533-539. 3) 都丸敬一・宇田川晃 (1975). 植物防疫 29 : 17-19. 4) Klin kowski, M. (1954). Mitt. Biol. Zentralanstalt Landa. Frostwirtschaft, Berlin-Dahlem No. 80 : 162-168. 5) 都丸敬一・日高醇 (1960). 植物ウイルス病一実験法と種類一 (日高他編), 朝倉書店, 東京, pp. 153-159.

Fig. 1. Inhibitory effect on TMV infection and some properties of aqueous extracts from the saw dust-rice bran medium with grown mycelia of *L. edodes* prepared by various heat treatments. Each point of inhibition (%) represents the mean of three trials and the vertical bars indicate ranges. Diluted extracts (1:10) were used for the measurement of colour intensity (OD₄₇₀).

シイタケとエノキタケの鋸屑培地培養物を120°C、20分間の処理で抽出したものについて、TMV感染阻止作用を検討した結果をFig. 2に示した。これら両抽出液はほぼ同等の阻止力を示し、希釈限界は2000倍以上と考えられた。

次に、これら鋸屑培地培養物からの抽出液のTMV感染阻止作用を評価するため、抽出材料を異にする帽菌類由来の各種抽出液との比較を行なった。用いた試料は1)子実体抽出液、2)菌糸体抽出液、3)液体培養菌糸の加熱抽出液、4)菌糸の液体培養液の熱処理液および5)液体培地(対照)である。子実体は市販のものを供試したが、2)~4)の試料は、150mlの液体培地(ショ糖5%, 酵母エキス日間振と0.5%, pH6.5)に菌糸を接種して27°Cで58う培養したものを材料として調製した。抽出はすべて

同一条件(2重量部の水を加えて120°C、20分間処理する)で行ない、菌糸体の培養液および液体培地にも同様の熱処理を施した。結果はFig. 3に示した。鋸屑培地培養物抽出液のTMV感染阻止作用は、シイタケでは子実体あるいは菌糸体の抽出液よりすぐれており(Fig. 3.A), エノキタケでも菌糸体抽出液と同等で、子実体抽出液よりすぐれていた(Fig. 3.B)。

さらに、鋸屑培地培養物の抽出液と子実体の抽出液について、粗作用物質の収量およびその作用程度を比較した。これら抽出液を真空凍結乾燥して固形物の収量を調査し、固形物単位重量当りのTMV感染阻止作用を比較した。各抽出液の収量と性状およびこれら

Fig. 2. Inhibitory effect of aqueous extracts from the saw dust-rice bran media with grown mycelia on TMV infection. A: *L. edodes*, B: *F. velutipes*.

を真空凍結乾燥したときの固形物の収量を一括してTable 1に示した。シイタケ、エノキタケの両者とも、固形物の収量は鋸屑培地培養物を抽出材料としたものが多かった。また、TMV感染阻止作用を比較した結果はFig. 4に示したとおりで、固形物単位重量当りの作用でも、鋸屑培地培養物から得られたものが強かった。

Fig. 3. Inhibitory effect of aqueous extracts obtained from various sources and culture filtrate on TMV infection.

A : *L. edodes*, B : *F. velutipes*

a : Aqueous extract from the saw dust -rice bran medium with grown mycelia.

b : Aqueous extract of fruit bodies.

c : Aqueous extract of mycelia.

d : Culture filtrate obtained after heat treatment.

e : Culture filtrate (heated after filtration).

f : Liquid medium (heated).

帽菌類起源のウイルス感染阻止物質は、子実体^{1,2,3)}、菌糸体⁴⁾など種々のものを材料として得ることができる。しかし、子実体を材料とする場合は、その発生までに長期間を要し、均一な材料の大量入手が困難であるなどの問題があり、液体培養菌糸を材料とする場合は、培養が進むと菌糸体ペレットが形成され、以後の増殖が遅延するので大量の菌糸体の入手が困難である。これに対し、鋸屑培地での菌糸の培養では、菌糸体ペレットの形成はなく、短期間に大量の均一な材料を得ることができる。また、TMV 感染阻止作用でも、鋸屑培地培養物抽出液は子実体、菌糸体などの抽出液に比較しても遜色がないと考えられる。

鋸屑培地培養物抽出液に含まれる作用成分に関しては現在検討中であるが、米ぬかの中にウイルス感染阻止物質が含まれている⁶⁾ことから、作用成分の1部はこれに由来する可能性がある。また、酵母からのウイルス感染阻止物質の抽出にオートクレーブ処理(15ポンド15分)が有効であるという都丸の報告⁷⁾、および今回の検討結果でもオートクレーブ処理が有効であったことを考え合わせると、アミノカルボニル反応にみられるように抽出過程において新たな物質が生成されている可能性も考えられ、このような物質の存在が作用の増大に関与しているかも知れない。作用成分の性状、作用特性などに関しては後

Table 1. Yield and some properties of aqueous extracts from various sources

Source	Fresh ^{a)} weight (g)	Water used for extraction (ml)	Extract ^{b)} obtained (ml)	pH of extract	OD 470 of extract	Weight of ^{c)} freeze-dried material (g)	1) Yield (%)	2) Yield (%)
Fruit bodies of <i>L. edodes</i>	200	400	350	5.50	0.05	4.63	2.3	13.23
Saw dust-rice bran medium with grown mycelium of <i>L. edodes</i>	370	740	435	4.50	0.48	11.64	3.2	26.75
Fruit bodies of <i>F. velutipes</i>	400	800	700	6.40	0.01	13.85	3.5	19.79
Saw dust-rice bran medium with grown mycelium of <i>F. velutipes</i>	400	800	525	5.85	0.46	16.17	4.0	30.79

1) $c/a \times 100$ 2) $c/d \times 100$

6) Kahn, R. P., Allen, T. C. Jr. and Zaumeyer, W. J. (1960). Phytopathology 50 : 845-851.

7) 都丸敬一(1975).昭和50年度日本植物病理学会, 植物病理化学談話会要旨, pp. 3-9.

Fig. 4. Inhibitory effect of freeze-dried materials of aqueous extracts from the saw dust wood meal-rice bran media with grown mycelia. A: *L. edodes*, B: *F. velutipes*
 a: Aqueous extract from the Saw dust-rice bran medium with grown mycelia.
 b: Aqueous extract of fruitbodies.

日稿を改めて報告したい。

本報の御校閲を賜り、御助言をいただいた島根大学教授達山和紀博士ならびに日本きのこセンター菌草研究所牛山六男博士に深謝の意を表す。また、本研究に理解を示され、ご援助いただいた大塚化学薬品(株)技術部長播磨六郎氏ならびに同課長永吉昭雄氏に感謝する。

(1976年11月4日受理)