チャカテキンのタバコモザイクウイルス に対する病斑形成阻害効果

岡田文雄*

Fumio OKADA* : Inhibitory Effect of Tea Catechin on the Local Lesion
Formation Caused by Tobacco Mosaic Virus

Abstract

Tea leaf galloyl-catechins, (–)-epicatechin gallate ((–)EC_g) and (–)-epigallocatechin gallate ((–)EGC_g) inhibited local lesion formation by tobacco mosaic virus (TMV) on *Nicotiana glutinosa*. In the present report, the amount of catechins necessary for inhibiting TMV infectivity and recovery of the infectivity after catechin removal by gelatin were investigated. When 0.1 and 0.2% (w/v) of (–)EC_g were added to TMV solution (ca. 32 μg/ml), the inhibition was estimated to be 90 and 99%, respectively. The same concentrations of (–)EGC_g inhibited by 98 and 99%, respectively. When a definite concentration of gelatin was added to the mixture of (–)EC_g and infected tobacco leaf extract, the number of local lesions increased as the period of incubation was prolonged. The addition of gelatin, however, did not cause any change in the inhibitory activity of (–)EGC_g even after a prolonged incubation. The mode of inhibition by catechin of the local lesion formation was discussed in connection with the action of tannic acid.

(Received July 20, 1977)

緒 言

著者はチャの主なカテキン4種のうち、エステル型の(–)エピカテキンガレート(EC_gと略)、(–)エピガロカテキンガレート(EGC_gと略)の2種がタバコモザイクウイルス(TMV)、キュウリモザイクウイルス(CMV)の病徴出現ならびに病斑形成を阻害することを前報^{3,4)}で明らかにし、その阻害作用はタンニン酸と同様、ウイルスたん白質との結合によるものと推察した。

今回は純化ウイルスを用いて病斑形成阻害に必要なウイルスたん白量に対するカテキン量について調べるとともに、ウイルス–カテキン混合懸濁液にゼラチンを加えることにより、カテキンをカテキン–ゼラチン複合体として除去した場合、そのウイルス活性の回復状況について検討を加えたので、その結果を報告する。

なお、これらの概要は日本茶業技術協会研究発表会で講演発表⁵⁾した。

本研究を遂行するに当たり、純化ウイルスの分譲を賜った農林省植物ウイルス研究所下村徹博士、大橋裕子技官、ならびに有益な助言と御指導をいただいた近畿大学教授平井篤造博士、茶業試験場製茶部長古谷弘三氏、企画室長坂本裕氏、製茶第一研究室長竹尾忠一氏に深謝する。

実験材料及び方法

チャのカテキン 前報^{3,4)}と同じ(–)EC_gと(–)EGC_gの結晶。

接種源 凍結保存したTMV(OM系統)を一たん *Nicotiana tabacum* (Bright Yellow-4号)に接種して増殖発病させたのち、その罹病葉にリン酸緩衝液(0.1M, pH7.0)を40倍量加えて摩砕し、その汁液をガーゼでろ過した後さらに遠沈(12,000 rpm,

* 茶業試験場 National Research Institute of Tea, Kanaya-Chō, Shizuoka-Ken, Japan

30min) してその上澄液をウイルス活性検定の接種源として用いた。また、純化ウイルス (TMV-OM 系統) は分画遠沈法で精製したものを農林省植物ウイルス研究所から譲り受けた。

ゼラチン 市販品粉末 (小宗化学 KK 製) 1 級。

供試植物 接種源の増殖にはタバコ By-4 号を、阻害作用の検定には *Nicotiana glutinosa* を用いた。

純化ウイルスに対するカテキンの影響 純化ウイルスの懸濁液 (粗たん白質 $32.2\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 M リン酸緩衝液 pH7.0 に懸濁) に (←) EC_g および (←) EGC_g を 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5% の濃度になるよう添加しウイルス活性を調査した。

カテキン除去による TMV 活性の復活実験 タバコ By-4 号より抽出した接種源の汁液を一定量 (10 ml) ずつとり, (←) EC_g および (←) EGC_g を 75mg (5 ml) 加え, さらにゼラチン 5% 溶液を 3 ml ずつ添加して攪拌し, 10分 , 30分 , 60分 間作用させたものを東洋

ろ紙 No.2 でろ別して, そのろ液を検定用の *N. glutinosa* に接種し, ウイルス活性を調べた。

検定方法 *N. glutinosa* を主脈に沿って 2分 した半葉接種法¹⁾ により, 一方に処理液を対応する半葉には所定濃度の対照液 (接種液) をカーボランダムを用いて接種し, ペトリ皿に納めて陽光ランプ育苗箱 ($23\text{C} \pm 0.5\text{C}$, 湿度 $75 \sim 80\%$, 平均 $7,000\text{ルクス}$) に 48時間 保持し, 生じた病斑数を比較した。

純化ウイルス中の粗たん白量の測定 臨床検査手法のケルダール・ネスラー法²⁾ で比色定量し, 窒素に対して 6.25 倍したものをたん白量とした。

実験結果

ウイルスの粗たん白量に対するカテキン量の検討

TMV の感染阻害に必要なカテキン量を明らかにするため, 純化 TMV 中の粗たん白量に対するカテキンの必要量を検討した。

純化 TMV の接種源にエステル型カテキンそれぞれ

第 1 表 純化 TMV の粗たん白量に対するカテキン量の阻害効果

カテキンの種類	a) カテキンの濃度 (%)	b) カテキン量 / 粗たん白量	対照区に対する病斑形成率 (%)					病斑数合計		阻害率 (%)
			1	2	3	4	5	対照	処理	
(←) EC_g	0.1	31	13.4	8.7	8.1	8.3	12.0	1698	168	90.3
	0.2	62	1.1	0.8	1.3	0.4	1.4	1510	16	99.0
	0.3	93	1.1	0.4	0.3	0.6	2.1	1492	11	99.3
	0.4	124	0	0.3	0.3	0	0	1523	2	99.9
	0.5	155	0	0	0	0.2	0.3	1528	2	99.9
(←) EGC_g	0.1	31	14.1	0.9	2.9	2.0	0	3226	46	98.6
	0.2	62	0.5	0	0	0	2.9	3959	29	99.3
	0.3	93	0	0	1.5	0.5	0	3405	14	99.6
	0.4	124	0	0.6	0	0	0.1	4456	7	99.8
	0.5	155	0	0	0	0	0	3558	0	100.0

a) カテキン濃度: TMV たん白液 ($32.2\mu\text{g}/\text{ml}$) 中に添加したカテキン濃度 (w/v)。

b) カテキン量 TMV粗たん白量: カテキンmg/粗たん白mgの比。

を添加して接種すると, その病斑形成数は対照区に比べて著しく減少し, (←) EC_g , (←) EGC_g のいずれも添加量の増加に伴って感染阻害作用は増大し, 前報³⁾の結果と一致した。また, 病斑形成の結果から TMV の粗たん白量に対するカテキン量を検討すると, (←) EC_g では粗たん白量の 31 倍量で約 90% , 62 倍量になると 99% が阻害された。一方, (←) EGC_g でも 31 倍量で

すでに 98% が阻害された。

TMV 接種源—カテキン混液からカテキン除去によるウイルス活性回復の検討

チャのエステル型カテキンをウイルス接種源に加えることによって生ずる沈殿現象, ならびにウイルス活性阻害作用が, TMV に対するタンニン酸と同じ作用を示すか否かを明らかにするため, Thornberry⁶⁾ の

第2表 TMV—カテキン混液からカテキン除去した際のウイルス活性の回復

カテキンの種類	ゼラチンの作用時間 (min)	対照区に対する病斑形成率 (%)					病斑数合計		対照区に対する病斑形成回復率 (%)
		1	2	3	4	5	対	照 処 理	
(–) EC _g	0	0.3	0	0	0.1	0.2	4476	6	0.1
	10	3.9	1.6	1.6	3.4	3.9	4216	133	2.9
	30	4.5	5.4	7.1	5.3	4.0	4277	239	5.6
	60	71.1	50.3	35.5	30.7	79.3	2725	1458	53.5
(–) EGC _g	0	0	0	0	0.3	0	1456	1	0.1
	10	7.4	5.7	1.0	1.9	6.3	2343	106	4.5
	30	7.1	1.2	4.2	0.6	8.1	1156	38	3.3
	60	1.5	8.3	7.6	4.4	2.0	1047	47	4.5

a) TMV—カテキン混液にゼラチンを添加した後、室温に放置した時間。

方法にしたがって調査した。

接種源の病葉汁液に(–)EC_gおよび(–)EGC_gを添加し、それぞれの混合懸濁液からゼラチンでカテキンを除去すると、ウイルス活性回復の様相は(–)EC_gと(–)EGC_gでは異なった。すなわち、(–)EC_g—ウイルスのものは、ゼラチンとの混在時間が長くなるにしたがって病斑数が増し、対照区に対して30分後に約5%、60分後では53%程度の病斑を生じ、ウイルス活性の回復が認められた。一方の(–)EGC_g—ウイルスのものはゼラチンを加えて処理しても、10分と60分後のウイルス活性は変わらず、ともに95%以上が阻害され、ゼラチンによるカテキン除去ならびにゼラチンとの混在時間の影響は少なかった。

考 察

(–)EC_gと(–)EGC_gはウイルスの純度の高いもの程、低濃度のカテキン量で感染阻害作用を顕著に現わし、ウイルスの粗たん白量に対してカテキン量が31倍量以上あると、病斑形成に対する阻害率は90%以上となった。また、接種源に(–)EC_gならびに(–)EGC_gを加えるとウイルスは不活化されるが、そのウイルス—カテキン混液からゼラチンによってカテキンを除くと、(–)EC_g処理区にゼラチンとの作用時間の違いでウイルス感染力の回復が認められ、一方の(–)EGC_g処理区では回復しなかった。これらの結果から判断すると、カテキンのウイルス感染に対する阻害作用は、カテキンがウイルスたん白と結合することによっておこることを支持するもので、(–)EC_gの場合ゼラチン処理で再び病斑形成がみられるのは、ウイルスと結合

したカテキンがゼラチンと結合することにより、その一部がウイルスから解離したためと思われる。以上のことからカテキンによる阻害作用は *Thornberry*⁶⁾ が報告しているタンニン酸と同様、ウイルスたん白との結合によることが考えられ、また、ウイルスの感染を阻害するには(–)EC_gより(–)EGC_gのほうが効果が大きいのは、ウイルスたん白との結合力が(–)EGC_gのほうが強いためと考えられた。

摘 要

チャのエステル型カテキンが植物のウイルス活性を阻害する作用を明らかにするため、(–)EC_gと(–)EGC_gについて調査した。

純化TMVの粗たん白量に対して、(–)EC_gと(–)EGC_gが90%以上の病斑形成阻害率を示す必要量は、31倍量であった。TMV—カテキン懸濁液からゼラチンでカテキンを除いて接種すると、(–)EC_g処理区ではゼラチンとの混合時間によってウイルス活性の回復力は影響を受けたが、(–)EGC_g処理区ではウイルス活性の回復はほとんど認められず、この点からも(–)EGC_gは(–)EC_gに比べ効果の著しいことが認められた。また、これらの実験結果から、カテキンのウイルス活性阻害作用はたん白との結合作用によることが明らかとなった。

引用文献

1. 平井篤造・下村 徹・平島昭和・林 幸正 (1965)・植物生理 5 (5) : 2.
2. 日本薬局方第一部解説書 (1962). 日本公定書協会・広川, 東京・pp.D-331.
3. 岡田文雄 (1971). 日植病報 37 : 29-33.
4. 岡田文雄 (1971)・茶技研 No. 42 : 47-53.
5. 岡田文雄 (1971)・茶研報 (茶技協講要) No. 35 : 150.
6. Thornberry, H. H. (1935). *Phytopathology* 25 : 934-937.