植物ウイルスの虫媒伝染機作に関する研究(第2報)

温州柑萎縮病媒介昆虫アオバハゴロモの保毒に伴う代謝異状^{*1}吉井 啓^{*2}・木曾 皓^{*2}

HIROMU YOSHII & A. KISO: STUDIES ON THE NATURE OF INSECT-TRANSMISSION IN PLANT VIRUSES (II) SOME RESEARCHES ON THE UNHEALTHY METABOLISM IN THE VIRULIFEROUS PLANT HOPPER, *GEISHA DISTINCTISSIMA* WAL., WHICH IS THE INSECT VECTOR OF THE DWARF DISEASE OF SATSUMA ORANGE.

〔受稿 7月30日 1957〕

1. 緒 言

先に筆者らは温州柑は、接木伝染と虫媒伝染のいかに拘らず、柑橘萎縮病ウイルスに感染すると健全樹に比較しその呼吸及び磷酸代謝が低下することを見た^{12) 14) 18)}。所で斯様な代謝機能の落ちる罹病柑橘樹上で吸汁生活し、保毒するにいたった場合、媒介昆虫はその体内の代謝生理上に何ら影響がないものであろうか。従来植物ウイルス媒介昆虫は、保毒に伴っては、少くも形態的には少しも異状が見られないとされている³⁾。しかし保毒昆虫には斃死個体が増加する事は、本実験でも確認しえたところであり¹⁶⁾、同様の事を指摘した報告も少くない⁵⁾。これは代謝に変調を来たした罹病寄主植物汁液で飼養される場合、昆虫には正常な健全虫とはちがった異常代謝が表われ、体内成分にも変化がみられる結果ではないかと想像される。K. Maramorosch (1956) は Aster yellow virus の媒介昆虫 Aster leaf hopper が保毒に伴いその脂肪体に顕微化学的变化の表われる事をみたが⁷⁾、これはその一例であろう。アオバハゴロモも柑橘萎縮病ウイルスを保毒せしめると、琥珀酸々化酵素系に異常が表われて呼吸は衰え、酸化了的磷酸化の低下に併せて、塩基性 Phosphatase の力価の減退が表われ、虫体内各形態磷酸に量的変化がみられた。これは明かに保毒によつて媒介昆虫には代謝異常が生じた証査と思われ、

保毒昆虫に斃死個体数の増加する原因の1つと考えられる。本報告は植物ウイルスの虫媒伝染機作を解明するため、保毒に伴つて媒介昆虫に表われる異常代謝を観察した結果の一部を取纏めたものである。同好の先覚諸賢よりの御叱正と御教示をいただければ幸甚である。

本研究に要した経費の一部は文部省総合科学研究費(代表者 福士貞吉教授)から支弁された。又研究遂行に当つて始終援助を惜しまぬ愛媛県立果樹試験場大森尚典、森介計両技官、考察に当り討論に参加した名大平井篤造教授、当研究室浅田泰次助教授、並に試験研究に助力した徳永省三、加田隆稔、田辺昇、坂本互各研究室員には記して深謝の意を表する。

2. 実験材料及び実験方法

供試虫アオバハゴロモには、本病未発生地区の柑橘園に於て、枝条に産みつけられた越冬卵塊を冬季に採集し、これより孵化生育せしめたものを当てた。尚他に必要に応じては松山市内の果樹園^{*3}より成虫として採集して供試した。成虫の飼育には一尺鉢に栽植した尾張系温州柑4年稚樹を当て、これをビニール製飼育籠に保持し、その中で吸汁發育させた。しかして成虫を保毒させるためには罹病温州柑樹上で10日間^{*4}吸汁させた。対照の健全虫は未感染温州柑を同様に栽植肥培したものの上で10日間吸汁させたものである。供試

*1 本論文の要旨は昭和32年4月4日日本植物病理学会大会で発表した。

*2 愛媛大学農学部植物病理学研究室

*3 特定園のものであり既に予め無毒園である事を証明しえた果樹園である。

*4 吸取時間8日以上で保毒は明らかである。(吉井啓他, 1957) ¹³⁾

した萎縮病罹病樹には、1950年の接木伝染試験の際芽接法によつて感染させた尾張系温州柑 8年生稚樹で、これを直径1.5尺、高さ2.5尺の円柱型素焼植木鉢に植え、網室中で厳密な肥培管理をしたものである。

媒介昆虫の呼吸量は供試個体数を健全虫、保毒虫各5匹宛とし、WARBURG 検圧計によつて観測した。即ち主室には供試虫を、側室には20% KOH 0.5ml と2×2cmの濾紙片を入れ、20℃下に静止状態^{*5}の manometer で測定した。尚本供試虫は飢餓時間が30分以上に及ぶと急速にその活力が衰えるので、測定に当つては、健全虫には健全葉汁を、保毒虫には罹病葉汁を吸収させた。即ち夫々葉5gに対して水10mlを加え氷冷下磨碎し、その遠沈(1000×g・5分)上清0.5mlを吸収させた主室内の脱脂綿(0.5gr)上に供試虫を置き観測した。酸化的磷酸化(P-O率)の測定には、健全虫及び保毒虫を Chloroform 麻醉後各1.5gr(約50匹前後)宛速かに精秤し、直ちに氷冷した Homogenizer に移し、麻醉覚醒後(1-2分後)これに0.25M 蔗糖液 7mlを加え、氷冷状態で20秒間磨碎する。しかし磨碎汁液の遠沈(500×g・3分)上清を粗酵素液として用いた。その他の反応組成及び操作は本研究第1報と同様である¹⁷⁾。反応測定終了後、87.5% TCA を添加し除蛋白後遠沈上清につき Fiske-Subbarow 法或は Safranin 法で比色定量して無機磷の減少値を求め、酸素吸収に伴う無機磷の減少との比を求めた。

琥珀酸脱水素酸素の活性度測定のための粗酵素液は、健全及び保毒ともに虫体0.5grを精秤し、水10mlを加え氷冷下に1分間磨碎し、遠沈(1000×g・3分)上清に水10mlを加え供試した。観察はThunberg 管法により、主室には粗酵素液2.0ml、0.1M Phosphate buffer(pH7.4)1.0mlを、側室には0.1% TCA 1.0ml 0.1% Sodium Succinate 1.0mlを入れ、排気し30℃に10分保持後、主室と側室の内容を混和し、30℃に12時間放置して生ずる Triphenyl Formazan (TPF) を定量した。尚対照試験として常法通り酵素液に対し熱処理、Malonic acid 添加による反応阻害の有無を調査しその酵素の力価を考察した。

Phosphatase の活性度の変化は、前項の方法で作製したものを粗酵素液として観察した。即ちこの1.5mlに基質として0.1Mβ-Sodium glycerophosphate (又

は Sodium pyrophosphate) 1.0mlを加え、反応pH別に酸性はpH4.0の0.1M Acetic acid buffer, 中性はpH7.0の0.1M phosphate buffer, 塩基性はpH9.4の0.1M Glycine bufferを、各1.0ml添加し、30℃で2時間作用させる。反応終了後に水1.5ml、50% TCA 1.0mlを加え、氷冷下(0°~5℃, 15分)で除蛋白し、遠沈(1000×g, 5分)上清について直ちにFiske-Subbarow 法或は Safranin 法により無機磷量の変化を比色定量し、対照除基質区と比較してその増減を考察した。

虫体内各磷酸分量は、虫体1gr精秤後^{*6}、水4ml

Fig. 1 Difference of respiration between the viruliferous and nonviruliferous insect with the virus of the Dwarf disease of Satsuma orange.

O₂ uptake of the insect was measured by 5 individuals put into each WARBURG'S vessel without vibration in 60 minutes at 25°C.

The food was the 0.5ml. of 50% homogenate of the citrus leaf.

The signs of key are as follows: H+F indicates the nonviruliferous insects with food, H-F, ditto without food; D+F, viruliferous insect with food; D-F, ditto without food.

^{*5} manometer を振動させると、主室中の供試虫は飛跳して測定困難である。

^{*6} 精秤を易くするために供試虫を容量50mlの3角フラスコに入れ、脱脂綿に chloroform 少量を含ませ綿栓すると虫は麻醉し動かなくなるから直ちに精秤する。

Table 1 Apparent P-O ratio at the Oxidative phosphorylation of the viruliferous and nonviruliferous insect.

Time (min.)	Sample	Ouptake (μ atoms)	Puptake (μ mols)	P/O
15	Nonviruliferous	7.6	8.0	1.05
		4.7	4.0	0.85
25	Nonviruliferous	13.4	18.5	1.27
		8.3	10.0	1.08
35	Nonviruliferous	20.7	27.5	1.26
		15.5	14.5	0.97

1.5g of insects were homogenized with 0.025 M Sucrose solution 7.0ml or Ringer's solution 7.0ml in cold homogenizer, and the homogenate was examined as crude enzyme.

The constitution of the reaction mixture is 0.015M Sodium glutamate 0.2 ml, 0.25 M KCl 0.3ml, 20 mg/ml Hexokinase solution 0.2ml, 0.2 M NaF 0.2 ml, Dist. water 0.1 ml and Crude enzyme 1.0ml.

を加え、氷冷下で速かに（20秒間）磨砕する。更に水で全量9mlにした後、100% TCA 1.0ml を加え氷冷下に10分間放置する。次いで Schneider 法により各磷酸を分割し、磷酸量は Fiske-Subbarow 法により比色定量した。

3. 実験結果

(1) 呼吸量

供試虫の酸素吸収量を吸汁又は飢餓の状態で測定した結果は第1図のとおりである。これによると保毒虫は健全虫に比べて酸素吸収量が約30%低下し、又飢餓状態下では健全、保毒共に測定時間30分経過後は急速に呼吸量の低下がみられる。しかして健全虫は80分保毒虫は60分経過後では殆んど酸素吸収は認められなかった。

(2) 酸化的磷酸化 (P-O率)

測定結果を表示すると第1表の通りである。これによると全測定時間を通して、保毒虫は酸化的磷酸化程度はかなり健全虫より小さい。即ち保毒に伴い媒介昆虫は酸素吸収量が減退するが、同時に無機磷の磷酸エステル化程度も衰える事がみられる。

(3) 琥珀酸脱水素酵素の活性度

同一試料に対して Thunberg 管 2本宛を当て、3回反覆観察したが、その結果は第2図に示すとおりである。尚対照試験として Malonic acid による阻害試

Fig. 2 Comparison of the Succinic dehydrogenase activity of the viruliferous insects with that of the nonviruliferous insects.

□ nonviruliferous, ■ Viruliferous.

Each Thunberg tube contains crude enzyme 2.0 ml. and 0.1 M phosphate buffer(pH7.0)1.0ml in the main tube, and 0.1% TTC 1.0ml and 0.1% Sodium succinate 1.0ml. in the side arm. Crude enzyme is prepared by homogenizing the insect 1.5g. with dist. water 10ml.

Activity was measured by optical density of TPF after incubation for 12 hours at 30°C.

験及び熱処理 (80°C, 20分) 試験を行つたが、いずれも還元力は完全に喪失されることをみた。以上の結果によると脱水素酵素の活性度には健病間に明かな差異がみられ、保毒虫の方が健全虫よりも本酵素の力価は高い。

(4) Phosphatase の活性度

各区とも試験管 3本宛を当て 2回反覆実施した。この結果を図示すると第3図のとおりである。健病間での Pyro-及び Glycero-phosphatase の活性度は、中性では殆んど差異がなく、酸性では酵素の種類により

Fig. 3 Difference of the phosphatase activity between the viruliferous and nonviruliferous insects with the virus of the Dwarf disease of Satsuma orange.

Each vessel contains crude enzyme 1.5ml., Buffer solution 1.0ml. (pH 4.0, 7.0 or 9.4), and 0.1M Sodium glycerol-P. or 0.1M Sodium pyro-P. 1.0ml.

Crude enzyme is the same as shown in Fig. 2.

The reaction mixture were incubated at 30°C. for 2 hours.

The liberated P was determined by the Fiske-Subbarow's method, and was shown in γ per insect 1.0g.

病虫の活性が落ちることもあるが、塩基性では明かに保毒に伴って両酵素共に力価の低下が見られる。即ち Phosphatase の活性は保毒に伴って減退する。

(5) 各磷酸分割量

供試虫 1 個体当りの体内各分割磷酸量は第 4 図の通りである。これによると保毒に伴って全磷酸量はやや減少しているが、その内容をみると保毒虫では脂質磷、酸可溶性有機磷は増加し、蛋白磷も稍増量するが、酸可溶性無機磷と核酸磷は減少する。

4. 考 察

萎縮病ウイルスに犯された場合、温州柑は健全樹に比べて体内の各種代謝系酵素、特に呼吸系、磷酸系酵素に活性の異常を表わす。即ち呼吸量が落ちると共に酸化的磷酸化も低調となり、磷酸各分割にも変化が表われる^{12) 14) 17)}。今このような代謝に変調を来した寄主植物上で飼養する場合、媒介昆虫は保毒に伴って何らかの影響をうけるのではないかと考えられるが、本実験結果はこの点を明かにしえたと思える。Price & Thimann (1954) は植物の呼吸量と脱水素酵素活性との間に定量的比較を行い、両者間には高い相関のある事を報告したが⁹⁾、山口・平井 (1956) も 2~3 の植物ウイルス感染個体について同様に酸素吸収量が

Fig. 4 Comparison of the amounts of the phosphorous compounds of the viruliferous insect with those of the nonviruliferous insect.

□ Nonviruliferous ■ Viruliferous

The supernatant of the insect homogenate was fractionated by the Schneider's method and amounts of the liberated P was determined by the Fiske-Subbarow's method.

TTC 還元力と略平行する事を示した¹¹⁾。しかし筆者等(1957)は萎縮病ウイルスに感染した温州柑では、脱水素酵素の活性増高に反し呼吸量の減少することを見た^{14) 17)}。しかしてこの磷素活性の均衡に異常の表われた柑橘葉汁液で飼養した場合媒介昆虫には、その食飼寄主植物の影響が表われて来る。即ち本実験に於ては保毒に伴つて虫体内での琥珀酸脱水素酵素が異常増高するの反し、その呼吸量が著しく減退する。即ち保毒虫体内の呼吸代謝異常の生じている事を首肯させる。然しこの現象も永続的なものでなく、保毒虫を健全樹上で復元飼養すると正常の酵素活性即ち均衡のとれた状態に戻る事が認められる¹⁶⁾。この事は罹病植物上での吸汁飼育は、たとえ媒介昆虫にとつても良い条件でない事を示している。

各種の磷酸化合物は脂肪酸及びその他の有機酸の酸化還元系反応に共軛しているが、更にこの間の反応を一層円滑にするために種々の Phosphatase, Phosphorylase 等が存在する事は周知の事実である⁸⁾。而して細胞の代謝、殊に蛋白質合成が旺盛に行われている場合には、塩基性 Phosphatase の活性度の高い事が報告されている⁹⁾。従つて今保毒媒介昆虫の体内の Phosphatase 力価が低下する事は、その細胞代謝の衰えをも意味すると考えられ、これまた保毒虫体内の代謝の異常減退を示すものと思われる。

次に保毒虫では、その体内の各形態磷酸化合物に量的変化の表われる事を見たが、就中有機磷の増量と核酸磷の減少は保毒に伴つて虫体内に生ずる異常代謝の結果と考えられる。本観察で用いた Schneider 法によると、有機磷酸分劃には ATP・ADP の他に 1-6 diphosphohexose, 3 phosphoglyceric acid, Glucose-1-phosphate, Glucose-6-phosphate, Fructose-6-phosphate, Phosphopyruvic acid, Triose phosphate, Adenilic acid, Phosphopyridine-nucleotides, Phosphocreatine, Ribose-5-phosphate, Inocinic acid, 1,2-propanediol phosphate, Aminoethyl phosphate 等が含まれるが²⁾、前項で明かなように呼吸代謝の衰退からみると ATP の高エネルギー磷酸の増加は考えられず、増えても他の低エネルギー磷酸化合物で、これが EMP 図式より TCA-Cycle にわたる一連の系の進行中に代謝系の均衡を失する結果蓄積するものと思われる。これ等は恐らく核酸代謝、蛋白代謝に直結しないであろうから、保毒虫体内の磷酸分劃中では、蛋

白態磷への移行は少く、核酸磷はかへつて減少して来ることは、この間の事情を示していると考ええる。尚生物がウイルス性疾病に罹患すると、少数の例外を除いて、一般に核酸磷に量的増加のある事が知られている^{4) 6) 10)}。従つてこの核酸磷量が減少する事実は媒介昆虫が保毒に伴つてウイルス性疾患に罹つていると考ええる事を困難にするものである。しかしこの問題については、今後更に十分の検討を加えなければならぬ事と考える。

以上の諸事実から窺われるように、アオバハゴロモは萎縮病感染温州柑上で飼養されて保毒すると、体内の代謝に異常が表われて来る。しかしてこれは保毒虫が広義の疾患状態を呈して来ると見ることが出来るのであつて、保毒に伴いアオバハゴロモには致死個体数が激増するのは、これを裏付ける事実と考えられる。

一方植物ウイルス病については、媒介昆虫は保毒しても無毒の場合と著しい差異がないとされ、例えば Poteto yellow dwarf virus の媒介虫 *Aceratagallia sanguinolenta*, Aster yellow virus の媒介虫 *Macrostoteles divinus*^{*7)} では、その生存期間が保毒によつて短縮される事は不明であるが、細胞組織学的な異常は保毒に伴つて表われないとも云われている³⁾。しかし Wound-tumor virus では *Crimson clover* (*Trifolium incarnatum* L.) から純化分離された Virus protein が、保毒した媒介昆虫 (*Agallia constrictor* VAN DUZER) から同様に分離された事が紹介されている¹⁾。この事は媒介昆虫が保毒に伴つて虫体内には、代謝に異常が生じて来る事を想像させる。Littau & Maramorosch(1956)は Aster yellow virus の媒介昆虫 *Aster leaf hopper* (*Macrostoteles fascifrons* STAL) が保毒するとその脂肪体組織の核は円形より星形に変わり、細胞質は網状を呈し、いずれも Azure B の染度が低下する事をみている⁷⁾。尤も同氏等はこの現象を代謝異常の結果とせず、この脂肪体を虫体内でのウイルス増殖の場と考えている。筆者等(1957)は保毒アオバハゴロモの体内成分の変化、代謝の異常を組織化学的に観察し、DNA, RNA には質並に量的変化がみられず、脂肪体その他の組織にも殆んど異常は見出し得ないが、たゞ Alkali phosphatase, Per-oxidase は保毒によつてその力価の低下する組織(例えば唾液腺組織等)を指摘出来た。又同様の事は稲萎縮病ウイルスの保毒ツマグロコバイにも見出し

*7 L. M. BLACK (1943), H. H. SEVERIN (1947) の報告による。

えた¹⁵⁾。しかし吾人は斯様な事実によつて、今直ちに虫体内でのウイルスの増殖現象の有無及び場を想定しようとするものではなく、唯これは、媒介昆虫が保毒に伴つて栄養生理的な不均衡を生じた結果なのか、或いはウイルス増殖に当つての前驅現象であるのか、この点を明かにして、今後の研究の進展の緒口としたいと考える。

5. 摘 要

(1) 柑橘萎縮病ウイルスの媒介昆虫アオバハゴロモ (*Geischa distinctissima* WAR.) には、保毒に伴つて虫体内代謝に異常が表われて来るか否かを観察し、ウイルスが昆虫によつて伝播される機作解析の手掛とした。本報告は保毒供試虫の代謝についての観察結果の一部を取纏めたものである。

(2) 保毒虫は酸素吸収量(Q_{O_2})が健全虫に比して約30%低下する。即ち保毒によつて供試虫は呼吸が衰えて来る。

(3) 保毒虫は酸化的磷酸化 (Oxidative phosphorylation) が小さくなり、呼吸に伴う無機磷の磷酸エステル化は減少する。

(4) 虫体内の琥珀酸脱水素酵素の力価のみは保毒によつて著しく増大する。しかして此は食餌寄主植物の罹病温州柑の場合と酷似している。

(5) 保毒に伴つて虫体の塩基性 Phosphatase は、他の中性及び酸性 Phosphatase に比し、その力価の

減退が著しい。

(6) 供試虫体内の各種形態磷酸量には保毒に伴つて変化が表われる。即ち酸可溶性有機磷・脂質磷は健全虫より増加するが、酸可溶性無機磷・核酸磷は減少する。しかして保毒虫の全磷酸量は健全虫に比し減量して来る。

以上の各観察事項よりみると、アオバハゴロモは柑橘萎縮病ウイルスを保毒する事によつて、その虫体内代謝、特に呼吸系及び磷酸系代謝に異常が表われて来ると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Black, L. M.: *Phytopath.*, **45**: 208-216, 1955.
- 2) 江上不二夫他: 標準生化学実験, 132-138, 1953.
- 3) 福士貞吉: 植物バイラス, 106, 1952.
- 4) 平井篤造: 植物防疫, **9**: 417-420, 1956.
- 5) 平山重勝: 植物防疫, **10**: 19-22, 1957.
- 6) 今泉照男: 日植病報, **20**: 101-102, 1955.
- 7) Littau, V. C. & K. Maramorosch, : *Virology*, **2**: 128-130, 1956.
- 8) 直良博人: 生物化学, **2**: 68-76, 1950.
- 9) Price, C. A. & K. V. Thimann, : *Plant Physiol.*, **29**: 495, 1954.
- 10) 下村徹・平井篤造: 植病研, **6**: 73-80, 1956.
- 11) 山口昭・平井篤造: ウイルス, **6**: 1-7, 1956.
- 12) 吉井啓・木曾皓: 日植病報, **21**: 123, 1956.
- 13) 吉井啓・木曾皓: 果樹研究, **2**: 97-107, 1957.
- 14) 吉井啓・木曾皓: 徳永省三: 日植病報, **22**: 20, 1957.
- 15) 吉井啓・木曾皓: 日植病報, **22**: 20, 1957.
- 16) 吉井啓・木曾皓: 日植病報, **22**: 21, 1957.
- 17) 吉井啓・木曾皓: ウイルス **7**: 306-314, 1957.