クリタマバチ虫えいにおけるアスパラギンの集積について

小沢哲夫, 羽賀清典, 滝野慶則
(東京教育大学農学部農芸化学科)

昭和 48 年 5 月 23 日 受 理

Accumulation of Asparagine in Chestnut Galls

By Tetsuo OZAWA, Kiyonori HAGA and Yoshinori TAKINO
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Education

Accumulation of a considerable amount of asparagine (18.6 mg in a fresh gall, corresponding to 11.9% of dry matter at the maximum) was observed in chestnut galls induced by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (chestnut gall wasp). It amounted to 5.7 times as much as the maximum content in healthy leaves which are resistant to the insect. Noteworthy fact is that the changes in asparagine content during the growth of the galls are closely correlated with the life cycle of the insect. In the growing period of larvae of this insect asparagine was rapidly accumulated as the galls grew, and its maximum content was maintained nearly during the pupa period. However, it decreased rapidly after the imaginal wasps bored the gall tissues and flew off.

(Received May 23, 1973)

緒 言

クリの腋芽にクリタマバチ (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu) が産卵寄生すると、翌春萌芽とともに芽は異常生長し、いわゆる虫えい (gall) を形成して、ひどいときには新梢を枯死させる。このため新梢が減少し、雌花をつける結果枝が少なくなるので、クリの収量が低下し樹勢も弱くなる。クリタマバチの発生は 1941 年岡山県下で発見されたのが最初であり、1950~1955 年頃には全国的に被害を表わすようになった。しかし、多数の生態学的研究、防除法の研究が行なわれた結果、抵抗性品種が育成されたことにより、クリタマバチは最近まで重要害虫の座をしりぞいていた。しかし、1961 年頃から抵抗性品種にも虫えいが現われ始め、この 2~3 年は相当の被害となり、再び重要な問題となっている⁽¹⁾。

松井、島高^(2,3) はクリタマバチ感受性品種および抵抗性品種の存在に着目し、ポリフェノール物質との相関を認め“抵抗性が大きいほど樹皮中のカテコールタンニンが多い”と述べている。虫えいが異常分裂組織であるという観点から、虫えい誘導物質の研究も進められている

が、まだ本体は充分には明らかになっていない⁽⁴⁻⁷⁾。著者らは数年前から、クリの虫えい形成機構および抵抗性発現機構を解明するための一環として、虫えい成分について研究を進めているが、その間に虫えい組織には遊離のアミノ酸として、特にアスパラギン (Asn) が異常に集積すること、その消長が虫えい組織の肥大および虫体の活動と関連することを認めたので報告する。

実 験 方 法

1. 試料 1971 年、神奈川県下で野生のシバグリ (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) および栽培品種丹沢に着生した虫えいを採取して、遊離アミノ酸の分析に用いた。また 1972 年、同県下のシバグリに着生した虫えいとクリタマバチ抵抗性シバグリの健全な芽・葉を萌芽期から継続的に採取して、Asn の消長を調べる試料とした。なお虫えい中にはクリタマバチの虫体が含まれるが、その占める重量比はきわめて小さいので、そのまま分析に供した。また、虫えいに付着した葉片も分取して分析に使用した。

2. 水分定量 常法にしたがい、試料を 110°C で恒

量になるまで乾燥して算出した。

3. 全窒素の定量 Kjeldahl 法にしたがい定量した。

4. アミノ酸の抽出および抽出液の前処理 試料を秤取し (虫えい 2~40 g, 葉 3~9 g), 虫えいには 70% エタノール 90 ml を, 葉には 120 ml を加え, そのまま 90 分間加熱して, 酵素作用を失活させると同時に還流抽出する。ついで, 抽出液を濾別した残渣につき, それぞれ 70% エタノール 100 ml を加え, ホモゲナイザーで磨砕した後加熱抽出を繰り返し, 抽出液にほとんどニンヒドリン陽性物質が検出されなくなるまで, 合計 10 回反復抽出した。抽出液は減圧濃縮後水溶液とし, 秤取した試料の量を考慮して, 25~100 ml の定容とした。これを遠心分離し (20,000×g, 20 分), 上澄をアミノ態窒素定量用の試料とした。

なお遊離アミノ酸の定量には, あらかじめ多量に含まれるポリフェノール物質その他の共存物質を除くために, Dowex 1×8 カラム (1×16 cm, 酢酸型)⁽⁶⁾ に上記の上澄の 1 または 2 ml を加え, 0.5 N 酢酸 70 ml でアミノ酸を溶出した。ポリフェノール物質の大部分はカラムに保持され, アミノ酸は溶離する。溶離液を集め, 減圧濃縮し乾固して完全に酢酸を除き, 残渣をアミノ酸分析 (後出) 用クエン酸緩衝液 (pH 2.2) に溶解し, 定容として Asn の分析に用いた。Asn 以外のアミノ酸の定量には, あらかじめ多量に含まれる Asn の大部分を除く操作を行なった。すなわち, 上記の遠心上澄 50 ml を減圧濃縮乾固し, 残渣に 95% エタノール 20 ml を加えて加温し, 冷却後不溶解の Asn の沈殿を濾別した。沈殿は 20 ml のエタノールで十分に洗浄し, 洗液は濾液と合せて濃縮乾固し, 水に溶解して 10 ml の定容とした。この溶液 1 ml を用い, 前述のように Dowex 1×8 カラム処理後分析に供した。

前処理に伴うアミノ酸の損失の有無を調べるために, 特に本報で問題とする Asn について対照試験を行なったところ, 再検率 100.7% で損失は認められなかった。

5. アミノ態窒素の定量 Van Slyke 法にしたがい定量した。

6. アミノ酸の検索および分析 アミノ酸の検索には虫えいの 50% エタノール抽出液を用い, ペーパークロマトグラフィー (PPC) を行なった。東洋濾紙 No. 5 B (20×20 cm) を用い, 展開溶媒は水飽和フェノール (Ph) および n-ブタノール:酢酸:水 (4:1:5, 上層, BAW)

を使用し, ニンヒドリンで呈色させた。アミノ酸の定量には, 日立 034 型液体クロマトグラフを使用し, 条件は標準アミノ酸分析法にしたがい, HW 法により算出した。この条件においては Asn と Ser が重なるので, Ser はアビセル SF を用いた薄層クロマトグラフ (展開溶媒, n-ブタノール:アセトン:ジエチルアミン:水, 30:30:6:5) で分別後ニンヒドリンで発色させ (*R_f*: Asn 0.11, Ser 0.32), 比色定量した。その結果に基づき, Asn 含量の補正を行なった。

実験結果

1. 遊離アミノ酸の検索

虫えいをメタノールに長期間浸漬しておくと, 虫えい表面に 2~3 mm の無色多角状の結晶が多数析出するのが認められた。この結晶は PPC, IR から Asn と判定された。そこで, 虫えい組織におけるその含有量が注目されるので, まず共存する遊離アミノ酸のパターンを知るため, 含水エタノール抽出液について PPC で検索を行なった結果, Asp, Ser, Asn, Gly, Gln, Ala, Tyr, Val, Leu が検出された。なかでも濃紺色に呈色する Asn が特に顕著であり, 上記の現象と合せ考えて, 他のアミノ酸に比べ Asn 含量ははるかに多いと判断された。また,

Table I. Amino Acid Contents of Chestnut Galls and Leaves*

Amino acids	Shibaguri		Tanzawa
	galls	leaves	galls
Asp	trace	188	—
Gln	108	trace	53
Asn	8559	655	6696
Ser	498	51	**
Glu	trace	160	—
Pro	"	trace	+
Gly	"	"	—
Ala	54	71	44
Val	55	+	33
Ile	25	trace	18
Leu	trace	+	trace
Tyr	"	trace	"
Phe	"	"	"
Trp	"	"	—
NH ₃	+	+	+
Agr	trace	trace	—
Sampling date	5/5, 8 '71	4/27 '72	4/27 '71

* mg/100g of dry matter, + small amount, — not detected. ** Content of serine was not determined.

液体クロマトグラフによる分析の結果, この他 6 種のアミノ酸が検出された (Table I). シバグリの健全葉に比較して, 虫えい組織には Asn 含量が著しく高い. 丹沢種虫えいにおいても同様である. これに対し, 同族アミドである Gln の含量はきわめて低く, Asn の 100 分の 1 程度である. また, 関連アミノ酸である Asp や Glu も微量であって, クリタマバチ虫えい組織には遊離アミノ酸として, Asn が特異的に集積することが認められる. 健全葉のアミノ酸量は虫えい組織に比べるとはるかに少ないが, Asn, Asp, Glu などの二塩基性アミノ酸が主となっている.

2. アスパラギンの確認

Asn 以外のアミノ酸の定量用試料を調製する際に, 虫えい 133.48 g (新鮮重) から得られた沈殿 2.24 g を, 水 8 ml に溶解して活性炭処理後再結し, 無色プリズム状結晶 1.45 g を得た. mp 237°C, $[\alpha]_D^{25} -5.9^\circ$ ($c=1.7$, H_2O), 分析値: C, 32.07; H, 6.71; N, 18.64%. 計算値: $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$ として, C, 32.00; H, 6.71; N, 18.66%. IR は L-Asn 標品と完全に一致した. また, 少量の結晶を濃塩酸に溶解しアンブルに封入して, 200°C に 1 時間分解後生成物を PPC で検索したところ, R_f 0.21 (Ph), 0.19 (BAW) に唯一つのニンヒドリン陽性スポットが検出され, L-Asp の標品と一致した. 以上の結果, 得られた結晶は L-アスパラギンと確認された.

3. アスパラギン含量の経時的变化

虫えい組織には Asn 含量が特に多いことが認められたので, 虫えいの肥大に伴う Asn の集積状況をみるため, 萌芽期からクリタマバチが羽化するまでの間, 虫えい中の Asn 含量の経時的变化を調べた.

1) 水分含有率: 虫えいの水分含量は, 虫えいの肥大に伴って約 85% に増し, 肥大停止後もほぼこの含水率を維持した. 健全葉と虫えいに付着した葉片は, 葉の伸長成熟に伴って増減し, 両者はほぼ同じ傾向を示す (Fig. 1).

2) Asn 含量の変化: 虫えいの平均重量は, Fig. 2 に示すように 4 月に入って急速に増大して, 4 月下旬から 5 月上旬頃最大となり, 約 1 g に達した. 虫えいの Asn 量は, 明らかに萌芽とともに急激に増加し, 虫えいの肥大が頂点に達する時期に最大値となり, 虫えい 1 個あたりの含量 18.6 mg, 対乾物量 11.9% であった. また, 虫えいにおける Asn の最高含有率は, 健全葉の萌芽期における最大値に比べ 5.7 倍であった (Fig. 3). こ

Fig. 1. Moisture Content of Chestnut Galls and Leaves.

○—○ galls, □—□ healthy leaves of resistant chestnut tree, △—△ leaves attached to the galls.

Fig. 2. Growth Curve and Asparagine Content of a Chestnut Gall.

●—● mean weight of a fresh gall, ○—○ amount of Asn.

Fig. 3. Asparagine Content of Chestnut Galls and Healthy Leaves.

○—○ galls, □—□ healthy leaves of resistant chestnut tree.

Fig. 4. Total Nitrogen Content of Chestnut Galls and Leaves.

The symbols are the same as in Fig. 1.

Fig. 5. Total Amino-nitrogen Content of Chestnut Galls and Leaves.

The symbols are the same as in Fig. 1.

Fig. 6. Ratios of Amino-nitrogen of Asparagine to Total Amino-nitrogen and Also to Total Nitrogen of the Galls and the Healthy Leaves.

の間における虫えい中の虫体の生長を観察すると、虫えいの肥大期には虫体の生長が認められ、虫えいが最大となり、同時に Asn 含量が最大値を示す時期には、幼虫が大部分蛹化しているのが認められた。その後、羽化が始まる頃から Asn は急激に減少し続ける (Fig. 2)。虫えいはクリタマバチの羽化脱出により損傷され、褐変枯死に近づく。クリタマバチの羽化消長についての観察は、田村⁽⁹⁾の調査結果と一致している。健全葉・虫えいに付着した葉片とも、5月上旬以降は Asn 含量が低いに加えて、前述の前処理では除くことのできない妨害物質のために、Asn 含量の定量はできなかった。しかし、次に述べるように全窒素および水溶性アミノ態窒素を調べた結果、5月上旬以降特にアミノ酸含量の増加は認められない。

4. 全窒素およびアミノ態窒素の変化

Asn の消長がタンパク質やアミノ酸の動きと量的にどのような関連にあるかをみるために、全窒素および水溶性のアミノ態窒素の消長を同時に測定して比較検討した。

健全葉の窒素含有量は4月の萌芽期には虫えいより高いが、伸育期の5月以降は、おそらく炭水化物の蓄積のために、虫えいよりも低下する (Fig. 4)。また水溶性のアミノ態窒素含量は、萌芽期には増大するが以後は漸減する (Fig. 5)。虫えいに付着する葉片の全窒素量も健全葉と大差はないが、5~6月の間に幾分高い値を示している (Fig. 4)。これに対して虫えい組織では、その肥大に伴って水溶性アミノ態窒素が著しく増大し (全窒素中アミノ態窒素は約 38% に達する, Fig. 6 参照)、肥大が極大に達した時期には、その約 83% が Asn で、アミノ態窒素増加の主要因は Asn の増大に帰せられる (Fig. 5, 6)。またこの時期には、Asn 窒素の占める割合は約 60% に達する (Fig. 7)。クリタマバチの羽化期に入る

Fig. 7. Ratios of Asparagine-nitrogen to Total Nitrogen of Chestnut Galls and Leaves.

The symbols are the same as in Fig. 3.

と Asn は急速に減少するが、同時にそれと平行して全窒素および水溶性アミノ態窒素も減少する。

なお健全葉において、萌芽期に一時 Asn 含量が増大し、全窒素中 Asn 窒素の占める割合は 8%、全アミノ態窒素中（全窒素中アミノ態窒素は約 8%、Fig. 6 参照）Asn のアミノ態窒素は 50% に達する（Fig. 7, 6）ことから、クリの幼芽は他のアミノ酸に比較して Asn を多く形成する機能を有するものと判断される。

考 察

Asn は植物に分布が広く、一般に生長期の植物組織中に含量が多い。特に暗黒下で生長させたルービンの芽ばえでは、対乾物量 25~30% にも達する^(10,11)。これは暗黒中の発芽によって、呼吸源の糖類が消費されてしまうと、アミノ酸が酸化的脱アミノ反応によって呼吸源として利用される結果、多量のアンモニアを生じ、その解毒のために、これが Asn のようなアミドとして集積されるためと解釈されている。

クリタマバチ虫えい中に Asn が多量に集積される理由として、虫えいが短期間に生長肥大していることから、同様の説明を当てはめることもできよう。しかし、萌芽期のクリの芽には元来他のアミノ酸に比し、Asn を多く形成する能力が認められ（Fig. 6）、また Asn の集積とクリタマバチ幼虫の生育過程の変化とが良く一致している（Fig. 2）ことから、幼虫の分泌または排泄物あるいは虫えい誘導物質が、Asn 合成あるいは分解の代謝系に大きな作用を及ぼしているものと考えられる。クリタマバチが虫えいから羽化脱出すると、Asn 含量が急激に減少するので、幼虫の生理的生活が Asn 含量の維持に強く関与しているとみることが出来る。また、集積された Asn のその後の行方についても興味あるところで、羽化期に入ると Asn と同時に全窒素や水溶性アミノ態窒素も減少している（Fig. 4, 5）ことから、虫えい組織内で単に Asn が Asp やその他のアミノ酸あるいはタンパク質に移行して虫えい組織内に存在するのではなく、Asn またはその代謝窒素化合物が虫えいから、すみやかに転出するものと考えられる。

このような病害生物の侵入に伴う罹病植物組織中に、特定アミノ酸が集積される例としては、ネマトーダの寄生によるグレープフルーツ芽ばえにおける Arg⁽¹²⁾、アルファルファにおける Arg, Asn, Thr, Trp やエンドウ芽ばえに Arg, Asn, Ser, Trp⁽¹³⁾、ウイルスの感染に

よるトウモロコシ⁽¹⁴⁾、ポポー⁽¹⁵⁾、ヒマ⁽¹⁶⁾、ruffa⁽¹⁷⁾、パレイシヨに^(18,19)における Asn の集積などが知られているが、集積の生化学的機構、意義は明らかではない。

要 約

クリタマバチ虫えいの成分について研究し、多量の Asn の存在が確認されたので、さらに虫えいの肥大に伴うその含量の経時的变化を調べた。その結果、虫えいの肥大とともに Asn が急激に集積し、健全葉の最大値に比べ 5.7 倍、虫えい 1 個（約 1g）あたり 18.6 mg、対乾物量 11.9% に達することが認められた。また、この間におけるクリタマバチの生育状況の観察の結果、幼虫の生長とともに虫えいの肥大と Asn の集積がおこり、蛹化する時期には両者とも一定の最大値となり、羽化期に入ると Asn は急激に減少するのが認められた。したがって、虫えいにおける Asn 含量の消長とクリタマバチ幼虫の生活環との間には、密接な関係があるものと考えられる。

- (1) 於保信彦, 志村 勲: 植物防疫, **24**, 421 (1970).
- (2) 鳥潟博高, 松井鎬一郎: 園学誌, **35**, 89 (1966).
- (3) 松井鎬一郎, 鳥潟博高: 同上, **37**, 95 (1968).
- (4) 松井鎬一郎, 鳥潟博高: 同上, **39**, 115 (1970).
- (5) 横田孝雄, 岡林みどり, 堤 和弘, 高橋信孝: 日農化大会講演要旨集 (仙台), p. 367 (1972).
- (6) 岡林みどり, 横田孝雄, 高橋信孝, 志村 勲, 梅谷猷二: 植物化学調節研究会大会研究発表記録集 (岐阜), p. 23 (1972).
- (7) 大川勝徳, 寺島賢一, 松井鎬一郎: 同会記録集, p. 25.
- (8) C. H. W. Hirs, S. Moore and W. H. Stein: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6063 (1954).
- (9) 田村正人: 関東東山病害虫研究会年報, 第 7 集, p. 60 (1960).
- (10) E. Schulze: *Z. Physiol. Chem.*, **24**, 18 (1898).
- (11) M. Lever and G. W. Butter: *J. Exp. Bot.*, **22**, 285 (1971).
- (12) R. W. Hanks and A. W. Feldman: *Phytopathology*, **56**, 261 (1966).
- (13) Robert K. Howell and L. R. Krusberg: *ibid.*, **56**, 1170 (1966).
- (14) I. Harpaz and S. W. Applebaum: *Nature*, **192**, 780 (1961).
- (15) M. M. Laloraya and Jee Govind: *ibid.*, **175**, 907 (1955).
- (16) M. M. Laloraya, Jee Govind, R. Varma and T. Rajarao: *Experientia*, **12**, 58 (1956).
- (17) T. Rajarao: *Flora*, **143**, 635 (1956).
- (18) B. L. Bershtein, M. K. Fomyuk and A. S. Okaneko: *C. R. Acad. Sci., U. R. S. S.*, **120**, 425 (1958).
- (19) O. Henke: *Zbl. Bakt., Abt.*, **2**, 110, 361 (1957).