

# カイコの脱皮・変態におよぼす緑きょう病菌(*Spicaria prasina*)生産物質の影響

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
著者	三国, 辰男 河上, 清
巻/号	19巻3号
掲載ページ	p. 203-207
発行年月	1975年9月

## カイコの脱皮・変態におよぼす緑きょう病菌

### (*Spicaria prasina*) 生産物質の影響

三 国 辰 男・河 上 清

農林省蚕糸試験場

(1975年6月3日受領)

The Effect of the Product by *Spicaria prasina* (MAUBLANC) SAWADA on the Molting and Metamorphosis of the Silkworm, *Bombyx mori* L. Tatsuo MIKUNI and Kiyoshi KAWAKAMI (The Sericultural Experiment Station, Wada-3, Suginami-ku, Tokyo 166) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 19: 203~207 (1975)

When a definite amount of the filtrate obtained from the haemolymph of an infected larva of the silkworm or from the culture of *Spicaria prasina* (MAUBLANC) SAWADA was injected into the 3rd- or 4th-instar larvae of the silkworm belonging to the four-molter hybrid, many larvae became precocious pupae without larval molting. The ratio of precocious pupae was higher when the filtrate was injected to the younger larvae than the older. On the contrary, either pupation from the 5th-instar larva or emergence from the pupa was inhibited by the injection of filtrate of the fungus culture. The active substance in the culture filtrate was extracted from water layer with organic solvents, such as ether, chloroform, petroleum ether, and *n*-butanol. While, the substance could not be extracted with methanol, ethanol, and ethylacetate, and was precipitated with acetone. The substance was inactivated by heating at 50°C for 10 min, even though no activity was lost following the treatment with buffer solution at pH 1.7 or 9.7 at about 23°C for 1 hr.

### 緒 言

昆虫病原糸状菌の中で、毒性的物質または殺虫性物質を代謝生産することが知られているのは、*Aspergillus* spp. (古平, 1954; KODAIRA, 1961 a, 1961 b; GUDAUSKAS *et al.*, 1967; MATSUMURA and KNIGHT, 1967; SHAN *et al.*, 1968; BEARD and WALTON, 1969; REISS, 1973, TOSCANO and REEVES, 1973), *Metarrhizium anisopliae* (KODAIRA, 1961 b, 1962; ROBERTS, 1966 a, 1966 b, 1969; SUZUKI *et al.*, 1970 a, 1970 b, 1971; CRISAN, 1971; SUZUKI and TAMURA, 1972), *Beauveria bassiana* (SCHAERFFENBERG, 1957; KUCERA and SAMSINAKOVA, 1968; HAMILL *et al.*, 1969; KUCERA, 1971), および *Entomophthora* spp. (PRASERTPHON, 1967; YENDOL *et al.*, 1968) である。昆虫の糸状菌病感染における菌の生産する毒性物質の役割を明らかにすることは、宿主昆虫の病死機序の解明に役立つと同時に、最近では、害虫の微生物利用による防除へも貢献するものとして期待され

ている (鈴木, 1973; 高橋ら, 1973)。

著者の1人、河上 (1972) は、緑きょう病蚕は他の硬化病蚕と違って病徴の発現した幼虫がその齢期から脱皮してつぎの齢期へは進まないで致死することを報告したが、今回、緑きょう病菌がカイコの発育、とくに、幼虫脱皮および変態に影響を与える物質を生産するといえる知見をえたので、その概要を報告する。

本文に入るに先だち、研究の指導ならびに本稿の校閲を賜った農林省蚕糸試験場病理部長小林勝利博士に感謝の意を表する。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌

蚕糸試験場硬化病研究室保存の緑きょう病菌 *Spicaria prasina* (MAUBLANC) SAWADA 4株 (菌株番号 202, 334, 335, 336), 白きょう病菌 *Beauveria bassiana* (BAL-SAMO) VUILLEMIN 2株 (菌株番号 201, 203), 黒きょう病菌 *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN,

および赤きょう病菌 *Paecilomyces fumoso-roseus* (WIZE) BROWN et SMITH である。

## 2. 培養ろ液の調製

上記各菌種を菌株ごとに蚕蛹煎汁寒天培地（蔗糖 2% 添加）で前培養してえられた分生子を、500 ml 容平底フラスコに入れた蚕蛹煎汁液体培地に接種し、25°C で所定日数静置または振とう培養後、ミリポアフィルター（孔径 1.2  $\mu$  および 0.45  $\mu$ ）でろ液を調製した。調製されたるろ液は供試時まで水室内に保存された。

## 3. 緑きょう病蚕ろ過体液の調製

緑きょう病菌 (336) の分生子懸濁液 ( $3 \times 10^4$  分生子/ $\text{mm}^3$ ) を、4 齢起蚕へ塗布接種した後、鏡検して体液中に短菌糸の増殖が確認された 5 齢 3~5 日目の病蚕からその体液を水室内で採取し、遠沈上清 (3,000 rpm, 20 min) を、ミリポアフィルターでろ過し、これを病蚕ろ過体液とした。なお、菌無接種蚕からの体液も同様に処理して健蚕ろ過体液とした。これらは供試時まで水室内に保存された。

## 4. 材料蚕

供試蚕品種は 4 眠交雑種の支 132 号  $\times$  日 132 号および支 135 号  $\times$  日 134 号で、それぞれの 3 齢 1~3 日、4 齢 1~3 日、5 齢 1~7 日の幼虫および蛹化 2 日目の蛹が供試された。

## 5. 培養ろ液中の菌生産物質の理化学的性質

緑きょう病菌の 15 日間培養ろ液を用いて、40~60°C の温度処理、メタノール、エタノール、酢酸エチル、エーテル、アセトン、石油エーテル、クロロホルム、または *n*-ブタノールによる抽出または分別処理を行い、その理化学的性状を調べた。なお、pH の影響は、アセトン粉末を用いて pH 1.7 の N/10 塩酸緩衝液および同 9.7 のペロナル緩衝液でそれぞれ 23°C、1 時間処理して調べた。

## 6. 検定法

上記の 2, 3, 5 でえられた培養ろ液、病蚕および健蚕ろ過体液、各種有機溶媒による分画液、温度処理ろ液または pH 処理ろ液のそれぞれを、3 齢および 4 齢幼虫に対しては 5  $\mu$ l、5 齢幼虫および蛹に対しては 10  $\mu$ l ずつ注射し、以後これら被検幼虫は普通に飼育、蛹は 25°C に保護し、幼虫脱皮、蛹化および羽化について無処理蚕との比較を行なった。

なお別に、培養ろ液を人工飼料に添加し、3 齢 1 日から 4 齢末期まで毎日、カイコ幼虫へ添食させた場合についても同様の調査を行なった。

## 結果と考察

### 1. 緑きょう病蚕ろ過体液による 3 眠蚕の発現

緑きょう病蚕および健蚕からえられたろ過体液をそれぞれ 4 齢起蚕へ注射した場合、病蚕ろ過体液注射区において、3 眠蚕が高率に発現した（第 1 表）。これら 3 眠蚕の 4 齢期間は 8~9 日間で、幼虫はその間発育を続け光沢を帯び、やがてそのまま熟蚕となり、結繭した。なお、この場合にろ過体液を注射された幼虫は、けいれん、胸部肥大、吐液、麻ひなどの注射体液に起因すると思われる中毒的症狀を、KODAIRA (1961 b) の場合と同様に起したが、これらはすべて、注射後 30~60 分で回復した。

### 2. 培養ろ液による 3 眠蚕の発現

緑きょう病菌 4 株を静置または振とう培養してえられた培養ろ液を 4 齢起蚕へ注射した場合、静置および振とうの両培養法のいずれの菌株の培養ろ液によっても 3 眠蚕が発現した（第 2 表）。なお、静置培養法では、3 株

第 1 表 緑きょう病蚕のろ過体液による 3 眠蚕の発現

注 射	試験区	供試蚕数	3 眠蚕数	4 眠蚕数
病蚕ろ過体液	1	21	17	4
	2	22	20	2
	3	22	21	1
	4	7	1	6
	5	10	7	3
健蚕ろ過体液	1	20	0	20
	2	20	0	20
	3	10	0	10
無 注 射	1	21	0	21
	2	22	0	22
	3	14	0	14
	4	12	0	12

注射には家蚕 4 眠交雑種の支 132 号  $\times$  日 132 号の 4 齢 1 日幼虫を用いた。

第 2 表 緑きょう病菌の培養ろ液による 3 眠蚕の発現

注 射	供試菌株番号	各培養時期のろ液による 3 眠蚕発現数			
		7 日	10 日	15 日	22 日
静置培養ろ液	202	11	19	11	12
	334	2	9	18	11
	335	16	16	14	10
	336	11	19	11	12
振とう培養ろ液	202	19	—	13	—
	334	5	—	15	—
	335	9	—	13	—
	336	9	—	14	—
無接種培地		0	—	—	—

注射には家蚕 4 眠交雑種の支 135 号  $\times$  日 135 号の 4 齢 1 日幼虫を各区 22 頭ずつ用いた。

が10日間培養で、1株が15日間培養でそれぞれ最も高率に3眠蚕を生じたが、それ以上に培養日数が増加すると3眠蚕発現数は減少傾向を示した。

一方、白きょう病菌2株、黒きょう病菌、赤きょう病菌、および緑きょう病菌(336)の4菌種5株を25°Cで4週間静置培養してえられたそれぞれの培養ろ液を4齢起蚕へ注射したが、緑きょう病菌以外の菌種の培養ろ液では3眠蚕はまったく発現しなかった。

ついで、緑きょう病菌培養ろ液を3齢1~3日および4齢1~4日の各幼虫へそれぞれ注射したところ3齢幼虫の場合、3齢起蚕注射区だけに2眠蚕が生じ、他区の幼虫はすべて4眠蚕となった。発現した2眠蚕は発育を続けて光沢を帯びた後に、熟蚕となり結繭・蛹化した。その3齢期間は11~13日間であった。4齢幼虫へ注射した場合は、いずれの注射区においても3眠蚕が発現したが、3眠蚕発現率は4齢起蚕注射区で最も高率であり以後注射時期が遅くなるほど低率となった(第3表)。以上から、2眠蚕または3眠蚕を発現させる培養ろ液注射の臨界期は、3齢幼虫では桑づけ後24時間以内、4齢幼虫ではほぼ72時間以内と考えられる。

さらに、5齢幼虫または蛹へ培養ろ液を注射した場合供試昆虫は蛹化または羽化を阻害されるとともに、死亡数が増加した(第4表)。培養ろ液を注射された5齢幼虫においては、幼虫期間内の死亡はなかったが、未蛹化個体または半蛹化個体が多発して蛹化率は9~71%となり、さらに羽化しない蛹もみられた。これら蛹化または羽化しない個体は、注射後23日目までの間にすべて死亡した。これら蛹化または羽化阻害ならびに致死効果と注射時期との関係は、5齢後期幼虫に対する注射区ほど蛹化数は減少し、逆に死亡個体数は増大して、カイコの発育に対する阻害程度は増加する傾向を示した。

一方、蛹注射区においては、羽化はまったくみられず注射23日後(蛹化25日後)には、25個体が蛹体のまま生存していたが、注射41日後においては3個体が蛹のまま生存し他はすべて死亡し、注射により蛹期の長期化または羽化阻害作用がみられた。

緑きょう病菌培養ろ液を人工飼料へ添加して、3齢期および4齢期を通じ連続経口投与された幼虫には、何らの発育異常も認められず、2眠蚕または3眠蚕はまったく発現しなかった。

以上から、緑きょう病菌がカイコの成長・成虫分化へ作用する物質を生産することが示された。この菌の生産する作用物質は、3齢および4齢幼虫に対しては、結果的には幼虫脱皮を省略して早熟化させる作用を、5齢幼

第3表 緑きょう病菌培養ろ液の注射時期と2眠蚕または3眠蚕発現との関係

供試蚕齢	桑づけ後の経過時間	供試蚕数	2眠蚕発現数	3眠蚕発現数
3	0	24	13	
	24	22	0	
	48	22	0	
4	0	22		21
	24	21		12
	48	22		3
4	0	22		14
		23		17
	24	24		7
		24		8
	48	24		6
		24		5
	72	24		6
		24		0
	無注射	23		0
		21		0

第4表 緑きょう病菌の培養ろ液の蛹化または羽化に対する影響

供試幼虫・蛹	注 射	供試蚕数	蛹化虫数	羽化虫数	死亡虫数	
5齢1日幼虫	培養ろ液	106	51	43	63	
	無注射	110	110	109	1	
5齢1日幼虫	培養ろ液	21	11	11	10	
	2 "	"	21	15	9	12
	3 "	"	22	8	8	14
	4 "	"	23	7	4	19
	5 "	"	21	10	8	13
	6 "	"	23	5	5	18
	7 "	"	23	2	1	22
	無注射	23	23	23	0	
蛹 2日目	培養ろ液	54	—	0	29	
	無接種培地	54	—	54	0	
	無注射	54	—	53	1	

死亡虫数の調査は、無処理区の個体のすべてが羽化を終了するまで(注射後23~29日間)とした。

虫または蛹に対しては、前者へは蛹化、後者へは羽化を妨げる作用を現した。このことから、河上(1972)によって示された緑きょう病蚕が発病齢期からつぎの齢期へ進まない原因の1つはこの物質に起因したと思われるしこの物質がまた緑きょう病蚕の致死機構へ関与していると推察される。

従来行われた菌生産物質による昆虫の脱皮・変態阻害についてみると、3眠蚕の発現については、コウジ酸とその関連物質の経口投与(村越, 1972; 村越・樺本, 1972)があり、変態阻害作用については、*Entomophthora apiculata* および *E. coronata* の培養ろ液の経皮注射(Prasertphon, 1967)がある。一方、昆虫の内分泌学

的研究においてはアラタ体摘出蚕や頭胸間結紮における早熟蚕の発現(金, 1939; FUKUDA, 1944), 脳摘出による永続蛹(小林, 1955)の発現などが知られているが, 本研究で示されたように菌生産物質が一方では2眠蚕または3眠蚕などの早熟蛹の発現を促し, 他方では蛹化あるいは羽化に対し阻害的に作用することは, これまでの内分泌学的知見とどのように関連をもつか, また, これらの作用は菌の生産する単一物質に由来するものか否かなどについては, 今後に多くの問題を残すとともに興味ある示唆を与えるものといえる。

### 3. 培養ろ液の理化学的性質

緑きょう病菌培養ろ液の3眠蚕発現作用は50°Cおよび60°C, 各10分処理により失われたが, pHによる影響は顕著でなかった(第5表)。

第5表 緑きょう病菌培養ろ液の各種処理と3眠蚕の発現

培養ろ液処理	供試蚕数	3眠蚕発現数
温度60°C10分	21	0
50 10	21	0
40 10	22	13
	22	21
無 処 理	21	18
pH* 9.7	23	3
	21	5
1.7	17	5
	19	9
有機溶媒		
メタノール40%抽出	30	0
	30	0
エタノール80%抽出	25	0
	25	0
酢酸エチル40%抽出	30	0
エチルエーテル50%分別		
エーテル層	21	0
	23	0
水 層	19	16
	20	17
アセトン50%分別		
上 清 部	21	0
	21	0
沈 殿 部	20	19
	21	15
石油エーテル50%分別		
エーテル層	15	1
	20	5
水 層	16	16
	17	14
クロロホルム50%分別		
水 層	21	20
	20	19
クロロホルム層	10	0
	17	0
n-ブタノール20%洗浄	22	19

\* 処理法は本文参照

なお, 室温(25~30°C)においても, 放置日数の増加にともない, 上記の作用は低下する傾向が示された。

有機溶媒による抽出または分別において, 3眠蚕発現作用は, エタノール, メタノール, 酢酸エチル処理によって失われるが, エーテルまたはクロロホルムによる水層部に, アセトンによる沈殿部に, そしてブタノールで脂質を除去した水層部に, それぞれ認められ, 石油エーテルでは分別されず(第5表), タンパク性物質であることが示唆された。

PRASERTPHON(1967)はハチミツガ幼虫の変態に阻害作用をもつとした *Entomophthora coronata* などの生産物質が, 熱変性, 水可溶, エーテル不溶, などからタンパク性のものとしているが, その性状は本培養ろ液の作用物質に類似しているように思われる。

## 摘 要

緑きょう病菌がその病蚕体液または培養液中に, 結果的にはカイコの早熟化を促進し, 2眠蚕または3眠蚕を発現させる作用, さらに蛹化または羽化を阻害する作用をもつ物質を生産することを明らかにした。

1. 緑きょう病蚕のろ過体液を4齢起蚕へ注射することにより, 3眠蚕が高率に発現した。
2. 緑きょう病菌培養ろ液を3齢および4齢幼虫に注射することにより, 3齢蚕からは2眠蚕, 4齢蚕からは3眠蚕を生じ, その発現率は起蚕時注射区において最も高率であった。なお, 他の硬化病菌培養ろ液による3眠蚕の発現はまったく認められなかった。
3. 緑きょう病菌培養ろ液を注射された5齢幼虫および蛹は, 蛹化または羽化をそれぞれ阻害された。
4. 培養ろ液に含まれる作用物質は, エーテルおよびクロロホルム処理の水層部に, アセトン処理の沈殿部に分別され, 温度による影響はうけ易いが, pHによる影響はうけにくいことが知られた。

## 引 用 文 献

- BEARD, R. L., and G. S. WALTON (1969) Kojic acid as an insecticidal mycotoxin. *J. Invert. Path.* **14**: 53~59.
- CRISAN, E. V. (1971) Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium* spores in mosquito larvae. *J. Invert. Path.* **17**: 260~264.
- FUKUDA, S. (1944) The hormonal mechanism of larval molting and metamorphosis in the silkworm. *J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ. Sec. 4* (6): 477~532.
- GUDAUSKAS, R. T., DAVIS, N. D., and U. L. DIENER (1967) Sensitivity of *Heliothis virescens* larvae to

- aflatoxin in *Ad Libitum* feeding. *J. Invert. Path.* **9** : 132~133.
- HAMILL, R. L., HIGGINS, C. E., BOAZ, H. E., and M. GORMANN (1969) The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotics toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Letters* (49) : 4255~4258.
- 河上 清 (1972) 硬化病蚕の病斑と菌の体内増殖について. *日蚕雑* **41** : 144~149.
- 金 順鳳 (1939) 蚕の *Corpus allatum* ホルモンに就て. *日蚕雑* **10** : 86~97.
- 小林勝利 (1955) 家蚕脳ホルモンと成虫分化. *日蚕雑* **24** : 389~392.
- 古平福紀 (1954) 硬化病菌の生産する毒性物質に関する研究 (第1報) *Aspergillus ochraceus* 及び *Sterigmatocystis japonica* の生産する蚕児中毒性物質について. *信大織研究報* (4) : 1~3.
- KODAIRA, Y. (1961a) Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agric. biol. Chem.* **25** : 261~262.
- KODAIRA, Y. (1961b) Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Fac. Text. Sci. Tech. Shinshu Univ. Ser. E*, (29) : 1~68.
- KODAIRA, Y. (1962) Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. *Agric. biol. Chem.* **26** : 36~42.
- KUCERA, M. (1971) Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. *J. Invert. Path.* **17** : 211~215.
- KUCERA, M., and A. SAMSINAKOVA (1968) Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invert. Path.* **12** : 316~320.
- MATSUMURA, F., and S. G. KNIGHT (1967) Toxicity and chemosterilizing activity of aflatoxin against insects. *J. econ. Ent.* **60** : 871~872.
- 村越重雄 (1972) こうじ酸の経口投与による4眠交雑種からの3眠蚕出現について. *応動昆* **16** : 111~113.
- 村越重雄・樺本五男 (1972) 2-ヒドロキシメチル-5-ヒドロキシ-4-ピリドンの経口投与による4眠交雑種からの3眠蚕出現について. *応動昆* **16** : 159~161.
- PRASERTPHON, S. (1967) Mycotoxin production by species of *Entomophthora*. *J. Invert. Path.* **9** : 281~282.
- REISS, J. (1973) Toxicity of molds to the larvae of *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Path.* **21** : 112~113.
- ROBERTS, D. W. (1966a) Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae*. I. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *J. Invert. Path.* **8** : 212~221.
- ROBERTS, D. W. (1969b) Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae*. II. Symptom and detection in moribund hosts. *J. Invert. Path.* **8** : 222~227.
- ROBERTS, D. W. (1969) Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae*: isolation of destruxins from submerged cultures. *J. Invert. Path.* **14** : 82~88.
- SCHAERFFENBERG, B. (1957) Infektions- und Entwicklungsverlauf des insektentötenden Pilzes *Beauveria bassiana* (Vuill.) Link. *Z. angew. Ent.* **41** : 395~402.
- SHAH, V. K., MATSUMURA, F., and S. G. KNIGHT (1968) Fungal toxins against larvae of the yellow-fever mosquito *Aedes aegypti*. *J. Invert. Path.* **11** : 146~148.
- 鈴木昭憲 (1973) 昆虫病原糸状菌の生産する殺虫性物質. *醸工* **51** : 374~377.
- SUZUKI, A., KAWAKAMI, K., and S. TAMURA (1971) Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarrhizium anisopliae*. *Agric. biol. Chem.* **35** : 1641~1643.
- SUZUKI, A., TAGUCHI, H., and S. TAMURA (1970a) Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C, D, and desmethyl destruxin B, produced by *Metarrhizium anisopliae*. *Agric. biol. Chem.* **34** : 813~816.
- SUZUKI, A., TAKAHASHI, N., and S. TAMURA (1970b) Mass spectrometry of destruxins A and B, insecticidal cyclodepsipeptides produced by *Metarrhizium anisopliae*. *Org. Mass Spectrom.* **4** : 175~180.
- SUZUKI, A., and S. TAMURA (1972) Isolation and structure of protodestruxin from *Metarrhizium anisopliae*. *Agric. biol. Chem.* **36** : 896~898.
- 高橋信孝・丸茂晋吾・大岳 望 (1973) 生理活性天然物化学. 東京大学出版会, 東京, 348 pp.
- TOSCANO, N. C., and E. L. REEVES (1973) Effect of *Aspergillus flavus* mycotoxin on *Culex* mosquito larvae. *J. Invert. Path.* **22** : 55~59.
- YENDOL, W. G., MILLER, E. M., and C. N. BEHNKE (1968) Toxic substances from entomophthoraceous fungi. *J. Invert. Path.* **10** : 313~319.