

昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* の発芽誘導期を短縮する 生理活性物質の分離精製と構造解析及びその利用に関する研究

Isolation and Characterization of a germination accelerating factor from the Silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, and potential of the bioactive substance as an adjuvant for a fungal pesticide of *N. rileyi*

野田孝博
Takahiro NODA

目 次

緒論	51
第 I 章 昆虫病原性糸状菌 <i>Nomuraea rileyi</i> の <i>Bombyx mori</i> 由来 発芽促進因子の単離方法の検討	53
緒言	53
第 1 節 実験材料及び方法	53
1) 抽出材料	
2) 抽出部位の検討	
3) 抽出溶媒の検討	
4) 分解反応の影響	
5) 溶媒分配クロマトグラフィーの検討	
6) カラムクロマトグラフィーの条件検討	
7) <i>N. rileyi</i> の分生子懸だく液の調製	
8) 生物検定	
第 2 節 結果及び考察	55
第 3 節 小括	58
第 II 章 昆虫病原性糸状菌 <i>N. rileyi</i> の <i>B. mori</i> 由来発芽促進物質の単離	58
緒言	58
第 1 節 実験材料及び方法	59
1) <i>N. rileyi</i> の分生子懸だく液の調製	
2) 抽出材料	
3) メタノール抽出	
4) 酸分解処理	
5) 溶媒分配クロマトグラフィー	
6) 順相カラムクロマトグラフィー	
7) 逆相カラムクロマトグラフィー	
8) Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー	
9) 薄層クロマトグラフィー (TLC)	
10) 高性能 TLC (HPTLC)	
11) TLC 呈色反応	

1 2)	TLC による酸分解処理前後の活性成分の <i>R_f</i> 値の比較	
1 3)	生物検定	
第 2 節	結果及び考察	60
第 3 節	小括	65
第三章	昆虫病原性糸状菌 <i>N. rileyi</i> の <i>B. mori</i> 由来発芽促進物質の構造解析	65
緒言		65
第 1 節	実験材料及び方法	66
1)	<i>N. rileyi</i> の分生子懸たく液の調製	
2)	発芽促進物質の単離	
3)	核磁気共鳴分光法 (NMR) による解析	
4)	旋光度測定	
5)	アセチル化	
6)	トリメチルシリル (TMS) 化	
7)	ガスクロマトグラフィー/質量スペクトル (GC/MS) 解析	
8)	構造活性相関	
9)	生物検定	
第 2 節	結果及び考察	66
第 3 節	小括	70
第四章	C_{14} -スフィンゴシンにより誘導される発芽に対する 栄養要求性と寄主昆虫表面の栄養条件	70
緒言		70
第 1 節	実験材料及び方法	71
1)	<i>N. rileyi</i> の分生子懸たく液の調製	
2)	窒素成分の C_{14} -スフィンゴシンの発芽促進活性に及ぼす影響	
3)	pH 及び培養期間の C_{14} -スフィンゴシンの発芽促進活性に及ぼす影響	
4)	発芽管の伸長調査	
5)	発芽管生育の経時的变化	
6)	生物検定	
7)	寄主表面抽出に用いた昆虫	
8)	寄主表面抽出物の調製	
9)	アミノ酸分析	
10)	C_{14} -スフィンゴシン分析	
1 1)	昆虫体表面積の測定	
1 2)	単位面積当たりの量	
第 2 節	結果及び考察	72
第 3 節	小括	78
第五章	C_{14} -スフィンゴシンの昆虫病原糸状菌製剤に対する 補助剤としての可能性	79
緒言		79
第 1 節	実験材料及び方法	79
1)	実験昆虫	
2)	<i>N. rileyi</i> の分生子懸たく液の調製	
3)	接種液の調製	

4) 感染所要時間の指標	
5) 室内実験	
6) ポット試験	
第2節 結果及び考察	80
第3節 小括	82
第VI章 総括	83
第1節 総合考察	83
第2節 要約	86
謝辞	88
参考文献	88
本論文に関わる報告	93
Summary	94

Abbreviations

C₁₂-Sph : *D-erythro*-C₁₂-sphingosine
C₁₄-Sph : *D-erythro*-C₁₄-sphingosine
C₁₆-Sph : *D-erythro*-C₁₆-sphingosine
C₁₈-Sph : *D-erythro*-C₁₈-sphingosine
CMC : critical micelle concentration
COSY : correlation spectroscopy
DM : defined media
EC₅₀ : the effective concentration for a 50% germination rate
ESI : electrospray ionization
GC : gas chromatography
GT₅₀ : the germination time to the 50% germination rate
HMQC : heteronuclear multiple-quantum coherence
HPLC : high-pressure liquid chromatography
HPTLC : high-performance thin-layer chromatography
HMBC : heteronuclear multiple-bond correlation
LC : liquid chromatography
MS : mass spectrometry
PB : phosphate buffer
R.H. : relative humidity
RI : refractive index
RT : retention time
SIM : selected ion monitoring
SMAY : Sabouraud-maltose agar fortified with 1% yeast extract
SE : standard error
SDW : sterile distilled water;
TLC : thin-layer chromatography
TR₅₀ : time required for 50% infection rate
TMS : trimethylsilyl

昆虫学名

A. gemmatalis

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (和名：なし)

A. obscurus

Agriotes obscurus Linnaeus (Coleoptera: Elateridae) (和名：なし)

B. mori

Bombix mori Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) (和名：カイコ)

D. melanogaster

Drosophila melanogaster Meigen (Diptera: Drosophilidae) (和名：ショウジョウバエ)

E. fabae

Empoasca fabae Harris (Homoptera: Cicadellidae) (和名：なし)

H. armigera

Helicoverpa armigera Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (和名：オオタバコガ)

H. virescens

Heliothis virescens Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (和名：なし)

H. zea

Heliothis zea Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) (和名：なし)

H. postica

Hylobius postica Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) (和名：アルファルファタコゾウムシ)

L. dispar

Lymantria dispar Linnaeus (Lepidoptera: Lymantriidae) (和名：マイマイガ)

M. sexta

Manduca sexta Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae) (和名：タバコスズメガ)

M. brassicae

Mamestra brassicae Linnaeus (Lepidoptera: Noctuidae) (和名：ヨトウガ)

O. rhinoceros

Oryctes rhinoceros Linnaeus (Coleoptera: Scarabaeidae) (和名：サイカブトムシ)

P. xylostella

Plutella xylostella Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae) (和名：コナガ)

S. decorum

Simulium decorum Walker (Diptera: Simuliidae) (和名：なし)

S. litura

Spodoptera litura Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (和名：ハスモンヨトウ)

S. rostratum

Simulium rostratum Lundström (Diptera: Simuliidae) (和名：なし)

T. ni

Trichoplusia ni Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (和名：イラクサギンウワバ)

微生物学名

A. flavus

Aspergillus flavus Link (Deuteromycotina 不完全菌類)

A. oligospora

Arthrobotrys oligospora Fresenius (Deuteromycotina 不完全菌類)

B. bassiana

Beauveria bassiana Balsamo (Deuteromycotina 不完全菌類)

B. brongniartii

Beauveria brongniartii (Saccardo) Petch (Deuteromycotina 不完全菌類)

E. conica

Erynia conica Nowak (Zygomycotina 接合菌類)

E. maimaiga

Entomophaga maimaiga Humber (Zygomycotina 接合菌類)

E. radicans

Erynia radicans Brefeld (Zygomycotina 接合菌類)

M. anisopliae

Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina 不完全菌類)

N. rileyi

Nomuraea rileyi (Farlow) Samson (Deuteromycotina 不完全菌類)

P. fumosoroseus

Paecilomyces fumosoroseus (Wize) Brown & Smith (Deuteromycotina 不完全菌類)

V. lecanii

Verticillium lecanii (Zimmermann) Viegas (Deuteromycotina 不完全菌類)

昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* の発芽誘導期を短縮する生理活性物質の分離精製と構造解析及びその利用に関する研究

Isolation and Characterization of a germination accelerating factor from the Silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, and potential of the bioactive substance as an adjuvant for a fungal pesticide of *N. rileyi*

野田孝博

Takahiro NODA

要 旨

昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* は鱗翅目昆虫、特にヤガ科昆虫への感染力が強い天敵微生物である。西南暖地においては野菜類・花き類など広範囲な農作物に被害を及ぼす大型鱗翅目害虫であるハスモンヨトウ、オオタバコガ、ヨトウガ等に対して病原性を示すことから、これらの害虫管理法の一つとして期待される。本菌の分生子は寄主由来の成分により発芽が促進されるなど特異な挙動を示すことが知られている。このことから寄主由来成分に本菌の寄主認識に関わる重要な因子が存在すると考えられるが、その因子は解明されていない。さらに、このような発芽促進活性は天敵糸状菌製剤の短所（感染成立のためには長時間の高湿、適温を要することなど）克服のための応用が期待された。そこで本研究では発芽促進因子の解析とその利用に関する研究をおこなった。

N.rileyi の寄主昆虫の一種であるカイコを材料としてメタノール抽出、酸分解処理、2種の溶媒分配、3種のカラムクロマトグラフィーにより発芽促進物質を単離した。精製された発芽促進物質は種々の機器分析により解析した結果、その化学構造を 2S-amino-tetradeca-4-ene-1,3R-diol (C₁₄-Sph) と決定した。

次に、スフィンゴシンの炭素鎖の長さに着目し構造活性相関を調査したところ、炭素鎖が 14 よりも短くても、長くても活性は劣り、精製物質と同じ炭素鎖 14 のスフィンゴシンが他の鎖長のものより数十倍～数百倍高い発芽促進活性を示した。さらに、C₁₄-Sph 誘導型発芽における補助因子についても検討した。その結果、アミノ酸であるアラニン、ヒスチジンに高い補助因子活性が認められた。

最後に *N. rileyi* を害虫管理に利用する際に、C₁₄-スフィンゴシンを補助剤として応用する方法について、感染所要時間を指標として検討した。in vitro 試験においては、C₁₄-スフィンゴシン存在下で前処理することによって感染所要時間の短縮効果が認められた。その効果は散布前処理 3～6 時間で高く、対照区の約 1/2 であった。しかし、それ以上の長時間の前処理は感染所要時間が長くなり逆効果であった。一方、C₁₄-スフィンゴシンが存在しない場合の散布前処理は前処理時間が長くなるにしたがい感染所要時間も長くなった。つまり、C₁₄-スフィンゴシンが存在しない場合は、散布前処理の感染時間に対する短縮効果は認められなかった。さらにポット試験においても、C₁₄-スフィンゴシンの存在下で前処理した場合には C₁₄-スフィンゴシンを使用しなかった場合と比較し感染所要時間は有意に短縮された。これらの結果から、C₁₄-スフィンゴシンを補助剤として利用することによって *N. rileyi* の感染における環境要求性を低下させることにつながり、ひいては実用場面での感染率の向上に寄与するものと考えられた。

本研究において得られた成果は、*N. rileyi* 分生子の寄主表面における分生子発芽の現象や寄主認識メカニズムを分子レベルで理解する足がかりとなるとともに、天敵微生物製剤の実用化に際し、補助剤としての可能性が示唆され、昆虫病原性糸状菌製剤の新しい利用技術へ展開できるものと期待された。

キーワード： *Nomuraea rileyi*, スフィンゴシン, 昆虫病原性糸状菌, 発芽促進物質, 生理活性物質

緒 論

近代農業における有害生物の防除は主に合成農薬によって行われ、これにより食料生産の増大と安定に多大な効果をあげてきた。しかし、その使用状況によっては環境の汚染、天敵や拮抗生物の減少、生物相のかく乱に加えて、有害生物の合成農薬に対する抵抗性の発達による農薬の効力低下などの諸弊害も起こり、従来のような合成農薬に過度に依存した有害生物防除は再検討をもとめられている。こうした弊害を軽減するため、今日、環境調和型ないしは環境保全型の農業指向の重要性が再認識され、病害虫の総合防除体系もしくは管理体系の構築のため、改めて各種素材の利用や機能開発が取り組まれている。昆虫病原性糸状菌もそうした対象のひとつであり、有害生物に対する選択性が高く、有害生物に対し抵抗性の獲得が少なく、また環境への負荷の少ない、しかも人体にも直接、間接に無害な殺虫機構 (Ignoffo, 1981) を応用する微生物的防除, microbial control (Steinhaus, 1949), の研究開発は国内外の多くの研究機関で進められている。

本論文で研究対象とした昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson は約 30 種類の鱗翅目昆虫への感染が報告されている天敵微生物である (Ignoffo, 1981)。本菌は、北米、南米、ヨーロッパ、アジアなどで多くの重要な農作物を加害する害虫に感染することが報告されており (Allen *et al.*, 1971; Fargues *et al.*, 1988; Hinds and Osterberger, 1931; Houle *et al.*, 1987; Ignoffo *et al.*, 1981; Ignoffo *et al.*, 1976; Kish and Allen, 1978; Leite and Lara, 1985), 特にヤガ科昆虫に対して感染力が強い (Ignoffo, 1981; 栢村, 1984; Stansly and Orellana, 1990; Vimala, 1994; Tang and Cheng, 1999)。また、北米においてはダイズに最も深刻な被害をもたらすヤガ科害虫である *Anticarsia gemmatilis* Hübner において自然界で密度を抑制する主要な要因でもある (Gazzoni *et al.*, 1961; Ignoffo, 1981; Pedigo *et al.*, 1983)。国内においては西南暖地で野菜類や花き類など広範囲な農作物に被害を及ぼしている広食性の大型の鱗翅目ヤガ科害虫である *Spodoptera litura* Fabricius, *Helicoverpa armigera* Hübner, *Mamestra brassicae* Linnae 等に対して病原性を示す。このようなことから、寄主となる害虫を対象とした害虫管理法の一つとして期待されている。

N. rileyi の生物農薬としての活用においては研究段階であるが、実際に害虫管理を試みた野外試験の報告がある。例えばダイズを加害するヤガ科害虫である *Plathypena scabra* Fabricius や *Heliothis zea* Boddie の防除実験 (Sprenkel and Brooks, 1975; Ignoffo *et al.*, 1977) では、一定の防除効果が認められた。また、トウモロコシを加害するヤガ科害虫である *H. armigera* の防除においては 8 割近い死

虫率が得られ、高い殺虫活性が認められた (Mohamed *et al.*, 1978)。しかし、作物における食害低減効果は合成農薬 (carbofuran) と比較すると 4 割程度の商品化率であったことが報告されている (Li-chang and Roger, 1998)。さらに、国内においても重要害虫の一つであるヤガ科昆虫の *S. litura* についても検討されており、他の昆虫病原性糸状菌である *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith や *Beauveria bassiana* Balsamo と比較すると、*N. rileyi* の殺虫活性の高さが示されている (栢村, 1984; Vimala *et al.*, 2003; 木本ら, 2007)。一方、コムシ科の一種 *Agriotes obscurus* Linnaeus の防除においては環境条件 (温度・湿度) から効果が不安定になり (Fox, 1961), ワタの防除においては無処理と同程度で防除効果が得られないことも報告されている (Pfrimmer, 1979)。

このように、天敵微生物の害虫管理への応用には安全性や環境面で多くの長所がある反面、その防除効果は不安定になりがちである。その一因は、昆虫病原性糸状菌の感染メカニズムに因ることが考えられる。*N. rileyi* をはじめとし一般に、昆虫病原性糸状菌の寄主昆虫に対する感染は主として経皮侵入によっておこる。すなわち、寄主昆虫表面に付着した分生子は高湿・適温等の感染に適度な環境条件が整えば発芽し、菌糸をのぼして、機械的圧力と酵素的分解によって表皮を貫通し侵入する。血体腔に達した菌糸は、外界の環境条件に影響されず分裂増殖し寄主を死に至らしめる (河上, 1962)。つまり、昆虫病原性糸状菌の感染が成立するか否かは、分生子が寄主表面に付着し侵入するまでの環境的 (湿度, 温度, 太陽光など) または生物的 (感受性, 脱皮など) 諸要因により影響される (Ferron, 1978)。特に湿度や温度は経皮感染の初期段階である分生子発芽を左右する大きな一因であり、昆虫病原性糸状菌の分生子が昆虫に付着し発芽するには高い湿度が必要である (Allen *et al.*, 1971; Ignoffo *et al.*, 1977; Hajek *et al.*, 1990)。例えば、*B. bassiana* 及び *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin の分生子発芽や菌糸の成長には 92.5% (relative humidity, R.H.) 以上の湿度と、15~35℃の温度を必要とし、とりわけ湿度 100% (H.R.), 温度 25~35℃では良好な発芽が得られる (Walstad *et al.*, 1970)。また実際の寄主昆虫を用いた研究も報告されている。例えば、ゾウムシの一種 *Hylobius postica* Gyllenhal の *B. bassiana* による感染において、高率の感染死亡個体を得るには 98~100% (R.H.) の湿度が必要である (Hedlund and Pass, 1967) と報告されている。*N. rileyi* においても高い感染率を得るためには 100% (H.R.) 近い湿度と 20~25℃の環境条件が要求されることが知られている (栢村, 1984; Gardner *et al.*, 1985; Mohaned *et al.*, 1977; Tang and Hou, 2001; Rangel *et al.*, 2005)。

このように高湿度及び適温条件が昆虫病原性糸状菌の感染に重要な条件であるが、この好適条件は分生子が昆虫表面に付着して侵入するまでの時間維持される必要があり、その後の糸状菌の生長は昆虫体内の条件が関係する(有賀, 1975a). 分生子が付着して感染が成立するまでにどの程度の時間を要するかについていくつかの報告がある. 例えば、寄主昆虫に分生子を付着させ経時的に寄主表面を殺菌する方法では、*B. mori* における *N. rileyi* 及び *B. bassiana* の感染所要時間は、2 齢幼虫で 16~24 時間、4 齢幼虫では 24~41 時間程度必要であることが報告されている(河上・三国, 1965). また、同様の方法で、*Plutella xylostella* Linnaeus に対する *B. bassiana* の感染所要時間は 14~15 時間と推定されている(増田, 2000). さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察による昆虫表面に付着した分生子を直接観察する方法においては、*B. mori* 3 齢幼虫に付着した *N. rileyi* の分生子は寄主表面上で 24 時間以内に発芽し、36 時間以内に虫体に侵入することが報告されている(Kumar *et al.*, 1997). また、同様の SEM 観察で、*A. gemmatalis* のクチクラ表面に付着した *N. rileyi* の分生子ははおおむね 6~18 時間で発芽し、24 時間以内に虫体に侵入することが報告されている(Boucias and Pendland, 1982). つまり、寄主の種類や昆虫の発育ステージにより異なるものの、100% (H.R.) に近い高い湿度が 14~41 時間維持されれば寄主昆虫の表面に付着した分生子は発芽し、付着器を形成し虫体に侵入し感染が成立すると考えられる. しかし、温度、湿度のみならず感染が成立するまでに太陽光(Zimmerman., 1982; Daoust and Pereira, 1986; Carruthers *et al.*, 1988; Braga *et al.*, 2001; Morley *et al.*, 1995; Drauzio *et al.*, 2005), 脱皮(Tang and Ccheng, 1999) 等の不適環境に遭遇すれば経皮侵入に悪影響を及ぼし感染効率が低下することも報告されている. 以上のように、感染成立のためには、分生子が寄主表面に付着してから虫体内への侵入までに好適環境が維持される必要があると考えられる. しかしながら、このような環境条件を野外ほ場環境で長時間持続して得るのは容易ではなく、そのことが昆虫病原性糸状菌の寄主昆虫への感染を不安定にする一因となっている. つまり、昆虫病原性糸状菌の感染メカニズムと環境要求性を考慮すると、感染効率を向上させるためには、寄主表面に付着した分生子のスムーズな発芽と虫体内への侵入が重要と考えられる.

このような中、昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* の分生子の発芽に関し、寄主昆虫表皮抽出物を人工培地に加えると分生子発芽に好影響を及ぼすという興味深い報告がある. 一般に *N. rileyi* の分生子は、人工培地上では適度な温湿度を得ると 10 時間くらいで膨大し、15~20 時間で主として分生子の一端から発芽管を出すことが知られている(青木,

1957; 有賀, 1975b). しかし、人工培地に寄主昆虫である鱗翅目ヤガ科害虫の *A. gemmatalis*, *Trichoplusia ni* Hübner, *H. zea*, *Heliothis virescens* Fabricious, *H. armigera* 等の寄主由来の抽出物を添加した培地では分生子の発芽誘導期(分生子が発芽に適する環境におかれてから発芽に至るまでの時間)が短縮されたり、あるいは発芽率が向上することが報告されている(Boucias and Pendland, 1984; Galal *et al.*, 1991; Tang and Hou, 2001). また、寄主昆虫由来の成分が上記のような特異な発芽挙動を誘導するのみならず、寄生のための代謝に関与すると考えられるキチナーゼやプロテアーゼ等の酵素活性を向上させることも報告されている(EI-Sayed *et al.*, 1993a, 1993b, 1993c). さらに、このような特異な発芽挙動は分生子が寄主表面に付着した際にもみられる. 例えば、SEM 観察においてヤガ科の一種 *A. gemmatalis* の表面に付着した *N. rileyi* の分生子は 6 時間程度で発芽し始めることが報告されている(Boucias and Latge, 1988). このような現象は *N. rileyi* のみならず、他の昆虫病原性糸状菌の分生子においても報告がある. 例えばヨコバイ科の一種 *Empoasca fabae* Harris に対する疫病菌の一種 *Erynia radicans* Brefeld (Wraight *et al.*, 1990), ブユ科の一種 *Simulium rostratum* Lundström や *Simulium decorum* Walker に対する *Erynia conica* Nowak (Nadeau *et al.*, 1996), *Lymantria dispar* Linnaeus に対する *Entomophaga maimaiga* Humber (Hajek *et al.*, 2002) においても、同様に寄主表面上では人工培地に比較して発芽が非常にスピーディーに行われることが報告されている.

このような‘分生子の発芽誘導期を短縮する生理活性物質(発芽促進物質)’は、昆虫病原性糸状菌の感染を安定化させることが期待された. すなわち、経皮感染する昆虫病原性糸状菌を害虫管理に活用する際の効果の不安定さの一因は、先にも述べたように、分生子が昆虫表面に付着してから虫体内に侵入するまでの期間に好適環境が維持されなければならず、その時期に不適環境(乾燥、太陽光、脱皮等)にさらされると不活性化され感染効率が落ちることである. そこで発芽促進物質を応用し、感染成立までの要求時間を短縮することによって、感染に関わる環境要求性を低下させることができれば、実用場面での感染効率の向上につながると期待された.

さらには、経皮感染する昆虫病原性糸状菌の感染メカニズムを考慮すると、昆虫外皮に付着した分生子の寄生のための代謝は寄主認識によりはじまると考えられる. 上記に示したように、寄主表面に付着した分生子の発芽挙動(発芽誘導期の短縮)と寄主昆虫由来成分を添加した培地における発芽挙動(発芽誘導期の短縮)とが類似していることを考慮すると、このような発芽誘導期を短縮させる因子は寄主認識に重要な意味を持つと考えられた. Boucias and

Pendland (1984) はこのような特異な発芽挙動を導く因子を *A. gemmatalis* の幼虫抽出物からシリカゲルカラムにより分画を試み、極性脂質あるいはステロールに関連する物質ではないかと考察している。しかし、精製には至っておらず、現在においても未だこのような特異な発芽挙動を導く因子は解明されていない。また、*N. rileyi* の寄主認識に関して、Pendland and Boucias (1992) は分生子の細胞壁における炭水化物の分布を調査し、寄主-寄生者の関係について論じているが、いずれも特異な発芽挙動にはふれていない。

以上のような背景において、*N. rileyi* の分生子の発芽促進因子の解明は、害虫管理への応用の際に有効な生物活性が期待されるとともに、寄主昆虫表面での分生子発芽の現象や寄主認識メカニズムを分子レベルで理解する足がかりとなると考えられた。そこで本研究では、発芽促進物質の分子構造を明らかにするとともに、発芽促進活性を得るための諸条件、そこから得られる情報による有効な活用法についても検討した。本論文は次の第I章から第VI章で構成される。

第I章では *N. rileyi* の寄主昆虫の一種である *B. mori* から発芽促進物質の精製を進めていく上で欠くことのできない、分画サンプルの生物活性や活性画分の比活性を効率よく安定して検出及び定量化できる生物検定系を確立した。また分離・精製のため抽出溶媒、分解反応、溶媒分配、順相及び逆相クロマトグラフィー等、種々のクロマトグラフィーにおいて発芽促進物質がどのような挙動を示すのかを明らかにした。これらの結果から分離・精製の工程を検討しプロトコールの骨子についてまとめた。

第II章では、得られたプロトコールに基づき、構造解析に必要な量の高純度精製物を大量調製した。高濃縮画分においては薄層クロマトグラフィーにより純度の検定を行い、発芽促進物質の高純度精製物の単離を試みた。

第III章では得られた高純度の発芽促進物質について、核磁気共鳴分光法 (NMR) や質量分析法 (MS) 等、種々の機器分析により構造解析を実施し、発芽促進物質の化学構造を決定した。また、構造活性相関についても検討した。

第IV章では発芽促進効果を効果的に得るための諸条件について解明し、さらに寄主昆虫表面成分において発芽促進効果を得るために要求される諸条件が満たされているのかを明らかにした。

第V章では発芽促進物質の昆虫病原性糸状菌製剤の補助剤としての可能性を検証するため、キャベツをモデル植物として *S. litura* に対する感染所要時間の短縮効果について検討した。

第VI章では、明らかとなった発芽促進物質について、他の分野における知見やそれらとの相違点などについて考

察し総括としてまとめた。

第I章 昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* の *Bombix mori* 由来発芽促進因子の単離方法の検討

緒言

昆虫病原性糸状菌の分生子の発芽に関し、緒論で述べたとおり寄主昆虫表面に付着した分生子は人工培地における分生子の発芽と比較して発芽誘導期が短縮されることが観察されている。また、同様に寄主昆虫由来成分を培地に添加すると、寄主表面に付着した分生子と同様な発芽挙動が観察されている (Boucias and Pendland, 1984; Galal et al., 1991; Tang and Hou, 2001)。そこで本章では、*N. rileyi* の寄主昆虫の一種である *B. mori* を材料として、*B. mori* 由来成分における発芽促進効果の検証と発芽促進因子の単離方法を検討した。

このような発芽促進因子はこれまで明らかにされておらず、そのため精製を進めていくため生物活性の程度を効率よく評価できる生物検定法を確立するとともに、抽出溶媒、分解反応、溶媒分配クロマトグラフィー、順相及び逆相クロマトグラフィーにおいて発芽促進物質がどのような挙動を示すのかを明らかにして、分離・精製のプロトコールの骨子を確立することを目的とした。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 抽出材料

昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* の寄主昆虫の一種である *B. mori* を発芽促進物質の抽出材料として用いた。*N. rileyi* の寄主昆虫の一種である *S. litura* において幼虫から蛹にいたる幅広いステージで感染が認められることから (野田・田中, 2001)、*B. mori* おいても幅広いステージで発芽促進物質が得られると考えられた。そこで、実験材料として大量入手が容易であることから製糸工場 (Usui Silk Reeling Industry, Gunma, Japan) において繭から糸を紡いだ後に排出される *B. mori* の蛹を用いた。なお、材料の蛹は 120 °C で 4 時間乾燥されたものを用いた。

2) 抽出部位の検討

表面抽出は *B. mori* の蛹を試験管に入れ、試料 1g 当たり 5 ml の水を加えピペッティングにより蛹表面抽出液を得

た。また、蛹内容物抽出は *B. mori* の蛹から表皮を除去し中身を取り出し、粉碎した後、試料 1g 当たり 5 ml の水を加えボルテックスミキサーで振とうして抽出した。各抽出液 1.0 ml を 1.5 ml マイクロチューブにとり、3,000 × g、15 分間遠心し上清を生物検定に供試した。

3) 抽出溶媒の検討

水、メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトン及びクロロホルム：メタノール (1:1) の 6 種類の溶媒を供試した。抽出方法は、*B. mori* の蛹を粉碎した後、試料 1g 当たり 5 ml の各溶媒を加えボルテックスミキサーで振とうして抽出した。各抽出液 1.0 ml を 1.5 ml マイクロチューブにとり、3,000 × g、15 分遠心し上清を生物検定に供試した。さらに、各抽出液をガラス製試験管 (12 × 105 mm) にとり減圧式遠心濃縮器を使用し 40 °C で 12 時間乾燥させ、1.0 ml あたりの溶質の重量を計測した。

4) 分解反応の影響

分解反応は酸分解、弱アルカリ分解及びアセトリスの 3 種類の処理を行った。酸分解はメタノール抽出液 1 ml をテフロンライナー蓋付きガラス製試験管にとり、減圧式遠心濃縮器を使用し 40 °C で 12 時間乾燥させた後、含水メタノール性 1 M 塩酸 (36% 塩酸:メタノール=1:11) を 3 ml 加え、沸騰水中で 5 時間加熱し分解処理液を得た。弱アルカリ分解はメタノール抽出液 1 ml をテフロンライナー蓋付きガラス製試験管にとり、同様に乾燥させた後、90% メタノール性 0.3 M 水酸化ナトリウムを 3 ml 加え、70 °C で 2 時間加熱し分解処理液を得た。アセトリスはメタノール抽出液 1 ml をテフロンライナー蓋付きガラス製試験管にとり、同様に乾燥させた後、90% 酢酸性 0.5 M 硫酸を 3 ml 加え、80 °C で 16 時間加熱し分解処理液を得た。各分解処理液は乾固しメタノール 1 ml で溶解し、メタノール可溶画分を生物検定に供試した。

5) 溶媒分配クロマトグラフィーの検討

石油エーテルとメタノール (含水) による溶媒分配は、方法 4) から得られた 1 ml の酸分解処理液に石油エーテル 1 ml を加え、振とうした後静置し、上層に石油エーテル層、下層にメタノール (含水) 層を形成させた。それぞれの画分は減圧式遠心濃縮器を使用し 40 °C で 12 時間乾燥させ、メタノール 1 ml に溶解させたのち生物検定に供試した。また、*n*-ブタノールと水による溶媒分配は、石油エーテルとメタノール (含水) の溶媒分配により得られたメタノール層を乾固したサンプルに *n*-ブタノール 1 ml と水 1 ml を加え振とうした後静置し、上層に *n*-ブタノール層、下層に水層を形成させた。それぞれの画分は減圧式遠

心濃縮器を使用し 40 °C で 12 時間乾燥させ、メタノール 1 ml に溶解させたのち生物検定に供試した。

6) カラムクロマトグラフィーの条件検討

方法 5) により得られた *n*-ブタノール可溶画分のメタノール溶液を HPLC 用のサンプル溶液とした。順相カラムクロマトグラフィーによる分離条件の検討にはシリカゲル HPLC カラム (Cosmosil 5SL-II (150 × 4.6 mm I.D.), Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用し、サンプル 10 μl を注入し、1.0 ml/min の流速により 50 分間イソクラティックで溶離した。溶離液にはクロロホルム：メタノール：水の比が 100:0:0, 140:20:1, 100:20:1, 80:20:2 及び 65:25:4 となるように調製した 5 種類を供試した。また、逆相カラムクロマトグラフィーによる分離条件の検討には ODS HPLC カラム (Cosmosil 5C18-MS-II (150 × 4.6 mm I.D.), Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用し、サンプル 10 μl を注入し、1.0 ml/min の流速により 50 分間イソクラティックで溶離した。溶離液には 20%, 40%, 60%, 70% 及び 80% の 5 種類の濃度のメタノール溶液を供試した。

各カラムから溶出した 50 ml の溶出液はロータリーエバポレーター及び減圧式遠心濃縮器を使用し濃縮後 100 μl のメタノールに溶解し、この溶液を 1 倍希釈液とし、段階希釈し生物検定に供試した。生物活性は各希釈液における発芽率から、希釈倍率 (fold) を単位とし EC₅₀ 値を算出した。また、発芽促進物質の収率は [(HPLC 注入サンプルの EC₅₀ 値 / 溶出溶液の EC₅₀ 値) × 100] によりもとめた。

7) *N. rileyi* の分生子懸たく液の調製

N. rileyi 菌株は熊本県農業研究センター内でダイズほ場において菌叢を形成し死亡していた *S. litura* 幼虫から分離した菌株 (N-37 株) を用いた。*N. rileyi* は直径 7.5 cm、高さ 13 cm のガラス製培養瓶に 1% 酵母エキス添加サブローマールトース寒天培地 (Sabouraud-maltose agar fortified with 1% yeast extract, SMAY) (ペプトン 1%, 乾燥酵母エキス 4%, マルトース 4%, 寒天 1.5%, pH 7.0) を 30 ml 分注し、オートクレーブ滅菌 (121 °C, 20 分) 後、23 °C で 10 ~ 14 日間培養し、培地上に菌叢を均一に形成させた。形成した分生子は 0.05% Tween 80 水溶液を使用して約 5 × 10⁶ 分生子/ml に調製し、分生子懸たく液とした。

8) 生物検定

生物検定は 96 穴マイクロプレート (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) を使用した。マイクロプレートの各穴にサンプル溶液 1 μl を入れ、クリーンベンチ内で 5 分間風乾させた。その後、滅菌水 10 μl, 1% ペプトン (カゼイン由来, Kyokuto Pharmaceutical Industrial, Tokyo, Japan) 水溶液

10 μ l, 分生子懸液 10 μ l を入れ, マイクロプレートミキサーで 5 分間振とう混和し, 23 $^{\circ}$ C で 10 時間培養した.

分生子の発芽について, 倒立顕微鏡でマイクロプレート底面から倍率 400 倍で分生子の発芽管の伸長の有無を観察した. 発芽管の長さがおおむね分生子の幅の 1/4 以上に伸長したものを発芽分生子と判断した. 発芽率の算出のため 100 個体以上の分生子を観察し, 発芽率 (%) は [(発芽分生子数/観察した分生子数) \times 100] により算出した. 50%発芽時間 (the germination time to the 50% germination rate, GT_{50}) 及び 50%発芽濃度 (the effective concentration for a 50% germination rate, EC_{50}) はコンピューターソフトウェア (Kyplot 5.0 program, KyensLab, Tokyo, Japan) を用い, プロビット解析 (Finney, 1972) によりもとめた.

5 回の実験結果により, 2 つのグループの有意差の検定を t - 検定により行い, $p < 0.05$ の際に有意差があると判断した.

第 2 節 結果及び考察

昆虫病原糸状菌 *N. rileyi* の寄主昆虫の一種である *B. mori* の蛹を用いて, 寄主表面の水による抽出物が *N. rileyi* の分生子発芽に対する影響を調査した (Fig. I - 1). 表面の水抽出物をペプトン溶液に加えると, 培養 4 時間後から分生子の発芽が観察されるのに対し, 抽出物を加えなかった場合には, 培養 8 時間後においても分生子の発芽は観察されなかった. すなわち, *N. rileyi* の寄主昆虫の一種である *B. mori* の蛹の表面由来成分が *N. rileyi* の分生子発芽を促進する因

子を含んでいることが明らかとなった.

さらに, 経時的な分生子の発芽状況を観察すると, 寄主表面の水抽出物をペプトン溶液に加えると, 培養 3 時間後から発芽した分生子が観察されはじめ, 6 時間後には約 10%が発芽し, 15 時間後にはほぼ 100%の分生子が発芽した. 一方, 水抽出物を加えなかった場合には, 培養 12 時間まではほとんど分生子の発芽は観察されず, それ以降に発芽率が急増し 24 時間後に約 80%の発芽率となった (Fig. I - 2). 50%発芽時間 (GT_{50}) で比較すると, 水抽出物を加えた場合には 9.5 時間で, 水抽出物を加えなかった場合の 21.4 時間と 50%の発芽に要する時間が半分以下に短縮された. 以上のような結果から, この発芽促進物質の生物検定では培養 10 時間後の発芽率を比較することによって, その活性を評価することができると判断された.

次に, 発芽促進物質の効率的な単離のために抽出部位について検討した. 寄主昆虫表面において特異的な発芽促進現象が観察される (Boucias and Latge, 1988) ことから, 発芽促進物質は寄主昆虫の表面に存在する成分と考えられる. しかし発芽促進因子が表面特異的な物質であるかは不明である. そこで *B. mori* 蛹の表面抽出物及び内部抽出物を調製し両者の発芽促進効果を比較した. その結果, 培養 10 時間後の発芽率が蛹表面由来成分では 43.7%, 蛹内部由来成分においては 79.0%であり, 発芽促進物質は表面に特異的に存在している物質ではないことが明らかとなった (Table I - 1). しかも, 有意に多く蛹内部にも存在することが示されたため, 抽出材料は表面のみならず内部を含め *B. mori* の蛹全体を用いることが有効と判断した.

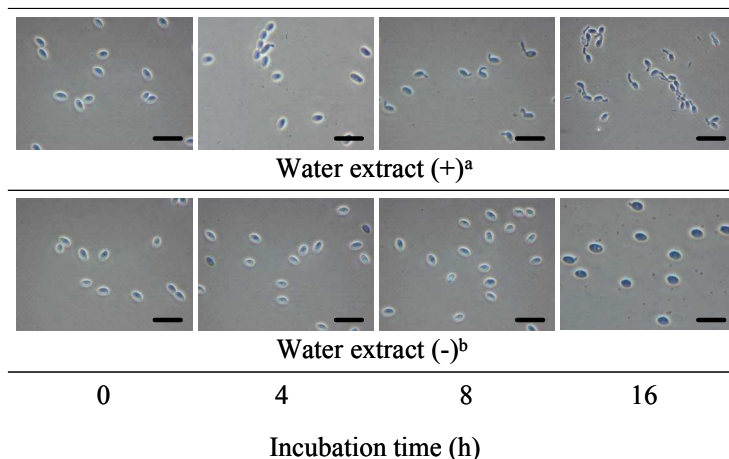


Fig. I - 1. Effects of Silkworm (*B. mori*) Water Extract on the Conidial Germination of *N. rileyi*.

Water extracts was prepared from surface of silkworm pupae. ^aConidia were cultured in liquid culture media supplemented with water extract. ^bConidia were cultured in liquid culture media without water extract. Conidial germination was observed at 1,000 \times with an oil-immersion objective using a phase contrast microscope. Scale bar shows 10 μ m.

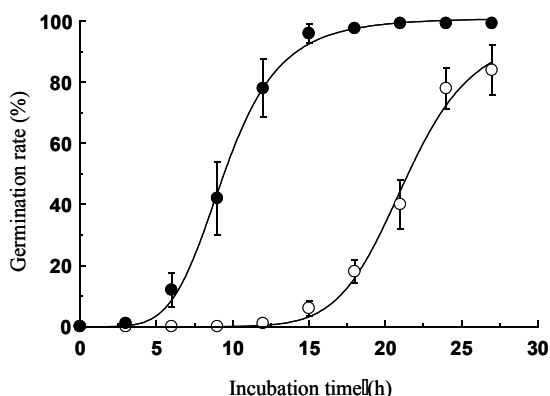


Fig. I-2. Effects of the Silkworm (*B. mori*) Water Extract on Conidial Germination.

Conidia were cultured in liquid media supplemented with water extract (●-●) and without water extract (○-○). Conidial germination was observed at 400× using an inverted microscope. Time-response data for the 50% germination rate were analyzed as GT₅₀. GT₅₀ values were 9.5 h with water extract and 21.4 h without water extract. Each data point shows the mean ± SE (n=5).

次に抽出溶媒について検討した。上記の実験により発芽促進物質は水によって抽出されたが、さらに抽出効率を高めるために6種類の有機溶媒による抽出効率を比較した。その結果、抽出効率はメタノール>エタノール>2-プロパノール>クロロホルム：メタノール混合液>水の順に高く、水よりも有機溶媒により高濃度で抽出され、特にアルコール等極性の高い有機溶媒で効率よく抽出されることが明らかとなった。さらに、EC₅₀(mg/ml)の値で比較すると水で9.6×10⁻³、メタノールで7.4×10⁻⁴、エタノールで1.1×10⁻³、2-プロパノールで2.4×10⁻³、アセトンで3.3×10⁻³、クロロホルム：メタノール混合液で1.1×10⁻³であり、最も高いメタノールでは水の10倍以上の効率で抽出された (Table I-2).

次に、発芽促進物質の安定性の検証と構造推定のため、メタノール抽出サンプルを用い、種々の分解反応が発芽促進活性に及ぼす影響について調査した。その結果、いずれの分解反応でも発芽促進活性が失活することはなく、むしろ活性の向上がみられた (Table I-3)。特に、酸分解処理ではEC₅₀の値が5.0×10⁻⁶ mg/mlとメタノール抽出液と比較して活性が約150倍に向上した。また、弱アルカリ分解処理においてはEC₅₀値が8.1×10⁻⁵ mg/mlとメタノール抽出液と比較すると約90倍に活性が向上した。しかし、アセトリス分解処理においては、ほとんど活性の変化はなかった。

Table I-1. Germination Accelerating Effect of Surface and Inside Extracts of the Silkworm (*B. mori*) pupae

Region for extract	Germination rate (%) ^a
Surface	43.7 ± 6.5*
Inside	79.0 ± 7.8*
^b Control	0.0

^aGermination rate (mean ± SE (n=3)) was determined after 10 h of incubation at 23°C. ^bWater was used for control groups. *Significantly different between the surface extract groups and the inside extract groups (*t*-test, *p*<0.05).

Table I-2. Effects of Extraction Solvents

Extraction solvent	Activity	Fold
	EC ₅₀ ^a (mg/ml)	
Water	9.6 × 10 ⁻³	1.0
Methanol	7.4 × 10 ⁻⁴	13.0
Ethanol	1.0 × 10 ⁻³	9.6
2-Propanol	2.4 × 10 ⁻³	6.4
Acetone	3.3 × 10 ⁻³	4.8
Chloroform: Methanol (1:1 v/v)	1.1 × 10 ⁻³	8.7

^aConcentration-response data for germination rate(%) were analyzed as the effective concentration for 50% germination (EC₅₀). Non-linear curve fitting was performed with the program Kypplot 5.0 to determine the EC₅₀.

Table I-3. Effect of Decomposition Reaction

Decomposition reaction	Activity	Fold
	EC ₅₀ ^a (mg/ml)	
Methanol extract	7.4 × 10 ⁻⁴	1.0
Acidolysis ^b	5.0 × 10 ⁻⁶	148.0
Alkaline fission ^c	8.1 × 10 ⁻⁵	9.1
Acetolysis ^d	7.9 × 10 ⁻³	0.95

^aConcentration-response data for germination rate(%) were analyzed as the effective concentration for 50% germination (EC₅₀). ^bAcidolysis was performed with 1 M-HCl in methanol for 5 h in boiling water. ^cMild-alkaline fission was performed with 0.3 M-NaOH in 90% methanol for 2 h at 70 °C. ^dAcetolysis was performed with 0.5 M-H₂SO₄ in 90% acetic acid for 16 h at 80 °C.

さらに、最も発芽促進活性の向上が認められた酸分解処理後のサンプルを用いて、溶媒分配により発芽促進物質を濃縮する方法について検討した。すなわち、メタノール性1M-塩酸により分解処理を行ったサンプルに、石油エーテルとメタノール(含水)で溶媒分配し、さらにメタノール(含水)層は濃縮乾固の後、*n*-ブタノールと水で溶媒分配を行った。その結果、培養10時間後の発芽率は石油エーテルとメタノール(含水)の溶媒分配において石油エー

テル層で 2.0 ± 1.5 (mean \pm SE (n=3)) %, メタノール層において 90.7 ± 2.0 (mean \pm SE (n=3)) % の発芽率を示した。また、*n*-ブタノールと水の溶媒分配においては *n*-ブタノール層で $91.0 \pm 3.4\%$ (mean \pm SE (n=3)), 水層において 1.3 ± 1.3 (mean \pm SE (n=3)) % を示した。

次に溶媒分配により得られた活性画分について、シリカゲルを吸着担体とする順相クロマトグラフィー及びオクタデシル基 (ODS) を化学結合したシリカゲルを吸着担体とする逆相クロマトグラフィー、それぞれにおける吸着及び溶離条件について高速液体クロマトグラフィーを用いて検討した。その結果、各溶離液で 50 分間溶出した結果、順相カラムクロマトグラフィーにおいてはクロロホルム：メタノール：水の比が 100：0：0, 140：20：1 の溶離液では発芽促進物はカラムからほとんど溶出されなかった。また、100：20：1 (クロロホルム：メタノール：水) より溶媒極性が高い溶離液においては、85%以上の活性回収率であった。一方、逆相カラムクロマトグラフィーにおいては 40%メタノールでは発芽促進物質はほとんど溶出されなかった。60%メタノールではわずかに溶出され、70%より高い濃度のメタノールを含む溶離液では 90%程度の高い活性回収率であった (Table I-4)。

本章において、発芽促進物質の抽出にはメタノールが有効との結果を示したが、メタノールのような極性の高い有機溶媒では脂質二重膜を構成するリン脂質等の両親媒性

の物質が多量に抽出される。そのため、メタノール抽出物を溶媒分配クロマトグラフィーに供すれば、両親媒性物質により乳濁し、液-液の二層形成が困難となる。そのような中、活性の向上の面から、酸分解処理の有効性が示された。酸分解反応は脂質中の *O*-アシルエステル結合、*N*-アシルアミドまたはグルコシド結合等の分解に利用され、脂肪酸、グルコシドなどを生ずる (宮澤・藤野, 2000)。このことは、メタノール抽出物の溶媒分配クロマトグラフィーの際に問題となる分配操作時における乳化の問題を解決する。つまり、酸分解処理によって乳化の要因となるグリセリド、グリセロリン脂質、グリセロ糖脂質などは、*O*-アシルエステル結合の分解反応によってアルコールと脂肪酸に分解される。そのため乳化の要因となる化合物の両親媒性が低下し溶媒分配の際に、液-液の二層形成が容易になるメリットがある。発芽促進物質は酸分解処理の前後で化学構造の変化が考えられるが、活性が向上していること及び溶媒分配におけるメリットから、酸分解処理は精製を進める上で有効な手段と考えられた。

さらに、溶媒分配において発芽促進物質は石油エーテルとメタノール (含水) における溶媒分配のメタノール (含水) 層に、また *n*-ブタノールと水における溶媒分配の *n*-ブタノール層に分配された。このことは、石油エーテルとメタノール (含水) における溶媒分配の石油エーテル層に酸分解処理により生じた脂肪酸等が分配され、活性画分か

Table I-4. Eluant Condition for Column Chromatography

Separation mood	Stationary phase	Column size	Eluant	Activity ^a EC ₅₀ (fold)	Yield ^b
Normal phase	Si	150 × 4.6 mmI.D. ^c	100:0:0 ^d	— ^e	— ^f
			140:20:1 ^d	— ^e	— ^f
			100:20:1 ^d	1.8×10^{-3}	85.7%
			80:20:2 ^d	1.7×10^{-3}	87.0%
			65:25:4 ^d	1.5×10^{-3}	98.9%
Reverse phase	ODS	150 × 4.6 mmI.D. ^g	20% MeOH	— ^e	— ^f
			40% MeOH	— ^e	— ^f
			60% MeOH	1.9×10^{-2}	7.9%
			70% MeOH	1.7×10^{-3}	89.0%
			80% MeOH	1.7×10^{-3}	90.1%

^aConcentration-response data for germination rate (%) was analyzed as the effective concentration for 50% germination rate (EC₅₀). Acidolysis samples of 10 μl were eluted with each eluant at a flow rate of 1.0 ml/min for 50 min, and then the total eluants of 50 ml were concentrated to 100 μl (1 fold solution). EC₅₀ was calculated from data of germination rate in serial diluted solutions of the concentrated solution (1 fold solution). ^bYield was calculated from data of EC₅₀. In case of 100% yield, EC₅₀ value was 1.52×10^{-3} fold. ^cSSL-II (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) silica gel column was used for normal phase column chromatography. ^dMixing ratio of Chloroform: Metanol: Water. ^eEC₅₀ values were 1.0 fold or higher Germination rate. ^fCalculation of yield was impossible because of no data of EC₅₀. ^gC18-5MS II (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) ODS column was used for reverse phase column chromatography.

ら除かれると考えられる。さらに、*n*-ブタノールと水における溶媒分配の水層にはメタノール抽出の際溶出された極性の高い低分子化合物が分配され、活性画分から除かれると考えられる。また、酸分解処理の際に使用した塩酸は *n*-ブタノールと水における溶媒分配の際に水層に分配され活性画分から除かれる。したがって、上記に示す2種類の溶媒分配によって *n*-ブタノール層に純度の向上した活性画分が得られると考えられた。

また、カラムクロマトグラフィーの条件検討より、順相カラムクロマトグラフィーにおいては初期溶媒をクロロホルムとして活性物質がシリカゲルカラムに吸着され、メタノール濃度を上げていくグラジエント溶離で分離されることが考えられた。さらに、逆相カラムクロマトグラフィーにおいては40%メタノールで ODS カラムに吸着され、メタノール濃度を上げていくグラジエント溶離で分離されることが考えられた。

以上により、本発芽促進物質の濃縮にはメタノールによる抽出、酸分解処理、石油エーテルとメタノール（含水）による溶媒分配におけるメタノール層の回収、さらに、*n*-ブタノールと水による溶媒分配における *n*-ブタノール層の回収、そしてクロロホルム - メタノールを溶媒系としたグラジエントによる順相（シリカゲル）カラムクロマトグラフィー、水 - メタノールを溶媒系とした逆相（ODS）カラムクロマトグラフィーによって発芽促進物質を分離・精製するというプロトコールの方向性が示された。

第3節 小括

経皮的に感染する昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* は寄主表面に付着した分生子あるいは寄主昆虫由来成分を添加した培地では発芽誘導期が短縮されるという特異な挙動を示すが、この因子は明らかとなっていない。これらの因子を明らかにすることは *N. rileyi* の寄主昆虫表面での分生子発芽あるいは寄主認識メカニズムを理解する上で非常に重要な情報となるばかりではなく、微生物防除に活用する際にも有用な生物活性をもつために応用面でも利用が期待される。そこで本章では寄主昆虫の一種である *B. mori* を用いて分離・精製法を検討した。

B. mori の蛹抽出物における *N. rileyi* 分生子の発芽挙動を詳細に観察した結果、*B. mori* の蛹由来成分に発芽誘導期を約1/3に短縮する発芽促進活性を有することが明らかとなった。そのため、*B. mori* の蛹に含まれる発芽促進物質の活性を評価するために、マイクロプレートを用いて培養10時間後の発芽率を調査する生物検定法を開発した。開発した生物検定法によって、分離・精製のため抽出溶媒、

分解反応、溶媒分配クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィーにおける芽促進物質の挙動を明らかにした。その結果、発芽促進物質はメタノールによって抽出し、抽出物を酸分解処理した後、石油エーテル-メタノール（含水）及び *n*-ブタノール-水の2種類の溶媒分配により活性画分を回収し、さらに、順相（シリカゲル）および逆相（ODS）のカラムクロマトグラフィーによって発芽促進物質を分離・精製するというプロトコールの方向性を示した。

第II章 昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* の *B. mori* 由来発芽促進物質の単離

緒言

第I章において *N. rileyi* の発芽促進物質を分離・精製するための種々の条件について検討した。その結果、抽出溶媒においては水よりも極性有機溶媒のほうが3~20倍効率よく抽出されることが明らかとなり、メタノールによる抽出が最も効率的であった。また、メタノールにより抽出したサンプルは酸、アルカリ処理において発芽促進活性の失活は認められず、逆に酸分解処理で活性が約150倍に向上した。上記処理で本来の生体成分から発芽促進物質の化学構造が変化している可能性も考えられたが、活性の向上のみならず溶媒分配における液-液の二層形成を容易にするというメリットがあることから、酸処理サンプルについて分離を進めることとした。溶媒分配においては、酸分解処理液の濃縮操作を行うことなく、反応液に直接石油エーテルを加え溶媒分配を行った結果、発芽促進物質はメタノール（含水）層に回収された。さらに、活性物質は *n*-ブタノール - 水による溶媒分配で *n*-ブタノールに回収され、この両溶媒分配によって純度の向上が期待された。溶媒分配後の活性画分をカラムクロマトグラフィーにより分離する際は、シリカゲルを用いた順相カラムクロマトグラフィーにおいては初期溶媒をクロロホルムとしてメタノール濃度を上げていくグラジエント溶離で活性物質の分離がなされることが考えられた。また、ODSを用いた逆相カラムクロマトグラフィーにおいては40%メタノールから順次メタノール濃度を上げていくグラジエント溶離で分離がなされることが考えられた。

以上のことから発芽促進物質の分離・精製についてはメタノールを用いて抽出し、酸処理の後、石油エーテルとメタノール（含水）による溶媒分配におけるメタノール（含水）層を濃縮後、さらに *n*-ブタノールと水による溶媒分配における *n*-ブタノール層を回収し、濃縮後にシリカゲルカ

ラムクロマトグラフィーに供し、さらに活性画分を ODS 逆相ラムクロマトグラフィーに供することにより目的とする発芽促進物質の純度の向上が期待された。そこで本章では、第 I 章で得られた発芽促進物質の各種クロマトグラフィーにおける挙動をもとに、サンプルの量をスケールアップし、構造解析に必要な量の高純度精製物を得ることを目的とした。

第 1 節 実験材料及び実験方法

1) *N. rileyi* の分生子懸だく液の調製

N. rileyi の分生子懸だく液の調製法は第 I 章、第 1 節-7) の方法と同様に行った。

2) 抽出材料

抽出材料として第 I 章、第 1 節-1) に示した *B. mori* の蛹を用いた。

3) メタノール抽出

1.0 kg の粉碎した *B. mori* の蛹に 5,000 ml のメタノールを加え攪拌した後、24 時間静置し、上清 1,000 ml について吸引式濾過器を用いてガラスフィルター (0.8 μm) でろ過した。得られた 1,000 ml の抽出液はロータリーエバポレーターで濃縮した後、凍結乾燥させ溶質を計量した。

4) 酸分解処理

方法 3) によりロータリーエバポレーターにより濃縮したメタノール抽出物 (21.2g) を 800 ml の含水メタノール性 1M-塩酸で溶解し、密閉したガラス容器に入れ沸騰水中で 5 時間加熱した。

5) 溶媒分配クロマトグラフィー

方法 4) により得られた酸分解処理液は室温に冷ました後、石油エーテル 1,000 ml を加え溶媒分配を行った。メタノール (含水) 層はロータリーエバポレーターにより濃縮し、メタノール可溶画分を得た。さらに、濃縮されたメタノール画分に *n*-ブタノール 300 ml と水 300 ml を加え溶媒分配を行った。*n*-ブタノール可溶画分はロータリーエバポレーターにより濃縮し、クロロホルムに溶解して順相ラムクロマトグラフィーに供した。

6) 順相ラムクロマトグラフィー

吸着担体はラムクロマトグラフィー用シリカゲル 60 (150 μm spherical-neutrality, Nacalai tesque) を使用した。シリカゲルは 100 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間活性化させ、デシケーター中

で室温まで冷まし、クロロホルムを用いてスラリー状に調製したシリカゲルをガラス製クロマト管 (500 \times 20 mm I.D.) に充填した。充填したカラムはシリカゲルが透明のガラス状になるまでクロロホルムを 1 ml/min で通液してコンディショニングした。溶媒分配クロマトグラフィーにおいて得られた活性画分は 100 ml のクロロホルムに溶解させ、順相ラムクロマトグラフィー用のサンプルとした。

サンプル全量は HPLC ポンプを使用しカラムにアプライした。アプライ後クロロホルムを 1 ml/min で 300 分間通液し溶出画分を除去した。その後、1,290 分間かけてメタノールの割合を 50% まで上げ、さらに 1,300 分後にメタノール濃度を 100% まで上昇させる濃度勾配法により溶出した。流速は 1.0 ml/min で実施した。溶出液はフラクションコレクター (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) を用いて 15 分間 (15.0 ml) 毎に分取した。分取したフラクションは生物検定に供試するとともに、減圧式遠心濃縮器を使い 40 $^{\circ}\text{C}$ で一晩乾燥させ、溶質を計量した。

7) 逆相ラムクロマトグラフィー

順相ラムクロマトグラフィーにおいて分画された活性画分は約 2 ml の 40%メタノールに溶解させ、ODS HPLC カラム (250 \times 20 mm I.D., Cosmosil 5C18-MS-II, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用し分離した。溶出は初期溶媒を 40%メタノールとし、サンプル注入後 5 分間 40%メタノールにて溶出後、100 分間かけて 100%メタノールまで上昇させる濃度勾配法により溶出した。流速は 2.0 ml/min で実施した。溶出液はフラクションコレクター (GE Healthcare UK) を用いて 2 分 (4.0 ml) 毎に分取した。分取したフラクションは生物検定に供試するとともに、減圧式遠心濃縮器を使い 40 $^{\circ}\text{C}$ で一晩乾燥させ溶質を計量した。

8) Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー

Sephadex LH-20 (GE Healthcare UK) ゲルはメタノールで一晩十分膨潤させた後、浮遊物を数回メタノールで洗浄して除いた。耐圧ガラス製クロマト管 (1,000 \times 10 mm I.D.) にメタノールを満たし、スラリー状になったゲルをクロマト管に充填した。

逆相ラムクロマトグラフィーより得られた活性画分は約 100 μl のメタノールに溶解させ、Sephadex LH-20 カラムにアプライした。溶離液にはメタノールを用い、流速 0.1 ml/min で分離した。溶出液は示差屈折計 (refractive index, RI) で検出するとともに、フラクションコレクターを用いて 10 分 (1.0 ml) 毎に分取した。分取したフラクションは生物検定に供試するとともに、減圧式遠心濃縮器を使い 40 $^{\circ}\text{C}$ で一晩乾燥させ各フラクションの溶質を計量し

た。

9) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

順相 TLC は Silica Gel 60 ガラスプレート (0.25 mm thick, 1 cm × 5 cm, F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany) を用いた。展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水 (65:25:4, v/v/v), クロロホルム：メタノール：酢酸 (65:25:4, v/v/v) 及びクロロホルム：メタノール：28%-アンモニア水 (65:5:4, v/v/v) の3種類を用いた。逆相 TLC は ODS ガラスプレート (RP-18, 0.25 mm thick, 1 cm × 5 cm, F₂₅₄, Merck) を用いた。展開溶媒はメタノール：水 (95:5, v/v), メタノール：酢酸 (95:5, v/v) 及びメタノール：28%-アンモニア水 (95:5, v/v) の3種類を用いた。スポットの検出は TLC プレートにメタノール性 5%硫酸を噴霧し、電気コンロでスポットが現れるまで数秒間加熱した。

10) 高性能 TLC (HPTLC)

HPTLC は Silica gel 60 ガラスプレート (0.2 mm thick, 5 cm × 10 cm, F₂₅₄, Merck) を用い、クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水 (70:20:1, v/v/v) により展開し、メタノール性 5%硫酸、またはヨウ素でスポットを検出した。ヨウ素で検出したスポットは鉛筆でマーキングし、ドラフトチャンバー内に放置しスポットが退色後、検出されたスポット部分のシリカゲルをプレートからかき取り、マイクロチューブに入れて 1.0 ml のメタノールを加えてボルテックスミキサーで攪拌し抽出した。抽出液は 6,000 rpm で 10 秒間遠心し、その上清を生物検定に供試した。

11) TLC 呈色反応

Sephadex LH-20 カラムより分画された活性画分は順相 TLC ガラスプレート (0.25 mm thick, 1 cm × 5 cm, F₂₅₄, Merck) に供し、クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水 (65:25:4, v/v/v) で展開した。スポットの検出にアミノ基を検出するニンヒドリン試薬 (Skipski and Peterson, 1962) と中性糖を検出するオルシノール-硫酸試薬 (Svennerholm, 1965) による呈色反応を実施した。

12) TLC による酸分解処理前後の活性成分の R_f 値の比較

順相 TLC は シリカゲルアルミニウムシート (Silica gel 60 F₂₅₄, 0.2 mm thick, 1 cm × 5 cm, Merck) を使用した。酸分解処理前のメタノール抽出液については 1 μl を原点にスポットし、クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水 (70:20:1, v/v/v) で 35 mm 展開した。展開したアルミニウムシートは 5 mm 間隔にはさみを使って 7 等分に分割した。分割した各シートはマイクロチューブに入れ 1.0 ml のメ

タノールを加えて、ボルテックスミキサーで攪拌し、TLC シートから展開された成分を抽出した。抽出液は 6,000 rpm で 10 秒間遠心して、その上清を生物検定に供試した。精製物についてはメタノールで 1 mg/ml に調製した溶液を 1 μl スポットし、同様の方法で TLC に供し、7 分割した各シートから展開された成分を抽出した。抽出液は 6,000 rpm で 10 秒間遠心して、さらにその上清をメタノールで 1,000 倍に希釈して生物検定に供試した。

また、逆相 TLC は ODS アルミニウムシート (RP-18 F₂₅₄, 0.2 mm thick, 1 cm × 5 cm, Merck) を使用した。酸分解処理前のメタノール抽出液については 1 μl スポットし、メタノール：28%アンモニア水 (95:5, v/v) で 35 mm 展開した。展開したアルミニウムシートは 5 mm 間隔にはさみを使って 7 等分に分割した。分割した各シートはマイクロチューブに入れ 1.0 ml のメタノールを加えて、ボルテックスミキサーで攪拌し、TLC シートから展開された成分を抽出した。抽出液は 6,000 rpm で 10 秒間遠心して、その上清を生物検定に供試した。精製物については 1 mg/ml に調製したものを 1 μl スポットし、同様に展開し、7 分割した各シートはマイクロチューブに入れて 1.0 ml のメタノールを加えてボルテックスミキサーで攪拌し抽出した。抽出液は 6,000 rpm で 10 秒間遠心して、さらにその上清をメタノールで 1,000 倍に希釈して生物検定溶液とした。

13) 生物検定

生物検定法は第 I 章、第 1 節-8) の方法と同様に行った。

第 2 節 結果及び考察

第 I 章で検討した精製工程にしたがい、メタノールによる抽出、酸分解処理、石油エーテルとメタノール (含水) による溶媒分配におけるメタノール層を濃縮後、*n*-ブタノールと水における溶媒分配の *n*-ブタノール層を活性画分としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、さらに活性画分を ODS 逆相カラムクロマトグラフィーにより分画する工程で発芽促進物質の精製を試みた。

粉碎した *B. mori* の蛹 (1.0 kg) から 5,000 ml のメタノールで抽出し、上清 1,000 ml (21.2 g) を濃縮し、1M-塩酸 800 ml を加えて酸分解処理 (100 °C, 5 時間) を行った。酸分解処理液に石油エーテル 1,000 ml を加え、メタノール (含水) 層 (11.4 g) を活性画分として得た。得られた活性画分は、*n*-ブタノール (300 ml) - 水 (300 ml) により溶媒分配を行い *n*-ブタノール層 (6.0 g) に活性画分を得た (Table II-1)。

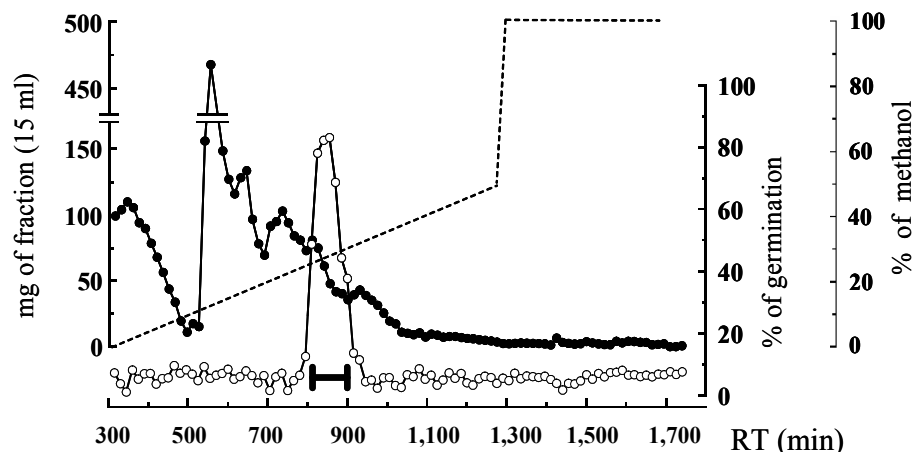


Fig. II-1. Normal Phase Column Chromatography Separation.

Normal phase chromatography separation on a 500 × 20 mm I.D. column. The initial solvent of chloroform was run for 300 min, increasing to 50% methanol by volume for 1,290 min, increasing to 100% methanol, and held at 100% methanol. The flow rate was 1.0 ml/min. The effluent was collected with a fraction collector cut to 15 min (15 ml) fractions, and 1 μ l of the fractions was diluted 10⁶-fold with methanol and used in the bioassay, as described in “Materials and Methods”. Symbols: ●-● (weight of fraction (mg)), ○-○ (germination rate (%)), ---- (concentration of methanol (%)). The active fraction (between 810 and 900 min), as shown by the bar, was collected and concentrated.

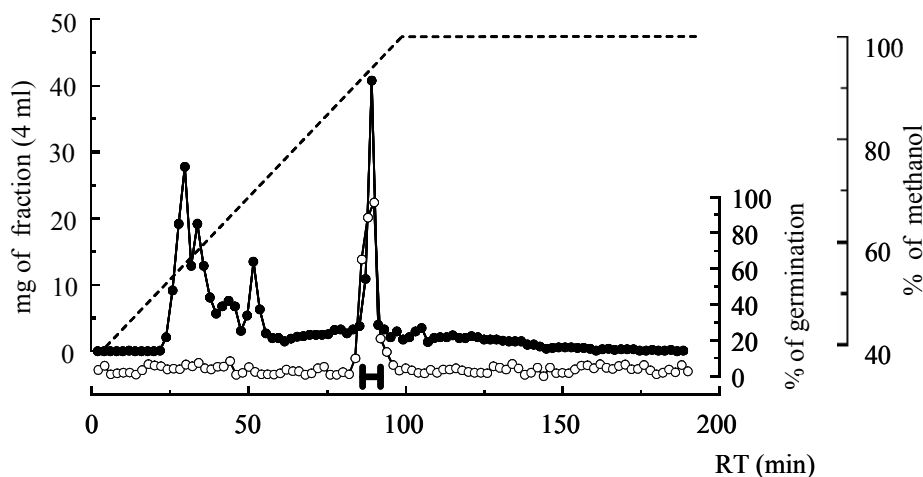


Fig. II-2. Reverse Phase HPLC Separation

ODS HPLC chromatography separation on a 250 × 20 mm I.D. column. The initial solvent of 40% methanol by volume was run for 5 min, increasing to 100% methanol for 105 min, and was held at 100% methanol. The flow rate was 2.0 ml/min. The effluent were collected with a fraction collector cut to 2 min (4 ml) fractions, and 1 μ l of the fractions was diluted 10⁶-fold with methanol and used in the bioassay, as described in “Materials and Methods”. Symbols: ●-● (weight of fraction (mg)), ○-○ (germination rate (%)), ---- (concentration of methanol (%)). The active fraction (between 86 min to 90 min), as shown by the bar, was collected and concentrated.

溶媒分配クロマトグラフィーにおいて活性の向上した 6.0 g の活性画分は、クロロホルムに溶解し順相カラムクロマトグラフィーでグラジエント溶離した。その結果、活性成分は 795~915 分にかけて溶出された。810~900 分にかけて溶出した活性画分をまとめて濃縮し、384 mg の黒褐色油状物質を得た (Fig. II-1)。分画した活性画分周辺には多くの溶出成分が認められたため、分取した活性画分は複数成分の混合物と判断された。そのため、分取した活性画分について逆相 HPLC で分離した。順相カラムクロマトグラフィーより得られた活性画分は、40%メタノールに溶解し逆相 HPLC にてグラジエント溶離すると、20~60 分にかけて複数のピークがみられた。その後、明確なピークはなく数 mg で推移し、86~90 分にかけて約 40 mg/フラクションの最も大きなピークがみられた。その後は明確なピークはなく数 mg で推移した。各フラクションを生物検定に供試すると、86~90 分にかけて溶出した画分に強い活性が認められた。そこで 86~90 分に分取されたフラクションはまとめて活性画分として濃縮し、50.7 mg の褐色油状物質が得られた (Fig. II-2)。活性を示した画分は他の主要なピークから分離されるシャープなピークであった。そのため、単一のピークとして分取されたと考えられ

たので、活性画分について TLC の条件検討とあわせて純度の検定を実施した。順相 TLC において、クロロホルム：メタノール：水 (65 : 25 : 4) により展開した場合、スポットは R_f 0.40~ R_f 0.66 にかけてテーリングするスポットが検出された。クロロホルム：メタノール：酢酸 (65 : 25 : 4) により展開した場合、スポットは R_f 0.39~ R_f 0.56 に検出され、クロロホルム：メタノール：水 (65 : 25 : 4) と比較すればややまとまったスポットとして検出されたが、依然としてテーリングしていた。クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水 (65 : 25 : 4) により展開した場合、テーリングのない明瞭なスポットが検出された。その結果、主要なスポットが R_f 0.56 に検出されたが、そのスポットの上部 R_f 0.61 にわずかに別のスポットが検出された (Fig. II-3)。

逆相 TLC においては、100%メタノールにより展開した場合、スポットは R_f 0.18~ R_f 0.92 まで激しくブリーディングした。酢酸を 5%添加した場合にも、スポットは R_f 0.36~ R_f 0.85 とやや保持が弱くなったが、同様にブリーディングした。28%アンモニア水を 5%添加した展開溶媒では、ブリーディングは収まったが、 R_f 0.31~ R_f 0.46 とやや縦長のスポットとして検出された (Fig. II-3)。

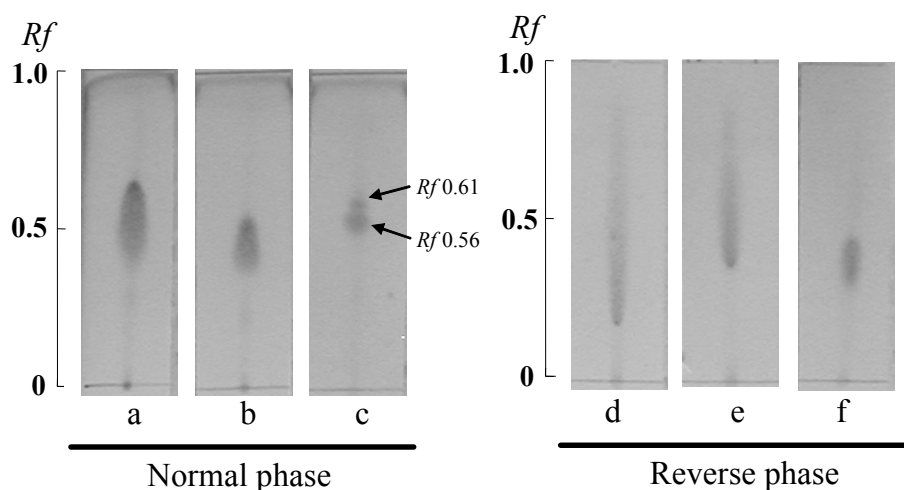


Fig. II-3. TLC Analysis of Active Fraction from ODS HPLC .

TLC analysis to determine the purity of sample collected on a ODS column. Normal phase TLC analysis was performed on silica gel 60 glass plate. The plate was developed with solvent(a) (chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v/v)), solvent(b) (chloroform-methanol-acetic acid (65 : 25 : 4, v/v/v)) and solvent(c) (chloroform-methanol-28% aqueous ammonia (65:25:4, v/v/v)). Reverse phase TLC analysis was performed on a ODS glass plate. The plate was developed with solvent(d) (methanol-water (95:5, v/v)), solvent (e) (methanol- acetic acid (95:5, v/v)) and solvent(f) (methanol-28% aqueous ammonia (95:5, v/v)). Spots were detected by charring with 5% H₂SO₄ in methanol.

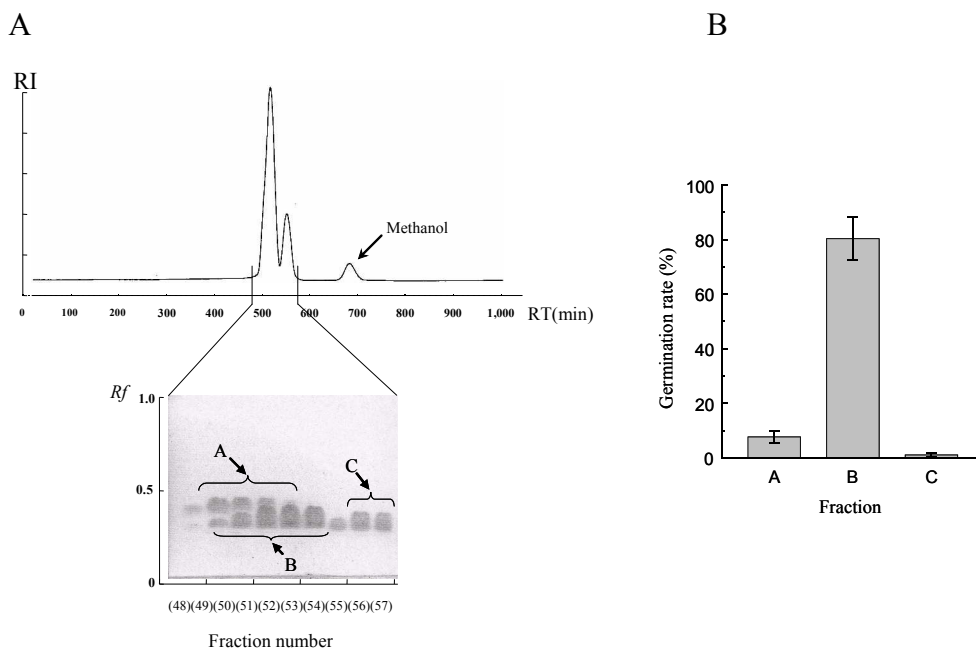


Fig. II-4. Purification on a Sephadex LH-20 Column Chromatography and HPTLC Analysis.

A, A Sephadex LH-20 column (1,000 × 10 mm I.D.) was eluted with methanol at a flow rate of 0.1 ml/min. The effluent was collected with a fraction collector cut to 10 min (1 ml) fractions, and elution was monitored with an RI detector. HPTLC analysis was performed on a silica gel 60 glass plate. The plate was developed with chloroform-methanol-28% aqueous ammonia (70:20:1, v/v/v). Spots were detected by charring with 5% H₂SO₄ in methanol. Numerals in the parenthesis were indicated the fraction numbers on a Sephadex LH-20 column. The substances carrying equal *R_f* values are indicated as A, B, and C in the figure. B, A bioassay of components A, B, and C was performed for the samples directly scraped from the HPTLC plate. The data represent the mean ± SE for three different preparations.

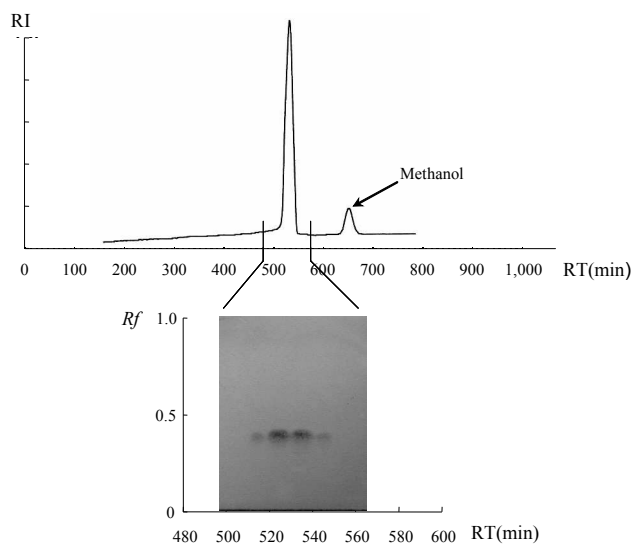


Fig. II-5. Sephadex LH-20 Column Chromatography and HPTLC of Component B.

A Sephadex LH-20 column (1,000 × 10 mm I.D.) was eluted with methanol at a flow rate of 0.1 ml/min. The effluent was monitored with an RI detector. The effluent was collected with a fraction collector cut to 10 min (1.0 ml) each. HPTLC analysis was performed on a silica gel 60 glass plate. The plate was developed with chloroform-methanol-28% aqueous ammonia (70:20:1, v/v/v), and the band was detected by charring with 5% H₂SO₄ in methanol.

以上の結果から、ODS カラムより分取された活性画分は混合物と判断された。そのため、これらの混合成分を分離するために、順相及び逆相とは異なる分離モードを持つ Sephadex LH-20 (GE Healthcare UK) カラムクロマトグラフィーによる分離を実施した。その結果、480 分から 570 分にかけてサンプル由来の 2 つのピークが検出された。さ

らに各フラクションを HPTLC で分離すると、単一の成分と考えられていた 480 分から 540 分にかけて検出されるメインのピークには成分 A と成分 B の 2 種類の成分が含まれていることが認められた。このことから逆相 HPLC における分取サンプルは、成分 A, B 及び C の 3 成分の混合物であることが明らかとなった (Fig. II-4. A.).

Table II-1. Summary of Purification Steps

Purification steps	Weight (mg)	Activity EC ₅₀ ^a (mg/ml)	Fold
Extraction (Pupa 1.0 kg/5,000 ml methanol)			
1,000 ml (supernatant)	21,200	7.4×10^{-4}	1
Acidolysis		5.0×10^{-6}	148
Solvent partition (Petroleum ether - Methanol)	11,440	2.7×10^{-6}	278
Solvent partition (Water - <i>n</i> -Butanol)	6,020	1.4×10^{-6}	526
Normal phase column chromatography separation	384.0	1.9×10^{-7}	3,810
Reverse phase HPLC separation	50.7	3.1×10^{-8}	23,810
Sephadex LH20	12.4	1.6×10^{-8}	46,641

^aConcentration-response data for germination rate (%) were analyzed as the effective concentration for 50% germination (EC₅₀). Non-linear curve fitting was performed with the program Kplot 5.0 to determine the EC₅₀.

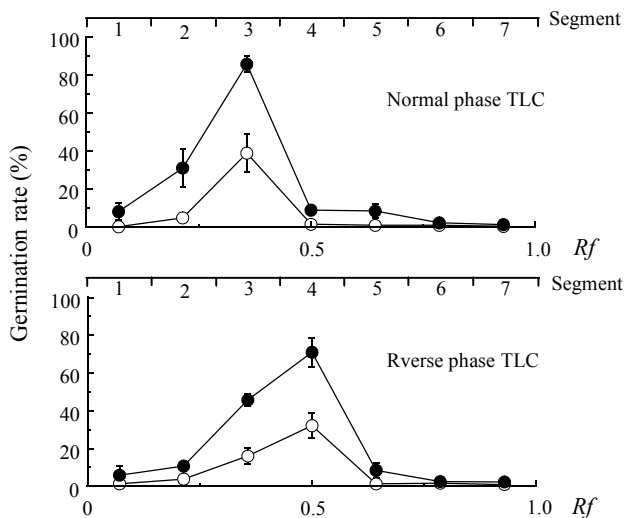


Fig. II-6. Comparison of the R_f Values of a Bioactive Substance of Methanol Extract without Acidolysis and of a Acidolysis Sample by TLC Separation.

Normal phase TLC was performed on a silica gel 60 aluminium sheet. The sheet was developed with chloroform-methanol-28% aqueous ammonia (70:20:1, v/v/v). Reverse phase TLC was performed on a ODS aluminium sheet. The sheet was developed with methanol-28% aqueous ammonia (95:5, v/v). After development (3.5 cm), the sheets were cut into seven segments (5 mm intervals) from origin to solvent front with scissors. The sample was extracted from each segment with methanol, as described in “Materials and Methods”. Symbols (mean values): ●-● (methanol extract with acidolysis sample), ○-○ (methanol extract without acidolysis). Each data point shows the mean ± SE (n = 3).

そこで、いずれの成分が活性物質であるかを特定するために、HPTLC プレートからのかき取り分取によって生物検定を実施した。その結果、成分 B に強い活性が認められた (Fig. II-4, B)。成分 A と成分 B は Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによりピークが重なり、完全には分離されないが、成分 A のほうが成分 B よりもわずかに溶出時間が短いため、この2つの成分については再度クロマトグラフィーを繰り返して成分 B のみを含むフラクション (フラクション no. 54) を分取し、最終的に 12.4 mg の無色ろう状物質を得た。分取したサンプルは Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより単一のピークが、また HPTLC により単一のバンドとして検出されたため、濃縮された画分は高純度の発芽促進物質であると判断された (Fig. II-5)。

以上の精製工程を Table II-1 にまとめた。B. mori の蛹 1.0 kg を材料に 5,000 ml のメタノールで抽出し、その上清 1,000 ml から 21 g の褐色油状物質が得られた。この物質を酸分解処理することにより EC₅₀ 値は 5.0×10^{-6} mg/ml とメタノール抽出液と比較して約 150 倍に活性が向上した。さらに 2 種類の溶媒分配クロマトグラフィーを経て EC₅₀ 値は 1.4×10^{-6} mg/ml と 500 倍以上に活性が向上した。得られたサンプルは順相カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを経て最終的に比活性が 46,000 倍以上に向上した 12.4 mg の白色ろう状物質が得られた。

精製工程の中で最も活性が向上したのは酸分解処理であった。この酸分解処理の前後で活性が向上した現象の原因として二つの可能性が考えられる。一つは、メタノールにて抽出された発芽促進物質が、酸分解処理によってさらに活性の高い化学構造に変化して活性が向上した場合、もう一つは、メタノールにより発芽促進物質を構造の一部に持つが、活性を出さない前駆体も同時に抽出され、酸分解処理によってその前駆体から発芽促進物質が切り出されて、発芽促進物質の濃度が向上した場合である。

そこで、順相と逆相 TLC によりメタノール抽出液とその酸分解処理後のサンプルにおける活性成分の R_f 値を比較した。その結果、いずれも同程度の R_f 値において活性が認められた (Fig. II-6)。このことにより両者の化学構造の極性基及び非極性基について両者に類似性が高いことが示唆された。したがって、発芽促進物質は酸分解処理により化学構造の変化はなかったと考察された。これらの結果から、酸分解処理による活性向上の要因は、上記に考察した後者の可能性が高いと考えられた。さらに、TLC における精製成分の呈色反応を実施したところ、ニンヒドリン試薬により赤紫色のスポットが得られた。このことから、発芽促進物質はアミノ基を有することが推察された。

酸分解はアミド結合を切断するため、前駆体がアミド結合を有し、酸分解によってフリーのアミノ基をもつ発芽促進物質が切り出された可能性が考えられた。精製工程における挙動、あるいは TLC における R_f 値等から総合的に判断すると、発芽促進物質はアミノ基を有する極性脂質と考えられた。

第3節 小括

本章では第1章で明らかにした、精製プロトコールに基づき、発芽促進物質の分離・精製を行った。すなわち、B. mori の蛹 1kg を材料にメタノール抽出、酸分解処理、2種類の溶媒分配クロマトグラフィー、2種類のカラムクロマトグラフィーを経て 50.7 mg の活性画分を得た。さらに Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを経て最終的に比活性が 46,000 倍以上に向上した 12.4 mg の白色ろう状の発芽促進物質を単離した。

精製された発芽促進物質は精製工程における挙動、TLC における R_f 値および呈色反応等から総合的に判断すると、アミノ基を有する極性脂質と考えられた。

第三章 昆虫病原性糸状菌 N. rileyi の B. mori 由来発芽促進物質の構造解析

緒言

N. rileyi の発芽促進物質の解明に関し、第 I 章では寄主昆虫の一種である B. mori から発芽促進物質の精製を進めていく上で必要な分取サンプルの生物活性や活性画分の比活性を効率よく検出及び定量化できる生物検定法を確立した。そして、分離・精製の工程を検討するため抽出溶媒、分解反応、溶媒分配クロマトグラフィー、順相及び逆相カラムクロマトグラフィーにおいて発芽促進物質がどのような挙動を示すのかを明らかにし、プロトコールの骨子についてまとめた。第 II 章では、得られたプロトコールに基づき、構造解析に必要な量の高純度の発芽促進物質を得るために大量調製を行った。高濃縮画分においては薄層クロマトグラフィーにより純度の検定を行い、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより不純物を除去し高純度の発芽促進物質を得た。

そこで、本章では得られた発芽促進物質の化学構造を解明するため、種々のスペクトル解析により、精製成分の構

造解析を実施するとともに、構造活性相関についても検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1) *N. rileyi* の分生子懸だく液の調製

N. rileyi の分生子懸だく液の調製法は第I章、第1節-7)の方法と同様に行った。但し、本章では分生子の懸だく液に0.05%と1.0%の2種類の濃度のTween 80水溶液を使用した。

2) 発芽促進物質の単離

第二章で得られた発芽促進物質、すなわちメタノール抽出液と比較し約46,000倍に活性が向上した12.4 mgの無色ろう状物質を用いた。

3) 核磁気共鳴分析法 (NMR) による解析

¹H-及び¹³C-NMRスペクトルはJEOL ALPHA 500 Spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan)で測定した。ケミカルシフトは両者ともtetramethylsilaneを内部標準とする δ (ppm)で示し、結合定数 (J) はHzで表記した。さらに、¹H-及び¹³C-NMRのシグナルは各種2次元NMR (¹H-¹H correlation spectroscopy, COSY; heteronuclear multiple-quantum coherence, HMQC; and heteronuclear multiple-bond correlation; HMBC)で帰属された。シグナルの表示は次の略号によった: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; br, broad.

4) 旋光度測定

旋光度はJASCO DIP-1000KYU (JASCO, Tokyo, Japan)で測定した。

5) アセチル化

1.5 mgの精製された発芽促進物質にアセチル化試薬: Ac₂O - pyridine (1:1), 0.3 mlを加え、室温で2時間反応させた。反応液は窒素気流下で除去した。残留物は酢酸エチル (1 ml) と水 (1 ml) による溶媒分配において、酢酸エチル層に発芽促進物質のアセチル化サンプルを得た (1.7 mg)。

6) トリメチルシリル (TMS) 化

トリメチルシリル化は、精製された発芽促進物質10 μ gにトリメチルシリル化試薬であるTMS-H (GL science, Tokyo, Japan)を1 ml加え65°Cで5分間反応させた。

7) ガスクロマトグラフィー-質量スペクトル (GC/MS)

解析

ガスクロマトグラフィーはAgilent 6890N (Agilent Technologies, CA, USA)を使用し、カラムはHP-5MS (0.25 mm I.D., 30 m, 0.25 μ m thickness, Agilent Technologies)を用いた。分析は80°C (10 min)で、その後10°C / minで280°Cまで昇温し、280°Cを8分間維持した。質量スペクトルはAgilent 5973N EI-mass spectrometer (Agilent Technologies)により解析した。質量分析計のイオン化電圧は70 eVで行った。

8) 構造活性相関

スフィンゴシンの構造骨格の炭素鎖長の違いによる発芽促進活性について調査した。標品はD-erythro-C₁₂-Sphingosine (catalog no.1838, Matreya, PA, USA), D-erythro-C₁₄-Sphingosine (catalog no. 1833, Matreya), D-erythro-C₁₆-Sphingosine (catalog no. 1835, Matreya)及びD-erythro-C₁₈-Sphingosine (catalog no. S7049, Sigma-Aldrich, MO, USA)を用いた。各スフィンゴシンはメタノールで種々の濃度に調製し、生物検定に供試した。

9) 生物検定

生物検定法は第I章、第1節-8)の方法と同様に行った。

第2節 結果及び考察

昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* の寄主の一種である *B. mori* の蛹からメタノール抽出、酸分解処理、石油エーテル-メタノール (含水) による溶媒分配、*n*-ブタノール-水による溶媒分配、順相カラムクロマトグラフィー、逆相HPLC及びSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーを経て46,000倍以上に活性が向上した単離成分 (発芽促進物質) について構造解析を実施した。

発芽促進物質は¹H-NMRスペクトルにおいて、1個のtertiary-メチル基 [δ 0.88 (3H, t, J = 6.7 Hz, H-14)], 2個の互いにトランスカップリングしたオレフィンプロトン [δ 5.47 (1H, dd, J = 5.3, 15.3 Hz, H-4); δ 5.84 (1H, dt, J = 15.3, 6.5 Hz, H-5)], 2個の二重結合に隣接すると考えられるメチレンプロトン [δ 2.03 (2H, dt, J = 6.5, 6.5 Hz, H-6)], 4個の酸素官能基または窒素官能基に隣接するプロトン [δ 3.51 (1H, br s, H-2); 3.90 (1H, br s, H-1a); 3.98 (1H, br s, H-1b); 4.62 (1H, br s, H-3)] ならびに複数のメチレンプロトン [δ 1.20-1.40, H-7 to H-13] 由来の各シグナルを与えた。一方、¹³C-NMRスペクトルでは、2個のオレフィンカーボン [δ 126.2 (C-4), 135.3 (C-5)], 1個の酸素官能基の結合したメチ

レンカーボン [δ 58.4 (C-1)], 1個の酸素官能基の結合したメチンカーボン [δ 70.4 (C-3)], 1個の窒素官能基と結合したと考えられるメチンカーボン [δ 56.4 (C-2)], 1個のメチルカーボン [δ 14.1 (C-14)], 1個のメチルカーボンに結合したメチレンカーボン [δ 22.7 (C-13)] 及び多数のメチレンカーボン [δ 29.0~30.0 (C-7~C-11)]由来の各シグナルが観察された。これらのデータから、発芽促進物質は各1個の酸素官能基の結合したメチレンカーボン, 酸素官能基の結合したメチンカーボン, 窒素官能基の結合したメチンカ

ーボン及び二重結合を有する長鎖アルコールと推定された (Table III-1)。

さらに上記の各シグナルを, ^1H - ^1H COSY スペクトル (H-1/H-2, H-2/H-3, H-3/H-4, H-4/H-5, H-5/H-6, H-6/メチレンプロトン) 及び HMBC スペクトル (H-4/C-3, H-4/C-6, H-5/C-3, H-5/C-6, H-6/C-4, H-6/C-5, H-6/メチレンカーボン) を用いて詳細に解析した結果, 発芽促進物質は4位と5位に二重結合を有するスフィンゴイド塩基であると判明した (Fig. III-1)。

Table III-1. ^1H and ^{13}C -NMR Data for Germination Accelerating Factor

Position	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC (H to C)
1	3.90a (1H, br s)	58.4	C-1
	3.98b (1H, br s)		C-1
2	3.51 (1H, br s)	56.4	C-2
3	4.62 (1H, br s)	70.4	C-3
4	5.47 (1H, dd, $J = 5.3, 15.3$)	126.2	C-4
5	5.84 (1H, dt, $J = 15.3, 6.5$)	135.3	C-5
6	2.03 (2H, dt, $J = 6.5, 6.5$)	32.4	C-6
7	1.20-1.40 (14H, br)	29.0-30.0 ^a	
8			
9			
10			
11			
12		31.9	
13		22.7	
14	0.88 (3H, t, $J = 6.7$)	14.1	C-14

δ in ppm from tetramethylsilane (coupling constants (J) in Hz are given in parentheses) in CDCl_3 . ^1H -NMR spectral data (500 MHz). ^{13}C -NMR spectral data (125 MHz). ^a ^{13}C -NMR signals were detected δ 29.2, 29.4, 29.5, 29.6 and 29.7 between 29.0 and 30.0 ppm.

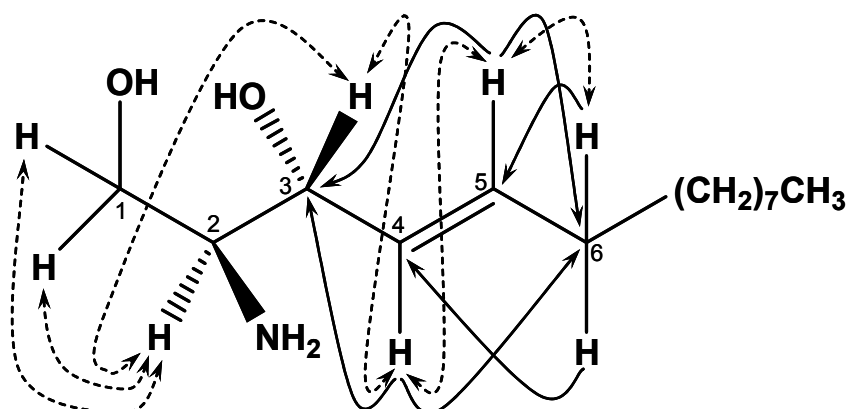


Fig. III-1. Key HMBC and ^1H - ^1H COSY Correlations for the Chemical Structure of Germination Accelerating Factor
Solid arrows: HMBC correlations, dashed arrows: ^1H - ^1H COSY correlations.

次に、発芽促進物質の立体配置について検討した。推定構造の2位,3位の炭素が不斉原子であることから4種類の立体異性体 (D-erythro, D-threo, L-erythro, L-threo, アミノ基と水酸基がフィッシャー投影式で互いに同じ側に配置されるのは erythro, 反対側に配置されるものは threo) が考えられる。

Kisic *et al.*(1995) はその配置を決定する方法について詳細に検討している。その方法にしたがい、活性物質を常法 (Shapiro *et al.*, 1958; Gaver and Sweeley, 1965) によってアセチル化し、得られたアセチル化体の各 NMR シグナルを文献値 (Kisic *et al.*, 1995) と比較した結果、精製した発芽促進物質は 2*S*, 3*R* (erythro 型) の相対配置を有することが明らかとなった (Table III-2)。さらに、旋光度が負の値 ($[\alpha]_D^{21} = -31.0^\circ$ (C=0.1, CHCl₃)) を示したことから D-erythro 型の絶対配置を有することが明らかとなった (Fig. III-1)。

また、分子量を決定するため、精製物質を TMS 化した後、常法 (Karlsson, 1965; Karlsson, 1973; Krisnangkura and Sweeley, 1974; Matsubara and Hayashi, 1991) により GC/MS の測定を行った。その結果、RT 16.7 min に精製物由来のピークが検出され、その MS スペクトルにおいて m/z 387 ($[M]^+$), m/z 372 ($[M-CH_3]^+$), m/z 284 ($[M-CH_2OTMS]^+$), m/z 282 ($[M-TMSOH-CH_3]^+$) 及び m/z 132 ($[H_2NCHCH_2OTMS]^+$) の各フラグメントピークの出現から、分子量を 387 と決定した (Fig. III-2)。また、この分子量は上記 ¹H-NMR スペクトルにおける積分曲線から得られるプロトン数 (δ 1.20~1.40, 14H) ならびに ¹³C-NMR スペクトルから概算される炭素数 (δ 29.2, δ 29.4, δ 29.5, δ 29.6, δ 29.7, CH₂×5) からも支持された。以上の結果から、発芽促進物質の構造を 2*S*-amino-tetradeca-4-ene-1,3*R*-diol (D-erythro-C₁₄-Sphingosine) (C₁₄-スフィンゴシン) と決定した。

Table III -2. Key ¹H-NMR Chemical Shifts for Acetylated Germination Accelerating Factor, D-erythro-sphingosine and L-threo-sphingosine

Sample	Relative configuration	Position							
		H-1a	H-1b	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7
Germination Accelerating Factor	-	4.049	4.309	4.438	5.277	5.400	5.792	2.040	1.348
D-erythro-Sphingosine ^a	2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>	4.042	4.304	4.433	5.277	5.391	5.792	2.040	1.350
L-threo-Sphingosine ^a	2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>	4.063	4.093	4.398	5.407	5.380	5.773	2.020	1.340

Numeral means δ in ppm from tetramethylsilane (coupling constants (*J*) in Hz are given in parentheses) in CDC₃. ¹H-NMR spectral data (500 MHz). ¹³C-NMR spectral data (125 MHz). ^aData from Kisic *et al.* (1995).

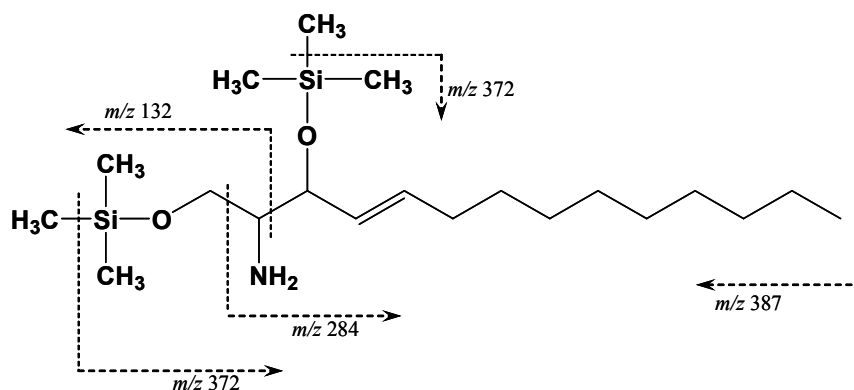


Fig. III-2. Fragments Observed in EI/MS of the Trimethylsilyl Derivative of Germination Accelerating Factor.

なお、本活性成分の精製過程において酸分解処理によって約 150 倍に活性が向上し、最も効果的な工程であった。その理由として活性を示さない前駆体の存在を仮定し、前駆体からの分解産物として活性物質が生成した可能性があることを考察した。そして構造解析によって、*N. rileyi* の発芽促進物質として単離した成分が C₁₄-スフィンゴシンであることが明らかとなり、前駆体と仮定していたものはセラミドなどの複合スフィンゴ脂質であると考えられた。そのような複合スフィンゴ脂質が酸分解によりアミド結合が切断されて (Gaver and Sweeley, 1965)、活性成分であるスフィンゴシンが生じたものと考えられた。

次に構造活性相関について検討した。スフィンゴイド塩基の構造骨格である炭素鎖長は生物種によって多様な長さを持つことが知られている (Hirabayasi, 2006)。そこでスフィンゴシンの炭素鎖長に注目し、炭素鎖 12, 14, 16 及び 18 の 4 種類のスフィンゴシンの発芽促進活性について調査した。また、スフィンゴシンは極性脂質であるため、水系の生物検定溶液に対する溶解性は共存する界面活性剤の濃度に影響すると考えられる。そのため、界面活性剤の濃度がスフィンゴシンの発芽促進活性に及ぼす影響についても調査した。

Fig. III-3.A は分生子懸だく液を調製する界面活性剤 (Tween 80) 濃度が 1.0% の場合の生物検定結果を示す。C₁₂-スフィンゴシン、C₁₄-スフィンゴシン、C₁₆-スフィンゴシンにおいて濃度が濃くなるにしたがい活性が向上するシグモイド型の用量反応を示した。標品化合物において精製物質と同様の生物活性が得られたことから、スフィンゴシンが *N. rileyi* の分生子に対し発芽促進効果を示すことが確認された。最も活性が高かったのは精製物質と同じ C₁₄-スフィンゴシン (EC₅₀: 1.02 × 10⁻⁸ mg/ml) であった。次いで C₁₂-スフィンゴシン (EC₅₀: 5.88 × 10⁻⁷ mg/ml)、C₁₆-スフィンゴシンであった (EC₅₀: 9.20 × 10⁻⁶ mg/ml)。C₁₈-スフィンゴシンにおいては濃度の向上にともなう活性の向上は認められず、10⁻⁴ ~ 10⁻⁶ mg/ml 付近にわずかな活性を示したが、それ以上の濃度では濃くなるにしたがい活性が低下した (**Fig. III-3.A**)。

次に、分生子懸だく液を調製する界面活性剤濃度を 1/20 (0.05% Tween 80) に希釈した場合の生物検定結果を **Fig. III-3.B** に示す。C₁₄-スフィンゴシンは 10⁻⁵ mg/ml くらいまでは濃度が高くなるにしたがい活性の向上がみられ、80% 以上の分生子の発芽を示したが、それ以上の濃度になると急激に活性が低下した。次に、活性が高かったのは C₁₂-スフィンゴシンであり 10⁻³ mg/ml くらいまでは濃度が高くなるにしたがい活性の向上がみられたが、最高でも発芽率は 50% 程度であり、それ以上の濃度になると活性が低下した。1.0% Tween 80 水溶液で調製した際には発芽促進活性

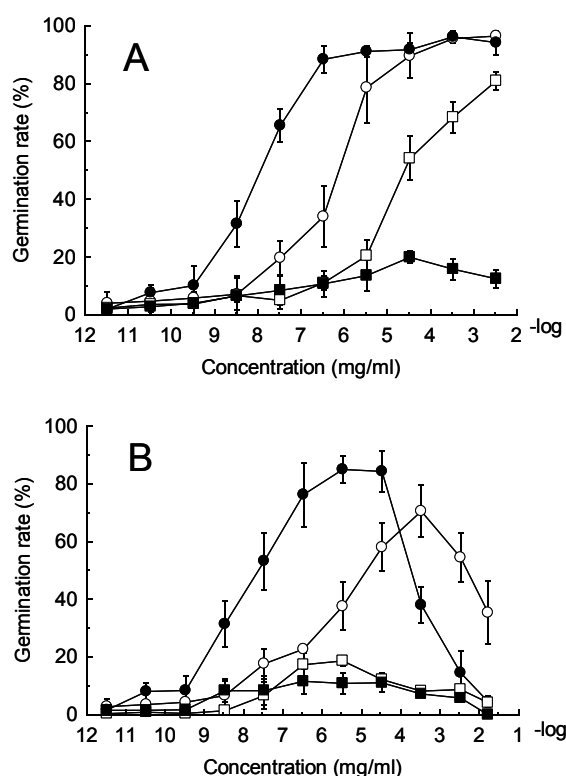


Fig. III-3. Effect of Chain Length of the Sphingosine on the Germination Activity.
 Symbols: ○ - ○ (C₁₂-Sph), ● - ● (C₁₄-Sph), □ - □ (C₁₆-Sph), ■ - ■ (C₁₈-Sph). A high concentration of detergent (A, 1.0% Tween 80) and a low concentration of detergent (B, 0.05% Tween 80) were used for the assay solution as a conidial suspension. Each data point shows the mean ± SE (n = 3).

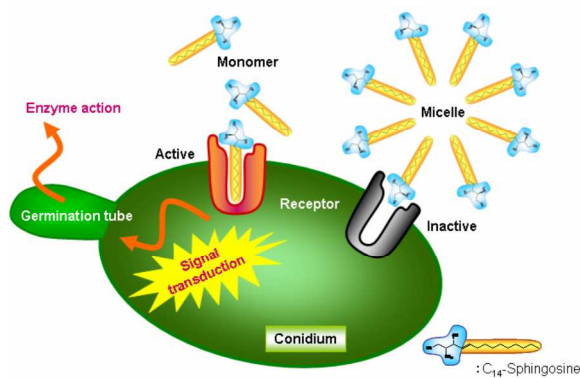


Fig. III-4. Model of the Induction of Conidial Germination of *N.rileyi* by C₁₄-Sphingosine.

が得られた C₁₆-スフィンゴシンは 0.05% Tween 80 水溶液ではほとんど活性を示さず 10⁻⁶~10⁻⁷ mg/ml 付近をピークに濃度が濃くなるにしたがい活性が低下した。C₁₈-スフィンゴシンも C₁₆-スフィンゴシンと同様の傾向を示した (Fig. III-3.B)。このように、分生子懸液を調製する界面活性剤の濃度を薄くした場合に、C₁₄-スフィンゴシンや C₁₂-スフィンゴシンが一定以上の濃度になれば活性が低下する現象が見られたが、その理由として、両親媒性物質であるスフィンゴシンが高濃度状態で臨界ミセル濃度 (Critical micelle concentration: CMC) を越え、生物検定溶液中でミセルを形成したためではないかと考えられた。つまり、スフィンゴシンの発芽促進活性はモノマー状態で得られ、ミセル状態では活性が得られないと考えられた。このように、モノマーの状態では活性を示し、ミセルの状態では活性が低下するという事は、会合体の表面に現れないアルキル鎖が分生子の受容体と疎水的に結合することでアゴニストとして機能するものと考えられた (Fig. III-4)。また、C₁₂及び C₁₄-スフィンゴシンの活性が低下し始める濃度を比較すると、C₁₂-スフィンゴシンのほうが活性の低下し始める濃度が高かったが、このことは、炭素鎖長の違いにより C₁₂-スフィンゴシンの CMC 値が C₁₄-スフィンゴシンより高いため (Huipers *et al.*, 1996) と考えられた。

高濃度の界面活性剤 (1.0% Tween 80) を使用した生物検定では、C₁₂、C₁₄及び C₁₆-スフィンゴシンが高濃度域でも活性の低下がなくシグモイド型の用量反応を示したことは、界面活性剤によりスフィンゴシンの検定溶液中での溶解度が高まり、スフィンゴシンのミセル形成が阻害され、高濃度領域でもモノマー状態が維持されたためと考えられた。C₁₈-スフィンゴシンにおいては生物検定溶液に対する溶解度が低く、水系の生物検定溶液ではモノマーの状態が存在しがいたために生物活性が低いものと考えられた。

水溶液に対する溶解度の面から考慮すると、物質極性の最も高い C₁₂-スフィンゴシンが最も溶解度が高いと考えられ、そのため高い活性が得られると考えられる。しかし、活性は C₁₄-スフィンゴシンが特異的に高く、炭素鎖が 14 よりも長くても短くても、その活性は大幅に低下した。そのため、脂質部分の鎖長が受容体との親和性や固有活性に大きく関与しており、さらには炭素鎖 14 のスフィンゴシンであることは寄主認識のための重要な意味を持つものと考えられた。

精製工程の中で、発芽促進物質の活性が最も向上したのは酸分解処理であった。そのため、この要因を第III章において、酸分解によって発芽促進物質の前駆体から発芽促進物質が切り出されて、発芽促進物質の濃度が向上したと考察した。そして、本章において発芽促進物質の化学構

造が C₁₄-スフィンゴシンであることが解明された。このことから考察すると、前駆体と推定していたものはセラミド等のスフィンゴ脂質であると考えられる。つまり、メタノール抽出により遊離の C₁₄-スフィンゴシンよりもはるかに多く前駆体であるセラミド等が抽出され、酸分解による分解産物として発芽促進物質である C₁₄-スフィンゴシンが切り出され、発芽促進物質である C₁₄-スフィンゴシンの濃度が向上し活性が向上したものと考えられた。結果として、スフィンゴシンの調製法として行われる、スフィンゴ脂質の酸分解 (Gaver and Sweeley, 1965) を行ったこととなった。そのため、効率よく発芽促進物質を調製するためには、セラミド等の前駆体を効率よく抽出し酸分解で C₁₄-スフィンゴシンを得る方法が有効と考えられる。

第3節 小括

本章では第2章で単離された発芽促進物質について種々のスペクトル解析により化学構造を明らかにした。すなわち、NMR スペクトル及び MS スペクトル等で構造解析すると、発芽促進物質として単離された成分は 2*S*-amino-tetradeca-4-ene-1,3*R*-diol、つまり既知物質である *D*-erythro-C₁₄-Sphingosine (C₁₄-スフィンゴシン) であることが明らかとなった。さらに、スフィンゴシンの炭素鎖に着目し、構造活性相関を調べたところ、精製物と同じ炭素鎖 14 のスフィンゴシンにおいて強い活性を示し、しかもその生物活性は、炭素鎖が 14 よりも長くても短くても大きく低下することが明らかとなった。このことからスフィンゴシンのアルキル鎖長がエピトープとして重要であると考えられた。また、水溶液中のスフィンゴシンが高濃度領域で活性が低下することからミセル形成により活性が阻害されると考えられた。このことはスフィンゴシンのアルキル鎖が受容体との疎水的結合によりアゴニストとして機能するものと考えられた。そのため、スフィンゴシンによる発芽促進活性を効果的に得るためには、水溶液中でミセル形成を防ぐことが重要であると考えられた。

第四章 C₁₄-スフィンゴシンにより誘導される発芽に対する栄養要求性と寄主昆虫表面の栄養条件

緒言

寄主昆虫である *A. gemmatilis* (Boucias and Pendland, 1984),

T. ni, *H. zea*, *H. virescens* (Galal *et al.*,1991), *H. armigera* (Tang and Cheng, 2001) 等のクチクラ抽出物を人工培地に添加すると分生子の発芽誘導期の短縮や発芽率が向上することが報告されている. このように昆虫病原性糸状菌の分生子は寄主昆虫由来抽出液の有無ではそれぞれに特異な発芽挙動が観察され, しかもその違いは発芽促進のみならず, 寄生のための代謝に関与すると思われる種々の酵素活性が向上することについても解明されている (El-Sayed *et al.*,1993a, 1993b, 1993c). さらに寄主昆虫抽出物の添加培地のみならず, ヤガ科の一種 *A. gemmatilis* のクチクラに付着した *N. rileyi* の分生子を SEM で観察するとクチクラ抽出物を添加した培地と同様に人工培地よりもはるかに短い発芽誘導期 (6 時間程度) で発芽し始めることが報告されている (Boucias and Latge,1988). このようなことから発芽促進因子の解明は, 寄主昆虫表面での分生子発芽の現象や寄主認識メカニズムを分子レベルで理解する足がかりとなるとともに, これが害虫管理への応用の際にも有効な生物活性を有すると考えたため本因子の解析を進めた.

第 I ~ III 章において, *N. rileyi* の寄主昆虫の一種である *B. mori* から発芽促進因子の精製を試み, その発芽促進物質が C₁₄-スフィンゴシンであることを明らかにした. この発芽促進物質を精製するに当たりペプトンを添加した生物検定によって発芽促進物質の濃縮を進めた. しかし, 検定溶液からペプトンを省くと C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性は大幅に低下した. そのため, C₁₄-スフィンゴシンによる発芽促進活性を得るための補助因子の存在が示唆された. ペプトンの培地への添加の主な目的は, 栄養素としての窒素源, 特にアミノ酸に関する成分の供給であることから, 補助因子としての窒素成分の影響が考えられる. また, 上記のように寄主表皮上で *N. rileyi* の分生子の発芽が促進されるということは, 寄主表面において発芽促進物質 (C₁₄-スフィンゴシン) 及び補助因子の存在が示唆される.

そこで, 本章では C₁₄-スフィンゴシンにより発芽促進効果に影響をおよぼす諸条件及び補助因子を明らかにするとともに, 寄主表面で利用し得る発芽促進物質 (C₁₄-スフィンゴシン) 及び補助因子の存在についても明らかにすることを目的とした.

第 1 節 実験材料及び実験方法

1) *N. rileyi* の分生子懸だく液の調製

N. rileyi の分生子懸だく液の調製法は第 I 章, 第 1 節-7) の方法と同様に行った.

2) 窒素成分の C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性に及ぼす影響

2 種類の無機体窒素 (硫酸アンモニウム, (NH₄)₂SO₄; 硝酸アンモニウム, NH₄NO₃) と 20 種類のアミノ酸 (アラニン, Ala; バリン, Val; ロイシン, Leu; イソロイシン, Ile; メチオニン, Met; トリプトファン, Trp; プロリン, Pro; フェニルアラニン, Phe; チロシン, Tyr; グリシン, Gly; セリン, Ser; トレオニン, Thr; システイン, Cys; アスパラギン, Asn; グルタミン, Gln; チロシン, Tyr; リシン, Lys; アルギニン, Arg; ヒスチジン, His; アスパラギン酸, Asp; グルタミン酸, Glu) について生物検定により C₁₄-スフィンゴシンの補助因子活性を調査した.

3) pH 及び培養期間の C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性に及ぼす影響

pH の影響については 50 mM リン酸緩衝液で調整した pH 4.5~9.4 の培地で C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性を調査した. また, 培養期間の影響については SMAY 培地において 23 °C で 6~100 日間の培養で得られた分生子を使用し, C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性を調査した.

4) 発芽管の伸長調査

分生子の生育に関しては, 培養 24 時間 (23 °C) 後に発芽管の伸長状況を 0~3 のレベルを設け, 以下の基準で調査した. すなわち, レベル 0 = 発芽なし, レベル 1 = 発芽管長が 50 μm 以下, レベル 2 = 発芽管長が約 50~100 μm で分枝なし, 及びレベル 3 = 発芽管長が 100 μm を越え, かつ分枝あり, とした. 発芽管長は接眼マイクロメーターを用いて調査した.

5) 発芽管生育の経時的変化

発芽管生育の経時的変化は培養後 0, 3, 6, 12, 18 及び 24 時間 (23°C) 経過後の分生子の生育状況を調査した.

6) 生物検定

生物検定は 96 穴マイクロプレート (BD Falcon) を使用した. マイクロプレートの各穴に C₁₄-スフィンゴシン (Matreya) のメタノール溶液 (10⁻³ ~ 10⁻¹² mg/ml) を 1 μl 入れ, クリーンベンチ内で 5 分間風乾させた. その後, 検定用試料 20 μl, リン酸緩衝液 (50 mM, pH 7.0) を 10 μl, 分生子懸だく液を 10 μl を入れた. ポジティブコントロールとして 1% ペプトン (Kyokuto) 水溶液を用いた. 検定溶液はマイクロプレートミキサーで 5 分間振とう混和し 23 °C で 10~24 時間培養した. 分生子発芽の観察法及び GT₅₀ 値, EC₅₀ 値の算出方法は第 I 章, 第 1 節-8) の方法に準じた.

7) 寄主表面抽出に用いた昆虫

N. rileyi の寄主昆虫として、熊本県農業研究センター農産園芸研究所バイオ育種研究室で3年以上、人工飼料 (Insecta LFS; Nihon Nosan Kogyo, Yokohama, Japan) を餌に累代飼育しているヤガ科昆虫である *S. litura* を用いた。

8) 寄主表面抽出物の調製

S. litura の表面の抽出には凍結 (-20°C) した終齢幼虫を用いた。吐液及び糞からのコンタミネーションを防ぐために、抽出する前に口部と肛門部を溶解したパラフィン (60°C) で被った。50匹の幼虫を個々に試験管に入れ、それぞれ10mlの水を用いピペッティングしながら寄主表面の水抽出物を得た。すべての水抽出物はまとめてロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。この水抽出の濃縮サンプルは2セット準備し、一方はアミノ酸分析のために1.0mlの水に溶解した。もう一方は C₁₄-スフィンゴシン分析のため1.0mlのメタノールで溶解した。

9) アミノ酸分析

S. litura 表面抽出物は加水分解前および加水分解後のアミノ酸組成について定量分析を行った。加水分解前の遊離アミノ酸については、200 µl の表面抽出物を濃縮し、200 µl の 0.02 M - 塩酸に溶解しアミノ酸分析装置 (L-8500A, Hitachi, Tokyo, Japan) により分析した。

また、加水分解後のアミノ酸成分の調製は Moore and Stein (1963) の方法にしたがって行った。すなわち、200 µl の表面抽出物を試験管 (12 × 105 mm) に入れ、減圧式遠心濃縮器を用いて乾固した後、0.05%のメルカプトエタノールを含む6 M-定沸点無鉄塩酸 200 µl を加え、減圧下で封かんし 110 °C で 20 時間反応させた。反応液は減圧下で湯煎しながら乾固し、200 µl の 0.02 M - 塩酸に溶解し同アミノ酸分析装置により分析した。

1 0) C₁₄-スフィンゴシン分析

C₁₄-スフィンゴシンの定量分析のため LC/MS 分析を行った。LC 装置は Agilent 1200 LC システム (Agilent Technologies) を使用した。カラムは ODS (Cosmosil 5C18-MS-II, 150 × 2.0 mm I.D., Nacalai Tesque) を用いた。サンプルは A 液 (H₂O - HCOOH (100 : 2; v/v) containing 7 mM ammonium formate) - B 液 (MeOH-HCOOH (100 : 2; v/v) containing 5 mM ammonium formate) を用い、ラジエント (30% B (0-1 min); 30-70% B (1-12min); 100% B (12-15 min)) により溶離した。この条件によって C₁₄-スフィンゴシンは RT 7.29 分に検出される。

LC/ESI スペクトルは 4 重極型質量分析器 Agilent 6120

(Agilent Technologies) を用いた。検出条件は、ESI, ポジティブ; SIM, m/z 244 ([M+H]⁺); フラグメンターボルト, 100 vで行った。

1 1) 昆虫体表面積の測定

S. litura の体表面積はキーエンス VHX-1000 デジタルマイクロSCOPE (Keyence, Osaka, Japan) を用いて測定した。また対物レンズは VH-Z20R を使用した。

1 2) 単位面積当たりの量

アミノ酸分析, C₁₄-スフィンゴシン分析から得られたデータは、昆虫体表面積の測定データを用い 1 cm² 当たりの量に換算した。

第2節 結果及び考察

第 I ~ III 章において、昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* の寄主の一種である *B. mori* の抽出物中に、*N. rileyi* 分生子の発芽誘導期を特異的に短縮する現象を見だし、その発芽促進因子が C₁₄-スフィンゴシンであることを明らかにした。このように寄主昆虫由来の物質により特異的な発芽挙動を示すことは本物質が、*N. rileyi* の寄主認識機構に重要な意味を持つものと考えられる。寄主昆虫表面に付着した分生子の SEM 観察などにより、寄主表面における発芽は分生子付着後 6~8 時間で発芽していることが報告されており (Boucias and Latge, 1988), *in vitro* において C₁₄-スフィンゴシンによってもたらされる発芽挙動と合致する。このことは寄主表面において、C₁₄-スフィンゴシンの存在とその発芽促進活性を得るための条件が満たされていることが示唆される。そこで本章では、C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性を得るための諸条件を明らかにするとともに、寄主昆虫表面成分の解析を実施した。

C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性の検定溶液からペプトンを省くと、発芽促進活性が大幅に低下することから、C₁₄-スフィンゴシンの補助因子物質として窒素成分が考えられた。したがって 2 種類の無機体窒素と 19 種類のアミノ酸を供試して、これらの成分が C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性に及ぼす影響について調査した。また、同時に Fig. IV-1.A に示す発芽管の生育レベルを基準に分生子の生育経過についても調査した。

C₁₄-スフィンゴシンの存在下において、無機体窒素では (NH₄)SO₄ で 6.3% , NH₄NO₃ で 5.8% と低い発芽率であった。一方、アミノ酸では、総じて無機体窒素よりも発芽率が高かった。特に、アラニン (72.4%), ヒスチジン (65.6%) は高い発芽率が得られ、補助因子として高い活性が認められ

た. これらのアミノ酸の影響はポジティブコントロールとして用いたペプトンの発芽率 (97.0%) と比較し同程度であった. しかし, その他のアミノ酸は 30%以下の発芽率であり, 補助因子としての活性は低かった. ネガティブコントロールとして用いたリン酸緩衝液では 3.8%の発芽率であり, リン酸緩衝液と同程度の発芽率を示すアミノ酸は C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性への補助因子としての活性は, ほとんどないと考えられた (Table IV-1). 一方, C₁₄-スフィンゴシンが存在しない条件下では, すべての無機体窒素及びアミノ酸において発芽がみられなかった. ペプトンにおいても 2.2%と低い発芽率であった.

さらに, 培養 24 時間後における発芽管の生育レベルについても観察した (Table IV-1). その結果, C₁₄-スフィンゴシンが存在する場合にはペプトンでレベル 3 と旺盛な発芽管の伸長が観察された (Fig. IV-1.B). アミノ酸ではアスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン酸でレベル 2 の発芽管伸長であったが, その他のアミノ酸はレベル 1 であ

った. 発芽率に関してペプトンと同程度の活性を示したアラニンとヒスチジンにおいても, 発芽管の生育レベルは 1 であった (Fig. IV-1.B). 一方, C₁₄-スフィンゴシンが存在しない場合においては, ペプトンの培養 24 時間後の発芽管伸長はレベル 3 に達し, C₁₄-スフィンゴシンは発芽誘導期の短縮効果にのみ影響した. また, 2 種類の無機体窒素及びすべてのアミノ酸においては発芽が認められなかった. 以上の結果から, ペプトンは C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽における高い補助因子活性を有し, また発芽後の生育に関する寄与することが明らかとなった. また, アミノ酸のアラニンやヒスチジンは C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽における高い補助因子活性を持つが, 発芽後の発芽管の伸長レベルはリン酸緩衝液と同程度であり, 発芽後の生育に対する影響はなかった. そして, アラニンやヒスチジンの発芽活性は C₁₄-スフィンゴシンの存在下でのみ有効であると考えられた.

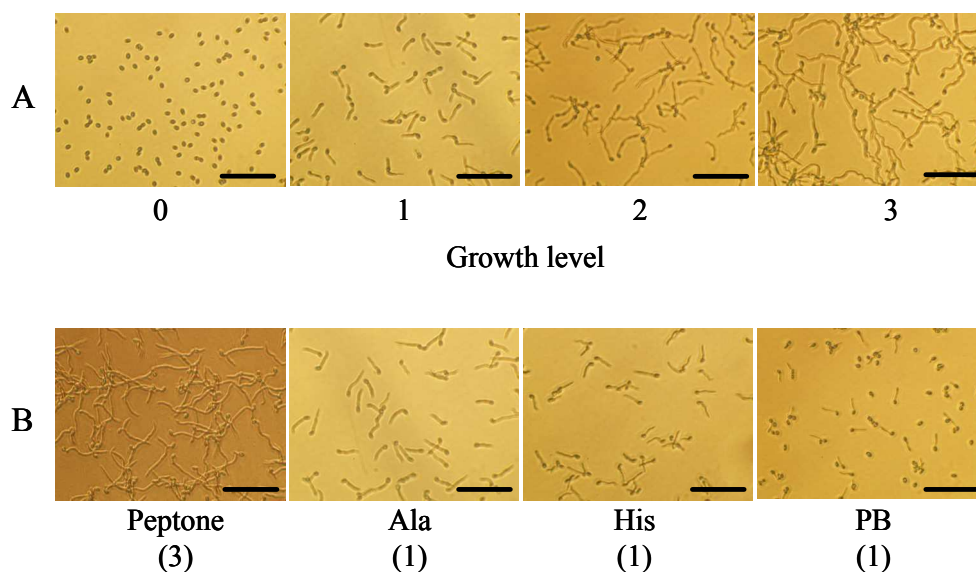


Fig. IV-1. Germ-Tube Growth.

A, Germ-tube growth ratings. Post-germinative development at 24 h was judged by germ-tube length based on a level of 0-3 with 0, no germination; 1, germ tube length less than 50 μm ; 2, germ tube length about 50-100 μm with no branching; 3, germ tube length more than 100 μm with branching. Length was estimated with an ocular micrometer. Scale bar shows 100 μm . B, Effects of nitrogen source on germ-tube growth. Numbers in parentheses show growth level based on Fig. IV-1A. Conidial germ-tube growth was observed after 24 h of incubation at 23°C. The final concentration of the nitrogen source was 0.5% in assay solutions. C₁₄-Sph was prepared to bring the final concentration to 2.5×10^{-5} mg/mL in each assay solution. Scale bar shows 100 μm .

Table IV-1. Effects of Nitrogen Source on C₁₄-Sphingosine-Triggered Germination

Nitrogen source ^a	C ₁₄ -Sph ^b (+)		C ₁₄ -Sph (-)	
	Germination rate ^c (%)	Germ tube growth ^d	Germination rate ^c (%)	Germ tube growth ^d
Inorganic compounds				
(NH ₄)SO ₄	6.3	1	0.0	0
NH ₄ NO ₃	5.8	1	0.0	0
Organic compounds				
Ala	72.4	1	0.0	0
Val	17.6	1	0.0	0
Leu	7.4	1	0.0	0
Ile	6.3	1	0.0	0
Met	5.9	1	0.0	0
Trp	6.4	1	0.0	0
Pro	24.1	1	0.0	0
Phe	6.9	1	0.0	0
Tyr	4.1	1	0.0	0
Gly	6.5	1	0.0	0
Ser	16.4	1	0.0	0
Thr	5.1	1	0.0	0
Cys	7.0	1	0.0	0
Asn	6.3	2	0.0	0
Gln	4.8	1	0.0	0
Lys	4.4	1	0.0	0
Arg	6.0	1	0.0	0
His	65.6	1	0.0	0
Asp	19.8	2	0.0	0
Glu	9.4	2	0.0	0
Control				
Peptone	97.0	3	2.2	3
PB	3.8	1	0.0	0

^aThe final concentration of nitrogen source was 0.5% in assay solution. ^bC₁₄-Sph (+) was prepared to bring the final concentration to 2.5 × 10⁻⁵ mg/ml in each assay solution. ^cGermination rate was determined after 10 h of incubation at 23°C. ^dGerm tube growth ratongs are shown in Fig. IV-1A.

次に、C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽に対して補助因子活性の高かったペプトン及びアミノ酸の中ではその効果が最も高かったアラニンを用いて、培養液の pH と分生子の培養期間が C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽に及ぼす影響について調査した (Fig. IV-2). pH についてはペプトン及びアラニンを添加した溶液ともに pH 6.5~7.5 の中性付近での発芽が良好であり、pH 6.0~8.0 を外れると低下し、特に酸性側において大きく低下した (Fig. IV-2. A). C₁₄-スフィンゴシンのみで窒素成分を含まない溶液においては全般的に発芽率が低いものの、中性付近では 10%程度の

発芽が得られた. いずれの検定溶液においても中性付近に活性のピークを示した. したがって、分生子発芽における至適 pH は中性付近であった.

さらに、C₁₄-スフィンゴシンにより誘導される分生子の発芽活性について、SMAY 培地において分生子形成が始まる培養後 7 日目から 100 日以上培養 (23 °C) した分生子を用いて調査した. ペプトン添加溶液では形成直後の分生子から 40 日間培養した分生子において 90%近い発芽率が得られたが、それ以上の期間培養した分生子については急激に発芽率が低下し、100 日以上培養した分生子はまっ

たく発芽しなかった。またアラニン添加溶液においては形成初期の分生子では発芽率が約 50%とペプトン添加溶液と比較すると低かったが、10~20 日の培養期間で得られた分生子では 70%程度の高い発芽率が得られた。それ以上の培養期間では、培養の長期化に伴い発芽率は急激に低下し、約 90 日以上培養した分生子ではまったく発芽しなかった (Fig. IV-2. B)。また、C₁₄-スフィンゴシンのみで窒素成分を含まない検定溶液においては、全体的にアラニン添加溶液と比較し発芽率は低いものの、発芽の傾向は類似していた。つまり、培養初期に得られる分生子の発芽率は 5%以下と低く、10~20 日の培養期間で得られた分生子で最も高いが、その発芽率は 10% 程度であった。そして、培養の長期化にしたがい徐々に発芽率が低下した。このことから、高い発芽率を得るための至適な培養期間は 10~20 日であり、培養期間の長期化にともないエイジングが進み、SMAY 培地上 (23 °C) の分生子は約 100 日で発芽が認められなくなった。ペプトン添加溶液では分生子形成間もない初期の分生子においても至適培養期間の分生子と比較し発芽率の低下は観察されず、高い発芽率が得られた

のに対し、アラニン及び窒素成分を含まない検定溶液においては、形成初期の分生子では、至適培養期間の分生子と比較し低い発芽率であった。糸状菌の分生子の発芽に関し、分生子内の貯蔵養分や細胞外の種々の基質が利用されることが知られている (柳田, 1982)。このことからアラニン及び窒素成分を含まない検定溶液において、培養 7 日程度の初期に形成された分生子は発芽の際に内生的に利用される貯蔵養分が不十分であるために、至適培養期間に得られた分生子と比較して発芽率が低かったものと考えられた。さらに、至適培養期間に得られた分生子は窒素成分を含まない溶液においても 10%程度の発芽率が得られたことから、十分に成熟した新鮮な分生子の発芽は細胞外の基質に依存せず、C₁₄-スフィンゴシンのみで発芽誘導されるものと考えられた。また、ペプトン添加溶液では未成熟と考えられる形成初期の分生子に対しても高い発芽率が得られており、分生子発芽に際し内生的に利用される基質を補完するような成分がペプトンに含まれており、*N. rileyi* の分生子は外因性の基質を分生子発芽の際に利用しうることが示唆された。

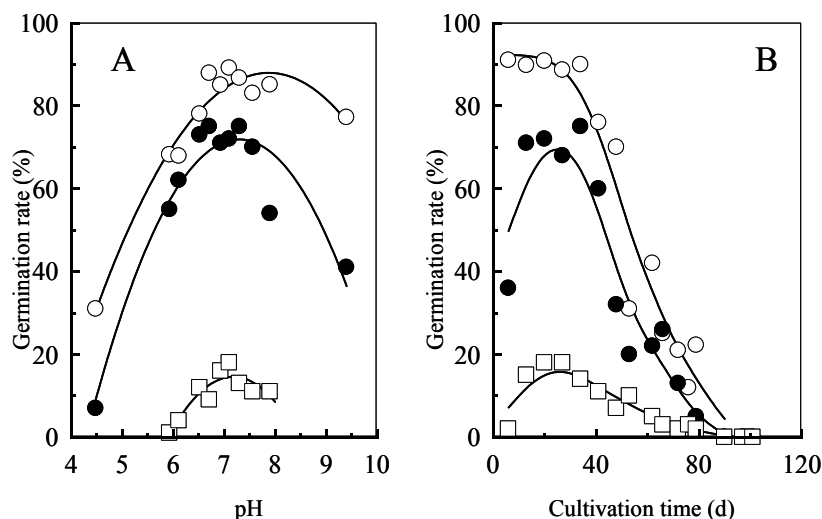


Fig. IV-2. pH Response Curves and Effect of Cultivation Time for Germination.

A, pH Response Curves. B, Effect of Cultivation Time for Germination. Assay solutions used were supplemented with peptone (○), L-Alanine (●) and no nitrogenous source (□). C₁₄-Sph (+) was prepared to bring the final concentration to 2.5×10^{-5} mg/ml in each assay solution. In pH response test, pH was adjusted by the addition of a phosphate buffer (50 mM), and conidia harvested after 20 d cultivation were used for assay. Germination rate was determined after 24 h of incubation at 23 °C.

次に、種々の培地における分生子の発芽管の伸長状況について経時的に観察した。ペプトン添加溶液において、C₁₄-スフィンゴシンの存在下ではGT₅₀値が6.8時間であるのに対し、C₁₄-スフィンゴシンが存在しない場合は20.1時間であった。C₁₄-スフィンゴシンを添加した場合は発芽誘導期を約1/3に短縮することができ、しかもC₁₄-スフィンゴシンを添加することにより発芽の同調性も向上した (Fig. IV-3. A)。アラニン添加溶液においてもC₁₄-スフィンゴシンの存在下ではGT₅₀値は8.7時間とペプトン添加溶液と比較するとやや時間を要するものの有効な発芽促進効果が得られ、18時間後には約90%と高い発芽率を示した。一方、窒素成分を含まない検定溶液では、培養6時間から分生子発芽が観察されC₁₄-スフィンゴシンの発芽誘導効果が認められたものの、その後発芽率の向上はほとんど認められず、培養24時間後においても約20%の発芽率であった。

さらに、それぞれの検定溶液において、発芽した分生子の発芽管の生育状況を観察すると、ペプトン添加溶液ではC₁₄-スフィンゴシンの存在に関係なく、発芽後に指数関数的な発芽管の伸長が観察されたが、アラニン添加溶液あるいは窒素成分を含まない検定溶液では発芽した分生子の発芽管伸長状況はほとんど変化なく、培養24時間経過後においても発芽管長は50 μm程度でそれ以上の伸長はほとんど認められなかった (Fig. IV-3. B)。分生子の発芽率に限れば、アラニンのC₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽における補助因子活性はペプトンと同程度の効果を示すものの、アラニンのみでは発芽後の発芽管の生育にはほとんど効果がなかった。

次に補助因子活性の高いペプトン及びアラニンをを用い、これらの濃度がC₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性におよぼす影響について調査した (Fig. IV-4)。ペプトンの濃度が0.5 mg/mlではC₁₄-スフィンゴシンのEC₅₀値が1.45 × 10⁻⁸ mg/mlであったのに対し、ペプトンの濃度が1/10になるとC₁₄-スフィンゴシンの活性は1.36 × 10⁻⁷ mg/mlと約1/10、さらにペプトンの濃度が1/10になるとC₁₄-スフィンゴシンの活性は2.74 × 10⁻⁵ mg/mlと約1/200に低下し、ペプトン濃度が低下するにしたがいC₁₄-スフィンゴシンの活性低下の程度は増していく傾向が見られた。アラニンについては、総じてペプトンよりC₁₄-スフィンゴシンの活性は低くなったが、同様の傾向を示した。つまり、アラニン濃度が5.0 mg/mlの時のC₁₄-スフィンゴシンの活性は4.65 × 10⁻⁸ mg/mlであり、アラニンの濃度が1/10になるとC₁₄-スフィンゴシンの活性は2.25 × 10⁻⁷ mg/mlと約1/5になり、さらにアラニンの濃度が1/10になるとC₁₄-スフィンゴシンの活性は6.09 × 10⁻⁵ mg/mlと約1/300倍に低下した。このように、C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性は補助因子成分の濃度に依存していることが明らかとなった。

ここまで、C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽における補助

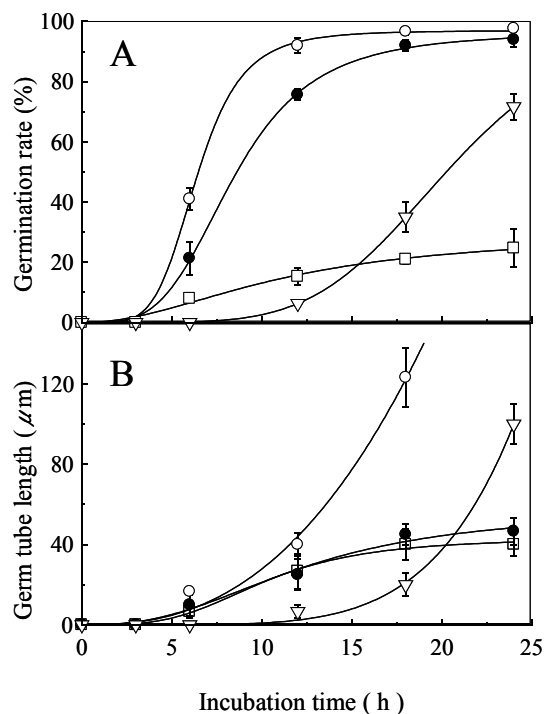


Fig. IV-3. Time course of Germination Rate and Germ Tube Growth.

A: Process of germination rate, B: Process of germ tube growth. Assay solutions used were supplemented with (○) peptone and C₁₄-Sph, (●) L-alanine and C₁₄-Sph, (□) C₁₄-Sph and (▽) peptone. Supplement nitrogen source (peptone and L-alanine) added were made to bring the final concentration in each assay solution to 0.5%. C₁₄-Sph (+) was prepared to bring the final concentration to 2.5 × 10⁻⁵ mg/ml in each assay solution. Cultivation was done at 23 °C. GT₅₀ values were 6.8 h (○), 8.7 h (●) and 20.1 h (▽). Each data point shows the mean ± SE (n = 3).

因子成分について *in vitro* において検討した。寄主昆虫表面に付着した分生子の SEM 観察などにより、寄主昆虫表面における分生子の発芽は表面に付着後 6~8 時間で起こっていることが観察されており、*in vitro* において C₁₄-スフィンゴシンによってもたらされる発芽挙動と類似している。このことは寄主表皮の表面において C₁₄-スフィンゴシン及びその補助因子活性をもつアミノ酸が存在することが示唆される。そこで、寄主昆虫として *S. litura* の終齢幼虫を用いて昆虫表皮の表面を水で抽出し、抽出液中に含まれるアミノ酸組成及び C₁₄-スフィンゴシンについて定量分析を行った。各分析から得られたデータは、供試昆虫の表面積の測定結果 (7.32 ± 0.19 cm² / *S. litura* 終齢幼虫 (mean ± SE, n = 10) から 1 cm² 当たりの量に換算し Table IV-2 にまとめた。

総アミノ酸は粗抽出液の 8.2%にあたる 67.6 mg/cm²であった。その組成分析の結果、17 種類のアミノ酸が検出され、特にプロリン (18.3%) とグルタミン酸 (16.3%) の割合が高く、この 2つのアミノ酸で全アミノ酸の 30%以上を占めていた。C₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性効果への影響が大きかったアラニンは全アミノ酸の 8.9%にあたる 6.0 × 10⁻⁴ mg/cm²、またヒスチジンは 2.1%にあたる 1.4 × 10⁻⁴ mg/cm²が検出された。そして、発芽促進物質である C₁₄-スフィンゴシンは寄主表面の粗抽出液に対し 4.27 × 10⁻³% にあたる 1.18 × 10⁻⁶ mg/cm²が検出された。

以上のように、寄主昆虫表面において C₁₄-スフィンゴシン及び補助因子であるアラニンやヒスチジンが検出された。

地と、その 10 倍濃度の培地を調製した。その結果、DM においては 11.4~30.2%と一定の発芽促進効果が得られ、*N. rileyi* の分生子が寄主昆虫表皮の表面において利用し得るアミノ酸及び C₁₄-スフィンゴシンが存在することが認められた。DM はアラニン培地と比較し 10 倍以上のアミノ酸を含有するにもかかわらず、発芽活性における大きな向上は認められなかった。このことはアミノ酸混合による相乗的な効果は低く、補助因子とした効果の高いヒスチジンが加わり相加的に活性が向上したものと考えられた。また、DM の発芽促進活性は、寄主表面の粗抽出液における発芽率 (56.1~84.6%) と比較し、やや低かった。このことは、C₁₄-スフィンゴシンの補助因子としてアミノ酸よりも効果の高い生体成分が存在することが示唆された。

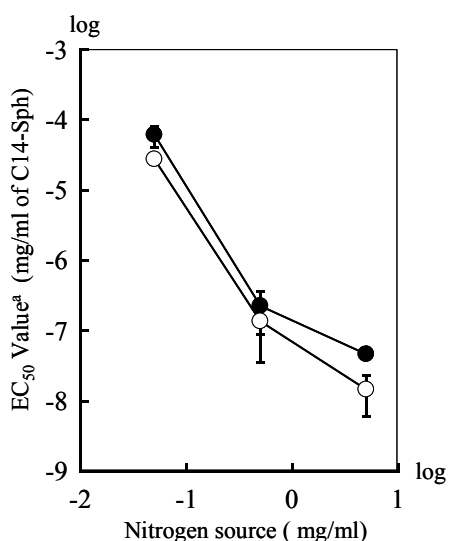


Fig. IV-4. Quantitative Relationship between C₁₄-Sph and Nitrogen Source for Germination.

^aThe EC₅₀ value of C₁₄-Sph was calculated by the germination rate after 10 h of incubation at 23° C. The assay solutions used were supplemented with peptone(○) and L-alanine(●). Each data point shows the mean ± SE (n = 3).

しかし、表面で検出された量においてどの程度の発芽促進効果が得られるのかは不明である。そこで、上記に得られた昆虫表面のアミノ酸及び C₁₄-スフィンゴシンの分析データをもとに、各アミノ酸及び C₁₄-スフィンゴシンの組成比が、表皮の表面抽出物と同様になるように調製した Defined media (DM), DM からアラニン以外を除いたアラニン培地及び粗抽出液を用いて、それぞれの培地における培養 10 時間後の発芽率を調査した (Table IV-3)。なお、各培地の濃度は 1 cm² 当たりの検出量を 1 ml に溶解した培

Table IV-2. Amino Acid Analysis of Surface Extract^a of *S. litura*

Component	(mg / cm ²) ^a	(%)
Free amino acid		
Asp	2.5 × 10 ⁻⁴	3.7
Thr	4.4 × 10 ⁻⁴	6.5
Ser	5.4 × 10 ⁻⁴	8.0
Glu	11.0 × 10 ⁻⁴	16.3
Pro	12.3 × 10 ⁻⁴	18.3
Gly	3.2 × 10 ⁻⁴	4.8
Ala	6.0 × 10 ⁻⁴	8.9
Cys	0.3 × 10 ⁻⁴	0.4
Val	3.1 × 10 ⁻⁴	4.7
Met	0.8 × 10 ⁻⁴	1.2
Ile	2.3 × 10 ⁻⁴	3.5
Leu	3.7 × 10 ⁻⁴	5.4
Tyr	2.7 × 10 ⁻⁴	4.0
Phe	2.6 × 10 ⁻⁴	3.8
Lys	4.3 × 10 ⁻⁴	6.3
His	1.4 × 10 ⁻⁴	2.1
Arg	1.4 × 10 ⁻⁴	2.0
(Total amino acid)	(67.4 × 10 ⁻⁴)	(100)

^aSurface area of a last instar larva of *S. litura* was 7.32 ± 0.19 cm² (mean ± SE, n = 10).

Table IV-3. Germination Activity of *N. rileyi* on Defined Media

Culture media	Concentration (cm ² extract / ml)	C ₁₄ -Sph concentration ^a (cm ² extract / ml)	Germination rate at 10 h (%)	GT ₅₀ value (h)
Defined media ^a	10	10	32.0	13.1
	1	1	11.4	16.5
L-Alanine ^a	10	10	17.6	15.2
	1	1	7.3	16.9
Crude extract ^a	10	10	84.6	6.7
	1	1	56.1	9.4

^aConcentrations are equal amino acids to those found in the surface extracts of *S.litura* as given in Table IV-2 and text. One cm² extracts were 6.76 × 10⁻³ mg of amino acid mixture (Defined media), 6.01 × 10⁻⁴ mg of L-alanine, 3.40 × 10⁻² of crude extract and 1.18 × 10⁻⁶ mg of C₁₄-Sph.

本章では C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽における補助因子成分について検討し、さらに昆虫表皮の表面においてそれらの条件が満たされているのかについても検討した。その結果、C₁₄-スフィンゴシンによる発芽促進活性は窒素成分に影響され、アミノ酸ではアラニン及びヒスチジンが高い補助因子活性を有することが明らかとなった。そして、実際に、昆虫表面から C₁₄-スフィンゴシンをはじめアラニン、ヒスチジン含む種々のアミノ酸が検出された。その結果から、昆虫表面と同様の組成となるような DM を調製し生物検定を実施したが、粗抽出液と比較し、十分な効果ではなかった。この生物検定では 1 cm² 当たりの抽出成分を 1.0~0.1 ml に溶解し生物活性を判断しているが、実際の表面では用いた生物検定溶液よりも C₁₄-スフィンゴシン及びアミノ酸は濃縮されている可能性が高く、さらに DM により発芽促進活性は高まると考えられる。また、疎水性の強い C₁₄-スフィンゴシンは同じく疎水性の強い昆虫表面と疎水的に吸着していると考えられるため、水による C₁₄-スフィンゴシンの抽出は不十分と考えられる。そこで、昆虫表皮の表面をメタノールで抽出すると約 10 倍の 3.51 × 10⁻⁵ mg/cm² の C₁₄-スフィンゴシンが検出された。そのため、水抽出物で得た C₁₄-スフィンゴシンの濃度よりも高濃度で存在している可能性がある。さらに、アミノ酸のみが C₁₄-スフィンゴシンにおける補助因子活性を持つのであれば、DM は粗抽出液と同程度の活性が得られると考えられるが、DM の発芽促進活性は粗抽出液より低かった。粗抽出液の加水分解後のアミノ酸の量は加水分解前と比較し約 36%増加しており、表面成分の窒素成分としてはペプチド成分の存在も示唆される。そのため、ペプチド成分等が C₁₄-スフィンゴシンの補助因子としての高い効果を有している可能性がある。

また、昆虫表面成分の分析結果について、Sue et al. (1982)

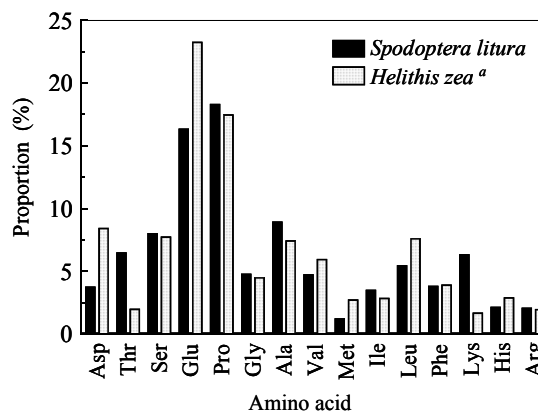


Fig. IV-5. Comparison of the Percentage Composition of Surface Amino Acid of Two Different Lepidopteran Insect.

^aData of Sue and Grula (1982).

は同じ鱗翅目昆虫の *H. zea* を材料にした分析結果を得ており、その結果と比較すると総アミノ酸及び、それぞれのアミノ酸の組成比ともに非常に類似していた (Fig. IV-4). そのため、昆虫表面に共通するアミノ酸であると示唆されるが、そのことを明らかにするには多くの昆虫で調べる必要があると考えられた。

第3節 小括

これまでの実験で *N. rileyi* の発芽促進物質が C₁₄-スフィンゴシンであることを明らかにしたが、本章では C₁₄-スフィンゴシンにより発芽促進効果に影響をおよぼす諸条件及び補助因子について明らかにした。さら

に、発芽促進因子は寄主表面での分生子発芽に関与すると考えられることから、寄主表面で利用し得る発芽促進物質 (C₁₄-スフィンゴシン) 及び補助因子の存在についても明らかにした。

すなわち、C₁₄-スフィンゴシンによる発芽促進効果は単独では弱く補助因子の存在下で高い活性を示した。補助因子としてはアミノ酸が関与し、特にアラニン及びヒスチジンにおいて高い補助因子活性を有することが明らかとなった。そして、C₁₄-スフィンゴシンにおける効果的な発芽促進のためにはアラニン等の補助因子の濃度が 0.5 mg/ml 以上、pH は中性付近で培養期間が 10~20 日で得られた分生子を用いることによって効果的な発芽促進活性が得られることが明らかとなった。さらに、寄主昆虫表皮の表面における C₁₄-スフィンゴシンおよびアミノ酸分析結果から、*N. rileyi* の分生子が利用し得る C₁₄-スフィンゴシン及びアミノ酸が存在することが確認された。このことから、*N. rileyi* の寄主昆虫表面では C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽がおこっていると考えられた。

第V章 C₁₄-スフィンゴシンの昆虫病原性糸状菌製剤に対する補助剤としての可能性

緒言

昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* は鱗翅目昆虫、特にヤガ科昆虫への感染性が強い天敵微生物である。国内では特に西南暖地において、野菜類・花卉類など広範囲な農作物に被害を及ぼしている広食性の大型鱗翅目害虫である *S. litura*, *H. armigera*, *M. brassicae* 等に対して病原性を示すことから、これらを対象とした害虫管理の手段の一つとして期待されている。

従来、害虫管理を目的とした糸状菌製剤の防除効果は環境条件により大きく影響をうけ、高温高湿等の好適条件下では感染効率が良く防除効果は上るが、低湿度等の不適環境下では感染率が悪化し防除効果の低下が問題となっている。経皮感染するこれらの糸状菌製剤の欠点は、分生子が昆虫表面に付着してから体内に侵入するまでの期間に好適環境 (高湿度、適温) が維持されなければならず、その時期に不適環境 (乾燥、脱皮等) にさらされると不活性化され、感染効率が落ちることが、防除効果低下の一因と考えられる。

このような中、本研究では第I~III章において *N. rileyi* の分生子を特異的に発芽促進する物質 (分生子の休眠期

から発芽誘導期時間を約 1/3 に短縮する) が C₁₄-スフィンゴシンであることを明らかにし、さらに第IV章においてアミノ酸であるアラニン、ヒスチジンが C₁₄-スフィンゴシン誘導型発芽における高い補助因子活性を有することを明らかにした。このような発芽促進物質を感染成立の時間を短縮するために活用できれば、長時間の高湿度等の環境要求性を低下させることができ、ひいては糸状菌製剤の効果の安定性に寄与すると考えられる。

そこで、本章では C₁₄-スフィンゴシンを用いて *in vitro* 及びポット試験において、前処理が感染時間におよぼす影響について検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 実験昆虫

N. rileyi の寄主昆虫として、熊本県農業研究センターで農産園芸研究所バイオ育種研究室で3年間以上、人工飼料 (Insecta LFS; Nihon Nosan Kogyo) を餌に累代飼育しているヤガ科昆虫である *S. litura* の3齢幼虫を用いた。

2) *N. rileyi* の分生子懸だく液の調製

N. rileyi の分生子懸だく液の調製法は第I章、第1節-7) の方法と同様に行った。但し、*S. litura* においては 10⁷ 分生子/ml レベルの濃度において十分な感染性が認められることから (木本ら, 2007), 本章で用いた分生子懸だく液の濃度は約 4 × 10⁷ 分生子/ml に調製した。

3) 接種液の調製

調製した分生子懸だく液に 1%アラニンを等量加え接種液を調製した。さらに、C₁₄-スフィンゴシンを加える場合は、メタノールで 1.0 mg/ml に溶解した C₁₄-スフィンゴシン溶液を用いて、十分な発芽促進活性が得られるように (Fig. III-3) 最終濃度が 2.5 × 10⁻⁵ mg/ml になるように接種液に添加した。

4) 感染所要時間の指標

菌接種から経皮侵入に要する所要時間を推定するために、50%感染率を得るために必要な湿度 (100% R.H.に近い高湿度) の持続時間 (time required for 50% infection rate, TR₅₀) を指標とした。50% 反応値はプロビット解析 (Finney, 1972) により求めた。*N. rileyi* による感染死亡は死亡昆虫の表面に形成させる菌叢の有無によって判断した。3回の実験結果による、2つのグループの有意差の検定は *t*-検定により行い、*p* < 0.05 の際に有意差があると判断した。

5) 室内実験

室内実験において経皮感染所要時間をもとめるため、菌接種後一定時間ごとに寄主表面を殺菌する方法によって、感染のために好適環境を要求する時間 (TR₅₀) を指標として比較した。方法3) で調製した接種液を接種前に種々の時間、振とう培養器を用いて 23 °C で培養した。接種前処理を行った分生子懸濁液は、実験昆虫の背中に小筆を用い塗布することによって接種した。菌接種された昆虫はキャベツを餌に、パラフィルムで密閉されたペトリ皿 (100% R.H.に近い高湿度) で個々に飼育した。

N. rileyi の分生子は 70%エタノールにおいて不活性化することが認められたため、菌接種し飼育した昆虫は 4 時間おきに 70%エタノールで数秒浸漬する方法 (柳田, 1987; 増田, 2000) にしたがって昆虫表面の殺菌を行った。すなわち、70%エタノールに浸漬した昆虫は、直ちに紙タオルでエタノールを拭き取り乾燥させ、別の新たなキャベツで同様の方法で飼育した。このような実験において接種後 6 日から 100%近い感染死亡率が得られることから (木本ら, 2007), 接種 7 日後の感染死亡率を調査し、TR₅₀ 値を算出した。一区の実験で 20 頭の昆虫を使用した。

6) ポット試験

ポット試験において経皮感染所要時間を求めるために、接種植物を好適湿度環境 (100% R.H.に近い高湿度) で栽培し、一定時間ごとに感染不適環境 (乾燥) に置くことによって TR₅₀ 値を算出し比較した。ポット試験には 1/2,000a のワグネルポットで約 30 日間栽培したキャベツを用いた。20 頭の *S. litura* 3 齢幼虫を個々のキャベツに放飼し、供試キャベツからの逃亡を防ぐためにネットで覆った。昆虫放飼後しばらくして、種々の時間前処理した接種液をハンドスプレーを用いて散布した。接種液の散布後、供試キャベツは温度調節機能のついた密閉されたガラスハウスに置き、供試キャベツに直接かからないようにハウス内に十分散水し感染に好適な湿度 100% (R.H.) に近い高湿度状態で飼育した (23 °C)。高湿度の環境下で様々な時間放置した後、感染不適環境とされている 40% R.H.以下 (Shimazu and Richard, 1986; 安田ら, 1987) に送風下で空調機器により湿度が調節された別の温室に移動し乾燥環境下で飼育した。つまり、40% R.H.以下の条件下は感染に不適環境であることから室内実験における 70%エタノールでの表面殺菌処理に相当する。上記の方法により、感染好適環境 (100% R.H.に近い高湿度状態) の維持時間を調節した。そして、7 日後の感染死亡率を調査し、TR₅₀ 値を算出した。また、試験期間中の温度、湿度 (R.H.) はデータロガー (TR-72U, T&D Co., Nagano, Japan) を用いてモニターした。

第 2 節 結果及び考察

接種前処理の分生子の発芽状態を、Fig. V-1 に示す。C₁₄-スフィンゴシンを加えた場合、分生子の発芽は培養 3 時間程度で認められ、12 時間後にはほとんどの分生子が発芽し (Fig. V-1. c), 発芽分生子はクラスターを形成した。一方、C₁₄-スフィンゴシンを加えなかった場合の分生子は、培養 12 時間後においても発芽はみられなかった。

このような分生子を用い感染所要時間に関する実験を行った。*N. rileyi* 分生子は 70%エタノールで不活性化されるため、菌接種し飼育した供試昆虫の表面を一定時間おきに 70%エタノールで数秒浸漬する方法により、表皮に接種した *N. rileyi* 分生子を不活性化させた。得られた感染死亡率のデータをもとに 100% R.H.に近い高湿度状態を要求する時間 (TR₅₀) を算出し経皮感染所要時間を比較するための指標とした。C₁₄-スフィンゴシンの有無に関わらず、接種後 3 時間以内の虫体表面殺菌においては *N. rileyi* による感染死亡は認められなかった。その後、接種から表面殺菌までの時間が長くなるにしたがい、*N. rileyi* による感染死亡虫数も増加したため、これらの実験結果をもとに TR₅₀ 値を算出した (Fig. V-2)。C₁₄-スフィンゴシンを加えた場合の分生子において、0 時間の前処理 (前処理なし) では、11.4 ± 1.4 時間であり、前処理の時間に伴い TR₅₀ 値は低下し、6 時間の前処理では TR₅₀ 値は 7.8 ± 1.3 時間に短縮された。しかし、12 時間の前処理になると、前処理をしない場合より TR₅₀ 値は上がった (7.7 ± 2.3 時間)。このことは、発芽分生子のクラスター形成が、分生子の寄主表面への付着あるいは菌糸の侵入を妨げたのではないかと考えられた。これらの結果から、3~6 時間の間 C₁₄-スフィンゴシンとともに前処理することによって、感染所要時間を短縮する効果が認められたが、長すぎる前処理ではかえって逆効果を招くために注意が必要であると考えられた。

一方、C₁₄-スフィンゴシンを添加しない場合では、前処理が感染時間を短縮する効果は認められず、前処理の時間に伴い感染所要時間は増加した。TR₅₀ 値は培養 12 時間で 20.8 ± 2.6 時間 と前処理をしない場合 (13.2 ± 2.1 時間) と比較し約 1.6 倍に上がった。前処理 6 時間においては、C₁₄-スフィンゴシンの有無による TR₅₀ 値は有意な差があった ($p < 0.05$)。

上記のように、前処理が TR₅₀ 値におよぼす影響は、C₁₄-スフィンゴシンの有無によって異なる傾向がみられた。すなわち、C₁₄-スフィンゴシンが存在する場合は、分生子のクラスター形成前までは感染所要時間短縮効果がみとめられ、クラスター形成にともない前処理の効果は低下し

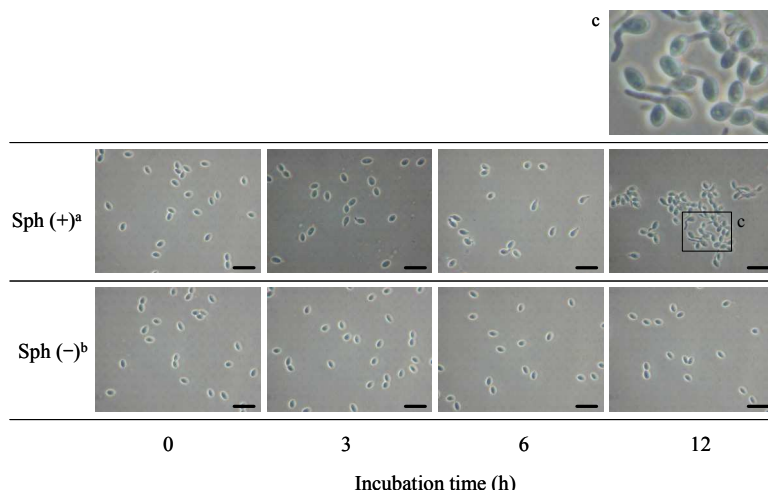


Fig. V-1. Conidia Incubated With and Without C₁₄-Sph for Infection.

^aConidia were incubated in L-alanine solution with C₁₄-Sph. ^bConidia were incubated in L-alanine solution without C₁₄-Sph. Each solution was cultured with a shaking incubator (80 oscillations / min) in the dark at 23 °C. Conidial germination was observed at 1,000 × with an oil-immersion objective using a phase contrast microscope. Scale bar shows 20 μm.

た。一方、C₁₄-スフィンゴシンが存在しない場合は、分生子のクラスターが形成されていないにもかかわらず、前処理の効果は認められず、前処理の時間にもない感染所要時間は長くなった。

昆虫病原糸状菌 *N. rileyi* は寄主昆虫由来の成分を培地に添加することによって発芽が促進されるだけでなく、寄生のための代謝に関連すると考えられるプロテアーゼやキチナーゼの活性が向上することが知られている (El-Sayed *et al.*, 1993a, 1993b)。これらのことから、発芽促進物質である C₁₄-スフィンゴシンが寄生のための代謝を導いている可能性が示唆された。つまり、C₁₄-スフィンゴシンとともに前処理することによって、予め寄生のための代謝が導かれた分生子を接種するためスムーズな感染が成立し、感染時間短縮効果に結びついたものと考えられた。一方、C₁₄-スフィンゴシンなしで前処理すると、寄生のための代謝ではなく腐生のための代謝がおこるため、前処理が有効に作用しなかったのではないかと推察された。

次に、室内実験結果をもとに、6時間培養した分生子を用いてポット試験において感染成立のために好適湿度環境 (100% R.H.に近い高湿度状態) が要求される時間について検討した。なお、密閉され加湿された温室内は 95% (R.H.) 以上の湿度が維持されていた。

菌接種から表面殺菌までの好適湿度環境 (95% R.H.以上) が長くなるにしたがい、*N. rileyi* による感染死亡虫数も増加したため、これらの実験結果をもとに TR₅₀ 値を算出した。その結果、C₁₄-スフィンゴシンの存在下で前処理した場合は、TR₅₀ 値が 12.5 ± 1.6 時間であったのに対し、

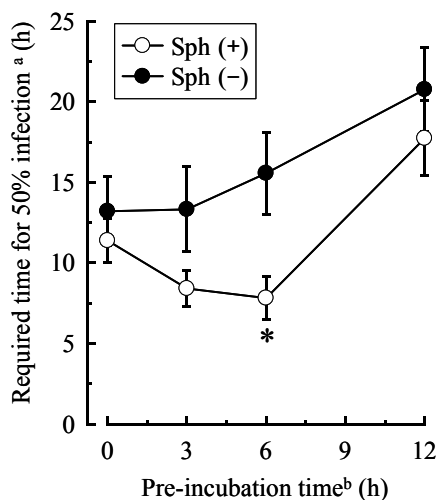


Fig. V-2. Effect of Pre-incubation of *N. rileyi* on Time Required for Infection in an *in vitro* Experiment.

^aThe time required for 50% infection rate was calculated by an experiment on surface-sterilization after inoculation. Larvae were inoculated by smearing with conidial suspension on the back using a small brush. The inoculated larvae were dipped in 70% ethanol for several s for surface-sterilization at various times after inoculation. ^bConidia were incubated for various time at 23 °C in the solution with and without C₁₄-Sph containing L-alanine before inoculation. Each data point shows the mean ± SE (n = 3). *Significantly different from the control group ($p < 0.05$).

C₁₄-スフィンゴシンがなかった場合には 20.5 ± 3.2 時間であり、C₁₄-スフィンゴシンの存在下で前処理した場合は C₁₄-スフィンゴシンがなかった場合と比較し有意に短縮された ($p < 0.05$) (Fig. V-3). これらの結果から、C₁₄-スフィンゴシンの存在下で前処理した分生子を用いることによって、感染に関わる好適環境を要求する時間を短縮させることが可能と考えられた。

ポット試験においては温湿度を人為的に制御できる環境下で実施した。その結果、雰囲気における相対湿度が寄主感染に影響することが明らかとなり、そして C₁₄-スフィンゴシンを併用した *N. rileyi* の接種方法が感染時間短縮効果に有効に機能した。そのため得られたデータは野菜、花き等人為的に環境制御が容易な施設作物に対し、*N. rileyi* を応用する際に利用できると考えられた。

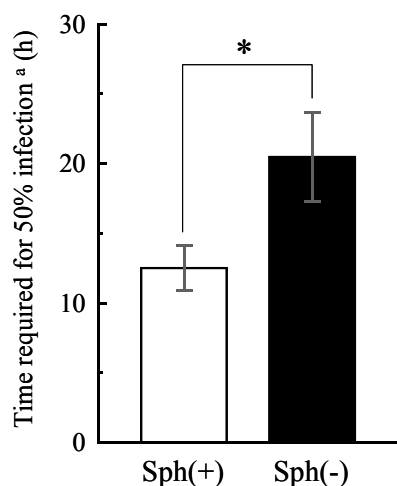


Fig. V-3. Effect of Pre-incubation of *N. rileyi* on the Time Required for Infection in the Pot Experiment.

A cabbage in a pot cultured at 1/2,000a for about 30 d at 23 °C was used in the experiment. 20 Larvae were released to the cabbage after it was covered with a net to prevent escape of the insects from the plant. Soon after the release of the insect, conidia incubated with and without C₁₄-Sph containing L-alanine for 6 h were sprayed onto the cabbage using a hand sprayer. The cabbage was cultured in the dark humidity-controlled room (95% R.H. or over at 23 °C), and then the plants were moved into another humidity-controlled room (40% R.H. or lower) at various time after inoculation, and were cultured under natural day length at 23°C. By these experiments, and the time required for 50% infection rate was calculated. Data shows the mean ± SE (n = 3). *Significantly different from the control group ($p < 0.05$).

一方、露地作物においては人為的な雰囲気環境制御は困難である。しかし *N. rileyi* 分生子の発芽は寄主昆虫との境界面での微気象的な環境下で行われることを考慮すると露地作物においても、発芽促進物質のメリットがあると考えられる。なぜなら、第IV章において、寄主昆虫表面において種々のアミノ酸の存在を明らかにしたが、アミノ酸は天然保湿成分として機能することが知られおり (Spier and Pascher, 1956; Rawling *et al.*, 1994), さらには植物体の蒸散作用等も考慮すると、分生子が附着している昆虫表面の微気象においては雰囲気湿度よりも高い湿度条件であるとされるためである。このことは、必ずしも雰囲気湿度が 100% (R.H.) 近くなくとも微気象的には感染好適条件が野外環境下でも一定時間得られる可能性を示唆している。つまり、感染所要時間が短縮出来るということは、感染好適条件が要求される時間の短縮化につながり、わずかな時間の感染好適条件下でも感染成立の機会が増加すると考えられる。したがって、発芽促進物質の利用は野外作物における *N. rileyi* の活用においてもメリットがあると考えられた。

本実験により、感染時間短縮効果が認められたことから、C₁₄-スフィンゴシンは *N. rileyi* を利用した昆虫病原性糸状菌製剤の補助剤としての利用可能性が示唆された。しかしながら、微生物防除剤の最終的な目的は農作物の被害低減である。そのため今後は、ほ場試験において食害低減効果について検討する必要があると考えられた。

第3節 小括

本章では *N. rileyi* を害虫管理に利用する際に、C₁₄-スフィンゴシンを補助剤として応用する方法について、感染所要時間を指標として検討した。

in vitro 試験においては、C₁₄-スフィンゴシン存在下で前処理することによって感染所要時間の短縮効果が認められた。その効果は散布前処理 3~6 時間で高く、対照区の約 1/2 であった。しかし、それ以上の長時間の前処理は感染所要時間が長くなり逆効果であった。一方、C₁₄-スフィンゴシンが存在しない場合の散布前処理は前処理時間が長くなるにしたがい感染所要時間も長くなった。つまり、C₁₄-スフィンゴシンが存在しない場合は、散布前処理の感染時間に対する短縮効果は認められなかった。

さらにポット試験においても、C₁₄-スフィンゴシンの存在下で前処理した場合には C₁₄-スフィンゴシンを使用しなかった場合と比較し感染所要時間は有意に短縮された。

これらの結果から、C₁₄-スフィンゴシンを補助剤として利用することによって *N. rileyi* の感染における環境要求性

を低下させることにつながり、ひいては実用場面での感染率の向上に寄与するものと考えられた。

第 VI 章 総括

第 1 節 総合考察

本研究により同定された *N. rileyi* 分生子の発芽促進物質である 2*S*-amino-tetradeca-4-ene-1,3*R*-diol (D-erythro-C₁₄-Sphingosine, C₁₄-スフィンゴシン) はスフィンゴ脂質の構造骨格である。スフィンゴシンのアミノ基に高級脂肪酸がアミド結合した誘導体はセラミドと総称され、セラミドの 1 位水酸基にリン酸や糖などの親水性の極性基が結合した誘導体は複合スフィンゴ脂質と呼ばれている。複合スフィンゴ脂質の中でも、セラミドの 1 位水酸基にホスホコリンが結合したスフィンゴミエリンは哺乳動物の総リン脂質の 5~10% を占めている。スフィンゴ脂質は普遍的に存在する複合脂質で膜構造の維持に寄与しており、長い間その役割は細胞構造を維持することや生体内の栄養素として働くだけと考えられていた。しかし近年、この代謝経路 (Fig. VI-1) (Dickson *et al.*, 1998; Merrill and Jones, 1990) が明らかになるにつれて、それらの代謝物の機能が注目されるようになり細胞内情報伝達分子として同定されてきた (Spiegel *et al.*, 1996a; Merrill *et al.*, 1997; Hannun, 1994)。スフィンゴミエリンの連続的な異化作用により産生されるセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸などの量的バランスが細胞の生存、増殖、アポトーシスといった様々な細胞機能に関与することが報告されている (Cuvillier *et al.*, 1996)。セラミドは細胞

分裂を抑制しアポトーシスを誘導する機能が知られている。例えば、セラミドをヒト T 細胞株 Jurkat セルに添加するとアポトーシスが誘導され (Obeid *et al.*, 1993)、また、C₆-セラミド等の細胞透過性のセラミドはサイトカインの一種である TNF (tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子) (Oberid *et al.*, 1993)、Fas リガンド (Gulbins *et al.*, 1995)、もしくは放射線が誘導するアポトーシス (Haimovitz *et al.*, 1994) を模倣することが報告されている。また、スフィンゴシン-1-リン酸は細胞分裂促進活性を示す機能が知られている。例えば、繊維芽細胞 (Zhang *et al.*, 1990)、T 細胞 (Miyake *et al.*, 1995)、動脈平滑筋 (Bornfeldt *et al.*, 1995) 等に対する細胞分裂促進作用に関して報告されている。一方、セラミドとスフィンゴシン-1-リン酸の中間体であるスフィンゴシンは、細胞増殖や逆にアポトーシスにおけるシグナル分子、または活性修飾因子としての機能が注目されつつある多機能脂質分子である (Spiegel and Merrill, 1996b; 五十嵐, 1997)。しかし、細胞に添加された、あるいは細胞内で生成したスフィンゴシンは機能を異にしたさまざまな誘導体に代謝されるため、しばしば矛盾したかたちで観察される。例えば、Zhang *et al.* (1991) はスフィンゴシンが Swiss 3T3 繊維芽細胞では細胞増殖因子であることを報告し、太田らはスフィンゴシンが白血球 (Ohta *et al.*, 1994) や白血病細胞 (Ohta *et al.*, 1995) のアポトーシス誘導に関わっていることを報告した。そのようななか細胞中で代謝されないジメチルスフィンゴシン (Sadahira *et al.*, 1992) を用いた実験で細胞増殖活性のあるスフィンゴシン-1-リン酸を誘導する酵素スフィンゴシンキナーゼの強力な阻害活性をもつことが明らかにされた (Yatomi *et al.*, 1996)。多くの場合、ジメチルスフィンゴシンはスフィンゴシンのもつ活性を共有しているため、スフィンゴシンのもつ生理活性を持続あるいは増強した形で示すことになり、代謝的

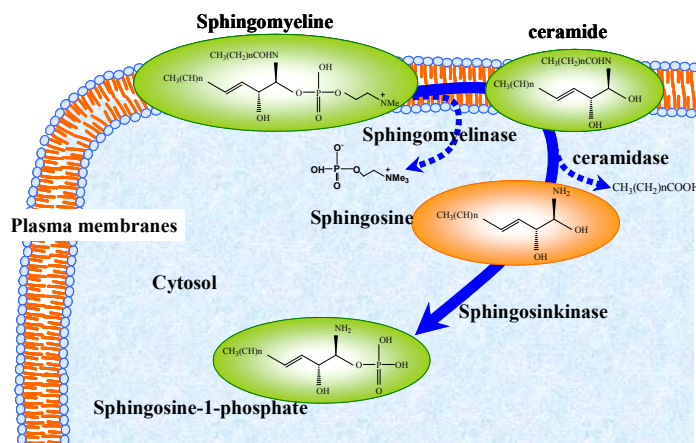


Fig. VI-1. Metabolism of Sphingolipids.

に安定なスフィンゴシンとしての側面をもつ。また Sweeney *et al.* (1996) はスフィンゴシン、ジメチルスフィンゴシン、C₂-セラミドなどによる白血病細胞のアポトーシス誘導の条件を比較した。その結果、セラミドによるアポトーシス誘導とスフィンゴシンやジメチルスフィンゴシンによるそれとでは誘導条件に大きな違いがあり、血清成分を含んだ培養液中ではセラミドによるアポトーシス誘導はきわめて弱く、一方、スフィンゴシンやジメチルスフィンゴシンでは血清成分の有無にかかわらず誘発することが示された。このような観点からもスフィンゴシンにおけるアポトーシスの誘導作用が報告されている (Sweeney *et al.*, 1996)。

このようなスフィンゴ脂質の生理活性に関する研究が進むにつれて、これらの脂質は細胞内でメッセンジャーとして作用するのか、または細胞外から受容体を介したアゴニストとして機能しているのかということが問題となった。Olivera and Spiegel (1993) は細胞内に注入されたスフィンゴシン-1-リン酸によって細胞増殖や反対にアポトーシスが抑制されるといった実験結果に基づき、スフィンゴシン-1-リン酸が細胞内標的分子を介して作用するセカンドメッセンジャーであるという説を発表した。一方、スフィンゴシン-1-リン酸が細胞外より細胞表面の受容体を介して作用していることを示唆する報告も多数ある。まず、スフィンゴシン-1-リン酸の作用が百日咳毒素により阻害されるということである (Goodemote *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; Bunemann *et al.*, 1996; Koppen *et al.*, 1996; Okajima *et al.*, 1996)。このことはスフィンゴシン-1-リン酸が G タンパク質に関連する 7 回膜貫通型受容体に作用するのではないかと考えられた (Yatomi *et al.*, 1997)。さらに、スフィンゴシン-1-リン酸を誘導化しアルキルアミンガラスビーズと共有結合させることにより固相化スフィンゴシン-1-リン酸を作製し、(Yamamura *et al.*, 1997) これがフリーのスフィンゴシン-1-リン酸と同様の生物活性を有することがメラノーマ (黒色腫) 細胞 (Yamamura *et al.*, 1997)、血小板 (Yatomi *et al.*, 1997)、PC12 細胞 (Sato *et al.*, 1997) において確認されている。この固相化スフィンゴシン-1-リン酸は当然、細胞表面で作用すると考えられる。さらには、NIE-115 神経細胞 (Postma *et al.*, 1996)、心細胞 (Koppen *et al.*, 1996)、アフリカツメガエル卵細胞 (Durieux *et al.*, 1993) におけるスフィンゴシン-1-リン酸の効果は、マイクロインジェクションなどで細胞内に直接投与しても認められず、細胞外から作用させた時のみ反応がおこる。このようなことからスフィンゴシン-1-リン酸の作用点は細胞内ではなく細胞表面の受容体ではないかと考えられ、1998 年にスフィンゴシン-1-リン酸はセカンドアゴニスト説として提唱された (Igarashi, 1998)。さらに、1998 年には血管

内皮分化遺伝子 (endothelial differentiation gene: Edg) としてクローニングされていた一つの G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) 型オーファン受容体のリガンドがスフィンゴシン-1-リン酸であることがつきとめられた (Lee *et al.*, 1998) ことにより、スフィンゴシン-1-リン酸が受容体を介したセカンドアゴニストであることが認知されている。

以上がスフィンゴ脂質の生理活性に関する知見であり、まとめると以下ようになる。①細胞膜に存在するスフィンゴミエリンの誘導体は様々な生理活性を示す。セラミドはアポトーシスを誘導し、スフィンゴシン-1-リン酸は細胞増殖を促す。その中間体のスフィンゴシンはアポトーシス誘導作用について多くの報告があり、またメチルスフィンゴシンの実験からスフィンゴシンはアポトーシス誘導作用があると示唆されるも、繊維芽細胞など限られた細胞では細胞増殖にプラスに作用するなど、その生理作用の統一された見解は得られていない。②スフィンゴシン-1-リン酸は細胞外に放出されセカンドアゴニストとして作用する。その受容体も同定され Edg ファミリーであることがわかっている。その他の誘導体 (セラミド及びスフィンゴシン) については細胞内メッセンジャーと考えられ、アゴニストとして作用する報告はない。

このような知見を踏まえ、本論文で報告したスフィンゴシンの *N. rileyi* の発芽を誘導した生物活性について以下のように考察された。もっとも大きな違いは、上記のような生物活性が同一細胞内のメッセンジャーとしてまたは同種細胞に対する細胞間アゴニストとして作用するのに対して、スフィンゴシンの *N. rileyi* 分生子に対する作用は *B. mori* という昆虫由来成分が別の生物である微生物の *N. rileyi* に対する作用ということである。しかも、この生理活性は他の昆虫病原性糸状菌 (独立行政法人 農業生物資源研究所ジーンバンクより分譲された *Aspergillus flavus* Link (MAFF 111305), *Beauveria bassiana* Balsamo (MAFF 830025), *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch (MAFF 830015), *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (MAFF 830005), *N. rileyi* (MAFF 830007), *P. fumosoroseus* (Wize) A.H.S. Brown et G. Smith (MAFF 830002) 及び *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas (MAFF 235140)) について同様に生物検定を実施したが、C₁₄-スフィンゴシンの有無で発芽誘導期の違いがあるのは *N. rileyi* のみであった (Fig. VI-2)。そのため、スフィンゴシンの昆虫病原性糸状菌に対する発芽促進活性は *N. rileyi* に特異的な反応であると考えられ、昆虫病原性糸状菌の発芽促進効果に対する一般性は認められなかった。

それでは、*N. rileyi* はスフィンゴシンを認識することでどのような情報が得られるのであろうか。昆虫病原性糸状

菌は人工培地においては腐生生活で増殖することができ、また宿主との間においては寄生生活を営む。昆虫病原性糸状菌がなんらかの情報を得て、宿主に付着したことを認識すると腐生生活では形成しない付着器等の器官を形成し、

クチクラを貫通するのに要すると考えられる種々の酵素活性を向上させ寄主に侵入する。そこで *N. rileyi* は寄主に付着したことをスフィンゴシンの有無で認識しているのかも知れない。本報告で *N. rileyi* の分生子は炭素鎖 14 の

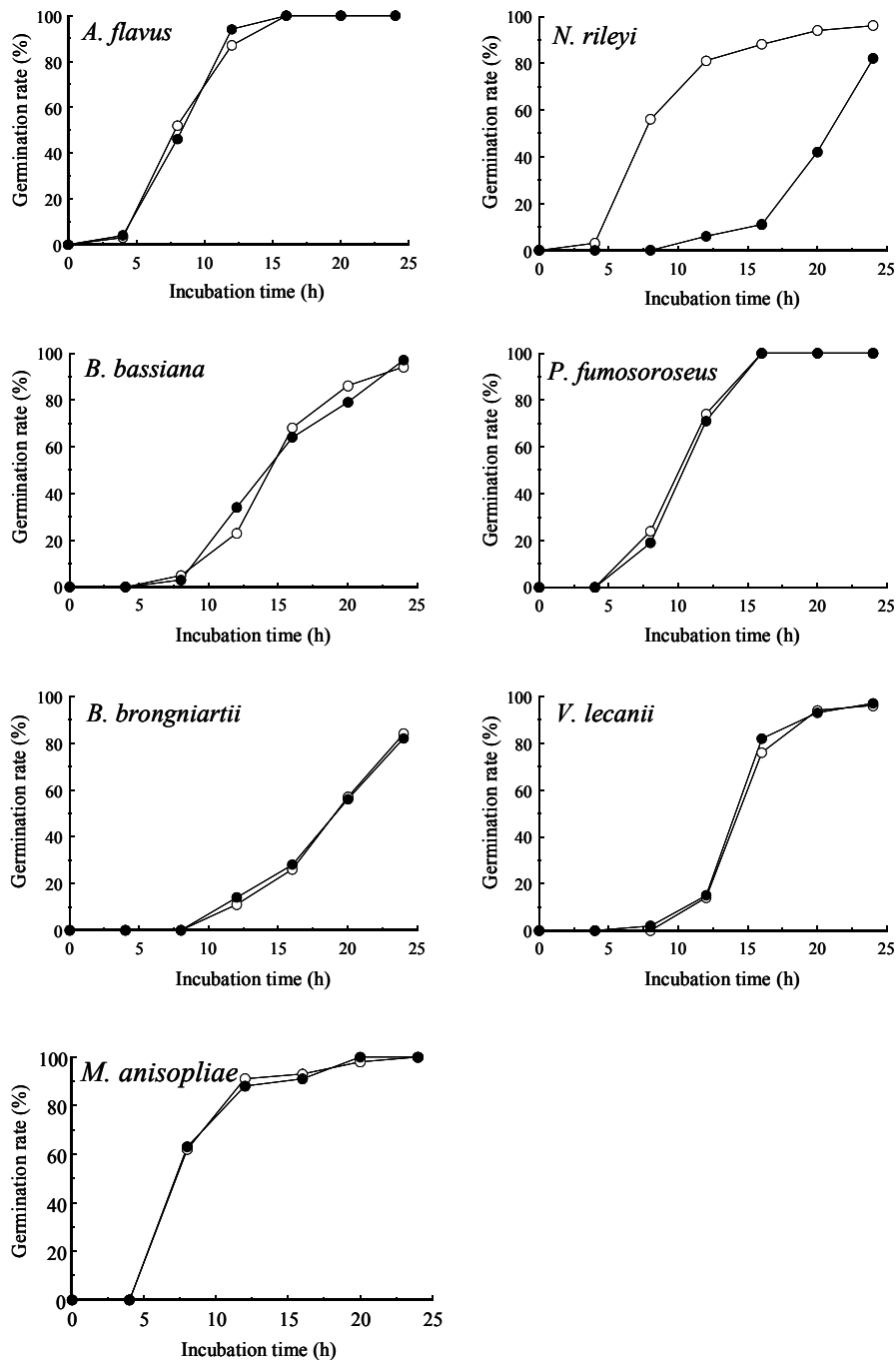


Fig. VI-2. Effects of C₁₄-Sph on Spore Germination of Various Entomopathogenic Fungi.

The germination rate was assayed on a 96-well microplate. Conidia were incubated at 23 °C in assay media mixed with 10 μl of conidial suspension (ca. 5 × 10⁶ conidia/ml in 0.05% Tween 80), 10 μl of liquid Sabouraud media (1% peptone, 4% dxtrose) and 10 μl of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). The assay media was supplemented with C₁₄-Sph (○-○) and without C₁₄-Sph (●-●). C₁₄-Sph added was made to bring the final concentration in the medium to 2.5 × 10⁻⁵ mg/ml in the medium. Each entomopathogenic fungi were cultivated in SMAY media for 20-45 d at 23 °C for conidial formation before bioassay.

スフィンゴシンに特に強い活性が得られることを示し、そのアルキル鎖長がエピトープとして重要であることが示唆された。

N. rileyi の分生子が炭素鎖 14 のスフィンゴシンに特異的に反応することは、寄主である昆虫を認識する上で非常に都合がよいと考えられる。つまり、昆虫のように生活史において脱皮をとめない変態により成長を続けていく生物は、変態する際には局所的には細胞増殖と細胞死がダイナミックに行われ、細胞死に導かれた表皮は脱皮殻となり脱ぎ捨てられると考えられる。この表皮細胞の細胞死にスフィンゴシンが関与し、脱皮殻に含まれるスフィンゴシンが脱ぎ捨てられる時に昆虫表皮の表面に残存していただいだけでも知れないが、*N. rileyi* の分生子は昆虫表面に付着したことを認識する重要な情報を得ていると考えられる。すなわち、スフィンゴシンによりアポトーシス誘導された細胞の残存物質を認識し、そのスフィンゴシンの炭素鎖長が 14 であることを感知すれば、そこは昆虫の脱皮殻が存在した場所であり、すなわち、昆虫表面の可能性が非常に高いと考えられる。

これらの考察には寄主表面にスフィンゴシンが存在していなければならない。そこで、*N. rileyi* の寄主昆虫の一種であるヤガ科鱗翅目昆虫の *S. litura* の表皮の表面成分の分析を行った。その結果、昆虫表面にスフィンゴシンの存在とスフィンゴシンの補助因子活性をもつアミノ酸の存在が認められ、昆虫表面で *N. rileyi* 分生子はこれらの成分を利用し発芽しているものと考えられた。

認識メカニズム面から考察すると、スフィンゴシンがアゴニストとして作用しているのであればその受容体の存在が考えられる。これまでスフィンゴシンの受容体についての報告例はない。しかし、スフィンゴシン-1-リン酸の受容体が膜タンパク質の G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) の Edg ファミリー受容体であることが同定されている (Lee *et al.*, 1998)。スフィンゴシンにおいても類似の受容体であるかも知れない。しかし、*N. rileyi* の分生子がスフィンゴシンを直接認識するには受容体は細胞膜ではなく、分生子表面の rodlet layer (Boucias and Latge, 1988) に存在する必要がある。そのため、まったく新しいタイプの受容体なのかも知れない。

また、寄主認識の面から考察すると、遊離のスフィンゴイド塩基の炭素鎖長は、ほ乳動物や酵母において 18 や 20 が一般的 (Merrill *et al.*, 1988; Valsecchi *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000; Lester and Dikson, 2001) であるのに対し、昆虫由来のスフィンゴイド塩基 (*Drosophila melanogaster* Meigen (Henrik *et al.*, 2004; Henrik *et al.*, 2008), *Manduca sexta* Meigen (Abeyunga *et al.*, 2004)) では炭素鎖 14 であることが報告されている。そのため、昆虫

におけるスフィンゴ脂質は炭素鎖 14 を基本骨格とするのではないかと考えられる。しかしながら、これらの昆虫はいずれも *N. rileyi* の寄主昆虫として報告されておらず、そのため、炭素鎖 14 のスフィンゴイド塩基は昆虫を認識するマーカーとしては有用と考えられるが、寄主特異的マーカーとしては不十分である。したがって、寄主認識のためには、別のシグナル分子を利用しているのか、あるいは C₁₄-スフィンゴシンにより寄生のための代謝が誘導され寄生が成立するか否かは寄主との攻防に依存していることなのか、今後の検討が必要である。また、クチクラ抽出液を加えた場合に寄生のための代謝と考えられるキチナーゼやプロテアーゼ等の酵素活性が向上することが報告されており (El-Sayed *et al.*, 1993a, 1993b, 1993b), 同様のことが C₁₄-スフィンゴシンにより導かれるのか、興味のあるところである。

第2節 要約

B. mori 由来の水抽出液により、昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* 分生子の発芽誘導期を特異的に短縮する生理活性作用を有することが観察され、この発見を発端に「昆虫病原性糸状菌 *N. rileyi* の発芽誘導期を短縮する生理活性物質の分離・精製と構造解析及びその利用に関する研究」を進めた。このように寄主昆虫由来の抽出物に特異的な反応を示すことは昆虫病原性糸状菌の寄主認識メカニズムを理解する上で非常に重要な情報となるばかりではなく、微生物防除に活用する際にも有用な生物活性をもつために応用面でも利用が期待される。そこで本発芽促進物質を分離・精製し、その分子構造を明らかにするとともに、利用技術の検討を行った。

まず取り組んだのは、目的物質を単離する際に不可欠となる生物活性を評価する生物検定系の確立である。そのために観察時間帯、培地の組成、pH、温度などを検討した。その結果、発芽促進物質を検出するためには培養開始後 25 日以内の分生子を供試し、培地にペプトン水溶液を使用し、培養 10 時間後 (23°C) の発芽率を観察することにより、発芽促進物質の有無を高感度に検出する検定方法として確立した。この方法は、マイクロプレートを利用することにより効率的になった。このような生物活性を指標に発芽促進物質を濃縮していくが、問題が生じた。それは抽出溶媒を検討していた際、水よりも有機溶媒によって効率的に抽出され、活性成分は脂溶性の物質である可能性が高いことが明らかとなったことである。このことから、分離・精製が進み脂溶性物質の発芽促進物質が水系の生物検定培地で可溶化されず、検定結果に悪影響を与える可能性が

考えられた。よって、脂溶性物質が水系の生物検定溶媒に可能な限り可溶化させるように改良する必要があると考えた。そこで、*N. rileyi* 分生子懸濁液の調製に使用した界面活性剤である Tween 80 を 1% の高い濃度を使用した生物検定系に改良した。そしてこの生物検定法を基軸に発芽促進物質の濃縮を進めた。

分離法に関しては抽出溶媒、溶媒分配クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィーの条件及び分解反応による活性の変化を調査した。その結果、抽出溶媒においては水よりも極性有機溶媒のほうが 3~20 倍効率よく抽出されることが明らかとなり、メタノールによる抽出が最も効率的であった。発芽促進物質の安定性あるいは部分構造推定のため種々の分解反応を行ったが、メタノールにより抽出したサンプルは分解反応において発芽促進活性の失活は認められず、逆に酸分解処理によりその活性が約 150 倍に向上した。化学反応により本来の生体成分の化学構造が変化している可能性も考えられたが、活性の向上のみならず溶媒分配操作時における乳化現象を低減させ、液-液の 2 層形成を容易にするというメリットがあることから、酸分解処理後のサンプルを用いて分離・精製を進める判断をした。溶媒分配においては、酸分解処理液と石油エーテルとの溶媒分配において発芽促進物質はメタノール（含水）層に回収された。さらに、発芽促進物質は *n*-ブタノールと水による溶媒分配の *n*-ブタノールに回収されることが明らかとなり、物質極性の違いで分離する方法として、この 2 種類の溶媒分配法は有用であると考えられた。溶媒分配により濃縮された発芽促進物質をカラムクロマトグラフィーにより分離する際、順相カラムクロマトグラフィーにおいては初期溶媒をクロロホルムとしてシリカゲルに吸着されメタノール濃度を上げていくと溶出されることが明らかとなった。さらに、逆相カラムクロマトグラフィーにおいては 40%メタノールで ODS カラムに吸着され、メタノール濃度を上げていくと溶出されることが明らかとなり、これらのクロマトグラフィーの挙動から発芽促進物質を単離するための方向性が示された。

次に構造解析に必要とされる量の発芽促進物質を単離するために、*B. mori* の蛹 1.0 kg を抽出材料にして大量調製を試みた。酸分解処理、溶媒分配クロマトグラフィーを経て順相カラムクロマトグラフィーにより分離し、さらに逆相カラムクロマトグラフィーにより分離すると活性画分には 20,000 倍以上に濃縮され、50.7 mg の褐色油状物質が得られた。しかし、この活性画分の純度を TLC で確認した結果、複数のスポットが認められたため、濃縮した活性画分は混合物であることが分かった。そこで不純物を除去するため、それまでの分離モードとは異なる Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによって目的成分の分

離を行った。その結果、活性画分にメタノール抽出液と比較すると 46,000 倍以上に活性が向上した 12.4 mg の無色ろう状物質を得た。この活性画分は Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより単一のピークが、また TLC により単一のスポットとして検出され、さらに検出されたピーク及びスポットに強い活性が認められたことから、濃縮された活性画分は高純度の発芽促進物質と判断された。この精製物を純度 100% と仮定するとメタノール抽出液にはわずか 0.0028% 程度しか発芽促進物質を含んでいなかったこととなる。

精製されたサンプルは酸分解処理を施したものであり、本来の生体成分の化学構造から変化していることが考えられるため、順相及び逆相の TLC を用いてメタノール抽出液と精製物の活性画分の *R_f* 値を比較した。その結果、いずれも同様の *R_f* 値において活性が得られた。このことは、極性基及び非極性基についての化学構造の類似性が高いことが示唆され、酸分解処理の前後で大きな化学構造の変化はなかったものと考えられた。

次に、単離された高純度の発芽促進物質について種々の NMR スペクトル及び MS スペクトル等で解析すると、発芽促進物質として単離された成分は 2*S*-amino-tetradeca-4-ene-1,3*R*-diol、つまり既知物質である *D*-erythro-*C*₁₄-Sphingosine (*C*₁₄-スフィンゴシン)であることが明らかとなった。そこで、スフィンゴシンの炭素鎖に着目し、構造活性相関を調べたところ、精製物と同じ炭素鎖 14 のスフィンゴシンにおいて強い活性を示したことから、*N. rileyi* の発芽促進物質が *C*₁₄-スフィンゴシンであることが確認された。しかもその生物活性は、炭素鎖が 14 よりも長くても短くても大きく低下し、アルキル鎖長がエピトープとして重要であることが推察された。

発芽促進物質の単離における生物検定はペプトン水溶液中で実施したが、ペプトンを除去し生物検定を行うと、*C*₁₄-スフィンゴシンの発芽促進活性は大幅に低下した。そのため、ペプトン中に *C*₁₄-スフィンゴシン発芽促進活性のための補助因子が存在することが示唆された。微生物培養における、ペプトンの主な目的はアミノ酸をはじめとする窒素源の供給であることから、無機体窒素及びアミノ酸の補助因子活性について調査した。その結果、無機体窒素には補助因子活性はなく、アミノ酸特にアラニン、ヒスチジンに高い補助因子活性が認められた。

最後に、発芽促進物質の応用として、緒論でも述べたように‘分生子が昆虫表面に付着してから経皮的侵入するまで時間を短縮し不適環境にさらされる時間をなるべく短くすることにより感染効率を上げる’というアイディアのもと、微生物農薬の補助剤としての利用の可能性を検討した。そこで、感染時間短縮効果について、*in vitro* 及び

ポット試験において検討した。その結果, *in vitro* では C₁₄-スフィンゴシンとともに 3~6 時間前処理することによって, 感染時間短縮効果が認められた。一方, C₁₄-スフィンゴシン無しで前処理を行うと, 感染時間短縮に関する効果は得られなかった。さらに, ポット試験においても同様の結果が得られ, C₁₄-スフィンゴシンの *N. rileyi* 昆虫病原糸状菌製剤の補助剤として利用することによって感染所要時間を短縮する効果が認められた。このことは, 感染成立に要求される環境条件のハードルを下げ野外での効果安定につながるものと期待された。なお, 発芽促進物質である C₁₄-スフィンゴシンを効果的に活用するには, 両親媒性のスフィンゴシンが水溶液中でミセルを形成せずに, モノマーの状態を維持させることが重要である。そのためには, 適度な濃度の界面活性剤の共存が必要である。さらに, C₁₄-スフィンゴシン補助因子活性を持つアラニン等の成分により発芽促進効果を有効に得ることが重要であると考えられた。

本研究において得られた成果は, *N. rileyi* 分生子の寄主表面における分生子発芽の現象や寄主認識メカニズムを分子レベルで理解する足がかりとなるとともに, スフィンゴシン受容体研究などの脂質シグナル系研究に展開されることが期待される。さらには天敵微生物製剤の実用化に際し, 補助剤としての可能性が示唆され, 昆虫病原性糸状菌製剤の新しい利用技術へ展開できるものと期待される。

謝 辞

本研究を行うに当たり, 始終ご懇篤なご指導とご鞭撻を賜りました東海大学農学部教授 荒木朋洋先生ならびに同教授 小野政輝先生に心より深甚なる感謝の意を表します。また, 本論文を作成するに当たり, ご校閲ならびにご助言を賜りました, 東海大学教授 星岳彦先生, 同教授 吉田政博先生ならびに九州沖縄農業研究センター 斉藤彰博士に深く感謝いたします。

さらに, 本研究に対し数々のご助言とご鞭撻を賜り, そして本研究のきっかけを作っていただきました, 元熊本県農業研究センター所長 久保研一博士, そして共同研究として数々のご議論と多大なご協力を頂きました大東肥料株式会社 中村元信氏, 廻武氏, 古賀進氏に謹んで厚くお礼申し上げます。

本論文の遂行にあたり, 種々の NMR スペクトル測定をしていただきました熊本大学生命資源センター 武田勝士氏, クロマトグラフィーの基礎を教えてくださいました熊本大学薬学部准教授 城戸裕先生, GC/MS 測定に関しご指

導とご助言を頂きました熊本県保健科学研究所生活科学部長 飛野敏明氏, 同研究主任 吉田達雄氏, アミノ酸分析をして頂きました東海大学技術員 千々岩有紀氏, LC/MS スペクトルを測定していただきました熊本県産業技術センター 佐藤崇雄博士, デジタル測定技術のご指導を賜りました同センター研究参事 重森清史氏に心より感謝いたします。

また, 野外試験においてはほ場の準備, 栽培管理, 調査等に始終多大なご協力を頂きましたバイオ育種研究室の柳原美苗氏, 立川亮一氏, また種々の実験や調査, 実験昆虫の準備等において始終多大なご協力を頂きました同研究室の松田奈緒美氏, 花崎康子氏に厚くお礼申し上げます。

そして, このような研究の機会を与えていただきました熊本県農業研究センター所長 大田黒慎一氏, 同センター次長 佐藤巖氏ならびに野田正広氏, 農産園芸研究所長 森田敏雅氏, バイオ育種研究室長 飯牟禮和彦氏, 元農業研究センター所長瀬口豊氏ならびに三島和隆氏, 元農産園芸研究所長田中正美氏ならびに石田豊明氏に心より感謝いたします。また, 本研究に対し, ご協力を頂きました熊本県農業研究センターの皆様にも厚くお礼申し上げます。

最後に, 鹿児島大学時代に私に研究活動の基礎をご指導いただきました鹿児島大学名誉教授 榎下町鉦敏先生, 同じく鹿児島大学名誉教授及び九州大学 湯川淳一先生に心より感謝申し上げます。

参考文献

- Abeytung DTU, Glick JJ, Gibson NJ, Oland LA, Somogyi A, Wysocki VH and Polt R, Presence of unsaturated sphingomyelins and changes in their composition during the life cycle of the moth *Manduca sexta*. *J. Lipid. Res.*, **45**, 1221-1231 (2004).
- Allen GE, Greene GL and Whitcomb WH, An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar. *Anticarsia gemmatialis*, in Florida. *Florida Entomol.*, **54**, 189-191 (1971).
- 青木 清, 昆虫病理学, 技報堂, 東京, pp.42-49 (1957).
- 有賀久雄, 昆虫病理学汎論, 養賢堂, 東京, p.469(a), p.502(b) (1975).
- Bornfeldt KE, Graves LM, Raines EW, Igarashi Y, Wayman G, Yamamura S, Yatomi Y, Sidhu JS, Krebs EG, Hakomori S and Roth R, Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of

- PDGF chemotactic signal transduction. *J. Cell Biol.*, **130**, 193-206 (1995).
- Boucias DG and Pendland JC, Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 288-292 (1984).
- Boucias DG and Pendland JC, Ultrastructural studies on the fungus, *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, 338-345 (1982).
- Boucias DG and Latge JP, Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle extracts. *J. Invertebr. Pathol.*, **51**, 168-171 (1988).
- Braga GU, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ and Roberts DW, Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem. Photobiol.*, **74**, 734-739 (2001).
- Bunemann M, Liliom K, Brandts BK, Pott L, Tseng JL, Desiderio DM, Sun G, Miller D and Tigyi G, A novel membrane receptor with high affinity for lysosphingomyelin and sphingosine 1-phosphate in atrial myocytes. *The EMBO journal*, **15**, 5527-5534 (1996).
- Carruthers RI, Feng Z, Ramos ME and Soper RS, The effect of solar radiation on the survival of Entomophaga grylli, (Entomophthorales: Entomophthoraceae) conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, **52**, 154-162 (1988).
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S and Spiegel S, Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, **381**, 800-803 (1996).
- Daoust RA and Pereira RM, Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on beetle-attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. *Environ. Entomol.*, **15**, 1237-1243 (1986).
- Dickson RC, Sphingolipid functions in Saccharomyces cerevisiae: Comparison to mammals. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 27-48, (1998).
- Drauzio EN, Rangel, Gilberto UL Bragaa, Anne JA and Donald WR, Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation germination speed and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. acridum conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, **90**, 55-58 (2005).
- Durieux ME, Carlisle SJ, Salafranca MN and Lynch KR, Responses to sphingosine-1-phosphate in X laevis oocytes: similarities with lysophosphatidic acid signaling. *Am. J. Physiol.*, **264**, 1360-1364 (1993).
- El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD and Gupta SC, Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia*, **122**, 79-87 (1993a)
- El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD and Gupta SC, Insect cuticle and yeast extract effects on germination, growth, and production of hydrolytic enzymes by *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia*, **122**, 143-147 (1993b).
- El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD and Gupta SC, Effects of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia*, **122**, 149-152 (1993c).
- Fargues F, Rougier M, Goujet R and Itier B, Effect of sunlight on field persistence of conidia of entomopathogenic hyphomycete, *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga*, **33**, 357-370 (1988).
- Ferron P, Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Ann. Rev. Entomol.*, **23**, 409-442 (1978).
- Finney DJ, Probit analysis, Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 333 (1972).
- Fox CJS, The incidence of Green Muscardine in the European Wireworm, *Agriotes obscurus* (Linnaeus), in Nova Scotia. *J. Insect Pathol.*, **3**, 94-95 (1961)
- Galal N, Sayed EI, Carlo M, Ignoffo and Timothy DL, Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia*, **113**, 95-102 (1991).
- Gardner WA, Effects of temperature on the susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.*, **46**, 348-349 (1985).
- Gaver RC and Sweeley CC, Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. *Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298 (1965).
- Gazzoni DL, Sosa-Gómez DR, Moscardi F, Hoffman-Campo CB, Spalding Correa B and Getzin LW, *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hübner). *J. Insect Pathol.*, **3**, 2-10 (1961).
- Goodemote KA, Mattie ME, Berger A and Spiegel S, Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10272-10277 (1995).

- Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, Baier G, BaierBitterlich G, Byrd C, Lang F, Kolesnick R, Altman A and Green D, FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide initiated Ras signalling pathway. *Immunity*, **2**, 341-351 (1995).
- Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN and Fuks Z, Ceramide signaling in apoptosis. *Br Med Bull.*, **53**, 539-553 (1997).
- Hajek AE, Carruthers RI and Soper RS, Temperature and moisture relations of sporulation and germination by a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.*, **19**, 85-90 (1990).
- Hajek AE, Eastburn CC, Davis CI and Vermeulen F, Deposition and germination of conidia of the entomopathogen *Entomophaga maimaiga* infecting gypsy moth, *Lymantria dispar*. *J. Invertebr. Pathol.*, **79**, 37-43 (2002).
- Hannun YA, The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3125-3128 (1994).
- Hedlund RC and Pass BC, Infection of the alfalfa weevil, *Hypera postica*, by the fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invert. Pathol.*, **11**, 25-34 (1967).
- Henrik F, Deron RH, Greg LH and Julie DS, Characterization of free endogenous C14 and C16 sphingoid bases from *Drosophila melanogaster*. *J. Lipid Res.*, **45**, 54-62 (2004).
- Henrik F, Xinyi Z, Deron RH, Hoe SB, Robert B, Van HP, Greg LH and Julie DS, Identification and characterization by electrospray mass spectrometry of endogenous *Drosophila* sphingadienes. *J. Lipid Res.*, **49**, 597-606 (2008).
- Hinds WE and Osterberger SA, The soybean caterpillar in Louisiana. *J. Econ. Entomol.*, **24**, 1168-1173 (1931).
- Hirabayashi Y, Igarashi Y and Merrill AH (Eds.), *Sphingolipid Biology*, Springer-Verlag, Tokyo, p.6 (2006).
- Houle C, Hartmann CG and Wasti SS, Infectivity of eight species of entomogenous fungi to the larvae of the elm bark beetle, *Scolytus multistriatus*. *J NY Entomol. Soc.*, **95**, 14-18 (1987).
- Huibers PDT, Lobanov VS, Katritzky AR, Shah DO and Karelson M, Prediction of critical micelle concentration using a quantitative structure-property relationship Approach. *Langmuir*, **12**, 1462-1470 (1996).
- 五十嵐靖之, スフィンゴ脂質代謝を介した細胞内情報伝達機構-特にスフィンゴシンの生理作用とアポトーシス誘導を中心として. *日本油化学会誌*, **46**, 1095-1107 (1997).
- Igarashi Y, Sphingosine-1-phosphate as an intercellular signaling molecule. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **845**, 19-31 (1998).
- Ignoffo CM, Marston NL, Hostetter DL, Buttler B and Bell JV, Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. *J. Invertebr. Pathol.*, **27**, 191-198 (1976).
- Ignoffo CM, Garcia C, Hostetter DL and Pinnel RE, Laboratory studies of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*: soil-borne contamination of soybean seedlings and dispersal of diseased larvae of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, **29**, 147-152 (1977).
- Ignoffo CM, The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, In H.D. Burges (ed.), *Microbial control of pests and plant diseases*. 1970-1980, Academic Press, New York, pp.531-538 (1981).
- Ignoffo CM, Garcia C and Gardner WA, Temperature stability of wet and dry conidia of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Environ. Entomol.*, **14**, 87-91 (1985).
- Jenkins GM, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid L and Hannun Y, Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32566-32572 (1997).
- Karlsson KA, Use of trimethylsilyl ethers for the gas chromatography and mass spectrometry sphingosines. *Acta. Chem. Scand.*, **19**, 2425-2427 (1965).
- Karlsson KA, Carbohydrate composition and sequence analysis of cell surface components by mass spectrometry. Characterization of the major monosialoganglioside of brain. *FEBS Lett.*, **32**, 317-320 (1973).
- 栢村 鶴雄, 野外昆虫の黄きょう病菌および緑きょう病菌に対する罹病性, 蚕糸研究, **131**, 27-34 (1984).
- 河上清, 硬化病菌の円筒形胞子に関する研究 I. 蚕試報, **18**, 133-146 (1962).
- 河上 清, 三国 辰夫, 硬化病菌の蚕体への進入時間について, 蚕糸研究, **56**, 35-41 (1965).
- Kim S, Fyrst H and Saba J, Accumulation of phosphorylated sphingoid long chain bases results in cell growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **156**, 1519-1529 (2000).
- 木本 紗帆, 信田 恵, 増田 俊雄, 江波 義成, 樋口 俊男, 廣森 創, 西東 力, ハスモンヨトウに対する昆虫病原糸状菌 3 種の混用効果, 関東東山病虫研究報, **54**, 117-120 (2007).

- Kish LP and Allen GE, The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatalis* in soybean. *Fla. Agric. Exp. Sta., Tech Bull.*, pp.795 (1978).
- Koppen C, Meyer HM, Laser KT, Zhang C, Jakobs KH, Bünemann M and Pott L. Activation of a high affinity G protein-coupled plasma membrane receptor by sphingosine-1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2082-2087 (1996).
- Krisnangkura K and Sweeley CC, Mass spectra of various deuterium-labeled forms of bis-o-trimethylsilyl-N-acetyl-sphinganine. *Chem. Phys. Lipids*, **13**, 415-428 (1974).
- Kumar V, Singh GP, Babu AM and Datta RK, SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, *Bombyx mori* Linn causing green muscardine. *Mycopathologia*, **138**, 141-144 (1997).
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S and Hla T, Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, **279**, 1552-1555 (1998).
- Leite LG and Lara FM, Seasonal abundance of insects and natural enemies associated to soybean crops. *An. Soc. Entomol. Bras.*, **14**, 45-58 (1985).
- Lester RL and Dickson RC, High-performance liquid chromatography analysis of molecular species of sphingolipid-related long chain bases and long chain base phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Anal. Biochem.*, **298**, 283-292 (2001).
- Li-chang T and Roger FH, Potential application of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, for control of the corn earworm, *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **8**, 25-30 (1998).
- 増田 俊雄, 昆虫病原糸状菌 *Beauveria bassiana* によるコナガの微生物的防除
II. 発病に及ぼす温度の影響と体内への侵入時間, 応動昆, **44**, 177-182 (2000).
- Matsubara T and Hayashi A, Fragmentation pathways of O-trimethylsilyl ethers of dihydroxy long-chain bases analysed by linked-scan mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **562**, 119-124 (1991).
- Merrill AHJr and Jones DD, An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1044**, 1-12 (1990).
- Merrill AHJr, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT and Wang E, Sphingolipids, The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**, 208-225 (1997).
- Merrill AH, Wang E, Mullins RE, Jamison WCL, Nimkar S and Liotta DC, Quantitation of free sphingosine in liver by HPLC. *Anal. Biochem.*, **171**, 373-381 (1988).
- Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T and Kawasaki T, Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 396-403 (1995).
- 宮澤陽夫, 藤野泰朗, 脂質・酸化脂質分生法入門, 学会出版センター, 東京, pp.161-166 (2000).
- Mohamed AKA, Bell JV and Sikorowski PP, Field cage tests with *Nomuraea rileyi* against corn earworm larvae on sweet corn. *J. Econ. Entomol.*, **71**, 102-104 (1978).
- Mohamed AKA, Sikorowski PP and Bell JV, Susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi* at various temperatures. *J. Invertebr. Pathol.*, **30**, 424-417 (1977).
- Moore S. and Stein WH., Methods in Enzymology 1963, pp.819-831, Academic Press New York (1963).
- Morley DJ, Moore D and Prior C, Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycol. Res.*, **100**, 31-38 (1995).
- Nadeau MP, Dunphy GB and Boisvert JL, Development of *Erynia conica* (Zygomycetes: Entomophthorales) on the cuticle of the adult flies *Simulium rostratum* and *Simulium decorum* (Diptera: Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.*, **68**, 50-58 (1996).
- Nirula KK, Radha K and Menon KP, The green muscardine disease of *Oryctes rhinoceros* L. I. Symptomatology, epizootology and economic importance. *Ind. Cocon. J.*, **9**, 3-10 (1955).
- Nirula KK, Radha K and Menon KP, The green muscardine disease of *Oryctes rhinoceros* L. II. The causal organism. *Ind. Cocon. J.*, **9**, 83-89 (1956).
- 野田孝博, 田中 正美, ハスモンヨトウに病原性を示す2種糸状菌, 九州農業研究, **63**, 84 (2001).
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA and Hannun YA, Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, **259**, 1769-1771 (1993).
- Ohta H, Yatomi Y, Sweeney EA, Hakomori S and Igarashi Y, A possible role of sphingosine in induction of apoptosis

- by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. *FEBS Lett.*, **355**, 267-270 (1994).
- Ohta H, Sweeney EA, Masamune A, Yatomi Y, Hakomori S and Igarashi Y, Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells: a possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation. *Cancer Res.*, **55**, 691-697 (1995).
- Okajima F, Tomura H, Sho K, Nochi H, Tamoto K and Kondo Y, Involvement of pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phospholipase C-Ca²⁺ system in HL60 leukemia cells. *FEBS Lett.*, **379**, 260-264 (1996).
- Olivera A and Spiegel S, Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, **365**, 557-560 (1993).
- Pedigo LP, Bechinski EJ and Higgins RA, Partial life tables of the green cloverworm (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean and a hypothesis of population dynamics in Iowa. *Environ. Entomol.*, **12**, 186-195 (1983).
- Pendland JC and Boucias DG, Ultrastructural localization of carbohydrate in cell walls of the entomogenous hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 377-386 (1992).
- Pfimmer TR, *Heliothis* spp.: Control on cotton with pyrethroids, carbamates, organophosphates, and biological insecticides. *J. Econ. Entomol.*, **72**, 593-598 (1979).
- Postma FR, Jalink K, Hengeveld T and Moolenaar WH, Sphingosine 1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: Action through a specific cell surface receptor. *EMBO J.*, **15**, 2388-2395 (1996).
- Rangel DEN, Braga GUL, Anderson AJ and Roberts DW, Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 116-125 (2005).
- Rawlings AV, Scott IR, Harding CR and Bowser PA, Straum corneum moisturization at the molecular level. *J. Invest. Dermatol.*, **103**, 731-741 (1994).
- Sadahira Y, Ruan F, Hakomori S and Igarashi Y. Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 9686-9690 (1992).
- Sato K, Tomura H, Igarashi Y, Ui M and Okajima F, Exogenous sphingosine 1-phosphate induces neurite retraction possibly through a cell surface receptor in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 329-334 (1997).
- Shimazu M and Richard SS, Pathogenicity and sporulation of *Entomophaga maimaiga* HUMBER, SHIMAZU, SOPER and HAJEK (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Appl. Ent. Zool.*, **21**, 589-596 (1986).
- Skipski VP and Peterson RF, Separation of phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine and other phospholipids by thin layer chromatography. *J. Lipid Res.*, **3**, 467-470 (1962).
- Spiegel S, Foster D and Kolesnick R, Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 159-167 (1996a).
- Spiegel S and Merrill AHJr, Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.*, **10**, 1388-1397 (1996b).
- Spier HW and Pascher G, Analytical and functional physiology of the skin surface. *Hautarzt*, **7**, 55-60 (1956).
- Sprenkel RM and Brooks WM, Artificial dissemination and epizootic initiation of *Nomuraea rileyi*, an entomogenous fungus of lepidopterous pests in soybeans. *J. Econ. Entomol.*, **68**, 847-851 (1975).
- Stansly PA and Orellana MGJ, Field manipulation of *Nomuraea rileyi* (Moniliales: Moniliaceae): effects on soybean defoliators in Coastal Ecuador. *J. Econ. Entomol.*, **83**, 2193-2195 (1990).
- Steinhaus EA, Principles of Insect Pathology, McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, pp.757 (1949).
- Sue PW and Grula EA, Utilizable surface nutrients on *Heliothis zea* available for growth of *Beauveria bassiana*, *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 259-269 (1984).
- Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.*, **10**, 613-623 (1963).
- Sweeney EA, Sakakura C, Shirahama T, Masamune A, Ohta H, Hakomori S and Igarashi Y, Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, **66**, 358-366 (1996).
- Tang LC and Cheng DJ, Virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, to various larval stages of the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **34**, 399-403 (1999).
- Tang LC and Hou RF, Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera*

- (Lep., Noctuidae). *J. Appl. Ent.*, **125**, 243-248 (2001).
- Valsecchi M, Chigorno V, Nicolini M and Sonnino S, Changes of free long-chain bases in neuronal cells during differentiation and aging in culture. *J. Neurochem.*, **67**, 1866-1871 (1996).
- Vimala DPS, Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 145-150 (1994).
- Vimala DPS, Prasad YG, Chowdary DA, Rao LM and Balakrishnan K, Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*; identification of virulent isolates of *N. rileyi*. *Mycopathologia*, **156**, 365-373 (2003).
- Walstad JD, Anderson RF and Stambaugh WJ, Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium. anisopliae*), *J. Invertebr. Pathol.*, **16**, 221-226 (1970).
- Wraight SP, Butt TM, Galaini-Wraight S, Allee LL and Roberts DW, Germination and infection process of the entomophthorean fungus. *Erynia radicans* on the potato leafhopper. *Empoasca fabae*. *J Invertebr Pathol.*, **56**, 157-174 (1990).
- Wu J, Spiegel S and Sturgill TW, Sphingosine 1-phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11484-11488 (1995).
- Yamamura S, Yatomi Y, Ruan F, Sweeney EA, Hakomori S and Igarashi Y, Sphingosine 1-phosphate regulates melanoma cell motility through a receptor-coupled extracellular action and in a pertussis toxin-insensitive manner. *Biochemistry*, **36**, 10751-10759 (1997).
- 柳田 健郎, 白きょう病菌による蚕への経口感染の検討, 日蚕雑, **56**, 279-284 (1987).
- 柳田友道, 微生物科学 **3**, 学会出版センター, 東京, pp.292-306 (1982).
- 安田 慶次, 高江洲 和子, 上原 勝江, 天敵糸状菌 *Beauveria bassiana* のアリモドキゾウムシ成虫に対する感染性に及ぼす温度,湿度,分生子密度の影響, 応動昆, **41**, 55-58(1987).
- Yatomi Y, Ruan F, Megidish T, Toyokuni T, Hakomori S and Igarashi Y, *N, N*-Dimethylsphingosine inhibition of sphingosine kinase and sphingosine1 - phosphate activity in human platelets. *Biochemistry*, **35**, 626-633 (1996).
- Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F and Igarashi Y, Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5291-5297 (1997).
- Zhang H, Buckley NE, Gibson K and Spiegel S, Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C- independent pathway. *J. Biol. Chem.*, **265**, 76-81 (1990).
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G and Spiegel S, Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J. Cell. Biol.*, **114**, 155-167 (1991).
- Zimmermann G, Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **40**, 36-40 (1982).

本論文に関わる報告

本論文は下記に発表した論文を基礎としてまとめたものである。

- Noda T, Ono M, Iimure K and Araki T, Isolation of a bioactive substance from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) that accelerates the germination of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 563-568 (2010).
- Noda T, Ono M, Iimure K and Araki T, Characterization of a germination-accelerating factor from the Silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1226-1230 (2010).
- Noda T, Meguri T, Iimure K, Ono M and Araki T, Potential of D-erythro-C₁₄-sphingosine as an adjuvant for fungal pesticide of *Nomuraea rileyi*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 373-375 (2011).
- Noda T, Satoh T, Iimure K, Ono M and Araki T, Effect of amino acids on C₁₄-sphingosine-triggered germination of *Nomuraea rileyi* and Surface Amino Acids on *Spodoptera litura* Fabricius. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 771-773 (2011).

Summary

Isolation and characterization of a germination accelerating factor from the Silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, and potential of the bioactive substance as an adjuvant for a fungal pesticide of *N. rileyi*.

Takahiro NODA

Nomuraea rileyi is an entomopathogenic fungus that infects about 30 species of Lepidopteran insects. It is known to infect harmful insects that affect major crops in North and South America, Europe, and Asia, and shows a particularly high infectivity of Noctuidae insects. The ability of the conidia of an entomopathogenic fungus, such as *N. rileyi*, to adhere, germinate, and then penetrate the cuticle integument, resulting in mycelial growth and the death of the host insect, is an intriguing biological process. Parasitic infection has been associated with a combination of factors, including surface recognition, mechanical penetration and enzyme action.

On culture media supplemented with host insect-derived extracts of Lepidopteran insects, the conidium of *N. rileyi* germinates with a shorter germination induction period and at a higher germination rate. It has also been found that *N. rileyi* conidia attached on the surface of the host insect require a shorter time of germination, as do those cultured on culture media containing cuticle extracts. These differences in germination behavior depending on the presence or absence of host insect-derived ingredients might play an important role in the host recognition mechanism of *N. rileyi*, but the factor responsible for this mechanism has yet to be identified.

Hence we attempted to purify this substance (germination-accelerating factor, GAF). One thousand g of dried silkworm pupae (a Lepidopteran host moth) was subjected to methanol extraction, followed by acidolysis, two different solvent partitions, and three different column chromatographies. A total of 12.4 mg of substance was obtained in the active fraction. The substance obtained exhibited an activity more than 46,000 times higher than that of the methanol extract. The substance was detected as a single peak on Sephadex LH20 column chromatography and as a single band on high-performance thin-layer chromatography. These data indicate that the concentrated fraction contained a high-purity substance.

Next, the chemical structure of the isolated bioactive substance (GAF) and the structure-activity relationship was analyzed. The chemical structure of GAF was characterized as 2*S*-amino-tetradeca-4-ene-1,3*R*-diol (*D*-erythro- C_{14} -sphingosine) based on various spectroscopic data. We next examined the biological activities of similar substances with regard to the carbon chain length (molecular species of *D*-erythro-sphingosine with 12 (C_{12} -Sph), 14 (C_{14} -Sph), 16 (C_{16} -Sph) and 18 (C_{18} -Sph) carbon atoms as a sphingoid-base backbone structure) to elucidate the structure-activity relationship. An examination of the structure-activity relationship shows that the activity of *D*-erythro- C_{14} -sphingosine was superior to that of sphingosines with shorter and longer carbon chains. It is suggested that the molecular species with a 14-carbon chain of a sphingosine is important for host recognition.

C_{14} -Sph accelerated the germination of *N. rileyi* in an assay solution containing peptone, but activity declined to a large degree in an assay solution without peptone. This suggests the presence of a co-factor in C_{14} -Sph-triggered germination. Hence, next study was to identify the co-factor in the C_{14} -Sph-triggered germination of *N. rileyi*. Since the main role of peptone is to supply nitrogen constituents, we examined the effects of various nitrogen constituents. It was found that L-Alanine and L-Histidine, an amino acids, were highly effective for C_{14} -Sph-triggered germination of *N. rileyi*.

The entomopathogenic fungus *N. rileyi* is infectious with respect to various lepidopterous agricultural insect pests, and is under investigation as a potential eco-friendly microbial control agent. As mentioned above, it is have found that the germination accelerating factor is C_{14} -Sph, suggesting that this activity can be utilized as an adjuvant for the effective control of pests. For successful infection of an entomopathogenic fungus, nearly 100% humidity and an appropriate temperature for more than 11 h are required from conidial adhesion on the surface of the host to invasion into the insect. These requirements are not easily achieved in the field, suggesting that failure of infection in a field is due to these environmental factors. For stable infection, the germination accelerating effect of C_{14} -Sph might reduce the time between conidial adhesion on a host insect surface and invasion into the insect. The application of C_{14} -Sph as an

adjuvant for a fungal pesticide might lower the environmental conditions for fungal infection, and thus the effects of fungal pesticides might be stabilized in field applications. We expect that effective infection would occur with conidia activated by C₁₄-Sph. Therefore, in next research we examined the effect of C₁₄-Sph on the time required for infection in an *in vitro* and in a pot experiment. It was found that conidia activated by C₁₄-Sph shortened the time to about half. Namely, the application of the substance to a fungal pesticide will lower the environmental requirements for fungal infection, and the effect of the fungal pesticide will be stabilized in a field environment..

In this study, it was discovered that germination accerating substance of entomopathogenic fungus *N. rileyi* was C₁₄-Sph. The result of this investigation will give a foothold to understand the germination on a host insect and the host recognition mechanism of *N. rileyi* at the molecular level. Furthermore, possibility of the substance (C₁₄-Sph) as an adjuvant for a fungal pesticide of *N. rileyi* was demonstrated in an application experiment. Hence, the bioactive substance was expected to be used in application of the entomopathogenic fungus *N. rileyi* for a fungal pesticide as a new method.