



色素によるTMVおよびTMV-RNAの不活性化に対するベントナイトの影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 北海道教育大学 公開日: 2012-11-07 キーワード: 作成者: 由崎, 俊道 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00003257

色素による TMV および TMV-RNA の 不活性化に対するベントナイトの影響

由 崎 俊 道

北海道教育大学札幌分校生物学教室

The Effect of Bentonite on the Inactivation of TMV and TMV-RNA by Dyes

Toshimichi YOSHIKAZI

Biological Laboratory, Sapporo College, Hokkaido University of Education
Sapporo 064

Abstract

The infection of *Nicotiana glutinosa* L. with tobacco mosaic virus (TMV) was inhibited by the addition of acridine orange, neutral red, methylene blue, or gentian violet to the inoculum. The inhibition of TMV by dyes was appreciably reduced by the addition of bentonite to the mixture of TMV and dye. TMV and its RNA (TMV-RNA) was irreversibly inactivated by the addition of the same dyes under solar rays or irradiation by a day-light lamp. The inactivation of TMV and TMV-RNA by dyes was obviously reduced by the addition of bentonite to the mixture of dye and TMV or TMV-RNA. A slight inactivation of TMV and TMV-RNA by a highly concentrated dye was brought about when the mixture of viruses and dye was incubated in the dark.

緒 言

タバコ・モザイク・ウイルス (TMV) は、種々の化学物質によって不活性化されることが知られているが、Oster and McLaren (1950) は、acridine 色素を混合した TMV は、可視光線の照射により不活性化されることを報告した。また、Chessin (1960) は acridine orange, methylene blue, あるいは safranin を含む TMV 核酸 (TMV-RNA) が可視光線の照射によって不活性化されると報告している。同様の結果が riboflavin, lumichrome, proflavin, thiopyronin, toluidine blue, neutral red についても報告されている (Tsugita *et al.*, 1965; Orlob, 1967; Sastry and

Gordon, 1966a: Singer and Fraenkel-Conrat, 1966). 本研究において, acridine orange, neutral red, methylene blue, および gentian violet の4種の色素による TMV および, TMV-RNA の不活性化について実験を行ったが, これらの色素の不活性化作用は, ベントナイトの添加によって著しく抑制されることを認めた. それらの結果を以下に報告する.

材料および方法

実験に用いたすべての植物は, 鉢植えにしてガラス室内で生育させた. TMV は普通系を用い, タバコ (*Nicotiana tabacum* L. var. White Burley) に接種し, 増殖させた後, その葉の搾汁液から超遠心分画法 (Steere, 1959) によって純化した. TMV-RNA は, bentonite-phenol 法 (Fraenkel-Conrat *et al.*, 1961) によって調整した. ベントナイトは, Fraenkel-Conrat *et al.* (1961) の方法に従って作成した. TMV および TMV-RNA の濃度は 260 nm の紫外線吸光度 (Takahashi, 1951) によって測定した. 色素はアクリジン・オレンジ (acridine orange), ニュートラル・レッド (neutral red), メチレン・ブルー (methylene blue), およびゲンチアン・バイオレット (gentian violet) を実験に用いた. これらの色素, TMV あるいは TMV-RNA の希釈には, 0.1 M の磷酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した. 色素を含むウイルス試料に対する可視光線の照射には, 250 W の陽光ランプ (東芝製, 波長のエネルギー比を Fig. 1 に示した) を使用し, 直径 4.5 cm の黒色プラスチックのシャーレに試料を入れ, 透明なガラス板で覆い, 17.5 cm の距離から照射を行った. 太陽光線の照射の際も, 同様に試料をシャーレに入れ, 透明なガラス板で覆い, 一定の時間, 太陽光線にさらした. その際, 温度の上昇を避けるためにシャーレのそばに氷を置いた. 照射後, 1.0 mg/ml の濃度のベントナイトを含む磷酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) で試料を一定濃度に希釈し, 600 メッシュのカーボランダムをふりかけた *Nicotiana glutinosa* L. の葉に接種を行い, 生じた壊疽病斑数から, その不活性化の程度を調べた.

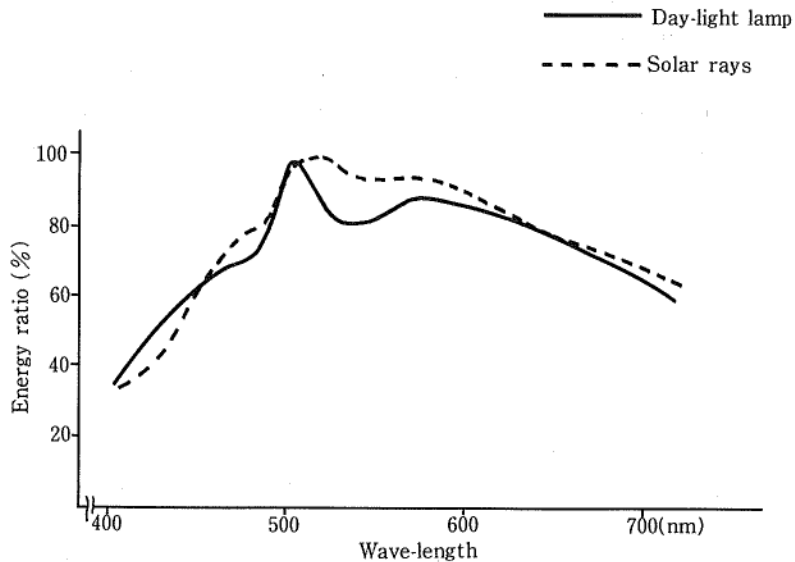


Fig. 1. The energy ratio of day-light lamp and solar rays in each wave-length.

実験結果

TMV に対する色素の感染阻止作用

TMV ($0.2 \mu\text{g/ml}$) に $200 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように acridine orange, neutral red, methylene blue, および gentian violet を混合した。また、ベントナイトの効果を調べるために、同濃度の TMV と色素の混合液にベントナイト (5 mg/ml) を加えた。対照には同じ濃度の TMV を用い、*N. glutinosa* に半葉法で接種を行った。以上の実験は光を避けるために、暗室内で写真用の安全灯の下で行った。接種後、*N. glutinosa* を温室に移し、3 日後に生じた壊疽病斑数を数えた。Fig. 2 には 4 種の色素について、TMV に色素を混合した場合、および TMV に色素とベントナイトを混合した場合の感染力 (病斑数) を対照に対する百分率 (%) で示した。どの色素においても、TMV の感染力は色素の混合によって阻止された。その阻止率は gentian violet の約 55% が最も高く、methylene blue の約 36% が最も低かった。これらの色素の TMV に対する感染阻止作用は、ベントナイトの添加によって抑制され、感染力が再び回復することが認められた。

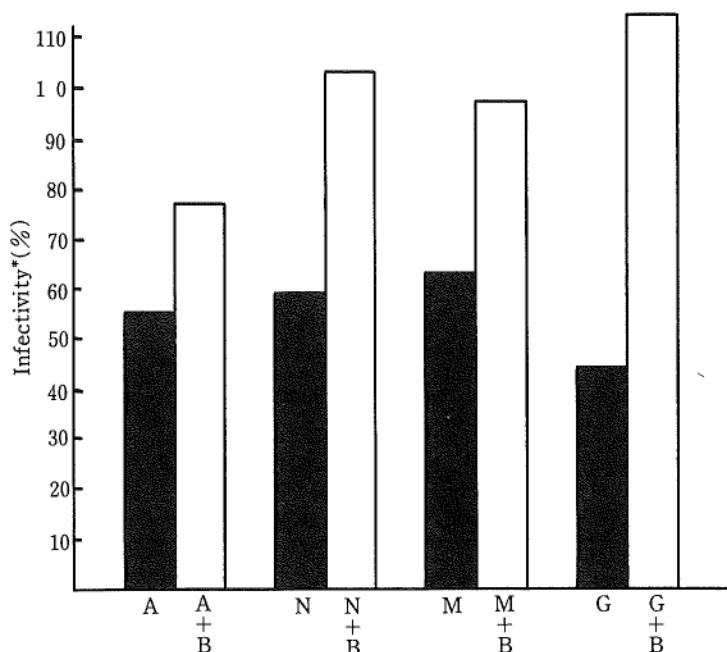


Fig. 2. The effect of bentonite on inhibition of TMV by dyes

A: acridine orange, N: neutral red
M: methylene blue, G: gentian violet
B: bentonite.

* The total number of local lesions produced on *N. glutinosa* by the mixture of TMV and dye or, dye and bentonite, was compared with that control.

太陽光線による色素の TMV および TMV-RNA に対する不活性化力

前述の 4 種の色素を用いて、TMV は $50 \mu\text{g/ml}$ 、色素は $200 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように混合した。また、ベントナイトの効果を調べるために、同濃度の TMV と色素の混合液にベントナイトを 10 mg/ml の濃度になるように加えた。これらの試料をシャーレに入れ、7 月の晴天の日に太陽光線を

30分間あてた。同じ濃度のTMVと色素との混合液を比較のために暗室に保った。30分後、ベントナイトを加えていない試料にはベントナイト(10 mg/ml)を加えた。各試料はTMVの濃度が0.2 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように、ベントナイト(1.0 mg/ml)を含む磷酸緩衝液を用いて希釈した後、*N. glutinosa*の葉8枚に接種を行った。その結果をTable 1に示した。色素を含むTMV試料は、太陽光線の照射によって不活性化されることが認められ、methylene blueとgentian violetの不活性化力が強く、neutral redの不活性化力は他の色素に比べ、弱かった。色素を含むTMVにベントナイトを混合して太陽光線をあてたが、その不活性化は、色素を含むTMVを暗所に保った試料の感染力と比較して、わずかであった。ベントナイトが色素の光化学作用による不活性化作用を抑制することは、用いた4種の色素について認められた。

次に、色素(100 $\mu\text{g/ml}$)を含むTMV-RNA(100 $\mu\text{g/ml}$)、およびこの色素とTMV-RNAの

Table 1. Inactivation of TMV by dyes under solar rays

Dye ^{a)}	Bentonite ^{b)}	Irradiation ^{c)}	Number of local lesions ^{d)}
Acridine orange	—	+	38
	+	+	168
	—	—	219
Neutral red	—	+	88
	+	+	248
	—	—	263
Methylene blue	—	+	14
	+	+	208
	—	—	220
Gentian violet	—	+	2
	+	+	159
	—	—	189

a) Dye (200 $\mu\text{g/ml}$) was mixed with TMV (50 $\mu\text{g/ml}$).

b) Bentonite was added at a concentration of 10 mg/ml to the mixture of dye and TMV.

c) The TMV preparations in petri dishes were irradiated with solar rays for 1 hour.

d) After dilution, each preparation was inoculated to 8 leaves of *N. glutinosa*. The local lesions produced were counted.

Table 2. Inactivation of TMV-RNA by dyes under solar rays

Dye ^{a)}	Bentonite ^{b)}	Irradiation ^{c)}	Number of local lesions ^{d)}
Acridine orange	—	+	0
	+	+	271
	—	—	245
Neutral red	—	+	0
	+	+	322
	—	—	349
Methylene blue	—	+	0
	+	+	142
	—	—	141
Gentian violet	—	+	1
	+	+	339
	—	—	336

a) Dye (100 $\mu\text{g/ml}$) was mixed with TMV-RNA (100 $\mu\text{g/ml}$).

b) Bentonite was added at a concentration of 10 mg/ml to the mixture of dye and TMV-RNA.

c) The TMV-RNA preparations in petri dishes were irradiated with solar rays for 30 min.

d) After dilution, each preparation was inoculated to 8 leaves of *N. glutinosa*. The local lesions produced were counted.

混合液にベントナイト (10 mg/ml) を加えた試料に太陽光線を 30 分間あてた。色素 (100 $\mu\text{g/ml}$) と TMV-RNA (100 $\mu\text{g/ml}$) との混合液を暗所に保ったものを対照とした。照射後、ベントナイトを加えなかった試料にはベントナイトを加え、ベントナイト (1.0 mg/ml) を含む磷酸緩衝液を用いて、TMV-RNA の濃度が 2 $\mu\text{g/ml}$ になるように希釈した後に、*N. glutinosa* の 8 枚の葉に接種を行った。その結果を Table 2 に示した。TMV-RNA においても、色素の混合と太陽光線の照射によって TMV-RNA は、ほぼ完全に不活性化され、ベントナイトを添加することによって、その不活性化は、ほぼ完全に抑制されることが、用いた 4 種の色素のすべてについて認められた。

陽光ランプの照射による色素の TMV および TMV-RNA に対する不活性化力

陽光ランプを使用して、可視光線の照射量を一定に保ち、色素による TMV の不活性化について実験を行った。色素 (200 $\mu\text{g/ml}$) と TMV (50 $\mu\text{g/ml}$) とを混合した。これと同じ濃度の色素と TMV の混合液にベントナイト (10 mg/ml) を加えた試料を作成した。試料をシャーレに入れ、陽光ランプで 60 分間照射を行った。照射後、ベントナイトを加えなかった試料には、ベントナイトを加えた。TMV の濃度が 0.2 $\mu\text{g/ml}$ になるように磷酸緩衝液を用いて希釈した。対照には、同じ濃度の TMV を用い、*N. glutinosa* に半葉法で接種を行った。4 種の色素についての結果を Fig. 3 に示した。acridine orange, neutral red, methylene blue, および gentian violet の色素は陽光ランプ

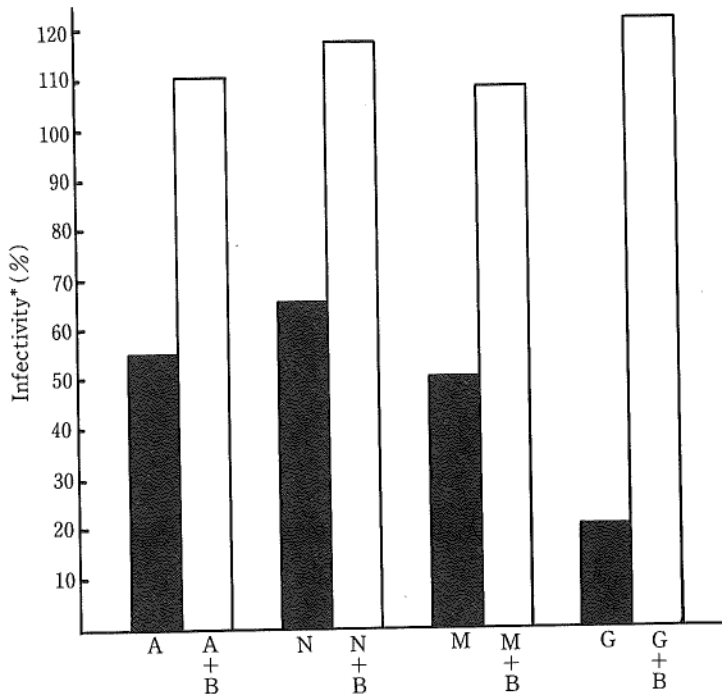


Fig. 3. The effect of bentonite on photodynamic inactivation of TMV by dyes.

A: acridine orange, N: neutral red
M: methylene blue, G: gentian violet
B: bentonite.

* TMV was mixed with dye or, dye and bentonite, and irradiated with a day-light lamp for 1 hour. The TMV preparations were inoculated to *N. glutinosa*. The total number of local lesions produced was compared with that of control.

の可視光線の照射によって TMV を不活性化し、特に gentian violet の不活性化率が、最も高かった。これらの色素の不活性化力は、ベントナイトを加えることによって完全に抑制されることが4種の色素について認められた (Fig. 3)。

TMV-RNA について、色素による不活性化を陽光ランプを用いて実験を行った。TMV-RNA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と色素 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とを混合した。これと同じ濃度の TMV-RNA と色素との混合液にベントナイト (10 mg/ml) を加えた試料を作成した。各試料に陽光ランプを用いて、可視光線を30分間照射した。照射後、ベントナイトを加えなかった試料には、ベントナイト (10 mg/ml) を加え、TRV-RNA の濃度が4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように、ベントナイト (1.0 mg/ml) を含む磷酸緩衝液を用いて希釈した。対照には、同じ濃度のベントナイトを含む TMV-RNA (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用い、*N. glutinosa* に半葉法で接種を行った。Fig. 4 には、各試料の感染力を対照に対する百分率で示した。色素を含む TMV-RNA は可視光線の照射によって強く不活性化されることが、用いた4種の色素について認められた。この不活性化の程度は TMV の場合よりも、はるかに高かった。これらの不活性化は、色素と TMV-RNA の混合液にベントナイトを加えることによって、ほぼ完全に抑制されることが認められた。

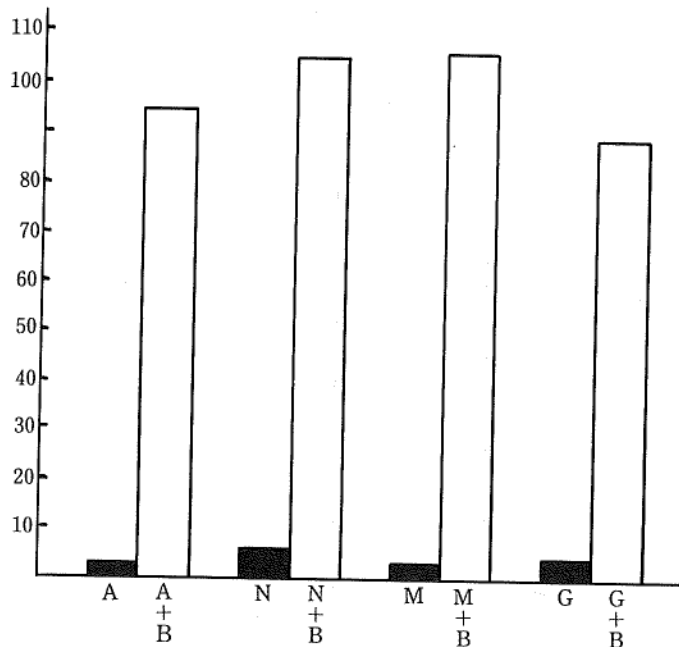


Fig. 4. The effect of bentonite on photodynamic inactivation of TMV-RNA by dyes.

A: acridine orange, N: neutral red
M: methylene blue, G: gentian violet
B: bentonite.

* TMV-RNA was mixed with dye or dye and bentonite, and irradiated with a day-light lamp for 30 min. The TMV-RNA preparations were inoculated to *N. glutinosa*. The total number of local lesions produced was compared with that of control.

色素による TMV および TMV-RNA の暗所での不活性化

高濃度の色素は、光の照射なしに、TMV あるいは TMV-RNA を不活性化するかどうか実験を

行った。前述の4種の色素を用い、TMVと色素とを、それぞれの濃度が5 mg/mlになるように暗室内で混合した。3時間後にベントナイトが10 mg/mlの濃度になるように加えて、色素の反応を止めた。写真用の安全灯の下でベントナイト(1.0 mg/ml)を含む磷酸緩衝液を用いて、TMVの濃度が0.2 µg/mlになるように希釈した。対照には、ベントナイト(1.0 mg/ml)を含む磷酸緩衝液で希釈したTMV(0.2 µg/ml)を用いた。それぞれを*N. glutinosa*に半葉法で接種を行い、生じた病斑数を数えた。この実験は4~5回行ったが、Table 3には、生じた病斑の総数を示した。暗所においても、TMVは色素によって不活性化されることが認められた。gentian violetの44%の不活性化率が最も高く、次いで、methylene blue, acridine orangeの順に低かった。neutral redでは約12%のわずかな不活性化率であった。

次に、TMV-RNAの暗所での色素による不活性化について調べた。TMV-RNA(400 µg/ml)と色素(500 µg/ml)とを混合し、3時間暗所に保った。3時間後にベントナイト(5 mg/ml)を加え、反応を止めた。暗室内の安全灯の下で、ベントナイト(1.0 mg/ml)を含む磷酸緩衝液を用いて、TMV-RNAの濃度が2 µg/mlになるように希釈した。対照には、ベントナイト(1.0 mg/ml)を含む磷酸緩衝液で希釈したTMV-RNA(2 µg/ml)を用いた。*N. glutinosa*に半葉法で接種し、感染力を比較した。実験を4~5回行った結果をTable 4に示した。acridine orange, neutral red, および methylene blueでは、10~15%の病斑数の減少がみられ、gentian violetでは、病斑数が約35%減少し、他の色素より減少率が高かった。以上のように、TMV-RNAにおいても、TMVと同様に、色素によって可視光線の照射なしに、わずかではあるが不活性化されることが認められた。

Table 3. Inactivation of TMV by dyes in the dark

Dye	Number of local lesions		
	Mixture of dye	Control	%
Acridine orange	5094	6815	74.8
Neutral red	4654	5308	87.7
Methylene blue	5369	8140	66.0
Gentian violet	2188	3934	55.6

The mixture of TMV (5 mg/ml) and dye (5 mg/ml) was incubated in a dark room for 3 hours. As a control, TMV was similarly mixed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) instead of dye solution. After dilution, the preparations were inoculated to *N. glutinosa* by the half-leaf method. The total number of local lesions produced by several repeated experiments are shown.

Table 4. Inactivation of TMV-RNA by dyes in the dark

Dye	Number of local lesions		
	Mixture of dye	Control	%
Acridine orange	4575	4970	89.4
Neutral red	2116	2456	86.2
Methylene blue	1942	2207	86.0
Gentian violet	1475	2265	65.1

The mixture of TMV-RNA (400 µg/ml) and dye (0.5 mg/ml) was incubated in a dark room for 3 hours. As a control, TMV-RNA was similarly mixed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) instead of dye solution. After dilution, the preparations were inoculated to *N. glutinosa* by the half-leaf method. The total number of local lesions produced by several repeated experiments are shown.

論 議

TMVあるいはTMV-RNAがacridine orange, methylene blue, toluidine blue, neutral red, などの色素の光力学作用 (photodynamic action) によって不活性化されることが知られている。(Chessin, 1960; Ito *et al.*, 1967; Orlob, 1963, 1965, 1967; Oster and McLaren, 1950;

Sastry and Gordon, 1966a, 1966b; Singer and Fraenkel-Conrat, 1966; Tsugita *et al.*, 1965). 同様に, alfalfa mosaic virus, cucumber mosaic virus およびそれらの核酸も色素によって不活性化されることが報告されている (Orlob, 1967). ウイルス核酸の色素に対する感受性は intact なウイルスよりも強く, また高い濃度の色素は, 光の照射なしにウイルスあるいはウイルス核酸をわずかではあるが, 不活性化することが知られている (Chessin, 1960; Hiatt *et al.*, 1960; Orlob, 1963, 1967; Wallis and Melnick, 1964). 本研究においては, acridine orange, neutral red, methylene blue, および gentian violet は, 太陽光線あるいは陽光ランプによる照射によって, TMV および TMV-RNA を不活性化させた. また, 高濃度の色素は, 暗所に保った TMV および TMV-RNA を, わずかに不活性化させ, 以前の色素の不活性化作用についての報告と一致する結果を得た.

ベントナイトは, RNase の作用を抑制する効果を有するため, ウイルスから感染力の強いウイルス核酸を分離する際, あるいはウイルス核酸の感染力を維持する目的のためにも利用されている (Singer and Fraenkel-Conrat, 1961; Fraenkel-Conrat *et al.*, 1961; Huppert and Pelmont, 1962; Hitchborn and Dunn, 1963; Sarkar, 1963). また, ベントナイトは, 多くの種類のウイルス感染阻止物質の作用を抑制することが知られている (由崎, 1980). その原因は, ベントナイトに阻止物質が吸着されるためと考えられている. ベントナイトを利用すれば, 今まで不可能であった昆虫体内のウイルスの感染力を直接検出することもできる (Yoshizaki, 1980; 由崎, 1981). 最近, Yoshizaki *et al.* (1985) は, ホップ矮化ウイロイドのキュウリ株 (HSV-C) を用い, このウイロイドの感染力は, ベントナイトの添加によって高められ, RNase によるウイロイドの不活性化は, ベントナイトによって抑制された. また HSV-C は, acridine orange, methylene blue, および toluidine blue 0 の添加と可視光線の照射によって不活性化され, この色素によるウイロイドの不活性化は, ベントナイトによって著しく抑制されることを認めている. 本研究においても, ベントナイトは, 色素の TMV および TMV-RNA に対する不活性化作用を強く抑制する効果が認められた. toluidine blue 0 などの色素は, 核酸を染色し検出するために用いられているが, これらの実験の際には, 色素の作用を軽減させるために, 光の照射をできる限り制限する必要がある. また, 色素の光力学作用による核酸の化学変化を抑制するために, ベントナイトの利用は有効な方法と考えられる.

引用文献

- Chessin, M. 1960. Photodynamic inactivation of infectious nucleic acid. *Science* 132 : 1840-1841.
- Fraenkel-Conrat, H., B. Singer, and T. Tsugita. 1961. Purification of viral RNA by means of bentonite. *Virology* 14 : 54-58.
- Hiatt, C. W., 1960. Photodynamic inactivation of viruses. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 23 : 66-78.
- Hiatt, C. W., E. Kaufman, J. J. Helprin, and S. Baron. 1960. Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue. *J. Immunol.* 84 : 470-484.
- Hitchborn, J. H. and D. B. Dunn. 1963. A potential source of error in base-ratio analysis of ribonucleic acid prepared using bentonite. *Biochem. Biophys. Acta* 68 : 139-140.
- Ito, T., T. Shiroya, K. Kubo, and J. Amagasa. 1967. Photoinactivation of acridine-sensitized tobacco mosaic virus ribonucleic acid with monochromatic light. *Current in Modern Biology* 1 : 192-195.
- Orlob, G. B. 1963. Some effects of photosensitizing dyes on three plant viruses. *Virology* 21 : 291-299.

- Orlob, G. B. 1965. Effects of photosensitizing dyes on purified tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 55 : 1070.
- Orlob, G. B. 1967. Inactivation of purified plant viruses and their nucleic acids by photosensitizing dyes. *Virology* 31 : 402-413.
- Oster, G. and A. D. McLaren, 1950. The ultraviolet light and photosensitized inactivation of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Physiol.* 33 : 215-228.
- Sarkar, S. 1963. Relative infectivity of tobacco mosaic virus and its nucleic acid. *Virology* 20 : 185-193.
- Sastry, K. S. and M. P. Gordon. 1966a. The photodynamic inactivation of tobacco mosaic virus and its ribonucleic acid by acridine orange. *Biochim. Biophys. Acta* 129 : 32-41.
- Sastry, K. S. and M. P. Gordon. 1966b. The photosensitized degradation of guanosine by acridine orange. *Biochem. Biophys. Acta* 129 : 42-48.
- Singer, B. and H. Fraenkel-Conrat. 1961. Effects of bentonite on infectivity and stability of TMV-RNA. *Virology* 14 : 59-65.
- Singer, B. and H. Fraenkel-Conrat. 1966. Dye-catalyzed photoinactivation of tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Biochem.* 5 : 2446-2450.
- Steere, R. L. 1959. The purification of plant viruses. *Advance in virus Res.* 6 : 1-70.
- Takahashi, W. N. 1951. Ultraviolet absorption as a measure of tobacco mosaic virus nucleoprotein. *Phytopathology* 41 : 142-145.
- Tsugita, A., Y. Okada, and K. Uehara, 1965. Photosensitized inactivation in the presence of riboflavin. *Biochem. Biophys. Acta* 103 : 360-363.
- Wallis, C. and J. L. Melnick. 1964. Irreversible photosensitization of viruses. *Virology* 23 : 520-527.
- 由崎俊道. 1980. タバコ・モザイク・ウイルスの感染阻止物質に関する研究. 北海道教育大学紀要 IIB 30 : 57-85.
- Yoshizaki, T. 1980. Recovery of infectious TMV from a single aphid by the use of bentonite. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46 : 464-470.
- 由崎俊道. 1981. ベントナイトの使用による昆虫体内のタバコ・モザイク・ウイルスの検出. 生物の教材 16 : 62-70.
- Yoshizaki, T., T. Sano, I. Uyeda, and E. Shikata. 1985. The effects of some chemicals on the infectivity of cucumber isolate of hop stunt viroid (cucumber pale fruit viroid). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* (投稿中).