タバコ・モザイク・ウイルス2系統の性質について

タバコ・モザイク・ウイルス2系統の性質について

由崎俊道

北海道学芸大学札幌分校生物学教室

Toshimichi Yoshizaki

On the properties of two strains of tobacco mosaic virus

Two strains of TMV which produced ordinary mosaic (o-strain) and local lesion symptoms (n-strain) on tobacco plants (White Burley and Bright Yellow) were examined in respect to the sizes of virus particles, the losses of infectivity as a rseult of dilution and heat treatment, and the interference phenomenon between two strains. The rod-shaped virus particles of about 15 mμ width and 300mμ length were similarly observed by electron microscope in two strains. There were differences in dilution end point of the viruses which showed no infectivity of the virus juice on *Nicotiana glutinosa* plants ; the juice of tobacco plants (Samsun) infected with o-strain virus did not lose infectivity as a result of dilution up to 10^6 times, but the juice of n-strain virus lost infectivity after dilution of 5×10^5 times. The n-strain virus showed less tolerance against heat treatment than o-strain virus ; o-strain virus was completely inactivated by heat treatment at 92-94°C for 10 minutes in the virus juice and by the heat treatment at 86-88°C for 10 min. in the purified virus solution. The n-strain virus was completely inactivated by heat treatment at 86-88°C for 10 min. in the virus juice and by heat treatment at 84-86°C for 10 min. in the purified virus solution. O and n-strain viruses showed the precipitation reactions when the viruses were mixed with the antiserum prepared from rabbits immunized with repeated injections of o-strain virus. The antigenicity declined in parallel with the loss of infectivity in these two strains. Interference phenomenon of o-strain virus against n-strain virus infections showed on the inoculated leaves of *N. glutinosa* plants inoculated with mixtures of both viruses, and on the inoculated leaves of tobacco plants (White Burley) when they were inoculated with n-strain virus following inoculation of o-strain virus. The interference phenomenon was promoted with the increase of the mixed virus concentrations and with the lapse of days after inoculation with o-strain virus.

I. 緒　　言

タバコ・モザイク・ウイルス（TMV）には種々の寄主植物での病徴，寄主範囲，血清学的，あるいはウイルスの物理化学的性質の差によつて分けられる多くの系統が知られているが，筆者は野外のトマトから，普通系統の TMV の感染によつて全身的なモザイク病徴を表わすタバコ（品種 White Burley, Bright Yellow,），*Nicotiana sylvestris*, *Petunia hybrida*（つくばねあさがお），などの植物に局部的な壊疽斑点のみを生ずる系統を分離した．この壊疽系統の寄主範囲，各種植物での病徴，ウイルスの増殖程度などについてはすでに報告したが（由崎1961, 1962），この壊疽系統はタバコの品種 Samsun および Xanthi，トマトなどに全身的なモザイク病徴を表わすが，菜豆の品種大手亡には感染がおこらず，普通系統の TMV とはかなり異つた感染を示した．筆者は普通系統とこの壊疽系統のウイルス粒子の形態，病汁液の稀釈試験，加熱試験，血清反態および干渉作用などについて実験を行ない，両系統のウイルスの性質について比較を行なつた．

なお，電子顕微鏡による実験に対しては多大の便宜と指導を戴いた北海道農業試験場大島信行氏に厚く感謝するとともに，この論文の作成にあたつて校閲の労をとられた北海道大学農学部植物学

教室村山大記教授に心から感謝の意を表する．

II. 実験材料および方法

実験に用いたタバコ植物は植木鉢に植え，ガラス室内で栽培した．TMV は普通系統，壊疽系統ともにタバコ(Samsun)に接種した．TMV の純化は次の方法に従つた．すなわち，罹病タバコの摩砕汁液を凍結させ，室温にて溶解後，遠心分離(3500 rpm, 30分) した上清に硫酸アンモニウムを $^1/_4$ 飽和になるように加え，遠心分離を行なつた沈渣に燐酸緩衝液 (pH 6.8) を加えてウイルスを遊離せしめ，さらに遠心分離(3500 rpm, 20 分)を行なつて狭雑物を沈澱除去した．この操作を2回反復した後，$^1/_{10}$ N の HCl を滴下して pH 3.3 の等電点とし，さらに遠心分離 (3500 rpm, 30分) を行なつて生じた沈渣を原汁液と等量の燐酸緩衝液(pH 6.8) に溶解し，さらに遠心分離を行なつて不溶性の物質を除去した液をウイルス原液とした．2系統ともに，ウイルス液の病原性は *Nicotiana glutinosa* の葉に接種を行なつて生じた壊疽斑点数によつて定めた．接種は摩擦法を用い加熱殺菌したガーゼにウイルス液をつけ．葉の表面を軽くこすつて接種を行なつた．ウイルス粒子の観察には北海道農業試験場病理研究室の日立 HF5 型電子顕微鏡を用いた．コロジウム膜にウイルス試料をのせ，真空ポンプで急速に乾燥させ，15 mg クロームを用いて shadowing を行ない，電子顕微鏡で観察した．粒子の幅および長さの測定は直接倍率12,000倍に拡大したウイルス粒子を乾板に撮影し，さらに写真用引伸機で5倍に拡大して実測した．加熱処理の場合は両端にゴム栓をしたガラス細管にウイルス液を入れ，所望温度の湯槽に10分間浸漬した後直ちに冷却し，各処理ウイルス液を *N. glutinosa* の葉に接種を行なつて生ずる壊疽斑点数から病原性の変化をしらべた．抗原性は純化した普通系統の TMV を家兎に連続注射して得た抗血清とウイルス液とを混合し，生ずる沈降反応から定めた．沈降反応は直径 0.8cm, 長さ 8cm の小試験管に階段稀釈した抗血清を 0.25ml ずつ入れ，次いでウイルス液を 0.25ml ずつ加えて軽く振盪し，37°C 湯槽中に2時間浸漬して，生ずる沈降反応の結果を読んだ．

III. 実験結果

A. 粒子の形態

電子顕微鏡のウイルス試料には，普通系統および壊疽系統ともに罹病汁液を凍結融解後遠心分離 (3500 rpm, 20分) を行なつて狭雑物を沈澱除去をした液を用いた．ウイルス粒子は 12000 倍に拡大して観察したが，その結果は写真に示すように，普通系統，壊疽系統ともに幅約 15 mμ の TMV の典型的な桿状の粒子が観察され，ウイルス粒子の長さは，各系統とも 400ケ以上の粒子について長さを実測し，各長さの粒子数の比を第1および2図に示した．2系統とも，長さ 300mμ 附近の粒子が最も多く認められ，普通系統と壊疽系統とも同一形態を示し，系統間に差は認められなかつた．

第1表　稀釈試験

稀釈倍数	壊疽斑点数	
	普通系統	壊疽系統
10^3	140	47
10^4	82	20
10^5	10	2
5×10^5	6	0
10^6	1	0

N. glutinose 各12葉に接種

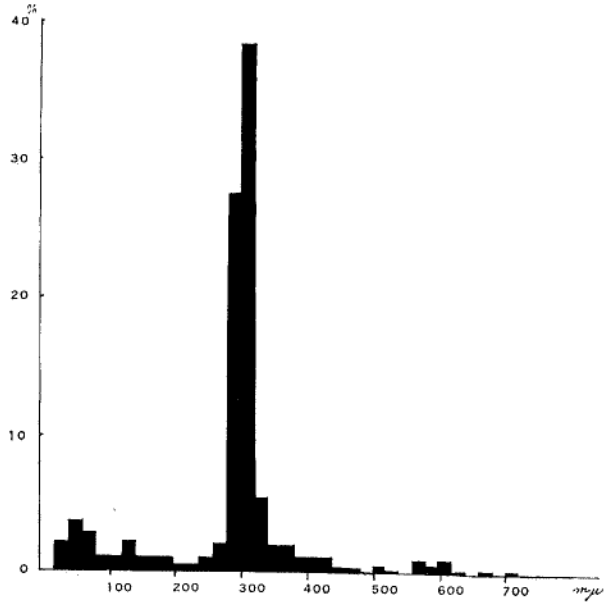
B. 稀釈試験

2系統の稀釈限界を知るために，感染させた Samsun タバコの汁液を燐酸緩衝液 (pH 6.8) で 10^3, 10^4, 10^5, 5×10^5 および 10^6 倍に稀釈し，各液を *N. glutinosa* の12枚の葉に接種を行ない．生ずる壊疽斑点数から病原性をしらべた．その結果を第1表に示したが，普通系統の汁液においては

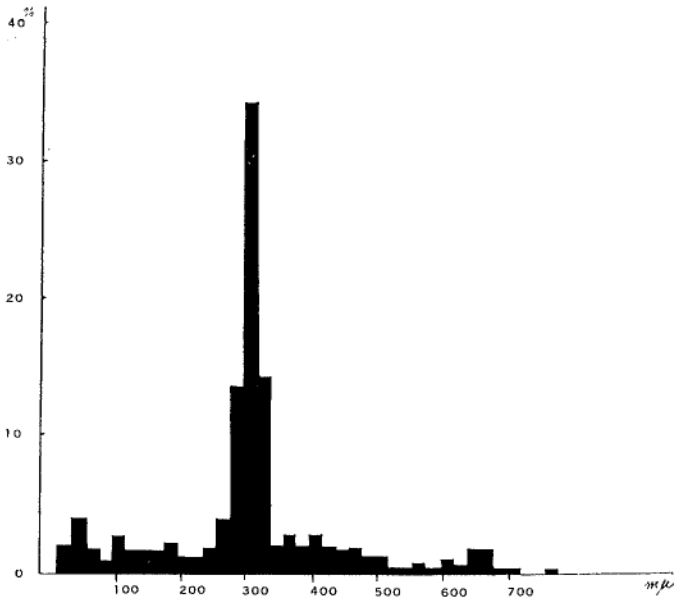
普通系統 TMV の粒子

壊疽系統 TMV の粒子

第 1 図　普通系統 TMV 粒子の長さ



第 2 図　壊疽系統 TMV 粒子の長さ



10^6 倍に稀釈しても僅かながら病原性が認められ，壊疽系統においては 5×10^5 倍の稀釈ですでに病原性を失つた．

C. 加　熱　試　験

加熱処理は 2 重のガーゼで濾過したウイルス汁液，その汁液を遠心分離（3500 rpm, 15 分）を行なつて狭雑物を沈澱除去した液，および純化したウイルス液の 3 種の試料について行なつた．加熱処理したウイルス液を *N. glutinosa* の 12枚の葉に接種を行ない病原性をしらべた．それらの結

第2表　ウイルス汁液（ガーゼにて濾過）の加熱処理

処理温度	壊疽斑点数	
	普通系統	壊疽系統
94°C	0	0
92	2	0
90	136	0
88	649	6
86	737	53
84		292
82		386
80		586
78		580
無処理	1152	954

N. glutinose 各葉に接種

第3表　ウイルス汁液（3500 rpm, 15分遠心分離）の加熱処理

処理温度	壊疽斑点数	
	普通系統	壊疽系統
94°C	0	0
92	2	0
90	3	0
88	44	0
86	280	2
84	303	12
82	412	160
80	448	226
78	497	288
74	—	444
無処理	763	645

N. glutinose 各12葉に接種

第4表　純化したウイルス液の加熱処理

処理温度	壊疽斑点数	
	普通系統	壊疽系統
90°C	0	0
88	0	0
86	1	0
84	206	1
82	690	1
80	778	29
78	1004	388
無処理	1107	884

N. glutinose 各12葉に接種

果は第2，3，および4表に示した．これらの表に示すごとく，普通系統においてはガーゼで濾過したウイルス汁液および遠心分離を行なつて狭雑物を除去した汁液ともに92～94°C 以上の加熱処理で病原性を失つたが，壊疽系統においては，ガーゼで濾過したウイルス液では 90°C 以上，遠心分離した汁液では 88°C 以上の加熱処理で病原性を失つた．純化したウイルス液では両系統ともに不活性化温度は低く，普通系統では 88°C 以上，壊疽系統では 86°C 以上の加熱処理で完全に病原性を失つた．

D.　血　清　反　応

遠心分離を行なつて狭雑物を除いたウイルス汁液を血清反応の試験に用いた．ウイルス汁液は加熱処理後さらに遠心分離を行なつて不純物を沈澱除去した液をウイルス抗原に用い，対照には無処理のウイルス汁液を用いた．抗血清は食塩水で階段稀釈を行ない，その各々の抗血清にウイルス液を混合して生ずる沈降反応をしらべた．2系統の沈降反応の結果を第5および6表に示したが，2系統とも対照においては明らかな沈降反応が認められ，さらに，普通系統においては 88°C 以下の温度で加熱処理を行なつたウイルス液では沈降反応が認められ，壊疽系統においては，84°C 以下の温度で加熱処理を行なつたウイルス液で沈降反応が認められた．両系統ともに加熱処理によつて病原性を失つたウイルス汁液では血清反応は認められなかつた．

干　渉　作　用

1)　混合接種：普通系統はタバコの品種 White Burley の接種葉に明らかな病徴を表わさないが，壊疽系統はその接種葉に壊疽斑点を表わす．壊疽系統と普通系統とを混合して White Burley の葉に接種することによつて，普通系統の干渉作用による壊疽系統の病斑数の減少がおこるかどうか実験を行なつた．この実験にはすべて純化したウイルス液を用いたが，原液および燐酸緩衝液で10倍に稀釈した壊疽系統のウイルス液に，原液，燐酸緩衝液（pH 6.8）で10倍および100倍に稀釈した普通系統

第5表　加熱 TMV の血清反応（普通系統）

処理温度	抗血清終末稀釈倍数					対照
	16	32	64	128	256	
無処理	++	++	++	+	+	−
94°C	−	−	−	−	−	−
92	−	−	−	−	−	−
90	±	−	−	−	−	−
88	+	+	±	−	−	−
86	++	++	+	+	+	−
84	++	++	+	+	+	−
82	++	++	+	+	+	−
80	++	++	++	+	+	−
78	++	++	++	+	+	−
74	++	++	++	+	+	−

第6表　加熱 TMV の血清反応（壊疽系統）

処理温度	抗血清終末稀釈倍数					対照
	16	32	64	128	256	
無処理	++	++	+	±	±	−
94°C	−	−	−	−	−	−
92	−	−	−	−	−	−
90	−	−	−	−	−	−
88	−	−	−	−	−	−
86	−	−	−	−	−	−
84	+	±	−	−	−	−
82	+	+	±	±	−	−
80	++	+	+	±	−	−
78	++	++	+	+	±	−
74	++	++	+	+	±	−

第7表　混合接種による干沙作用

壊疽系統 TMV ＼ 普通系統 TMV	原液			10倍数		
	混合	対照	対照に対する百分率	混合	対照	対照に対する百分率
原液	731	1294	56.5	103	556	18.5
10倍液	1439	1608	89.5	403	770	52.3
100〃	1047	1174	89.2	180	223	80.7

のウイルス液を各々等量加えた．各混合液を White Burley の16葉の半面に接種を行ない，他の半面には対照として普通系統のウイルス液の代りに燐酸緩衝液（pH 6.8）を等量加えた壊疽系統のウイルス液を接種した．各半葉に生じた壊疽斑点の総数を第7表に示した．第7表の結果から，普通系統のウイルスを混合することによつて壊疽系統の壊疽斑点数は明らかに減少し，混合した普通系統の濃度が高まるにつれて壊疽斑点数の減少率は高まつた．

2)　普通系統接種後に壊疽系統を接種：White Burley の葉の半面に普通系統のウイルスを接種し，他の半面には対照として燐酸緩衝液（pH 6.8）をウイルス接種と同様に処理し，1, 3, 5, 7および9日後に葉の全面に壊疽系統のウイルスを接種した．各半葉に生じた壊疽斑点数を第8表に示

写真説明：左側半面に普通系統 TMV を接種し，9日後に葉全面に壊疽系統 TMV を接種した．その結果，普通系統 TMV を予め接種した部分には壊疽系統による斑点は生じなかつた．

したが，普通系統接種後の日数が増すにつれて生ずる壊疽斑点数は減少し，普通系統のウイルスの増殖が進むにつれて干渉作用は増大した．

IV. 考察および結論

この実験に用いた2系統の TMV は数種の植物上で異つた病徴を表わしたが（由崎1961，1962），

第8表　普通系統ウイルス接種葉での干渉作用

普通系統接種後の経過日数	壊疽斑点数		対照に対する百分率
	普通系統TMVの接種葉	対照	
1	612	790	77.5
3	363	1119	32.4
5	41	631	6.5
7	27	681	4.0
9	6	411	1.5

ウイルス粒子は2系統ともに幅 15 mμ の桿状の粒子が観察され，長さは 300 mμ 附近の粒子が最も多く，Kausche ら(1939)の報告以後多くの研究者によつて認められたと同様の典型的な TMV の粒子が観察された．TMV の粒子の形態は系統によつて差がないことはすでに報告されているが (Knight and Oster 1947, Takahashi and Rawlins 1947)，この実験においてもウイルス粒子の形態は系統間に差はなかつた．TMV の稀釈限度は 10^6 倍とされているが，この実験においても普通系統のウイルス汁液を 10^6 倍に稀釈した液において僅かながら病原性が認められた．しかし，壊疽系統においては 5×10^5 倍の稀釈ですでに病原性を失い，普通系統の稀釈限度との間に差が認められた．加熱試験においては，加熱温度が高まるにつれて病原性は減退し，さらにウイルス粗汁液と純化したウイルス液とでは不活性化温度が異つた．普通系統のウイルスにおいては粗汁液を用いた場合92～94°C の加熱処理で病原性を失い，純化したウイルス液では 86～88°C の加熱処理で病原性を失つた．壊疽系統においては粗汁液では 86～88°C，純化したウイルス液では 84～86°C の加熱処理で病原性を失つた．以上壊疽系統の不活性化温度は普通系統に比べて低かつた．ウイルスの類縁関係の判定に血清学的な方法が用いられるが (Chester 1935, 1937 : Bawden 1950)，この実験においては，2系統ともに普通系統で作つた抗血清と沈降反応を示し，系統間の差は認められなかつた．さらに2系統とも加熱処理による病原性の消失とともに抗原性をも失つた．また，TMV の系統間に干渉作用のあることは McKinney (1929)，Thung (1931)，および Kunkel (1934) などにより古くから知られているが，壊疽系統に普通系統を混合して接種することによつて，壊疽系統の感染力は干渉され，壊疽斑点数は減少した．さらに混合した普通系統のウイルス濃度比を高めるにつれて干渉効果は増大した．さらに普通系統の接種後一定日数経過後に壊疽系統を接種した場合には，普通系統接種後の経過日数が増すにつれて壊疽系統により生ずる壊疽斑点数は減少し，普通系統のウイルスの増殖が進むにつれて干渉効果は増大すると考えられる．干渉作用はウイルス類縁関係の判定に利用されるが，干渉効果の結果は血清反応の結果と一致している例が多い (Kunkel 1934, Matthews 1949, Thung 1931)．この実験においても血清反応によつて類縁関係のあることが認められ，さらに干渉効果も認められた．

引　用　文　献

1. Bawden, F. C. (1950) : Plant viruses and virus diseases, 3rd. ed.; Chronica Botanica.
2. Chester, K. S. (1935) : Serological evidence in plant-virus classification. Phytopath. 25 ; 686—701.
3. …… (1937) : Serological studies of plant viruses. Ibid. 27 ; 903—912.
4. Kausche, G. A., E. Pfankuch und H. Ruska (1939) : Die Sichtbarmachung von pflanzlichen Virus im Ubermikoskop. Naturwiss. 27 ; 292—299.
5. Knight, C. A. and G. Oster (1947) : The size of the particles of some strains of tobacco mosaic virus as shown by the electron microscope. Arch. Biochem. 15 ; 289—294.
6. Kunkel, L. O. (1934) : Studies on acquired immunity with tobacco and aucuba mosaic. Phytopath. 24 ;

437-466.

7. Matthews, R. E. F. (1949) : Studies on potato virus X. Types of changes in potato virus X infections. II. Criteria of relationships between strains. Ann. Appl. Biol. 36 ; 448-474.
8. McKinney, H. H. (1929) : Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. Jour Agr. Res. 39 ; 557-578.
9. Thung, T. H. (1931) : Smetstoff en plantencel bij enkele virus-ziekten van de tabaksplant. Nandel. Nederl. Ind Naturw. Congr. 6 de 1931 ; 450-463. (R.A. M., 11, 750, 1932)
10. Takahashi, W. N. and T. E. Rawlins (1947) : An electron microscope study of mutation in tobacco mosaic virus. Phytopath. 37 ; 73-76,
11. 由崎　俊道 (1961) : タバコモザイクウイルス3系統の寄主植物について (講演要旨) 日植病報 25 ; 234.
12. ＿＿＿＿＿ (1962) : タバコモザイクウイルス3系統の寄主植物について. 北学大紀要2部, 13巻, 1号 : 1～14