

新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第2報) ダイズモザイクウイルスの精製と血清試験

小島 誠・高野直行・原沢良栄*・藤巻雄一*

Makoto KOJIMA, Naoyuki TAKANO, Ryohei HARASAWA* and Yuichi FUJIMAKI*:

Studies on soybean virus diseases in Niigata Prefecture

(2) Purification and serology of soybean mosaic virus

Summary

Soybean mosaic virus (SMV) was purified by extraction with 0.3 M phosphate buffer containing 0.01 M DIECA, being followed by clarification with a chloroform and *n*-butanol mixture, concentration with 6% PEG, 2 cycles of differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation (SDG). Sonication against the partially purified preparations before SDG, was useful to avoid virus aggregation. Antiserum to SMV was obtained by 2 intramuscular and 3 interveinal injections of the purified preparations. It had a titre of 1/512 (ring interface tests). A combination of γ -globulin (2 μ g/ml) and its 500-fold diluted conjugate was found to be the optimum condition for ELISA. Under this condition, viral antigens were easily detected by ELISA in leaf materials of plants naturally infected with SMV and also in some parts of their immature seeds.

近年、新潟県においても転換畑の増加に伴い、ダイズ栽培が以前に比べて増加の傾向にある。それに伴いダイズの収量・品質に影響を及ぼすウイルス病の問題が浮上してきている。特にウイルス感染との関連で議論されている褐斑粒の発生は紫斑病とともに品質低下の原因として重要な問題となってきた。現在までわが国のダイズ褐斑粒とのかかわりで論じられているウイルスにダイズモザイクウイルス (SMV)、ダイズ萎縮ウイルス (SV) が知られているが^{2,4,7}、この両ウイルスを含めて新潟県におけるダイズの病原ウイルスについての実態はほとんど不明である。本研究では先づ SMV の発生実態を把握するため、また SMV と褐斑粒発生との関係をより明確にするため血清学的診断法のひとつである酵素抗体法 (ELISA) の応用の可否を調べてみた。SMV-B 系統を分譲下さった飯塚典男氏 (北海道農試)、ダイズ種子を分譲下さった番場宏治氏 (北海道中央農試) にお礼申し上げる。

材料及び方法

1 供試ウイルスと植物

本試験には SMV-B 系統 (北海道農業試験場より分

譲) を用い、ダイズ品種十勝長葉 (北海道中央農業試験場より分譲) で増殖維持した。罹病葉は -20°C で凍結保存した。

2 ウイルスの精製

精製は Iwai and Wakimoto³⁾ の方法に改良を加えた方法に依った。罹病凍結葉に 3 倍量の 0.3 M リン酸緩液 (0.01 M DIECA を含む, pH7.0) を加えブレンダーで破碎したのち乳鉢で更に磨碎した。粗汁液をクロロホルム、*n*-ブタノール (1:1 混合液) 処理したのち遠心分離により水相を得る。それにポリエチレングリコール (PEG#6000) を加えウイルスを濃縮した。濃縮液を 2 回反復の分画遠心により部分精製したのち、最終的にしよ糖濃度勾配遠心法により精製した。PEG による濃縮段階までは高速遠心機 (日立 PR-52, RPR12-2 ローター)、以後の操作は超遠心機 (日立 55 P-72, RP40 ローター, SRP28SA ローター) を使用した。しよ糖濃度勾配遠心にかかる前に部分精製試料は予め超音波処理 (UR-200P, トミー精工) を施した。

3 電顕観察

ウイルス試料はカーボン蒸着したホルムバル支持膜 (400 メッシュ 銅グリッド使用) にとり、2% リンタングステン酸 (pH5.5) でネガティブ染色し、電顕 (JEOL 100 B, 80KV) で観察した。

4 抗血清の作成と ELISA 試験

新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-21

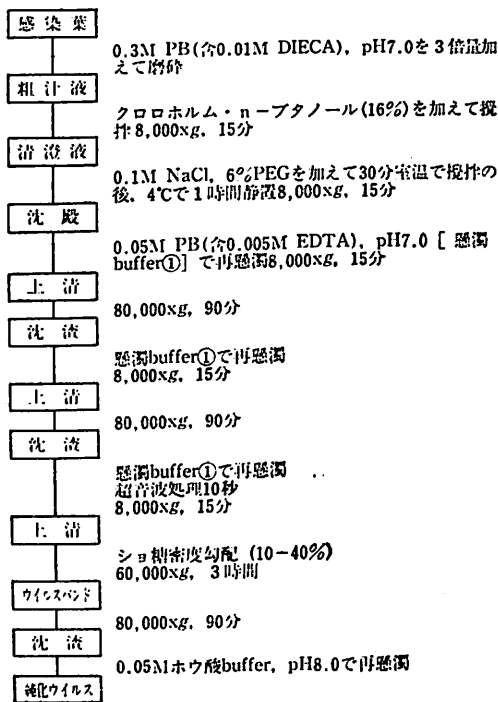
*新潟県農業試験場 Niigata Agricultural Experiment Station, Nagaoka 940

純化ウイルス標品 (約100 μ g/ml) を用い、2回の筋肉 (フロント完全アジュバント使用) と3回の静脈注射を家兎に施し、最終免疫10日後に全採血した。定法により抗血清をとり、0.1%アジ化ナトリウムを添加し4°Cで保存した。抗血清からの γ -グロブリンの抽出、酵素結合抗体 (コンジュゲート) はClark and Adams 1)の方法に従い作成した。酵素はアルカリフォスファターゼ (Sigma type VII) を用いた。反応にはポリスチレンマイクロプレート (Dynatech 社) を使用し、結果の判読はマイクロプレート光度計 (MTP-12型, コロナ社) によった。

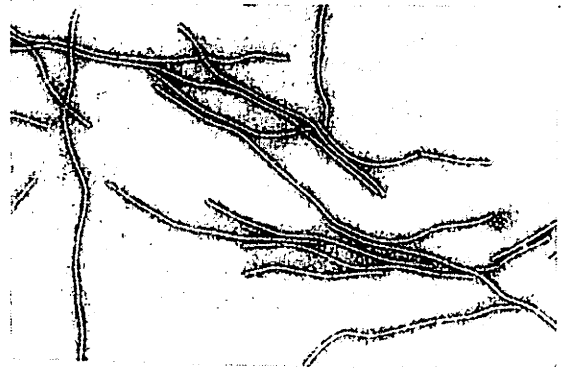
結 果

1 ウイルスの精製

ウイルスの抽出、濃縮等につき種々検討を加え第1図に示す純化法を確立した。この方法によって得られた標品を電顕観察したところ、長さ700~800nmの均一なひも状粒子が観察され、挟雑物はほとんど認められなかった (第2図)。また紫外外部吸収を測定したところ波長260nmに極大をもち290nmにショルダーを有するPotyvirus群に特有なスペクトルが得られた。ウイルス収量は罹病葉100gから約100 μ gであった。



第1図 SMV純化手順



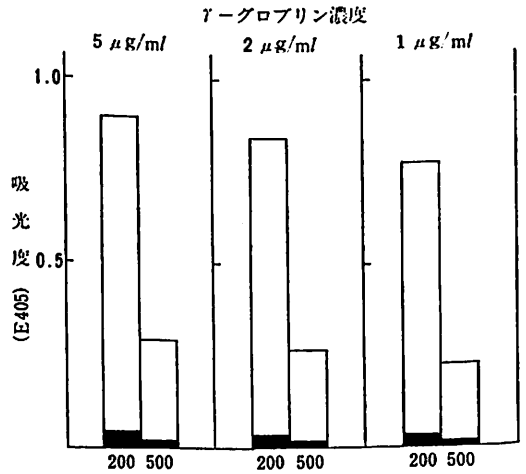
第2図 SMV純化標品の電顕像 (PTA染色) 47,200倍

2 抗血清の力価

材料及び方法で述べた免疫スケジュールで得られた抗血清の力価を純化ウイルス標品を抗原として重層法で測定したところ、1/512であった。本血清から γ -グロブリンを抽出し、以下のELISA試験に供した。

3 ELISAの至適条件

SMV罹病ダイズ及び健全ダイズ葉 (対照区) を各々20倍量のPBS-tween液で磨砕し、低速遠心後その上清を抗原として γ -グロブリン、コンジュゲートの種々の希釈度の組み合わせで至適条件を検討した。条件の決定には基質 (p-ニトロフェニルりん酸) 添加後、60分で反応を停止させた場合の健全区の吸光値 (E405) が0.05以下で、感染葉との吸光値の差が0.20以上になる γ -グロブリンの濃度とコンジュゲートの希釈倍数の組合せを一応の目安と考えた。各組み合わせの一例を第3図に示したが、上記の条件を満すものとして、 γ -グロブリン2 μ g/ml、コンジュゲート500倍を至適条件とした。



第3図 ELISAの至適条件
□感染葉 ■健全葉

4 ELISA による SMV の検定の試み

新潟県下から採集されたモザイク株 (疑似株も含む) からの葉組織を用い、上記至適条件で検定を試みた。67 株中 8 株からの試料が ELISA により陽性と判断された。因みに同一株からの試料を電顕による粒子観察、インゲン (Top-Crop) による生物検定を併行させた結果、各々 7 株、9 株が陽性と判断された。このように検定法により結果に若干のくい違いが生じた。

5 同一個体内の部位別ウイルス濃度の比較

川西町橋の圃場で採集した典型的なモザイク株 (ユキワリマメ) につきその上位・中位・下位の 3 段階に区切り、各々の葉と未熟種子 (莢・種皮・胚・子葉) について ELISA 検定してみた。第 1 表に示すように、葉からはほぼ同レベルの高い吸光値が得られた。未熟種子につ

第 1 表 ELISA による同一個体の部位別 SMV 濃度の比較

部 位	葉	未 熟 種 子			
		種 皮	胚	子 葉	莢
上 位	0.668 ¹⁾	0.072	0.017	0.008	0.026
中 位	0.596	0.020	0.508	0.655	0.016
下 位	—	0.037	0.547	0.634	0.016

¹⁾ E405 の吸光値

いては中・下位の胚・子葉からもウイルス抗原が検出された。このことから ELISA により葉組織のみならず、未熟種子についてもウイルス抗原が検定可能であることがわかった。しかし、同一個体内においても、種子についてはその部位によってウイルス抗原の濃度に差があること (ウイルスの分布の不均一性) が判明した。

考 察

良質の抗血清を得るためには抗原性を損うことなくいかに純度の高い抗原を得るかにかかっている。SMV をはじめとするひも状粒子からなる Potyvirus の精製で最も重要なことは精製の過程でいかに粒子の凝集を防ぐかである⁶⁾。そのため従来から還元剤、キレート剤、尿素などが使用されている⁸⁾。本実験では清澄・濃縮段階で EDTA の使用と部分精製試料を短時間超音波処理することによりその目的を達することができた。得られた抗血清は力価の点で決して高いものではなかったが、それから得られた γ -グロブリン、コンジュゲートを用いて充

分に ELISA によってウイルス抗原が検出し得ることが明らかとなった。一般圃場からの検体につき従来の生物検定、電顕による dip 法と比較するため ELISA を行ったが、一部のくい違いを除きほぼその診断結果は一致した。時間、設備等を考慮すると ELISA は簡便で感度が高いことから SMV の検定にも有用と考えられる。ダイズ種子からの SMV 検出に ELISA が米国で既に試みられている⁵⁾ が、本実験からも ELISA は SMV の種子伝染機構、褐斑粒発生機構の解明に有効な情報を提供してくれるものと期待される。

摘 要

1 凍結罹病葉組織に 0.3 M リン酸緩衝液 (0.01M DIECA を含む) を加え磨砕抽出後、クロロホルム・ブタノールで清澄化し、6% PEG による濃縮、2 回反復の分画遠心、しょ糖濃度勾配遠心によりウイルスを精製した。部分精製標品に対する超音波処理はウイルス粒子の凝集防止に有効であった。

2 精製標品を用い 2 回の筋肉注射と 3 回の静脈注射により力価 1/512 (重層法) のウサギ抗血清を得た。

3 ELISA の条件としてコーティング用の γ -グロブリンは 2 $\mu\text{g/ml}$ 、コンジュゲートは 500 倍希釈を至適条件とした。

4 一般圃場からのダイズ試料 67 検体を ELISA で検定したところ 8 株が陽性と判断された。同一株についての dip 法、インゲンによる生物検定の結果は各々 7 株、9 株が陽性であった。

引 用 文 献

1) Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) J. gen. Virol. 34: 475~483. 2) 飯塚典男 (1973) 東北農試研報 46: 131~141. 3) Iwai, H. and Wakimoto, S. (1985) 日植病報 51: 465~474. 4) 越水幸男・飯塚典男 (1963) 東北農試研報 27: 1~103. 5) Lister, R.M. (1978) Phytopathology 68: 1393~1400. 6) Shepherd, R.J. and Pound, G.S. (1960) Phytopathology 50: 797~802. 7) 高橋幸吉・田中敏丸・飯田格・津田保昭 (1980) 東北農試研報 62: 1~130. 8) Uyeda, I., Kojima, M. and Murayama, D. (1975) 日植病報 41: 192~203.

(1987年 8月 21日 受領)