

## オオムギ黄萎ウイルスの媒介虫体内における存在様式

工藤 暢宏・小島 誠

Nobuhiro KUDO and Makoto KOJIMA: The fate of barley yellow dwarf virus in its aphid vector, *Rhopalosiphum padi*

## Summary

An ultrastructural research was conducted by using an aphid species *Rhopalosiphum padi* fed on barley yellow dwarf virus (BYDV 805) -infected plant to determine the site and cellular mechanism involved in the transcellular movement of the virus. Virus-like particles were found in the gut lumen, the hindgut cells, and the accessory salivary gland of viruliferous aphids. Virus particles were consistently associated with cell membranes of hindgut and accessory salivary gland of the aphids. Tubular vesicles and endosomes containing virus particles occurred in the cytoplasm of hindgut cells and accessory salivary gland cells. Occurrence of virions adsorbed to the hindgut apical membranes and the membrane invaginations of basal membrane of accessory salivary gland suggested that the virions entered into these cells by endocytosis.

1980年5月、新潟県長岡市の圃場において、オオムギに著しい黄萎萎縮症状を呈する病害が発生した<sup>5)</sup>。その後の研究によって、本病害がオオムギ黄萎ウイルス (Barley yellow dwarf virus, BYDV) に起因するものであることが明らかになった。

BYDV は、世界的に広く分布する一般的な植物ウイルスのひとつであり、ムギ類をはじめとするイネ科植物に感染し多大な被害を及ぼす<sup>6,7)</sup>。現在までのところ、我が国の穀物生産における BYDV の実質的被害は、不明である。しかしながら、今後、我が国においても、水田再編利用の一環としてムギ類の作付面積が増大するにしたがって、BYDV が広く蔓延する可能性も懸念される。

BYDV は、直径約 25nm の小球形粒子でルテオウイルス群のタイプメンバーであり、ムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) などのアブラムシによって永続的に循環型で媒介される<sup>3,7)</sup>。BYDV の伝搬には高度な媒介虫特異性があり、自然界ではアブラムシによってのみ媒介されるためアブラムシの行動・生態が BYDV の伝搬様式を研究する上での焦点となっている<sup>7,8)</sup>。しかし、BYDV が媒介虫体内に獲得され、アブラムシの体内を移行・循環し、再び体外へ放出される細胞レベルの機構は十分解明されていない<sup>1,2)</sup>。そこで、本研究の目的は、媒介アブラムシ体内における BYDV の存在様式を解明するとともに、その体内移行に直接関与する特異的部位を明らかにすることである。

## 材料及び方法

## 1. 供試ウイルス

本研究に供試したウイルス分離株 (BYDV 805) は、1980年5月新潟県長岡市において圃場より分離したものである<sup>5)</sup>。この分離株を、ムギクビレアブラムシによって第一本葉展開時のオオムギに接種し、約3日間の接種吸汁を行った。その後、2~3週間生育させ病徴の発現を確認し、これをウイルス源とした。

## 2. 供試アブラムシ

ガラス室内で、健全オオムギ葉上においてムギクビレアブラムシのコロニーを維持した。無毒のアブラムシを BYDV 罹病オオムギ上に移し、少なくとも10日間吸汁させ続けたのち、電子顕微鏡観察のための試料とした。

## 3. 組織の固定・包埋

本研究では、細胞内のウイルス粒子とリボゾームとの混同を避けて、ウイルスの検出を容易にするため、固定の過程で RNA 分解酵素 (RNase) 処理を行い、組織のリボゾームを消化した<sup>4)</sup>。また、RNase 処理を行わない従来の固定・包埋方法も、これと併行して行った。

保毒アブラムシ、また、対照試料として無毒アブラムシをそれぞれ解剖し、唾液分泌器官と消化管を摘出して、2.5% グルタルアルデヒドで12~16時間固定した。そして、リン酸緩衝液 (pH 7.2) で軽く洗った後、SSC 緩衝液 (0.15M 塩化ナトリウム, 0.01M クエン酸ナトリウム, pH 7.2) を用いて組織を6~7時間洗浄してから、RNase 処理 (RNase 「Sigma社」 2.0 $\mu$ g/ml, 25°C, 16

時間)を施した。それから、SSC とリン酸緩衝液で組織を洗い、2% OsO<sub>4</sub> で後固定(4 °C, 2時間)して、3% 酢酸ウランでブロック染色した。アセトン脱水後、Sppur 低粘性エポキシ樹脂に包埋、70°C、約16時間重合させた。

4. 電子顕微鏡観察

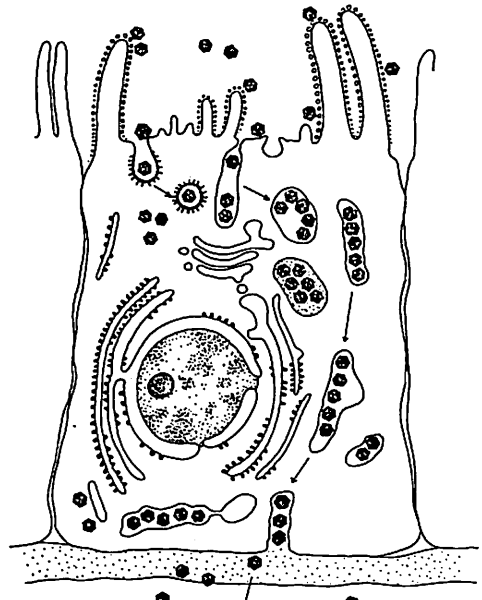
ガラスナイフを装着した Um4 ウルトラミクローム (Reihert 社) を用いて、包埋試料から超薄切片を作製した。切片をホルムバール支持膜を張ったグリッドに載物し、酢酸ウランと Reynolds 鉛で染色して、電子顕微鏡 (JEM-100B) 観察した。

結果及び考察

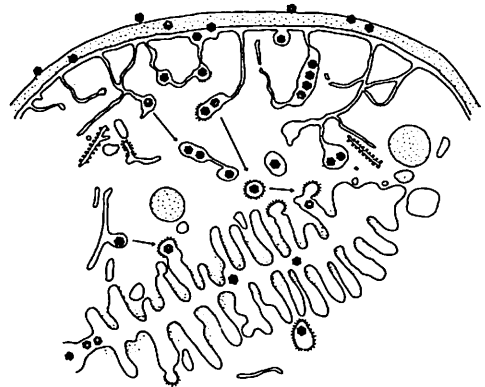
RNase 処理を固定の過程で組織に施すことによって、細胞内のリボソームはほぼ安全に消化され、ウイルス粒子の検出が容易になった。酵素処理によって、従来の方法では検出が、極めて困難であった細胞質中に散在する僅かなウイルス粒子でさえも、観察することができた。特に、この方法は、非常に多くのリボソームを含んでいる唾液分泌細胞からウイルスを検出する場合に、不可欠の手段と考えられる。

直径約 25nm の小球形のウイルス様粒子が、BYDV 感染オオムギを吸させたアブラムシから観察された。しかしながら、健全オオムギを吸させたアブラムシから同様な粒子は検出されなかった。消化管の観察においては、ウイルス粒子が後腸上皮細胞でのみ特異的に観察され、前腸及び中腸の細胞では観察されなかった。しかしながら、粒子の直径、形状、染色特性から BYDV であると思われるウイルス様粒子が中腸、後腸の内腔に遊離の状態で見られる。ウイルス粒子は、後腸の頂部細胞膜に近接した領域で頻りに観察され、ウイルス粒子が単独あるいは複数で細胞膜の陥入部に吸着していた (図版 I-a)。これらのことは、ウイルスが後腸細胞に侵入する際に、細胞の本来もっているエンドサイトーシスの機構を利用していることを示唆する。また、細胞質中でウイルス粒子を含んだ管状の小胞がしばしば観察され (図版 I-b)、血体腔に面した基底膜からウイルスが放出されることを示唆する電子顕微鏡像も得られた (図版 I-c)。後腸上皮細胞から血体腔へと放出される機構は明らかではないが、おそらく、エクソサイトーシス類似の機構で細胞外に放出されるものと考えられる。

唾液分泌腺及び隣接する食道下神経節において、ウイルス粒子は、副唾腺細胞でのみ観察され、それ以外の器官 (主唾腺、食道下神経節) では観察されなかった。ウイルス粒子は、副唾腺細胞の基底膜陥入部で最も頻りに観察された (図版 I-d)。また、基底膜陥入部の先端が小胞化して、その内部に取り込まれたウイルス粒子が



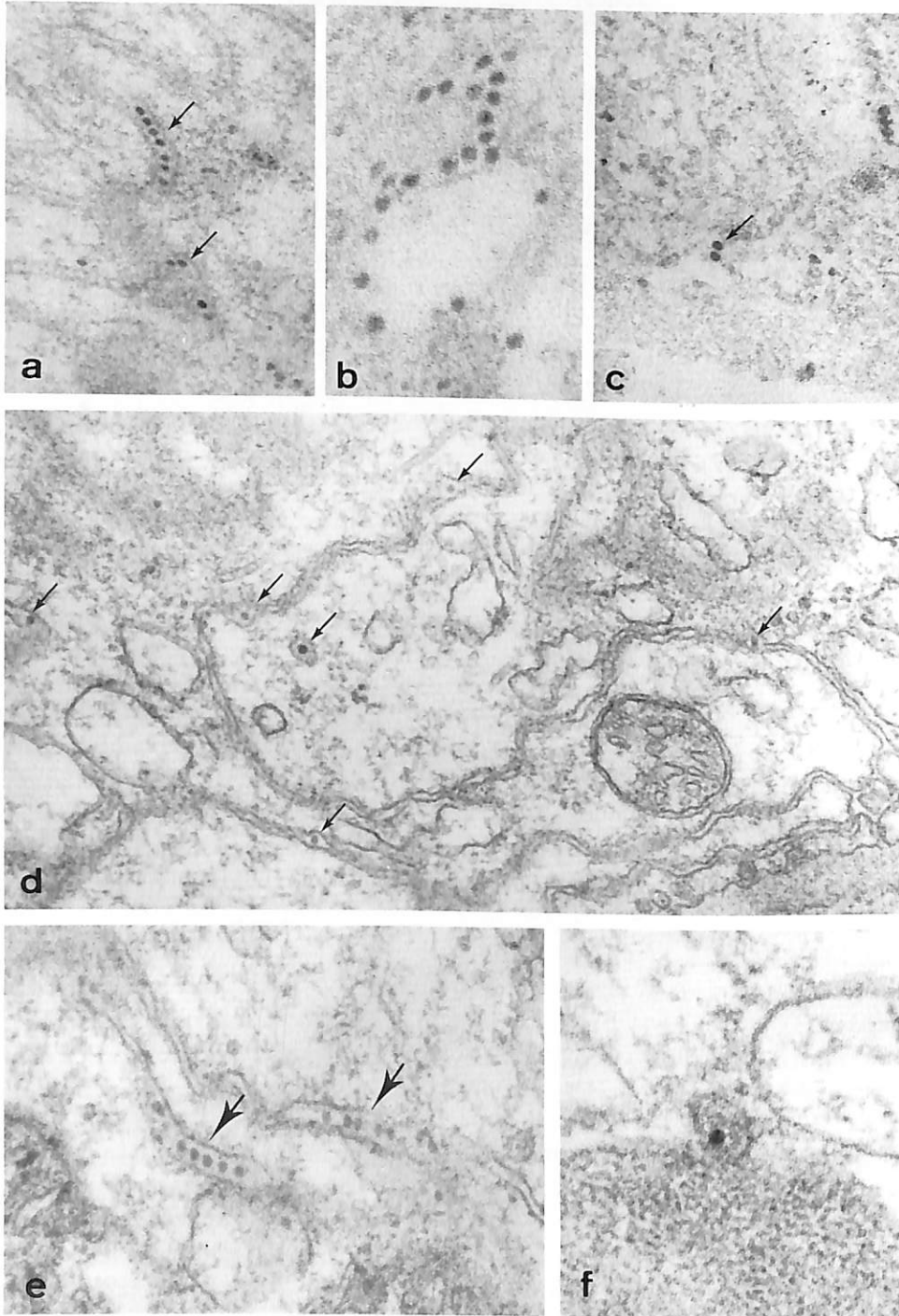
第1図 後腸上皮細胞におけるウイルスの侵入と放出の模式図



第2図 副唾腺細胞におけるウイルスの侵入と放出の模式図

観察されたことから (図版 I-e)、この陥入部の先端が細胞質側にくびれ出るとともに、ウイルスが細胞内に侵入すると考えられる。細胞質中では、後腸細胞で観察されたものと同様のウイルスを含んだ小胞が観察された (図版 I-f)。加えて、ウイルスを含んだ小胞と頂部細胞膜とが融合した像が得られたことから、副唾腺細胞において、ウイルスは後腸同様、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、エクソサイトーシスを利用して細胞外に放出されるものと考えられる。

以上のことから、BYDV が媒介虫体内を循環する場合に、アブラムシの後腸細胞と副唾腺細胞がウイルスの



- I a 後腸上皮細胞の細胞膜陥入部に吸着するウイルス粒子 (×72,000)  
 b 後腸細胞中のウイルス粒子を含んだ管状小胞 (×108,000)  
 c 後腸細胞の基底膜から放出されるウイルス粒子 (×72,000)  
 d 副唾腺細胞の基底膜陥入部に侵入するウイルス粒子 (×54,000)  
 e 副唾腺細胞の基底膜陥入部の先端のウイルス粒子 (×90,000)  
 f 副唾腺細胞の細胞質中のウイルス粒子を含んだ小胞 (×108,000)

特異的通過部位であることが明らかとなった。すなわち、ウイルスは後腸上皮細胞から特異的に獲得され、小胞を介して細胞内を通過し血体腔へ侵入する(第1図)。そして、血体腔に侵入したウイルスは血リンパ中に拡散して、あるものは血流に乗って副唾腺細胞に到達するのだろう。それから、後腸細胞の場合同様に細胞を通過し、体外に放出され、新たなウイルスの伝搬が成立するのであろう(第2図)。Gildow の報告と同様に、ウイルスが媒介虫体内を移行する機構には、ウイルスの外被タンパク質と媒介虫細胞の細胞膜との相互作用が関与していると考えられ<sup>1,2)</sup>、おそらく、後腸上皮細胞と副唾腺細胞の細胞膜上に、ウイルスの外被タンパク質を特異的に認識するレセプター分子が存在しており、これらの細胞に到達したウイルス粒子のみが媒介虫体内を移行して新たな伝染源となるもの考えられる。

### 摘 要

BYDV 感染オオムギを吸汁させたムギクビレアブラムシの体内におけるウイルスの存在様式を解明するために、電子顕微鏡観察を行った。

- 1 消化管においては、ウイルス粒子が後腸上皮細胞にのみ観察され、前腸及び中腸では観察されなかった。
- 2 唾液分泌器官及びそれに隣接する器官の観察では、ウイルス粒子が副唾腺細胞でのみ特異的に見いだされた。
- 3 BYDV が、媒介虫体内を移行する場合に後腸と副唾腺細胞が、重要な役割を果たすものと示唆される。

### 引 用 文 献

- 1) Gildow, F.E. (1982) Coated-vesicle trans-

port of luteoviruses through salivary glands of *Myzus persicae*. *Phytopathology* 72 : 1289~1296.

- 2) Gildow, F.E. (1985) Transcellular transport of barley yellow dwarf virus into the hemocoel of the aphid vector, *Rhopalosiphum padi*. *Phytopathology* 75 : 292~297.
- 3) Harris, K.F. (1983) Sternorrhynchous vectors of plant viruses: virus-vector interactions and transmission mechanisms. *Adv. Virus Res.* 28 : 113~140.
- 4) Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1981) Identification of small polyhedral virus particles in thin sections of plant cells by enzyme cytochemical technique. *J. Ultrastruct. Res.* 74 : 116~129.
- 5) Kojima, M., Matsubara, A., Yanase, S., and Toriyama, S. (1983) The occurrence of barley yellow dwarf disease in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 49 : 338~346.
- 6) Plumb, R.T. (1983) Barley yellow dwarf virus-a global problem. 185~198, *Plant Virus Epidemiology*, R. T. Plumb and J.M. Thresh, eds., Blackwell Scientific Publications.
- 7) Rochow, W.F. and Duffus, J.E. (1981) Luteoviruses and yellows disease. 147~170, *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 8) Rochow, W.F., Foxe, M.J. and Muller, I. (1975) A mechanism of vector specificity for circulative aphid-transmitted plant viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60 : 293~301.

(1989年11月30日受領)