

酵素抗体法によるウイルス感染葉の全層染色

石本万寿広・佐野義孝・小島 誠

Masuhiko ISHIMOTO, Yoshitaka SANO and Makoto KOJIMA : Whole body staining of virus infected leaves by enzyme immunohistochemistry

Summary

Whole body staining technique was applied for detection of plant virus antigens in the infected leaves. The cellulase treatment allowed antibodies to penetrate to the inside of leaf tissues, and facilitated to stain viral antigens by enzyme immunohistochemistry. This technique was useful to investigate the distribution of virus antigens *in situ*.

The staining of Japanese radish leaves infected with CMV, either alone or with TuMV together, showed that there was no difference in the spread and the distribution of CMV in the inoculated leaves, between singly inoculated and co-infected ones. On the contrary, the number of stained cells was increased at the upper leaves co-infected with both viruses.

ウイルス感染植物におけるウイルスの分布を調べる方法としては、超薄切片法による電子顕微鏡観察や、蛍光抗体を用いた免疫組織染色などがある。最近、我々は酵素結合抗体を用いた免疫組織化学的方法でウイルス抗原の検出を行った²⁾。しかし、これらの方法は、いずれも切片上で抗原の分布を見るもので、観察できる範囲はおのずから限定される。

カブモザイクウイルス (TuMV) と重複感染したダイコンにおけるキュウリモザイクウイルス (CMV) の濃度の増大は CMV の維管束系を介した長距離の移行が促進された結果であることを既に報告した^{2,3,4)}。本研究では、重複感染葉と単独感染葉における CMV の分布の差異をさらに調べるために、葉組織全体でのウイルス抗原の検出を免疫組織染色法 (全層染色法) を用いて試みた。

材料および方法

1 供試ウイルスおよび供試植物

既報⁴⁾で述べた方法で純化した TuMV および CMV を、子葉期のダイコン (品種: 宮重総太り) の子葉へ重複あるいは単独接種した。接種植物は、25°C、16時間照明の人工気象室で生育された。

2 感染葉の全層染色

Ishikawa ら¹⁾の方法を一部改変し、葉組織全体におけるウイルス抗原の検出を試みた。

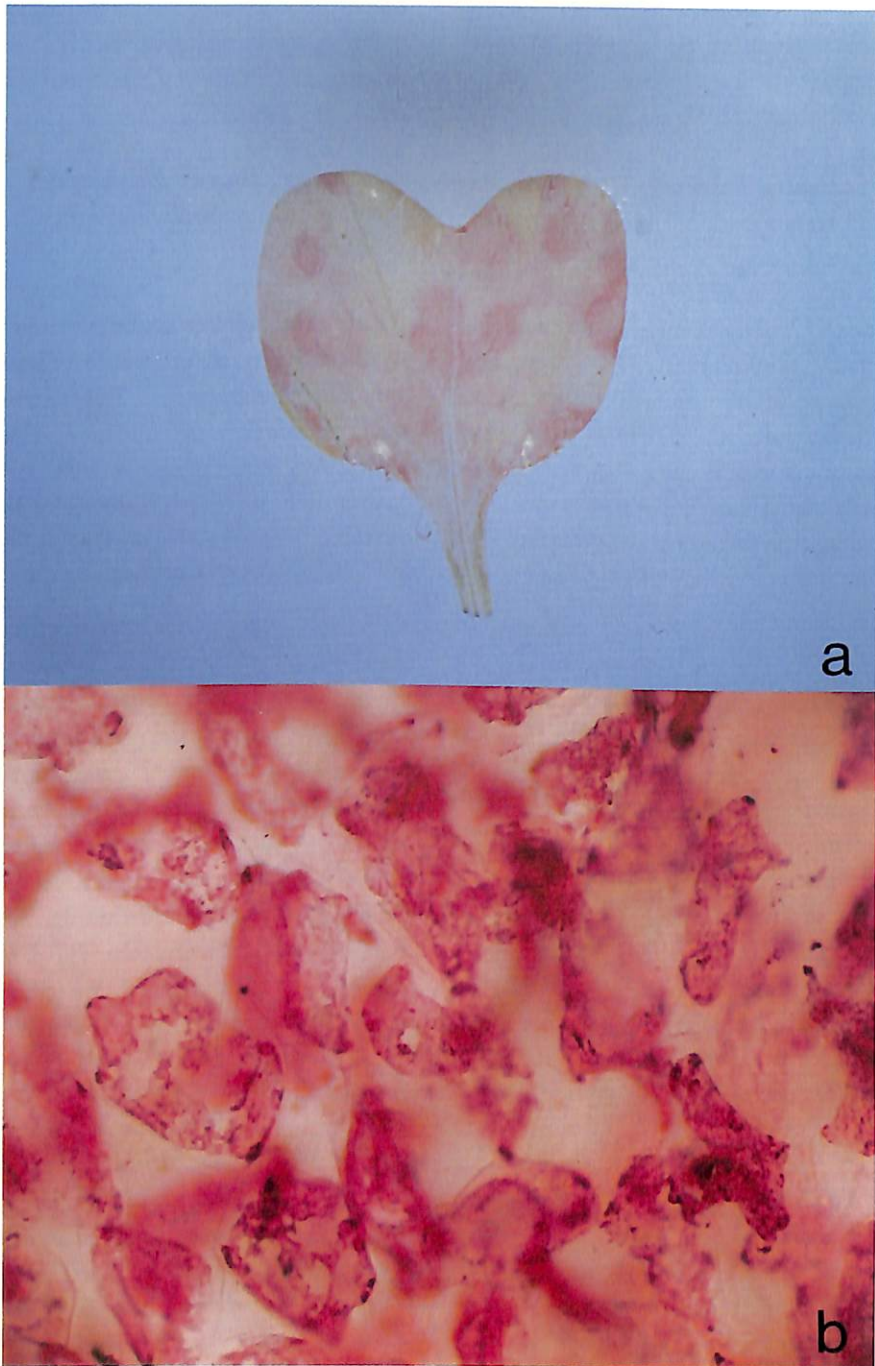
感染葉の裏側の表皮をピンセットで完全に剝離し、マニトール溶液 (子葉: 0.65M, 本葉: 0.6M, pH5.5)

に30分間以上浸漬したのち、細胞壁を消化するために酵素処理を行った。酵素には、セルラーゼ、ペクチナーゼ、ドリセラゼを用い、その効果を比較検討した。酵素処理後、マニトール溶液および PBS で洗い、4%パラホルムアルデヒドで一晩 (4°C) 固定した。エタノールに浸漬し、クロロフィルを完全に抜いたのち、TBS (20 mM トリス-塩酸-500mM NaCl, pH7.5) で洗い、さらに、TS 溶液 (1.5% Triton X-100, 1.5% サボニン, 8% ショ糖-TBS) に1時間浸漬した。次いで、TSB で30分間洗い、凍結融解を1回行った。その後、TS 溶液に1日浸漬し、TBS で洗ったのち、一次抗体 (抗 TuMV, 抗 CMV IgG) と反応させた。1次抗体は BSA-TBS (0.2% 子牛血清アルブミン, 0.3% Triton X-100, 0.1% アジ化ナトリウム-TBS) で希釈して用いた。TBS で6時間洗い、さらに2次抗体処理 (2~3日間) を行った。二次抗体には、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ-ヤギ IgG (TAGO 社) を用いた。さらに TBS で洗い、0.1M トリス-塩酸 (pH8.2) に1時間浸漬したのち、基質溶液 (0.02% Naphthol AS-MX Phosphate, 0.1% Fast Red TR Salt, Sigma 社) に30~60分間反応させた。蒸留水で反応を停止させ、グリセリン溶液 (10~80%) に浸漬し、試料を透明化させたのち、肉眼ならびに光学顕微鏡で観察した。

結果および考察

1 至適条件の検討

セルラーゼ、ペクチナーゼ、ドリセラゼを用い、処理濃度および処理時間を検討した。セルラーゼとペクチ



図版 1 a 重複接種後 5 日目の接種葉（子葉）における CMV 抗原の分布
図版 1 b 同一試料の光学顕微鏡像（拡大図）

ナーゼの混用, ドリセラーゼによる処理では, 多数の細胞の遊離 (プロトプラスト化) がみられた。セルラーゼの単独処理でも高濃度では, 細胞が遊離したため, 1% セルラーゼで2時間 (20°C) 処理が適当であると考えた。一方, このような酵素処理により葉の強度が著しく低下し, その後の過程で破損する恐れがあったのでスライドグラス等へ葉を固着させる必要があった。

一次抗体ならびに二次抗体の至適濃度を検討した結果, 一次抗体は2 µg/ml, 二次抗体は200倍希釈が適当であり, この条件下では非特異反応はほとんど認められなかった。

2 重複あるいは単独接種したダイコンにおけるCMVの分布

前述の条件下で, 重複接種株と単独接種株におけるCMVの移行, 分布を比較した。

接種葉では, まず円形の染色部がいくつか見られ, 感染が進むにつれそれが拡大していった (図版1 a)。このCMV染色部の広がり, 重複接種葉と単独接種葉で著しい違いは認められなかった。また, これらの葉を光学顕微鏡で観察したところ, 細胞の細胞質が強く染色されていた (図版1 b)。

一方, 上位葉においては, 単独接種株では, 重複接種株とは異なり, ごく一部にしか染色部は認められなかった。

これらのことは, 既報^{2,4)}の結果と一致し, TuMVとの重複感染によってCMVの接種葉 (子葉) からの長距離の移行が促進されることを示唆するものである。

この全層染色法は, 抗体を組織の内部にまで浸透させるために, 酵素処理により細胞壁を部分的に消化することが不可欠であった。この全層染色法は, 広範囲におけるウイルス抗原の分布を調べる方法として有効であり, また, 切片法と組み合わせることにより, より有効性が高まるものと考えられる。

摘 要

1 酵素抗体を用いた免疫組織染色法により葉組織全体におけるウイルス抗原の検出を試みた。

2 表皮を剝離した葉をセルラーゼにより前処理することにより, 抗体の組織内部への浸透が可能となった。

3 CMVを単独接種したダイコンとCMVとTuMVを重複接種したダイコンにおけるCMVの分布を比較した。その結果, 接種葉ではその分布に著しい差は認められなかったが, 上位葉ではTuMVとの重複感染でCMVが移行増殖していることが明らかとなった。

引用文献

- 1) Ishikawa, Y., Zukeran, C., Kuratani, S., and Tanaka, S. (1986) A staining procedure for nerve fibers in whole mount preparations of the medaka and chick embryos. *Acta Histochem. Cytochem.* 19: 775~783.
- 2) Ishimoto, M., Sano, Y., and Kojima, M. (1989) Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants co-infected with turnip mosaic virus. (II) Electron microscopic and immunohistochemical observations. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* (in press)
- 3) 佐野義孝・関川正規・小島 誠 (1986) 新潟砂丘地における有翅アブラムシの発生活長とダイコンのモザイク病について (第3報) ダイコンから分離されたキュウリモザイクウイルスについて. *北陸病害虫研報* 34: 45~48.
- 4) Sano, Y. and Kojima, M. (1989) Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants co-infected with turnip mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 55: 296~302.

(1989年11月30日受領)