

カブモザイクウイルス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濃度の増大
(III) プロトプラスト系による観察

辻 俊明・佐野義孝・小島 誠

Toshiaki TSUJI, Yoshitaka SANO and Makoto KOJIMA: Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants co-infected with turnip mosaic virus
(III) Observations on virus-infected cells by means of fluorescent-antibody staining

Summary

Systemic spreading of CMV in the infected radish plants was stimulated by the presence of TuMV. The altered mode of CMV distribution in the co-infected plants was investigated by monitoring the frequencies of CMV-infected cells at various leaf positions. Protoplasts were isolated separately from individual parts of the infected radish seedlings, and then treated with fluorescent antibody to detect the CMV-infected cells. The increase in the number of CMV-infected cells (%) due to the co-infection, was evident particularly in the petioles of inoculated cotyledons and in the upper young leaves.

新潟砂丘地におけるダイコンモザイク病については、これまで有翅アブラムシの発消長とモザイク病の関係について調査され、カブモザイクウイルス (TuMV) とキュウリモザイクウイルス (CMV) による重複感染が激しいモザイク病の原因であることが明らかにされている⁴⁾。また、モザイク病罹病株より分離した両ウイルスをダイコン苗に接種し、各ウイルスの単独および重複感染による病徴を観察した結果、TuMV は単独で容易に感染しモザイク症を引き起こすが、CMV は単独では感染し難く、また無病徴感染すること、さらに両ウイルスが重複感染すると病徴が激しくなることを突き止めた⁶⁾。一方、血清学的方法 (間接 ELISA) により、CMV 単独接種では植物の上位葉からはほとんどウイルス抗原が検出されないが、TuMV と重複感染した場合、CMV 抗原量が上位葉で増大することが判明した⁷⁾。また、TuMV と重複感染した場合、その上位葉だけでなく葉柄部からも CMV がより高頻度に検出されることが、電子顕微鏡観察および免疫組織学的手法により確認された^{2,3)}。こうした知見は、CMV のダイコンにおける全身的な移行・拡散が TuMV の存在下で助長されることを示している。

本報文では、感染葉から単離したプロトプラストを蛍光色素結合抗体で染色することにより、植物全体におけるウイルス感染細胞の分布を追跡し、重複感染に伴う CMV の移行促進を検証した。併せて両ウイルス間の重複感染における相互作用を考察する。

材料および方法

1. 供試植物およびウイルス

本試験においても、前報同様の CMV, TuMV 分離株を各々タバコ (Ky57), カブ (寄居) で増殖させたものを供試した⁷⁾。

2. ウイルスの純化

CMV の純化は接種タバコ葉より、また、TuMV は接種カブより前報の方法に従って行なった⁷⁾。

3. ウイルスの接種

接種源として CMV 1~2 mg/m² 挽 TuMV200~300 μg/m² 挽となるように 0.01 M リン酸緩衝液 (PB, pH8.0) で希釈し、子葉期のダイコン苗 (宮重総太り) に対して、各処理区につき 10 株に全面汁液接種を行なった。

4. プロトプラストの単離および固定

接種 4 日目および 8 日目に、子葉、子葉の葉柄、第 1 本葉、第 2 本葉 (8 日目のみ) を摘葉し、酵素液 (1% セルラーゼ, 0.05% マセロザイムを含む 0.6 M マンニトール液, pH5.5) 中で 25°C 下 3 時間の振盪により、組織中の葉肉細胞を遊離させた。次いで未消化の組織を 2 重ガーゼ濾過により除去し、600~850 rpm, 3 分間の遠心により遊離細胞を回収した。この遠心操作を 3 回反復し、最終沈殿を 0.6 M マンニトール液で懸濁した。プロトプラストの濃度は、EKDS 血球計算盤 (KAYAGAKI 社) を用いて測定し、最終的に細胞数が $1 \times 10^{4-5}$ /m² 挽となるようにマンニトール液で調製した。プロトプラスト懸濁液は、Mayer's albumin を塗布した無蛍光スライドガラス上に滴下し、速やかに風乾させた。風乾後、スライド

ガラスを99.5%アセトンに30分間浸漬し、その後0.01 MPB (pH7.0) に一晚浸漬して洗浄した。

5. 蛍光抗体染色

蛍光色素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) を用いた染色の手順は Otsuki らの方法に準拠した⁵⁾。

スライドガラス上で固定したプロトプラストに抗 CMV あるいは抗 TuMV 血清 (1% IgG 原液を10%グリセリン溶液で8倍あるいは16倍に希釈したもの) を滴下し、36°C, 60分間湿室中で静置した。次いで、スライドガラスを PBS (0.01 MPB, 0.85% NaCl, pH7.0) 中に4時間浸漬することにより試料を洗浄した。洗浄後、蛍光色素結合抗ウサギ・ヤギ IgG (生化学工業社製、使用時に1%原液を8倍希釈) を滴下し、36°C, 60分間湿室中で静置した。続いて、前述のごとく PBS 中で4時間の浸漬洗浄を施した (遮光のため容器をアルミ箔で被覆した)。蛍光染色が終了したところで試料を蛍光顕微鏡で観察したが、感染率の測定には無作為に300個以上の細胞をカウントした。

6. ELISA

検体の一部については、プロトプラスト (1×10^5 個相当量) を遠心分離により集め、ELISA 検定に供した。

結果および考察

CMV による単独あるいは TuMV との重複感染植物からのプロトプラストにおける CMV 感染率は第1表に示す通りである。

検鏡の結果、陽性の反応を示したプロトプラストは、蛍光の強弱はあるものの細胞全体が発色していた。対照区の健全植物プロトプラストでは全く発色が認められなかった。

CMV 単独接種区では、接種4日目から8日目にかけて接種葉および葉柄においては感染細胞数の増加が見られた (接種葉: 26.1% → 42.1%, 葉柄: 12.1% → 45.0%)。しかし上位葉での感染率は低く、時間を追ってもその上昇は見られなかった (8日目, 第1葉: 7.0%, 第2葉: 2.8%)。これに対し重複接種区では、接種葉以外の部位 (葉柄および上葉) においても、CMV 感染率が顕著に増加していることが観察された (葉柄: 9.1% → 74.3%, 第1葉: 20.9% → 65.3%)。同様な結果が ELISA によっても得られた。第1表中、() 内の数値は、各葉位別に単離したプロトプラスト検体中の CMV 抗原に対する ELISA 値を示す。各検体における CMV 感染率と CMV 抗原量 (ELISA 値) はおおむね一致したが、展開直後の上葉 (4日目の第1葉および8日目の第2葉) では CMV 感染率に比べて ELISA 値が若干低くなる傾向が見られた。例えば重複接種区8日目の第2葉では、全検体を通じて最も高いウイルス感染率 (75.6%) が計測

されたが、その ELISA 値 (0.812) は同時に採取された子葉部 (1.154) や第1葉 (1.074) に比べ低い。これは、検体が展開後間もないために個々の葉肉細胞が小さく、また、感染細胞中のウイルス増殖量も感染初期であるために相対的に低いこと、などに起因すると考えられる。しかしながら、重複接種区において、展開直後の新葉 (第2葉) 中に CMV が既に高率に分布していることは、すなわち CMV の全身的移行・分布が重複感染により助長されることを示している。また、同時に採取した子葉 (接種葉) の葉柄部においても同様に高率の CMV 分布が確認された (74.3%)。これらの結果は、明らかに、重複感染したダイコンにおいては、維管束系を介した CMV の全身的移行が顕著に促進されていることを細胞レベルで確認したものである。

TuMV による単独あるいは CMV との重複感染によるプロトプラストの感染率を第2表に示した。TuMV の各葉位における分布を検定したところ、単独・重複接種区の間で感染率に有意な差は認められなかった。これは、前報で報告した ELISA 検定の結果とも一致し、CMV との重複感染は TuMV の増殖移行に対し、ほとんど影響を及ぼさないことを示している⁷⁾。

2種の異なるウイルスが重複感染した際、一方のウイルスの増殖・移行が促進される現象 (協力現象, synergism) については、これまでに種々の報告がなされており、多くの場合、ウイルスの宿主体内における細胞間あるいは組織間の移行機能が異種ウイルス間で介助される

第1表 単独あるいは重複接種したダイコンより単離したプロトプラストの CMV 感染率 (%) および ELISA 値

日数	4 日		8 日	
	単独	重複	単独	重複
子葉	26.1 ¹⁾ (1.012) ²⁾	37.1 (0.994)	42.1 (0.949)	55.1 (1.154)
葉柄	12.1	9.1	45.0	74.3
第1葉	4.6 (0.008)	20.9 (0.416)	7.0 (0.410)	65.3 (1.074)
第2葉	—	—	2.8 (0.195)	75.6 (0.812)

1) 感染率 (%), 2) ELISA 値

第2表 単独あるいは重複接種したダイコンより単離したプロトプラストの TuMV 感染率 (%)

日数	4 日		8 日	
	単独	重複	単独	重複
子葉	16.4 ¹⁾	21.9	35.8	56.5
葉柄	8.2	29.3	29.3	31.6
第1葉	25.2	18.1	33.3	37.2
第2葉	—	—	24.3	25.1

1) 感染率 (%)

ことによるものと考えられている。

ダイコンモザイク病のように複数ウイルスが関与するウイルス病では、圃場レベルでの病害の診断および防除を図るうえで、ウイルス間の相互作用を考慮することは重要であり、協力現象は非常に有益な示唆を含むものと思われる。

摘 要

TuMVと重複感染したダイコンにおけるCMVの増殖について、感染葉からのプロトプラストの単離を試み、蛍光抗体法による感染率の測定、ELISAによるCMV抗原の検定を行ない、次の点を明らかにした。

1. 子葉に接種した植物の上位葉において、CMV単独接種区では感染率が低く(4日後の第1葉:4.6%, 8日後の第1葉:7.0%), 重複接種区ではCMVの感染率が増大した(4日後の第1葉:20.9%, 8日後の第1葉:65.3%)。これらの結果はELISA検定によっても確認された。また、とりわけ高率のCMV分布が重複接種8日後の葉柄(74.3%)および第2葉(75.6%)において観察された。

2. TuMVの感染率は単独・重複接種区で大きな差は認められなかった(8日後の第1葉で単独区33.5%, 重複区37.2%)。

引用文献

1) Atabekov, J. G. and Dorokov, YU. L. (1984) Plant virus-specific transport function and resistance of

plants to viruses. *Adv. virus Res.* 29: 313-364.

2) 石本万寿広・佐野義孝・小島 誠 (1989) 酵素抗体法によるウイルス感染葉の全層染色. *北陸病虫研報* 37: 57-59.

3) Ishimoto, M. Sano, Y. and Kojima, M. (1990) 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* 56: 63-72.

4) 小島 誠・横倉 明 (1980) 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. *北陸病虫研報* 28: 61-65.

5) Otsuki, Y. and Takebe, I. (1969) Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic virus antigen in tobacco mesophyll protoplasts. *Virology* 38: 497-499.

6) 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. *北陸病虫研報* 34: 45-48.

7) 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.

(1990年7月28日受領)