

新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第6報) ラッカセイわい化ウイルスの分離

石川 寛・守屋 透・原澤 良栄*・
小島 誠

Hiroshi ISHIKAWA, Thoru MORIYA, Ryohei HARASAWA* and Makoto KOJIMA:
Studies on soybean virus diseases in Niigata Prefecture (6)
Isolation of peanut stunt virus

Summary

A virus was isolated from a soybean plant showing mild mosaic collected in Niigata Prefecture. Host range of the virus was moderately wide, most in Leguminosae and Solanaceae. The virus was purified from the inoculated tobacco leaves by 2 cycles of differential centrifugation followed by sucrose density-gradient centrifugation. Electron microscopic examination of the purified preparation showed spherical particles of 30 nm in diameter with some dark core by negative staining in uranyl acetate. The virus consisted of single molecule of its coat protein and four molecules of its genomic RNA. In the agar gel diffusion test, this virus isolate was closely related with peanut stunt virus (PSV-S1 and PSV-161). This isolate did not react in direct ELISA using IgG from antiserum to cucumber mosaic virus. Based on these results, the virus was identified as a strain of PSV. This is the first report in occurrence of PSV in Niigata Prefecture.

筆者らはこれまで、新潟県におけるダイズウイルス病の発生実態を明らかにすべく調査研究を進め、ダイズ褐斑粒との関係からダイズモザイクウイルス (SMV) とダイズ萎縮ウイルス (SSV) の単独ないし重複感染が大きく関わっていることを明らかにしてきた。^{1,3,12)} また、前報²⁾においてさらにこれらのウイルス以外のウイルスも褐斑粒発生に関与している可能性を指摘した。1989年、DIBA 検定により、反応が微弱ながら SSV に対して陽性と診断したウイルス株につき検討を重ねた結果、新潟県では未報告のラッカセイわい化ウイルス (peanut stunt virus, PSV) であることが判明した。PSV は SSV 同様、Cucumovirus 群に属し、直径30nmの球形ウイルスである。自然発生植物には、ラッカセイのほかダイズ、インゲン、アズキ、シロクロバー、タバコなどが知られており⁹⁾、宿主範囲は SSV のそれに較べ広い^{9,11)}。PSV は低率ながらダイズにおいて種子伝染し、褐斑粒を生じさせることが報告されている^{4,5,6,9)}。PSV は日本では福島県のインゲンからはじめて分離され¹³⁾、その後、山形県、北海道でダイズから分離されている^{5,9)}。

この試験を進めるに当たり果樹試験場盛岡支場の吉田幸二氏より貴重な抗 PSV 血清を分譲して頂き、さらに

有益なご助言を賜った。ここに記して感謝の意を表す。

材料および方法

1. 供試植物とウイルス

本試験で供試したウイルス株は、1989年8月、新潟県朝日村猿沢地区で採集した軽微なモザイク症状を示すダイズから分離した。採集株から調製した抽出液の一部を採種源としてササゲ (黒種三尺) に接種し、単一病斑分離を3回反復した後、タバコ (ホホワイトバレー) に接種し増殖させた。接種後7日目の接種葉を収穫し、凍結保存 (-20℃) した。本分離株の宿主範囲を調べるためインゲン、ツルナなども用い、カーボランダム法により汁液接種を行った。対照としてダイコンから分離したキューリモザイクウイルス (CMV-R83) を供試した¹⁰⁾。

2. ウイルスの精製ならびに電顕観察

佐野ら¹⁰⁾の CMV の精製法に従い、凍結タバコ葉を用い、ウイルスの精製を試みた。2回反復の分画遠心の後、しよ糖濃度勾配遠心 (日立 RPS-28SA ローター, 22,500 rpm 3時間) で精製し、ウイルスを含む部分を分取、希釈後、遠心 (日立 RP40 ローター, 36,000rpm90分間) によりウイルスを回収した。沈渣は0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0) またはトリス (塩酸) 緩衝液 (pH7.0) で再懸濁し、精製標品とした。精製標品の一部を希釈後、3% 酢酸ウランで染色し、電顕観察を行った (JEOM100B, 80

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

KV)。

3. 免疫と血清試験

本ウイルス分離株の精製標品を生理食塩水で希釈し、家兎に静脈注射6回、さらに等量の完全アジュバントで混合した液を筋肉に2回注射した。最終免疫後7日目に全採血し、抗血清を得た。得られた抗血清からIgGを精製し、酵素抗体法(ELISA)による試験に供した¹⁰⁾。一方、ウイルス同定のため寒天ゲル内拡散法による試験も行った。0.7%寒天(0.85% NaCl, 0.05% アジ化ナトリウム, 2.5mM EDTA を含む)を用い、2種類の抗PSV血清(吉田幸二氏より分譲)との反応の有無を調べた。

4. 外被タンパクと核酸の解析

本ウイルス分離株の精製標品を用い、Laemi⁹⁾の方法に従いSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により外被タンパク質の解析を行った。また、Hanadaら²⁾の方法に従ってウイルス核酸の抽出、PAGEを行った。

結 果

1. 本ウイルス分離株の宿主範囲と病徴

本ウイルス分離株(PSV-N89)を各種植物に汁液接種し、その反応を検討した(第1表)。ダイズについては供試した10品種中、SSV全系統に罹病性の農林2号を含む5品種には感染しなかった。感染の認められた農林4号などでは軽微なモザイクあるいは縮葉症状を示した。ササゲでは接種葉に退緑斑点、上位葉にモザイク症状を示

第1表 本分離株とSSVとの宿主範囲と病徴の比較

接 種 植 物	本分離株	SSV 系統 ¹⁾			
		A	B	C	D
ダイズ (農林2号)	—	M	M	M	M
〃 (農林4号)	m	M	M	M	M
〃 (エンレイ)	—	M	M	—	—
〃 (ライデン)	m	—	—	M	M
〃 (ユウヅル)	M	M	M	M	M
〃 (鶴の子)	—	M	•	M	•
〃 (刈羽滝谷28号)	m	M	—	M	—
〃 (奥羽3号)	M	—	—	M	—
〃 (十勝長葉)	—	—	—	—	—
〃 (Harosoy)	—	—	—	—	M
ササゲ (黒種三尺)	CS, M	NS	CS, NS, M		
インゲン (Top Crop)	CS, m	—	—		
タバコ (White burley)	CS, M	SL	SL		
ツルナ	NS	—	—		

1) 高橋ら(1987)の文献による¹¹⁾

M: 上位葉におけるモザイク; m: 軽微なモザイク(感染率も低い);

CS: 接種葉における退緑斑点; NS: 接種におけるえそ斑点

SL: 無病徴感染

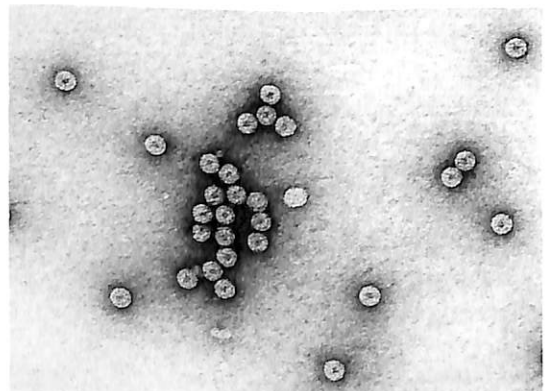
した。タバコではSSV全系統が無病徴感染であるのに対して、本ウイルス分離株は接種葉に退緑斑点(もしくは退緑斑紋)、上位葉に軽微なモザイク症状を示した。また、インゲン(トップクローブ)においてもSSV全系統が感染しないのに対して、本分離株は病徴は軽微ながら感染が認められた。さらにツルナはSSV全系統が感染しないのに対して、本分離株は接種葉に明瞭なえそ斑点を生じた。これらのことから本分離株は既報のいずれのSSV系統にも該当せず、宿主範囲および病徴からPSVの一系統であると考えた。

2. ウイルスの精製と電顕観察

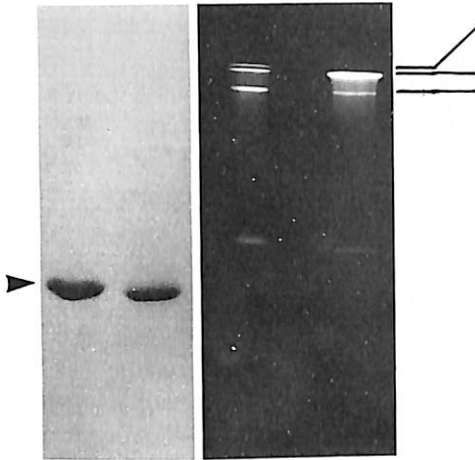
佐野ら¹⁰⁾の方法によりタバコ(接種葉)から効率良く精製標品を得ることができた。得られた標品は波長240nm附近に極小、260nm附近に極大を有する核タンパク特有の紫外部吸収スペクトルを示した。また、電顕観察の結果、cucumovirus群ウイルスに特有な酢酸ウランにより強く染色される中心部を有する直径30nmの球形粒子が多数観察され、挟雑物はほとんど見られなかった(第1図)。

3. ウイルス外被タンパクと核酸

CMV-R83の外被タンパクとともに本ウイルス分離株の外被タンパクを同時にSDS-PAGEによる解析をしたところ、CMVと同様、単一でしかもほぼ同一の易動度を示す1種類のタンパク質が検出された(第2図a)。一方、PAGEによるウイルスゲノム核酸の解析の結果、対照のCMVと同様4本のバンドが検出され、RNA 1, 2, 3, 4の4分子種からなることが判明した(第2図b)。しかし、易動度にCMVのそれと若干差があることから、各分子種の正確な分子量はCMVのそれとやや異なるものと思われる。本分離株PSV-N89はRNA 5(サ



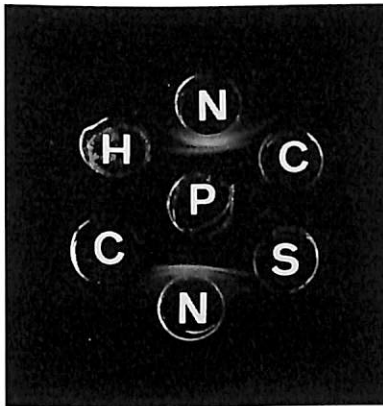
第1図 PSV-N89の純化標品の電顕像
酢酸ウラン染色 ×100,000



第2図 PSV-N89の外被タンパクとゲノムRNAの電気泳動像

A: CMV外被タンパク(▶); B: PSV-N89外被タンパク; C: CMV-RNA; D: PSV-N89-RNA

①~④: RNA1~RNA4



第3図 抗PSV-S1抗血清を用いた寒天ゲル内反応

P: 抗PSV-S1血清; N: 本分離株の純化標品; C: CMV-R83の純化標品; S: SSV感染ダイズ粗汁液; H: 健全タバコ粗汁液

テライトRNA)を有していなかった。

4. 寒天ゲル内反応

第1表に示した接種試験の結果をさらに補強するため抗PSV血清(抗PSV-S1と抗PSV-161)を用い寒天ゲル内拡散試験を試みた。抗原として本分離株の精製標品、対照としてCMV-R83の精製標品、SSV感染ダイズ葉、健全タバコ葉の粗汁液を用いた。その結果、2種類の抗PSV血清とも本ウイルス分離株とのみ反応し、他の抗原

との間には沈降線は見られなかった(第3図)。

5. ELISA 反応

本ウイルス分離株PSV-N89に対して得られた抗血清の力価は512倍(重層法)であった。この抗血清からIgGを精製し、さらにコンジュゲートIgGを作製し、以下の結果を得た。まず、直接ELISAの至適条件を検討したところ、コーティング用IgGの濃度を1~2 μg/ml、コンジュゲートIgGの希釈度を200倍と決定した(第2表)。いずれの条件下でも健全ダイズ葉との間の特異反応は低く抑えられていた。対照としてCMV-IgGとコンジュゲートを用いた直接ELISAではhomologousなCMVとのみ反応がみられ、本ウイルス分離株とは全く反応が認められなかった。

考 察

新潟県において発生しているダイズのウイルス病の病原として、これまでSMVとSSVが重要であると指摘してきた^{1,3,7,12}。さらに血清学的診断と褐斑粒発生実態調査の結果、SMV、SSV両ウイルスが検出されないダイズからも褐斑粒の発生がみられたことから両ウイルス以外のウイルスの関与が示唆されてきた³。

1989年度の調査個体中に朝日村猿沢で採集した1株が抗CMV-IgG(SSVがCMVの1系統であることからSSVの検定に当たって抗CMV血清を用いてきた)を用いたDIBA、間接ELISAでは反応するが、直接ELISAでは反応しないことからPSVの存在が考えられた。接種試験の結果、本ウイルス分離株はその宿主範囲、病徴がPSVにきわめて類似していることが判明した。また、既報のPSVに対する抗血清を用いた寒天ゲル内試験でも陽性の反応が認められた。そのほか、ウイルスの化学的性状においても既報のものと同様一致した^{2,9}。

これらのことから本分離株をPSVと同定した。新潟県でPSVが分離されたのは今回がはじめてである。

第2表 ELISA(直接法)の至適条件¹⁾

コンジュゲート 希 釈 倍 率	コーティング IgG 濃度 (μg/ml)			
	10	2	1	0.5
X100	0.968 ²⁾ (0.089) ³⁾	0.935 (0.087)	0.918 (0.080)	0.894 (0.040)
X200	0.642 (0.065)	0.541 (0.053)	0.521 (0.051)	0.507 (0.042)
X500	0.365 (0.051)	0.351 (0.050)	0.339 (0.043)	0.289 (0.035)

1) 抗原は全て10μg/ml

2) 3回反復の平均値

3) ()内は健全ダイズ葉に対する値

PSVは福島県のインゲンから土崎¹³⁾によって日本ではじめて分離され、その後、山形県、北海道ではダイズから分離されている^{5,6)}。本ウイルス分離株 PSV-N89が分離された経緯からも明らかのように、従来著者らが抗CMV血清を用いたDIBA検定からSSVと診断してきたものの中にPSVが含まれていた可能性がある。今後の調査、診断には抗SMV血清、抗CMV血清に加えて抗PSV血清も導入した直接ELISAなどの検定が必要であると考えられる。

摘 要

新潟県で採集された軽微なモザイク症状を示すダイズから1ウイルスを分離した。そのウイルス分離株の宿主範囲、病徴を調べたところ、ダイズ萎縮ウイルスのそれよりやや広く、病徴も異なっていた。接種タバコ葉を用い、ウイルスの精製を試みたところ、直径30nmの球形ウイルスが得られた。本ウイルスは1種類の外被タンパクと4種類のRNAから構成されていた。ラッカセイわい化ウイルス(PSV-S1, PSV-161)に対する抗血清を用いた寒天ゲル内試験で本分離株は陽性の反応を示した。一方、キュウリモザイクウイルスに対する抗血清(IgG)を用いた直接ELISAでは本分離株は反応を示さなかった。これらの結果から本分離株をPSVの1系統と同定した。なお、新潟県におけるPSVの発生についてはこれが最初の報告である。

引用文献

- 1) 藤巻雄一・原澤良栄・矢尾板恒雄・小島誠(1987)新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究(第1報)ダイズモザイクウイルスとダイズ褐斑粒の発生実態。北陸病害虫研報 35: 66~68.
- 2) Hanada, K. and Tochihara, H. (1980) Genetic analysis of cucumber mosaic, peanut stunt and chrysanthemum mild mottle viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan 46: 159~168.
- 3) 原澤良栄・藤巻雄一・小嶋昭雄・立見康明・小島誠(1988)新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究(第5報)ダイズモザイクウイルスの系統と品

種エンレイの病原ウイルスの種類。北陸病害虫研報 36: 64~67.

- 4) 飯塚典男(1973)ダイズにおけるウイルスの種子伝染。東北農試研報 46: 131~141.
- 5) 飯塚典男・柚木利文(1973)ダイズから分離されたPeanut stunt virus。東北農試研報 47: 1~12.
- 6) 飯塚典男・吉田幸二(1988)北海道におけるダイズモザイク病の発生と病原ウイルスの種子伝染。北海道農試研報 150: 33~43.
- 7) 小島誠・高野直行・原澤良策・藤巻雄一(1987)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反応。北陸病害虫研報 35: 69~71.
- 8) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227: 680~685.
- 9) Mink, G. I. (1972) Peanut stunt virus. Descriptions of Plant Viruses No.92 CMI/AAB.
- 10) 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消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.
- 11) 高橋幸吉・長沢次男・田中敏夫・飯塚典男(1987)ダイズモザイクウイルス及びダイズ萎縮ウイルスの各系統に対するダイズ品種の反応。東北農試研究資料 7: 1~35.
- 12) 立身康明・小島誠・原澤良栄・藤巻雄一(1988)新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究(第4報)DIBA法によるダイズモザイクウイルスの検出。北陸病害虫研報 36: 61~63.
- 13) 土崎常男(1973)日本でインゲンより分離されたPeanut stunt virusについて。日植病報 39: 67~72.
- 14) Toriyama, S. (1982) Three ribonucleic acids associated with rice stripe virus. Ann. Phytopath. Soc. 48: 482~489.

(1991年6月10日受領)