

チューリップモザイクウイルスの純化と抗血清の作製

守川俊幸・野村良邦

Toshiyuki MORIKAWA, Yoshikuni NOMURA:
Purification and antiserum production of tulip breaking virus.

Summary

Tulip breaking virus particles were purified from the infected tulip tissue extracts in 0.1M Tris-thioglycollate (pH 9.0) containing 1% Na₂SO₃ by clarification with 1/10 vol of HCP (hydrated calcium phosphate) and 2% Triton X-100, and 2 cycles of differential centrifugation. The TBV antisera had a titer of 1/512 in the ring interface test. In ELISA, purified TBV could be detected until 5 ng/ml in concentration, and dilution end point of the extracts from infected bulbs was 1/500.

我が国におけるチューリップモザイク病はチューリップモザイクウイルス (Tulip breaking virus, TBV) とキュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) に起因し、球根生産にとって極めて重要な病害となっている。富山県においてはこのうち TBV によるものがほとんどである¹⁾。近年ではこのほかにウイルス様症状 (微斑モザイク症状, 条斑症状) が広範囲に発生しており、一部の品種でタバコ茎えそウイルス (tobacco rattle virus, TRV), ユリ潜在ウイルス (lily symptomless virus, LSV) の発生が認められるほか、未同定のひも状ウイルスが分離されることもある (未発表)。これらのウイルス病を迅速に診断するには、血清学的な診断が有効と考えられる。TBV の純化は Derks ら²⁾ の方法があるが、この方法では純度の高い純化試料を得ることができない場合が多かった。そこで、純化方法を検討した結果、再現性が高く、高純度の純化試料を得ることのできる方法が明らかとなり、さらにこの方法で得られた純化試料を抗原として作製した抗血清を用いて ELISA 法による診断を試みた。

材料および方法

純化には富山県農業技術センター野菜花き試験場で維持している TBV 感染チューリップ (品種: ハルクロ) の感染葉を材料に用い、Derks ら²⁾ の方法とそれに種々の改良を加えた純化方法について検討した。また、得られた純化試料を抗原とし、Frend's complete adjuvant を用いた筋肉注射 (各 2 mg 計 4 回) により抗血清を作

成し、DAS-ELISA 法³⁾ による球根からの検出を試みた。なお、抗血清は健全チューリップ葉のアセトンパウダー⁴⁾ で吸収したのち使用した。

結 果

1. 純化方法

Derks ら²⁾ の方法では純化ウイルスの収量が少なかったり、夾雑物を十分に除去できない場合が多く、純化方法の改良が必要であった。そこで、緩衝液は Derks ら²⁾ のものを基本にクロロホルム、ブタノール、四塩化炭素などの有機溶媒および HCP (hydrated calcium phosphate) による清澄化、セシウム塩の密度勾配遠心による分画を試みた。その結果、有機溶媒による清澄化はいずれを用いてもウイルス収量が極端に低下したり、粒子の崩壊が顕著であったり、清澄が不十分である場合があった。それに対し、HCP を用いた清澄化は夾雑物を除去する能力が高く、かつウイルス粒子の収量は良好であった。また、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心は明瞭なウイルスバンドとして分画することができたが、収量は低下した。以上のことを参考に、Fig. 1 に示す手順 (step-1 まで) によって効率的にウイルス粒子が純化された (Fig. 2)。本純化試料を抗原として作製した抗血清は重層法で力価 512 倍であった。

2. ELISA 法による検出

得られた抗血清から精製した IgG を用いた DAS-ELISA 法 (コーティング IgG: 2 μg/ml, コンジュゲート: 1/1000) により、純化ウイルスでは 5 ng/ml まで、感染球根からは 500 倍希釈まで検出が可能であった。

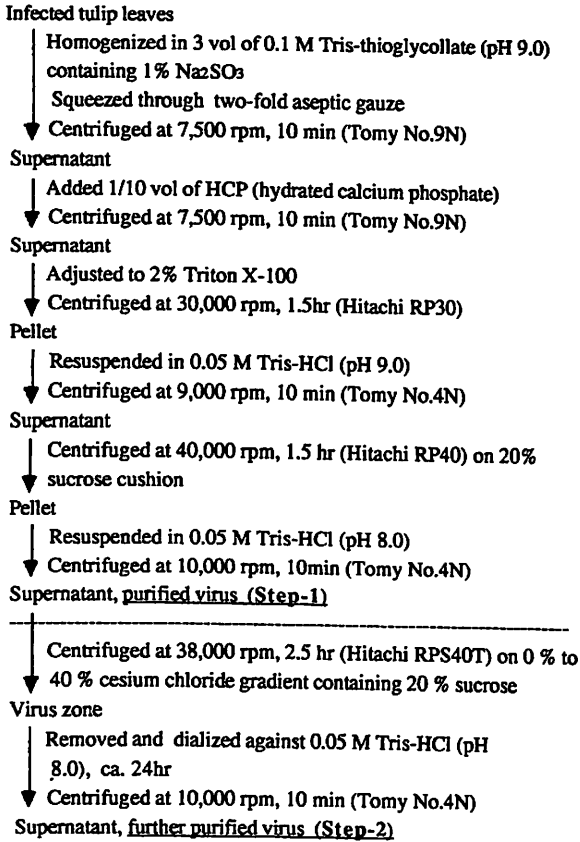


Fig. 1 Procedure of TBV purification.

考 察

本研究により、これまで難しいとされてきた TBV の純化を比較的短時間に容易に行なえる手順が明らかとなった。また、開花1週間前から開花2週間後の成育ステージの異なる感染葉から安定してウイルス粒子を純化することができたことから、本純化方法の再現性は高いと考えられた。なお、純化が不十分な場合は20% ショ糖を含む0~40% 塩化セシウム密度勾配遠心を行なうことにより純度は向上した (Fig. 1 : step-2)。

本純化方法では HCP による清澄化の果たす役割が大きいと考えられる。これまで HCP を用いた清澄化は Iarvirus group のウイルスの純化⁹⁾ に必須であったが、TBV の純化にも有効なことから、他の純化が困難な Potyvirus group のウイルスの純化にも利用できるものと推察された。なお、HCP の添加量に比例して夾雑物は減少するが、同時にウイルス粒子の収量も減少することから、良好な結果の得られる添加量を予め検討しておく必要があると考えられた。

Romanow ら⁹⁾ は磨砕緩衝液にセルラーゼを添加し

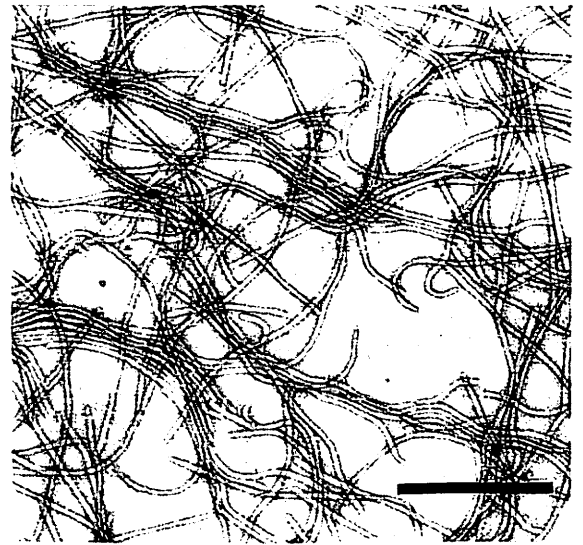


Fig. 2 Electron micrograph of purified TBV particles, stained with 2% uranyl acetate. Bar represents 400 nm.

て ELISA 法による TBV の検出を行なっている。本研究では特に添加物の検討を加えなかったが、十分に有意な検出が可能であった。しかしながら、さらに検出感度を向上するためにも、至適条件の検討を行なう必要があると考えられた。また、ELISA 法は抗血清と抗原が少量ですみ、一度に多数の試料を検討できるが、手順が複雑で設備も必要なことから、今後さらに簡便で短時間に行なえる血清学的手法による診断方法を確立する必要があると考えられた。

摘 要

チューリップモザイクウイルス (TBV) の効率的な純化方法について検討した。その結果、感染葉は 0.1 M Tris-チオグリコール酸 (pH 9.0) 中で磨砕、HCP (hydrated calcium phosphate) および Triton X-100 での清澄化の後、分画遠心を行なうことによりウイルス粒子を純化することができた。純化試料を抗原として抗血清を作製し、DAS-ELISA 法によって球根から TBV の検出を行なった。

引用文献

- 1) Ball, E.M., Hampton, R. O., De Boer, S. H. and Schaad, N. W. (1990) In Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens: Polyclonal antibodies (Hampton, R. et al. eds).

