HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ムギ北地モザイク病ウイルスの分離
Author(s)	盧, 耀村; 四方, 英四郎; 村山, 大記
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 6(3), 335-339
Issue Date	1968
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11766
Type	bulletin (article)
File Information	6(3)_p335-339.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ムギ北地モザイク病ウイルスの分離

盧　耀村・四方英四郎・村山大記
(北海道大学農学部植物学教室)

Isolation of Northern Cereal Mosaic Virus

YAW-TSUEN LU, EISHIRO SHIKATA and DAIKI MURAYAMA
(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University)

(Received October 28, 1967)

I. 緒　言

ムギ北地モザイク病はヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus* (FALLÉN)) によって媒介されるウイルス病であることが明らかにされ (伊藤・福士, 1943, 44a, b.), その後シロオビウンカ (*Delphacodes albifascia* MATSUMURA) (石井・松井 1964; 石井 1966), サッポロトビウンカ (*Unkanodes sapporonus* MATSUMURA) (新海, 1966) も本病を媒介することが報告された。本ウイルスの媒介昆虫および植物体内における潜伏期間, 寄主範囲あるいは罹病ムギの細胞内におけるX体 (伊藤・福士 1943, 44a, b; 福士 1946; 新海 1955; ITO and FUKUSHI 1956), 注射法によるウイルスの物理的性質 (MURAYAMA and LU 1967) などについては既に報告されたが, 本ウイルスの分離・精製については報告されたものがなく, ウイルス粒子の形態は全く明らかにされていない。本研究はウイルスの精製および形態を明らかにするために必要な分離方法を確立するために行なったものである。

II. 実験材料および方法

無毒のヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus* FALLÉN) は温室 (15～33°C) あるいは実験室内 (18～30°C) で免疫植物イネ上で繁殖させた。

保毒のヒメトビウンカは3～4齢の無毒の幼虫を罹病植物上で5日間獲得吸汁せしめてからイネ苗に移し, 最短9日間の潜伏期間を経て後, ハダカムギ (北斗裸麦) につけ, これを発病せしめたものである。

病葉はつぎのようにして得た。温室内に播種後約25日の北斗裸麦に保毒虫を3頭ずつ放ち, 5日間加害せしめ, 7～10日後発病した株から病徴の明瞭に出た葉を集めて −35°C の低温室に保存した。また凍結せず生葉を直ちに用いたこともある。

ウイルスの分離は蔗糖密度勾配遠心法 (sucrose density gradient centrifugation (BRAKKE 1951, 1960) により, 蔗糖濃度 40, 30, 20 および 10% の 1/15 M 燐酸緩衝液および 1/10 M 酢酸アンモンあるいは 1/10 M 炭酸アンモン溶液を各 1 ml ずつ日立 40 P 用水平ローター (RPS-40) の遠心管に積み重ねた後低温室 (4～5°C) に約 15 時間静置し, その上に 0.5 ml のウイルス試料をのせて, 20,000 rpm (32,650×g), 3時間遠心を行なった。遠心後各分画を注射器で取出し, ヒメトビウンカに注射してその感染性を調べた。すなわち 4-5 齢の幼虫約 30 頭に 5-7°C の室で注射を行ない, 注射後の虫はイネ幼苗の上で 9 日間飼育した後, 3 頭ずつ 1～2 葉期のハダカムギに放飼して, その発病の有無を調べた。

電子顕微鏡の試料は蔗糖密度勾配遠心後の試験を原液の 10 倍および 100 倍に希釈し, ROCHOW and BRAKKE (1964) と同様の方法によって蔗糖を除き, タングステン蒸着した後観察した。

III. 実験結果

A. 燐酸緩衝液による分離

実験 1.

罹病植物茎葉 25 g に 1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 7) 25 ml を加えて磨砕し, 低速遠心 (1,000×g) を 20 分間行なって後, 上清を遠心分離 (6,500×g) 20 分間行ない, さらにその上清を高速遠心 (26,000×g, 60 分間) した沈澱を 2.5 ml の燐酸緩衝液にとかして再び低速遠心 (5,400×g, 15 分間) した, その上清を蔗糖密度勾配遠心を行ない, 後各分画をヒメトビウンカに注射した。健全植物を用いて前述と同様な処理を行なって対照とした。

蔗糖密度勾配遠心後蔗糖液のメニスカスから5～7 mm, 13～15 mm の部分に幅約 2 mm の明瞭な乳白色の band が観察された。これらの band は健全植物試料にも同様に認められたが，これらの band を取出して無毒ヒメトビウンカに注射した結果，いずれの band も感染性を示さなかった (表 1, 実験 1)。

表 1.　燐酸緩衝液による分離

実験番号	注射試料 (mm)	注射虫数	10日間以上生存虫数	感染株数	感染率 (%)
1	5～7	30	16	0	0
	13～15	30	22	0	0
	対　照	30	12	6/12	50.0
2	5～7	30	13	0	0
	10～13	30	16	0	0
	13～15	30	15	0	0
	15～18	30	18	0	0
	対　照	30	16	6/16	37.5
3	5～7	30	17	0/6	0
	7～10	30	24	0/8	0
	13～15	35	28	0/10	0
	21～23	35	18	0/6	0
	2～3	30	14	0/5	0
	22～24	30	20	0/7	0
	24～27	30	18	2/6	33.3
	30～32	30	21	0/7	0
	対　照	30	18	5/6	83.3
4	24～27*	25	20	2/5	40.0
	対　照*	25	18	3/4	75.0
	24～27**	30	26	0/9	0
	対　照**	30	22	6/8	75.0

*: 蔗糖密度勾配遠心を行なった後直ちに注射した。
**: 蔗糖密度勾配遠心を行なった後 7°C 下で約 20 時間後に注射。

実験 2.

凍結罹病葉 20 g に 60 ml の燐酸緩衝液 (pH 7) を加え，実験 1 と同様な方法で分離し，蔗糖液のメニスカスから 5～7 mm と 13～15 mm にある band の部分と，13～15 mm の band の上方 10～13 mm と，その下方 15～18mm のそれぞれ透明な部分を取り出して無毒のヒメトビウンカに注射して感染性を調べたがいずれも結果は陰性であった (表 1, 実験 2)。

実験 3.

凍結罹病葉 25 g を用い，実験 2 と同じ方法で分離を行なった。蔗糖液のメニスカスから 20～28 mm の位置は健病両試料とも混濁した境界の不明瞭な分画であったが，病植物試料では 24～27 mm のところにわずかに濃い層が認められた。蔗糖液のメニスカスから 7 mm, 10 mm, 15 mm と 23 mm のところ，および 3 mm, 24 mm, 27 mm, 32 mm の各分画からそれぞれ約 0.2 ml ずつ取出して，無毒のヒメトビウンカに注射したところ，27 mm の分画に感染性が認められた。これ以外の分画ではすべて感染性が見られなかった (表 1, 実験 3)。

実験 4.

罹病生植物茎葉 30 g を用いて前実験と同様の方法で分離を行ない，蔗糖液のメニスカスから 24～27 mm の分画を取り出し無毒のヒメトビウンカに注射した。その結果 40% の感染性を示した。高速遠心後の蔗糖密度勾配遠心に用いる試料を対照として無毒の媒介昆虫に注射した結果では 75% の感染性が認められた。しかしメニスカスより 27 mm よりの試料を 7°C 下に約 20 時間放置してから無毒の媒介昆虫に注射したものではすでに活性が失なわれていた (表 1, 実験 4)。

B.　酢酸アンモンおよび炭酸アンモンによる分離

1.　罹病植物よりの分離

実験 1.

凍結した罹病葉 10 g に 0.1 M 酢酸アンモン溶液 (pH 6.5) および 0.1 M 炭酸アンモン溶液 (pH 6.5) をそれぞれ 30 ml ずつ加えて磨砕し，搾汁液を 1,000×g, 30 分間遠心した上清をさらに 5,500×g, 30 分間遠心して清澄にした。その上清を 34,000×g, 60 分間遠心した沈澱を 1 ml にとかして濃縮し，さらに 5,400×g, 20 分間遠心した。その上清を蔗糖密度勾配遠心によって分画し，蔗糖液のメニスカスから 24～27 mm および 30～33 mm の分画試料を取り出し，翌日 (15～20 時間後) 無毒のヒメトビウンカに注射して感染性を調べた。その結果酢酸アンモンを用いた試料の 24～27 mm 分画に感染性が認められた。表 2 のごとく 0.1 M 炭酸アンモンよりも 0.1 M 酢酸アンモンの方が本ウイルスの活性を保持できることが認められた (表 2, 実験 1)。

実験 2.

罹病植物の生葉 15 g に 0.1 M 酢酸アンモン 45 ml を加えて上と同じ方法によって分離を行なった結果，前同様に 27 mm の分画に高い感染性が見られた (表 2, 実験 2)。

表 2. 酢酸アンモンおよび炭酸アンモンによる分離

実験番号	注射試料* (mm)	注射虫数	10日間以上生存虫数	感染株数	感染率 (%)
1	酢酸アンモン対照	22	18	5/6	83.3
	24～27	30	23	5/8	62.5
	30～33	30	22	0/8	0
	炭酸アンモン対照	20	17	2/6	33.3
	24～27	30	20	0/7	0
2	酢酸アンモン対照	30	22	6/8	75.0
	24～27	30	24	7/8	87.5

*： 蔗糖密度勾配遠心を行なった翌日に媒介昆虫に注射した。

2. 保毒ヒメトビウンカよりの分離

実験 1.

無毒ヒメトビウンカの3齢の幼虫を用いて罹病植物上で20日間獲得吸汁させ，イネ苗上に10日間飼育して後該虫を1g (約2060頭) 集め，これに0.1 M の酢酸アンモン溶液 (pH 6.5) を10 ml 加えて磨砕し，その搾汁液を1,500×g，20分間遠心した。その上清をさらに6,500×g，30分間遠心した上清を26,000×g，60分間遠心し，沈澱を0.05 M 酢酸アンモン溶液 1 ml に溶解して後 1,500×g，20分間低速遠心し，蔗糖密度勾配遠心した。蔗糖液のメニスカスから27 mm の分画を0.2 ml 取出し，翌日 (15～20時間後) 無毒媒介昆虫に注射して感染性を調べた。その結果分画遠心のみの試料と同程度の高い感染性を示した (表3)。

C. クロロホルム処理による分離

実験結果

凍結罹病葉あるいは罹病生葉を葉量1に対し3の割に1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 7) を加えて磨砕し，粗汁液をスターラーで攪拌しながら等量のクロロホルムを加えて3～5分間攪拌した。混合液を低速遠心 (1,000×g) 20分後透明な上層と混濁した中層とに分けて取り出し，これらを34,000×g，60分間遠心してから，沈澱を1/10にとかし，さらに低速遠心 (5,400×g) 15分間遠心した後，上清を無毒ヒメトビウンカに注射した。その結果上層，中層ともに感染性が認められなかった，クロロホルム処理を行なわなかった対照には感染性が認められた (表4)。

同様な方法で粗汁液量に対して20% あるいは10% のクロロホルム処理を行なったが，いずれも感染性が見られなかった (表4)。

さらに同様の方法で 0.1 M の酢酸アンモン溶液 (pH 6.5) を加えて磨砕し，粗汁液の量に対して10% のクロロ

表 3. 保毒ヒメトビウンカからの分離

注射試料*	注射虫数	10日間以上生存虫数	感染株数	感染率 (%)
健全虫分画遠心	30	26	0/9	0
保毒虫分画遠心	30	27	4/9	44.4
健全虫試料 24～27 mm	30	29	0/10	0
保毒虫試料 24～27 mm	30	26	4/9	44.4

*： 蔗糖密度勾配遠心を行なった翌日に媒介昆虫に注射した。

表 4. 薬剤処理による分離

処理	注射試料		注射虫数	10日間以上生存虫数	感染株数	感染率 (%)
クロロホルム	50%*	上層	30	8	0/8	0
		中層	30	12	0/12	0
		対照	30	20	7/20	35.0
	20%*	上層	30	10	0/10	0
		中層	30	11	0/11	0
		対照	30	19	6/19	31.6
	10%*	上層	30	13	0/13	0
		対照	30	23	8/23	34.8
		上層	61	28	0/28	0
		中層	57	38	0/38	0
		対照	46	37	12/37	32.4
	10%**	上層	30	13	0/5	0
		中層	30	16	0/6	0
		対照	30	25	5/9	55.6
エーテル	50%**	下層 (1)	30	17	0/6	0
		下層 (2)	30	20	0/7	0
		中層	30	16	0/6	0
		対照	30	14	3/5	60.0
四塩化炭素	20%**	19～22 mm	30	23	0/8	0
		24～27 mm	63	37	0/13	0
		対照	58	39	10/13	76.9

*： 1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。
**： 1/10 M 酢酸アンモン (pH 6.5) を用いた。

ホルムを加えた場合も前同様に処理したものに感染性が認められなかった (表4)。

D. エーテル処理による分離

実験結果

凍結罹病葉に 0.1 M の酢酸アンモン溶液 (pH 6.5) を病葉重の3倍量加えて磨砕して粗汁液を得た。この粗汁液を低速遠心 (1,000×g), 20分後, 上清を攪拌しながら等量のエーテルを徐々に加えて, 分液漏斗に入れて10分間ふりまぜた後, 30分間静置し, 下層の透明部分を取除き, 上の部分の変性蛋白層をさらに低速遠心 (1,300×gg), 15分間行ない, 上層の変性蛋白層を捨て, 下層の混濁部分をさらに分液漏斗に入れて10分間ふりまぜて後30分間静置した。上, 下両層を分別して取り出し, 第1回目の分液漏斗で得た透明部分 (下層(1)) と別々に15時間0.1 Mの酢酸アンモン溶液 (pH 6.5) で透析してから無毒のヒメトビウンカに注射した。この結果いずれの分画にも感染性は認められなかった。無処理の対照には感染力のあることが認められた (表4)。

E. 四塩化炭素処理による分離

実験結果

昆虫ウイルスで四塩化炭素を用いて分離に成功した例が報告されている (BAILEY and GIBBS 1964, BAILEY ら 1963, 1964, LEE and FURGALA 1965a, b)。

本ウイルスについても四塩化炭素を用いて分離を試みた。罹病葉に 0.1 M 酢酸アンモン溶液 (pH 7.0) を加えて磨砕し, 粗汁液量に対して, 1/4 量の四塩化炭素を攪拌しながら加え, 分画遠心後, 蔗糖密度勾配遠心によって分離を行なった。蔗糖液のメニスカスから 24～27 mm の部分を取り出して無毒の媒介昆虫に注射したが感染性は認められなかった (表4)。

同様な方法でさらに実験を行ない蔗糖液のメニスカスから 19～22 mm および 24～27 mm の部分を取り出して感染性を調べたが, ともに感染性が認められなかった (表4)。

F. 電子顕微鏡による観察

罹病植物から燐酸緩衝液および酢酸アンモンを用いて分離された 24～27 mm 分画を電子顕微鏡で観察した結果桿状の粒子が多数認められた。これらの粒子の他に不定形の球状物質が多く認められるが, 健全植物の同じ分画からは桿状粒子は全く認められず, 不定形球状物質が僅かに認められた。この桿状粒子の大きさは 500～600×40～45 mμ であった。

保毒のヒメトビウンカから分離された 24～27 mm 分画にも同じ桿状粒子 500～600×40～45 mμ が観察され, 無毒のヒメトビウンカの同じ分画には全く桿状粒子が見られなかった。

IV. 論議および結論

イネ萎縮病を蔗糖密度勾配遠心法によって精製し, 4°C で24時間, 種々の緩衝液に対して透析し, 電子顕微鏡および密度勾配遠心によって粒子構造の安定性を検討した結果, 蒸溜水, 1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 6.5), 0.1 M tris 緩衝液 (pH 7.4) 中では粒子はきわめて不安定であったとのことである (児玉ら, 1966)。ムギ北地モザイク病ウイルスの場合はその分離過程において感染性のいちじるしい低下が見られる。とくに 1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 7) において蔗糖密度勾配遠心後の試料を直ちに媒介昆虫に注射すれば 30～40% の感染性が認められるが, 5～7°C 下で約20時間放置した試料では感染性は認められず, その間にウイルスの感染性が失なわれたことと思われる。酢酸アンモン溶液 (pH 6.5, 7.0) を用いた場合, 密度勾配遠心後の試料を 5～7°C で 15～20 時間後にヒメトビウンカに注射しても 60% 以上の感染性が認められた。密度勾配遠心後の試料を分離直後に媒介昆虫に注射すれば, 対照 (分画遠沈で濃縮したウイルス試料) より高いか, 同程度の感染性を示すことができる。これは本ウイルスが 0.1 M 酢酸アンモン溶液 (pH 6.5, 7.0) で比較的安定であることを示している。しかし同様の方法でヒメトビウンカより分離を行なった場合は対照と同等の感染性 (44.4 %) しか示さず, 昆虫組織から分離した場合はあまり高い感染性が得られなかった。

蔗糖密度勾配遠心により蔗糖液のメニスカスから, 5～7 mm, 13～15 mm および 24～27 mm の部分に band が認められた。5～7 mm と 13～15 mm の band は 24～27 mm 分画に比べると, 幅約 2 mm の狭い明瞭な band であったが, ウイルスの感染性は認められなかった。24～27 mm 部分の分画は 20～29 mm の範囲にわたって混濁しており, 不明確な分画であった。健全植物試料の分画にも同じような状態が見られたが, 24～27 mm の分画は罹病植物試料のそれよりもややうすく見られるのみで健病の band の間に差を認めることは困難であった。しかしこれらの分画の中 24～27 mm の試料にのみ感染性が認められ, 本ウイルスが含まれているものと考えられた。この分画を電子顕微鏡で観察した結果, 桿状のやや屈曲した粒子が認められた。かかる粒子は健全植物および無毒媒介昆虫の試料には認められぬことから, この粒子が本病のウイルスと考えられる。この分画中にはウイルス粒子以外の多くの物質の存在することが電子顕微鏡

で認められたが，健全植物試料の同じ分画に不明瞭な混濁が認められる点からも，まだ精製が十分でなく，かなりの植物成分を含んでいるものと考えられる。このような不純物を除くためクロロホルム，エチルエーテル，四塩化炭素などを用いて分離を試みたが，いずれもウイルスの活性が全く失なわれた。植物ウイルスでこのような有機溶媒によって不活性化されるのは lettuce necrotic yellows virus において報告されており (CROWLEY ら 1965, HARRISON and CROWLEY 1965)，ムギ北地モザイク病ウイルスも形態あるいは組成上このウイルスに近い性質を有するようである。

引用文献

1. BAILEY, L. and GIBBS, A. J. 1964. Acute infection of bees with paralysis virus. J. Insect Pathology **6**: 395–407.
2. BAILEY, L. GIBBS, A. J. and WOODS, R. D. 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* LINNAEUS). Virology **21**: 390–395.
3. BAILEY, L. GIBBS, A. J. and WOODS, R. D. 1964. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* LINNAEUS). Virology **23**: 425–429.
4. BRAKKE, M. K. 1951. Density gradient centrifugation: a new separation technique. J. Am. Chem. Soc. **73**: 1847–1848.
5. BRAKKE, M. K. 1960. Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. Adv. Virus Res. **7**: 193–224.
6. CROWLEY, N. C. HARRISON, B. D. and FranckI, R. I. B. 1965. Partial purification of lettuce necrotic virus. Virology **26**: 290–296.
7. 福士貞吉 1946. 北地ムギ類モザイク病の予防に関する研究. 寒地農学, **1**: 150–111.
8. HARRISON, B. D. and CROWLEY, N. C. 1965. Properties and structure of lettuce necrotic yellows virus. Virology **26**: 297–310.
9. 石井卓爾・松本 蕃 1964. ムギ北地モザイク病の新しい媒介昆虫について. 日植病報, **29**: 280.
10. 石井卓爾 1966. シロオビウンカ *Delphacodes albifascia* (MATSUMURA) の分布，翅型ならびにムギ北地モザイク病の媒介について. 北農試彙報, **89**: 49–54.
11. 伊藤誠哉・福士貞吉 1943. 北地ムギ類モザイク病の研究 (予報). 病虫害雑誌, **30**: 8–13.
12. 伊藤誠哉・福士貞吉 1944a. 北地ムギ類モザイク病の研究. 札幌農林学会報, **36** (3): 62–89.
13. 伊藤誠哉・福士貞吉 1944b. 北地ムギ類モザイク病の研究. 札幌農林学会報, **36** (4): 65–89.
14. ITO, S. and FUKUSHI, T. 1956. Studies on northern cereal mosaic. Ann. Phytopath. Soc. Japan 21 (1): 3.
15. 児玉忠士・木村郁夫・沢田 皓・鈴木直治 1966. イネ萎縮病ウイルス純化標品の均質性と安定性. 日植病報, **32**: 86.
16. LEE, P. E. and FURGALA, B. 1965a. Chronic bee paralysis virus in the nerve ganglia of the adult honey bee. J. Inverteb. Path. **7**: 170–174.
17. LEE, P. E. and FURGALA, B. 1965b. Sacbrood virus: some morphological features and nucleic acid type. J. Inverteb. Path. **7**: 502–505.
18. MURAYAMA, D. and LU, Y. T. 1967. Some physical properties of northern cereal mosaic virus. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. **55**: 182–190.
19. ROCHOW, W. F. and BRAKKE, M. K. 1964. Purification of barley yellow dwarf virus. Virology **24**: 310–322.
20. 新海 昭 1955. 北地麦類モザイク病の寄主植物追加. 日植病報, **19**: 140.
21. 新海 昭 1966. サッポロトビウンカによるイネ黒条萎縮病. 縞葉枯病およびムギ北地モザイク病ウイルスの媒介. 日植病報, **32**: 317.

Summary

Northern cereal mosaic virus (NCMV) was isolated from both diseased plants and viruliferous insects by means of sucrose density-gradient centrifugation. After alternate cycles of low and high speed centrifugations, the concentrated virus preparations were layered on the sucrose columns, and highly infective fraction was removed from the 24–27 mm zone.

Effects of the phosphate buffers and some chemicals on the infectivity of the virus during the isolation procedures resulted that the virus was more stable in the 1/10 M ammonium acetate solution than in 1/15 M phosphate buffer solution.

Electron microscopy of the preparations of infective fractions of 24–27 mm from the sucrose meniscus after density-gradient centrifugations revealed the flexuous rods of 500–600 mμ × 40–45 mμ. Since the infectivity highly corresponded with the 24–27 mm fractions from both diseased plant and infective insect materials, and no such particles were found in the healthy plant and insect preparations, it is most likely that such flexuous rods are the causal virus of NCMV.

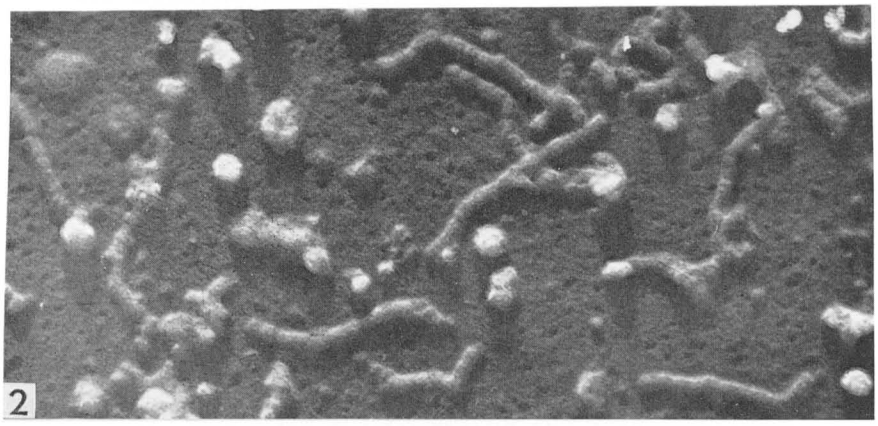
図 版 説 明

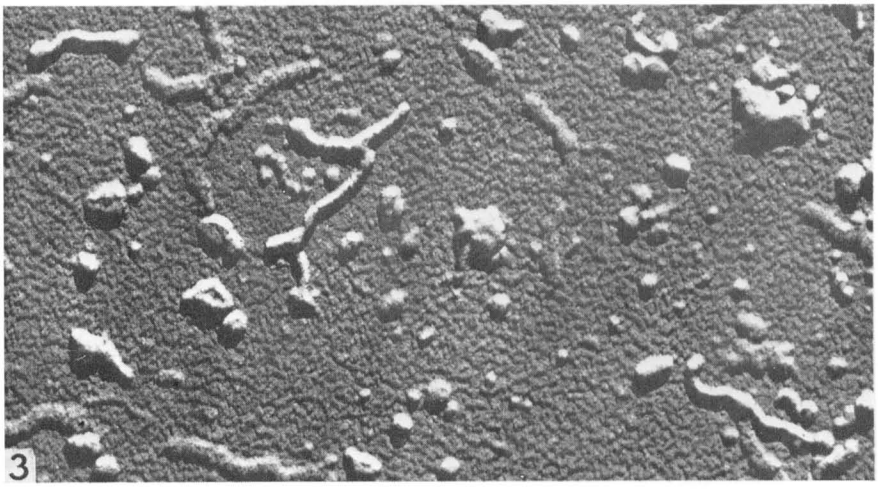
1. 罹病植物から 1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて分離，蔗糖密度勾配遠心後 24～27 mm の分画から得られたムギ北地モザイク病ウイルス　× 30,000

2. 同上，1/10 M 酢酸アンモン (pH 6.5) を用いた。　× 60,000

3. 保毒ヒメトビウンカから 1/10 M 酢酸アンモン (pH 6.5) を用いて分離，蔗糖密度勾配遠心後 24～27 mm の分画から得られたムギ北地モザイク病ウイルス　× 30,000

1


2


3