HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イネ黒条萎縮病ウイルスの純化
Author(s)	北川, 良親; 四方, 英四郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 6(4), 446-451
Issue Date	1969-02-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11779
Type	bulletin (article)
File Information	6(4)_p446-451.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

イネ黒条萎縮病ウイルスの純化

北川良親・四方英四郎
(北海道大学農学部植物学教室)

Purification of rice black-streaked dwarf virus

Yoshichika KITAGAWA and Eishiro SHIKATA
(Department of Botany, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received October 21, 1968

緒　言

イネ黒条萎縮病ウィルスについては前報[1]において報告したようにウィルスの諸性質が著者らの研究によって明らかにされ，クロロホルムを除く幾つかの有機溶媒に対して安定であることが解った。このような結果に基づいて未だ明らかにされていない本ウィルス粒子の形態を明らかにするため，ウィルスの分離および純化を試みた。本研究に当たり御懇得なる御指導を賜った北大農学部植物学教室村山大記教授に深く感謝する次第である。

実験材料および方法

供試ウィルス源および接種方法は前報に記したものと同様である。

本実験に用いた蔗糖濃度勾配カラムは径2.5 cm，長さ7.5 cmのニトロセルロース・チューブに蔗糖濃度50, 40, 30, 20%を含む0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を7:7:7:4 mℓずつ積み上げ，4°Cの冷室に一夜放置した。超遠心分離は日立製作所40P型遠心機のRPS 25ローターで20,000 rpm，60分行ない，遠心分離後，注射器でチューブの側壁もしくは上部から試料を抜き取った。

実験結果

汁液の清澄化

イネ黒条萎縮病ウィルスはクロロホルムもしくはクロロホル:n-ブタノール (1:1) 処理により全く活性を失なうが四塩化炭素，フロロカーボン (Difron S-3) および活性炭などの処理ではほとんど影響を受けない (北川・四方, 1969)[1]。しかし，搾汁液の清澄化の点からみると活性炭のみでは効果が薄く，四塩化炭素およびフロロカーボンなどで比較的良い結果が得られる。

罹病イネ粗汁液の四塩化炭素，フロロカーボン処理およびpH 6のリン酸緩衝液での抽出の際におけるウィルスの損失あるいは不活化についてさらに詳しく調べた。罹病イネ粗汁液に20%四塩化炭素およびフロロカーボンを加えホモジナイザーで3分間攪拌後，3,000 rpm，10分の遠心分離を行ない，その上清を稀釈して無毒のヒメトビウンカに注射した結果，四塩化炭素処理では無処理の汁液と同じ400倍稀釈まで活性があったが，フロロカーボン処理では無処理の汁液が4000倍稀釈においても活性があるのに対し400倍稀釈までしか活性がなく，フロロカーボン処理によって若干ウィルスの損失があるものと思われる (表-1)。

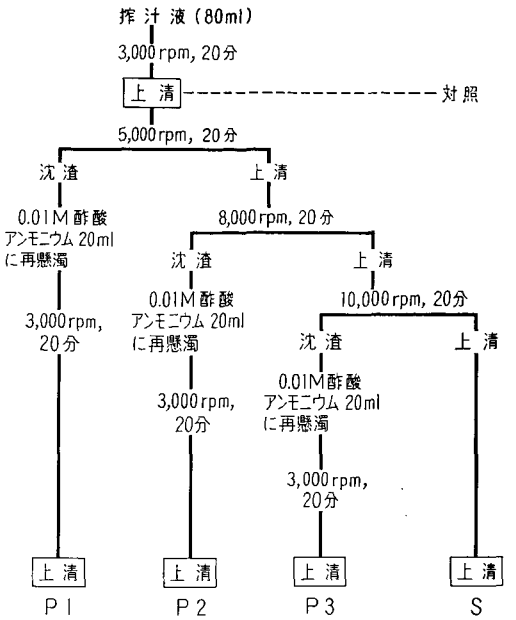
また，フロロカーボン処理では遠心分離後の上清がなお薄い緑色を呈するが，四塩化炭素処理では淡褐色の混濁した上清を得る。しかしなお僅少の緑色が残り，四塩化炭素1回の処理では清澄化は不十分である。

罹病イネ茎葉2 gにpH 6の0.1 Mリン酸緩衝液18 mℓを加えて磨砕し，3,000 rpm，10分の遠心分離後，上清を10倍稀釈液として，0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6) でさらに100, 1000倍に稀釈して無毒虫に注射した。沈渣はpH 7の0.1 Mリン酸緩衝液20 mℓに再懸濁し，3,000 rpm，10分の遠心分離を行ない，上清を10倍稀釈液として，0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7) でさらに100, 1000倍に稀釈して無毒虫に注射した。この結果，上清は1000倍稀釈まで活性があったが，沈渣部分中にpH 7のリン酸緩衝液で再懸濁された溶液中のウィルス活性は10倍稀釈までであり，pH 6のリン酸緩衝液で抽出後，低速遠心分離で若干のウィルスが沈澱することが認められた。

本研究の一部は昭和40年度偕成学術奨励金，昭和42年度科学研究補助金 (各個研究) 61378による。

表—1 四塩化炭素，フロロカーボン処理および pH 6 におけるウィルスの損失

薬剤および pH		稀釈度 (倍)	注射虫数	15日目生存虫数	1株当りの接種虫数	発病植物数/接種植物数	感染率 (%)
四塩化炭素	処理	40	40	27	3	3/9	(33.3)
		400	40	18	3	2/6	(33.3)
		4000	40	21	3	0/7	(0)
	無処理	40	40	0	—	—	—
		400	40	20	3	4/7	(57.1)
		4000	40	23	3	0/8	(0)
フロロカーボン	処理	40	40	15	3	1/5	(20.0)
		400	40	27	3	3/9	(33.3)
		4000	40	21	3	0/7	(0)
	無処理	40	40	24	3	4/8	(50.0)
		400	40	21	3	6/7	(85.7)
		4000	40	21	3	1/7	(14.3)
pH 6	上清	10	40	16	2	4/8	(50.0)
		100	40	12	2	0/6	(0)
		1000	40	14	2	1/7	(14.3)
	沈渣	10	40	14	2	3/7	(42.9)
		100	40	16	2	0/8	(0)
		1000	40	12	2	0/6	(0)



図—1 低速遠沈試験の方法

遠心分離

(1) 低速遠沈試験

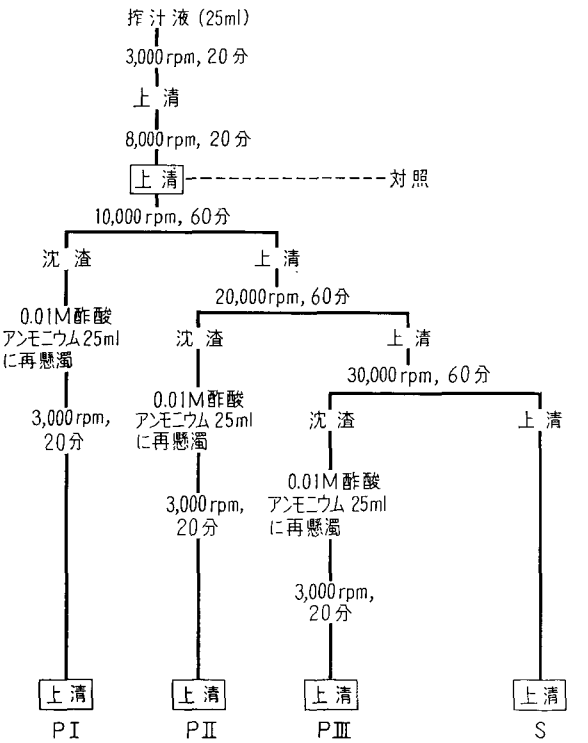
罹病イネ茎葉に4倍量の0.1M酢酸アンモニウムを加え乳鉢で磨砕して得た搾汁液を図-1の方法で低速遠沈試験を行なった。

このようにして得た各上清を無毒虫に注射した。結果は表-2に示した通りである。

表—2 低速遠沈試験結果

注射試料	注射虫数	15日目生存虫数	1株当りの接種虫数	発病植物数/接種植物数	感染率 (%)
対照	60	21	3	6/7	(85.7)
P 1	60	24	3	3/8	(37.5)
P 2	60	20	3	3/7	(42.9)
P 3	60	21	3	3/7	(42.9)
S	60	12	3	4/4	(100)

以上の結果から，いずれの上清にも活性が認められたが10,000 rpm, 20分の遠心分離後の上清に大部分のウィルスが残るものと思われる。



図—2 高速遠沈試験の方法

(2)　高速遠沈試験

罹病イネ茎葉に5倍量の0.1 M酢酸アンモニウムを加えて磨砕して得た搾汁液を図-2の方法で高速遠沈試験を行なった。

このようにして得た各上清を無毒虫に注射した。結果は表-3に示した。

表—3　高速沈試験結果

注射試料	注射虫数	15日目生存虫数	1株当りの接種虫数	発病植物数/接種植物数	感染率 (%)
対　照	60	46	3	15/15	(100)
P I	60	42	3	14/14	(100)
P II	60	44	3	11/15	(73.3)
P III	60	36	3	0/12	(0)
S	60	39	3	0/12	(0)

この結果，20,000 rpm，60分で全てのウィルスが沈澱することが解った。

(3)　分画遠心試験

低速・高速遠沈試験の結果からウィルス分離には8,000 rpm，20分の低速と20,000 rpm，60分の高速による分画遠心が適当と思われる。このような分画遠心を1～2回反復した場合のウィルスに及ぼす影響について調べた。結果は表-4に示した通りである。

表—4　反復分画遠心試験

分画遠心の回数	注射虫数	15日目生存虫数	1株当りの接種虫数	発病植物数/接種植物数	感染率 (%)
対　照	50	42	3	7/14	(50.0)
1回目	50	41	3	9/14	(64.2)
2回目	50	43	3	7/14	(50.0)

すなわち，分画遠心を2回繰返し行なってもウィルス活性の低下は認められなかった。

蔗糖濃度勾配遠心法によるウイルスの分離

罹病イネ茎葉もしくは保毒虫に0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7)を加えて磨砕し搾汁後，上述のような分画遠心法1回で清澄化したウィルス汁液を2 mℓに濃縮し，蔗糖濃度勾配カラムにのせ，RPS 25水平ローターを用いて20,000 rpm，60分の遠心分離後，チューブの上部から先を直角に曲げた注射針を用いて表-5に示したように順次試料を吸い取り各分画を各々無毒虫に注射した。

以上の結果を表-5に示した。実験1では，保毒虫(0.525 g)を用い，実験2および3は罹病イネ茎葉(40 gおよび15 g)を用いた場合の各分画のウィルス活性を示した。

表—5　蔗糖濃度勾配カラムの各分画のウィルス活性

実験No.	分画 管底からの距離 (mm)	注射虫数	15日目生存虫数	1株当りの接種虫数	発病植物数/接種植物数	感染率 (%)
実験1	対　照	40	33	3	11/11	(100)
	0～21	40	36	3	7/12	(58.3)
	21～28	40	30	3	1/10	(10.0)
	28～35	40	12	3	3/4	(75.0)
	35～42	40	33	3	9/11	(81.8)
	42～49	40	36	3	7/12	(58.3)
	49～56	40	27	3	6/9	(66.7)
実験2	対　照	40	10	2	1/5	(20.0)
	0～21	40	24	2	0/12	(0)
	21～28	40	18	2	2/9	(22.2)
	28～35	40	14	2	1/7	(14.3)
	35～42	40	28	2	5/14	(35.7)
	42～49	40	18	2	0/9	(0)
	49～56	40	20	2	0/10	(0)
実験3	対　照	40	28	3	2/9	(22.2)
	25～31	40	11	2	1/5	(20.0)
	31～35	40	27	3	0/9	(0)
	35～40	40	30	3	3/10	(30.0)
	40～43	40	23	3	0/8	(0)
	43～47	40	12	3	0/4	(0)

保毒虫汁液を用いた場合(実験1)はいずれの分画とも感染性が認められたが，管底より35～42 mmの分画に極めて高く，実験2および3の罹病イネ茎葉を用いた場合も同様にこの分画に最大のウィルス活性があった。

純化の方法

汁液の清澄化，分画遠心および蔗糖濃度勾配遠心分離試験の結果を組合せて，次のようにしてイネ黒条萎縮病ウィルスの純化を行ない，蔗糖濃度勾配カラムの管底より35～37 mmの部位にウィルスバンドを得た。純化の方法は図-3に示した。

このような方法で純化するとウィルス分画以外に1～2本のバンドが認められることがある。これらのバンドは管底より32～33 mmおよび28～29 mmの位置にあり，健全イネ茎葉を図-3の方法で処理した場合に現われ

罹病イネ茎葉 600g

↓ 0.1Mリン酸緩衝液(pH7)900mlを加えつつ肉挽機で磨砕し、ガーゼで搾汁 3,000rpm, 5分

上清

↓ 30%四塩化炭素処理 3,000rpm, 10分

上清

↓ 20,000rpm, 60分

沈渣

↓ 0.01Mリン酸緩衝液(pH7)60mlに再懸濁 8,000rpm, 20分

上清

↓ 10%四塩化炭素処理 3,000rpm, 10分

上清

↓ 20,000rpm, 60分

沈渣

↓ 0.01Mリン酸緩衝液(pH7) 2mlに再懸濁 8,000rpm, 20分

上清

↓ 蔗糖濃度勾配遠心分離 20,000rpm, 60分 (濃度勾配カラム；50：40：30：20%蔗糖＝7：7：7：4ml)

ウィルス分画（管底より35～37mm）

→（一部注射試料）

↓ 0.01Mリン酸緩衝液(pH7)を加えて30～35mlにする。20,000rpm, 60分

沈渣

↓ 0.01Mリン酸緩衝液(pH7)の適当量を加えて再懸濁 8,000rpm, 20分

ウィルス液

図—3 純化の方法

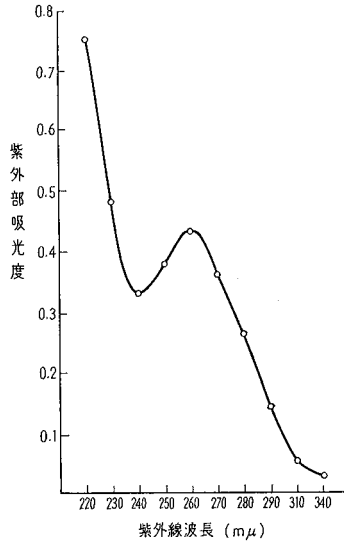
る1～2本のバンドと同じ位置である。これらのバンドのウィルス活性について調べたのが表-6である。

対照として，20%四塩化炭素を処理する前の粗汁液(対照1)および四塩化炭素処理後分画遠心で部分純化して，蔗糖濃度勾配カラムにのせる前の試料(対照2)を用いた。

その結果，蔗糖濃度勾配カラムの管底より35～37mmの位置にあるウィルスバンドはいずれも高い感染性を示した。なお，実験2および3ではウィルスバンド以外のバンドは認められなかった。

表—6 蔗糖濃度勾配カラム内の各バンドのウィルス活性

実験No.	注射試料	注射虫数	15日目生存虫数	1株当りの接種虫数	発病植物数／接種植物数	感染率(%)
実験1	対照1	40	8	2	3/4	(75.0)
	対照2	40	8	2	4/4	(100)
	ウィルスバンド	40	12	2	4/6	(66.7)
	32～33mmバンド	40	8	2	1/4	(25.0)
実験2	対照1	40	8	2	3/4	(75.0)
	ウィルスバンド	40	16	2	4/8	(50.0)
実験3	対照1	40	21	3	5/7	(71.4)
	ウィルスバンド	40	27	3	6/9	(66.7)



図—4 紫外部吸収曲線

紫外部吸収曲線

純化ウィルス液の紫外部吸光度を測定した(図-4)。この結果，O.D. 260 mμに最大吸収を示す核蛋白の特異的な吸収曲線が得られた。

電子顕微鏡観察

上記の純化の方法にしたがって得られた純化ウィルス試料について，negative staining および tungsten shadowing した後，電子顕微鏡による観察を行なった。

ウィルス活性の高い管底より35～37mmのバンドに

は多数の直径60 mμの均一な球形粒子が認められた(図版1)。32～33 mmのバンド中にも僅かにウィルス粒子が見られるが，その他の分画にはウィルス粒子は認められなかった。ウィルスバンドの試料をshadowingして検鏡した結果，薄い膜様物質がウィルス粒子を包んでいるのが観察された(図版2)。そのため粒子の大きさは不斉で直径80～100 mμに計測される。このような膜様物質は非常に薄く，negative stainingでは明瞭に観察できない。

論　　議

イネ黒条萎縮病ウィルスの純化は30%四塩化炭素処理後，1回の分画遠心を行ない，再び10%四塩化炭素処理を行なうことにより，よい結果が得られた。四塩化炭素とフロロカーボンの組合せではいずれの場合もウィルスバンドは認められたが，なおウィルス以外の植物成分が混っていた。pH 6のリン酸緩衝液を用いて純化を行なうとウィルスの損失が大きいため緩衝液はpH 7を用いるのが適当と思われる。四塩化炭素もしくはフロロカーボンと組合せて活性炭の使用も試みたが，ウィルスバンドは認められなかった。このような結果から，四塩化炭素のみを用いて純化する方法が最適と思われるが，この方法で得られるウィルスの収量はあまり高くない。

電子顕微鏡による観察から本ウィルスには粒子の表面に薄い膜様物質が付着していることが解った。この膜様物質がイネ萎縮病ウィルスに見られるようなphospholipid性の細胞成分(TOYOTAら1965)[5]であるかウィルスenvelopeなのか未だ明らかでない。四方ら(1967)[4]は超薄切片による罹病イネおよびトウモロコシ腫瘍部細胞の電子顕微鏡観察から本ウィルスは直径75 mμの球状ウィルスであると報告したが，筆者らが，純化したウィルスの直径は約60 mμであった。このような相違が何に由来するのか，未だ明らかでない。

しかし，LOVISOLOら(1967)[3]はイタリーに発生しているMaize rough dwarf virusについても部分純化ウィルス粒子の大きさは60 mμの球形であり，超薄切片による細胞中のウィルスは直径70 mμであることを報告している。

Maize rough dwarf virusについてはそのトウモロコシの病徴とヒメトビウンカによって媒介されることから，LOVISOLO and CONTI (1966)[2]はイネ黒条萎縮病ウイルスによく似ていることを指摘した。今回筆者らの精製ウィルスから得られた結果からも，イネ黒条萎縮ウィルスとMaize rough dwarf virusはきわめて近縁なウィルスと考えられる。

摘　　要

1) 罹病イネ茎葉からのイネ黒条萎縮病ウィルスの純化を試みた。

2) フロロカーボン(Difron S-3)処理およびpH 6のリン酸緩衝液による抽出よりも四塩化炭素処理による清澄化の方がよい結果を得た。

3) 本ウィルスは5,000 rpm，20分の遠心分離でも若干沈澱するが，10,000 rpm，20分の上清に大部分が残る。また，20,000 rpm，60分の遠心分離で全てのウィルスは沈澱した。

4) 8,000 rpm，20分；20,000 rpm，60分の分画遠心を反覆してもウィルス活性の低下は認められなかった。

5) 四塩化炭素処理および分画遠心で部分純化し，さらに蔗糖濃度勾配遠心分離を行なうと，蔗糖濃度勾配カラムの管底より35～37 mmの位置にウィルスバンドが認められた。

6) このバンドの試料はO.D. 260 mμに最大吸収を持つ核蛋白の吸収曲線を示し，高いウィルス活性があった。

7) 電子顕微鏡で観察すると，本ウィルスは直径60 mμの球状粒子である。shadowing像の観察から，ウィルスの周囲に薄い膜様物質が付着しているのが認められた。

引 用 文 献

1) 北川良親・四方英四郎 (1969). イネ黒条萎縮病ウィルスの諸性質. 北海道大学農・邦・紀要., **6**: 439–445.

2) LOVISOLO, O. and CONTI, M. (1966). Individuazione al microscopio elettronico del Virus del nanismo ruvido del mais (MRDV) in piante die *Zea mays* L. sperimentalmente infettate. Atti Accad. Sci. Torino, **100**: 63–72.

3) LOVISOLO, O., LUISONI, E., CONTI, M. and WETTER, C. (1967). Partial purification of maize rough dwarf virus. Naturwissenschaften, **54**: 73–74.

4) 四方英四郎・盧　耀村・松本　勤・山田堅一郎 (1967). イネ黒条萎縮病ウィルスの電子顕微鏡学的研究. 日植病報, **33**: 96.

5) TOYOTA, K., KIMURA, I. and SUZUKI, N. (1965). Purification of rice dwarf virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **30**: 225–230.

Summary

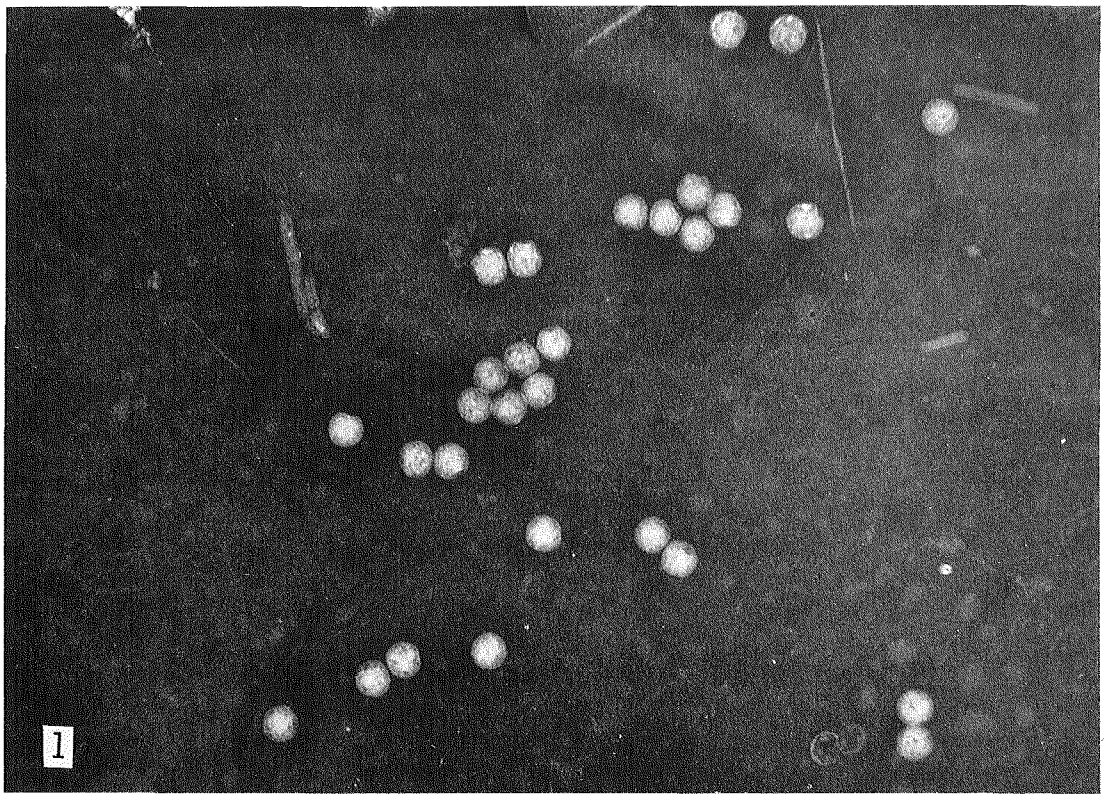
Rice black-streaked dwarf virus (RBSV) was pur-

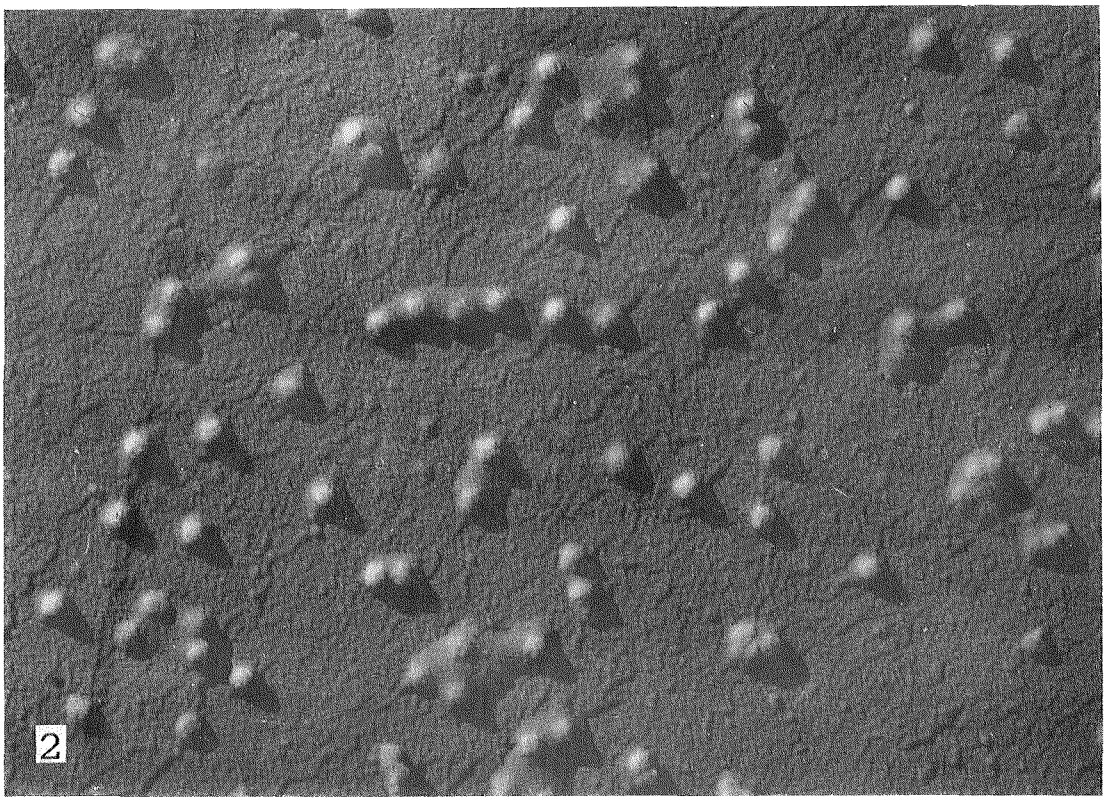
ified from the extracts of diseased rice leaves. The extracts were clarified with 30% carbon tetrachloride and by differential centrifugations at 8,000 rpm (4,930 g) for 30 minutes and 20,000 rpm (30,800 g) for 60 minutes. The resultant pellets were resuspended in a 1/100 M phosphate buffer at pH 7.0 and then the virus was purified by sucrose density gradient centrifugation. High infectivity was associated with a visible band of 35-37 mm from the bottom of the tube. Ultraviolet absorption spectrum of the virus zones showed a characteristic nucleoprotein absorption curve. Electron microscopy of the purified virus preparations revealed that RBSV particles were spherical of 60 mμ in diam. and contained negligible amount of host cell components.

図 版 説 明

第 1 図 罹病イネから分離したイネ黒条萎縮病ウィルス，2% PTA Negative staining. × 80,000

第 2 図 罹病イネから分離した，イネ黒条萎縮病ウィルスのタングステン shadowing 像 × 40,000


1


2