



Title	オオムギ斑葉モザイクウイルスの鈍化、感染性および抗原性
Author(s)	村山, 大記; MURAYAMA, Daiki; 横山, 竜夫 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 5(3), 184-188
Issue Date	1965-10-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11748
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(3)_p184-188.pdf



オオムギ斑葉モザイクウイルスの純化, 感染性および抗原性

村山大記・横山 竜夫

(北大農学部植物学教室)

Purification, infectivity and antigenicity of barley stripe mosaic virus

By

DAIKI MURAYAMA and TATSUO YOKOYAMA

(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

I. 緒 言

オオムギ斑葉モザイクウイルス (BSMV) の化学的性質についてはすでに報告した¹⁸⁾。本ウイルスの純化には分画遠心法^{16, 28)}が多く採用されているが, KASSANIS and SLYKHUIS¹⁴⁾は硫酸塩析法を用いた。筆者らは 2, 3 の薬品を用いて純化を行ない, ウイルスの感染性ならびに抗原性におよぼす影響について実験を行なった。

II. 実験材料

用いたウイルスおよび抗血清, あるいは接種試験に用いたオオムギは既報の通りである¹⁶⁾。

III. 実験結果

1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ による純化

実験第 1. BSMV 罹病オオムギ(モラビア)の茎葉搾汁液を遠心分離 (750×g, 30 min) し, 上清に 1/10~8/10 飽和の硫酸を加えて, 約 30 分間冷室 (4°C) に静置した。これを遠心分離 (750×g, 30 min) し, 上清を流水中にて約 6 時間透析を行ない, 一方, 沈殿を蒸溜水で溶解し, 遠心分離 (750×g, 30 min) して不溶性沈殿物を除去

第 1 表 硫酸塩析法による BSMV の感染性

硫酸飽和度	対照	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10
沈 殿	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{3}{20}$	$\frac{6}{20}$	$\frac{6}{20}$	$\frac{4}{20}$	$\frac{3}{20}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{2}{20}$
上 清	$\frac{8}{20}$	$\frac{6}{20}$	$\frac{4}{20}$	$\frac{4}{20}$	$\frac{4}{20}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{0}{20}$	$\frac{0}{20}$	$\frac{0}{20}$

分母: 接種株数, 分子: 発病株数, 以下の表同様。

して同様に透析を行なった。接種には健全オオムギ(モラビア)を用い, 第 3 葉期にカーボランダム法にて行なった。結果は第 1 表に示した。

すなわち, BSMV の感染力は硫酸 3/10 および 4/10 飽和処理沈殿中において最も高いことが認められ, 1/10 飽和ではウイルスはほとんど沈殿せず, 上清に活性が見られた。5/10 飽和以上ではウイルスはすべて沈殿するがそのほとんどが不活化されることが認められた。

実験第 2. 同様にして行なった結果を第 2 表に示した。

第 2 表 硫酸塩析法による BSMV の感染性

硫酸飽和度	対照	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10
沈 殿	$\frac{3}{30}$	$\frac{11}{30}$	$\frac{12}{30}$	$\frac{17}{30}$	$\frac{6}{30}$	$\frac{2}{30}$	$\frac{2}{30}$	$\frac{0}{30}$	$\frac{0}{30}$
上 清	$\frac{11}{30}$	$\frac{6}{30}$	$\frac{4}{30}$	$\frac{2}{30}$	$\frac{0}{30}$	$\frac{0}{30}$	$\frac{0}{30}$	$\frac{0}{30}$	$\frac{0}{30}$

すなわち, 3/10 飽和の硫酸を加えた場合, 沈殿に最も高い感染力が認められ, 2/10 飽和の沈殿にも高い感染力が見られたが, 3/10 飽和の上清になおウイルス活性が認められ, 4/10 飽和ですべてのウイルスが沈殿したものと考えられる。しかし, 5/10 飽和以上の硫酸により沈殿したウイルスには感染力が認められなかった。

実験第 3. 同様にして硫酸塩析を行ない, 沈降反応混合合法により抗原性を検討した。

硫酸 1/10 飽和の沈殿に, 抗血清終末稀釈 128 倍まで反応が見られ, 抗原性が認められた。2/10 飽和ではかなり反応が強くなり, 3/10 飽和以上では反応は著しく, 抗原性が強く認められた。また, 上清では 3/10 飽和のも

第3表 硫酸塩析法によるBSMVの抗原性

処理抗原	抗血清終末希釈倍数					対照
	32	64	128	256	512	
対照	+	+	±	-	-	-
1/10*	+	+	+	±	-	-
2/10	+	+	+	+	+	-
3/10	+	+	+	+	+	-
4/10	+	+	+	+	+	-
5/10	+	+	+	+	+	-
6/10	+	+	+	+	+	-
7/10	+	+	+	+	+	-
8/10	+	+	+	+	+	-

処理抗原	抗血清終末希釈倍数					対照
	32	64	128	256	512	
対照	+	+	+	+	+	-
1/10*	+	+	+	+	+	-
2/10	+	+	+	+	+	-
3/10	+	+	+	±	-	-
4/10	-	-	-	-	-	-
5/10	-	-	-	-	-	-
6/10	-	-	-	-	-	-
7/10	-	-	-	-	-	-
8/10	-	-	-	-	-	-

* 硫酸飽和度

ので反応がかなり弱まり，4/10 飽和のものではまったくこれが認められず，ウイルス抗原がすべて沈殿したものと思われる。このような高濃度の塩析で，ウイルスの感染性が消失しても，抗原性にはほとんど変化が認められなかった。

2. Ethylalcohol による純化

実験第1. BSMV 罹病オオムギの莖葉搾汁液の遠心上清に ethylalcohol を所望の濃度となるように加え，冷室に10分間静置した。処理後ただちに遠心分離

第4表 ethylalcohol 処理によるBSMVの感染性

ethylalcohol 濃度 (%)	対照	10	15	20	25	30	35	40
		沈殿	0/20	2/20	3/20	6/20	9/20	6/20
上清	5/20	4/20	2/20	2/20	1/20	2/20	2/20	0/20

(1,000×g, 15 min) し，上清は流水中にて約12時間透析し，沈殿は蒸留水に再懸濁させ，遠心分離(1,000×g, 15 min) した上清を同様に約6時間透析した。接種試験には健全オオムギを用いた。

第4表に示したように，25% ethylalcohol 処理の沈殿は最も高い感染性を示し，20~30% ethylalcohol による沈殿が比較的活性が高かった。しかし，35% 以上のものにてはウイルスの感染性は減じた。

実験第2. 前実験と同様にして行なった。

第5表 ethylalcohol 処理によるBSMVの感染性

ethylalcohol 濃度 (%)	対照	10	15	20	25	30	35	40
		沈殿	3/30	15/30	19/30	20/30	14/30	6/30
上清	19/30	19/30	10/30	4/30	0/30	0/30	0/30	0/30

第6表 ethylalcohol 処理によるBSMVの抗原性

処理抗原	抗血清終末希釈倍数					対照
	32	64	128	256	512	
対照	+	+	+	±	-	-
10*	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	+	-
25	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	±	-	-
35	+	+	+	±	-	-
40	+	+	±	-	-	-

処理抗原	抗血清終末希釈倍数					対照
	32	64	128	256	512	
対照	+	+	+	+	+	-
10*	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	±	-	-
25	+	+	±	-	-	-
30	+	±	-	-	-	-
35	±	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-

* ethylalcohol 濃度 (%)

以上に示すごとく、20% ethylalcohol 処理による沈殿に最も高いウイルス活性が認められた。

実験第3. さらに本処理を行なって後、沈降反応を試みた。結果は第6表に示した。

すなわち、ethylalcohol 10% 処理のものにもかなりの抗原性が認められたが、20 および 25% に最も高い抗原性が得られ、30% 以上の処理により抗原性が減少した。

3. Acetone による純化

実験第1. BSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液を遠心分離 (750×g, 30 min) し、これを冷却した後、同様に冷却した acetone を所定濃度に加えて冷室に10分間静置した。しかる後、遠心分離 (1,000×g, 15 min) し、上

第7表 acetone 処理による BSMV の感染性

acetone 濃度 (%)	対照	10	15	20	25	30	35	40
沈 殿	0 20	2 20	15 20	9 20	5 20	2 20	0 20	1 20
上 清	9 20	6 20	5 20	3 20	0 20	0 20	0 20	0 20

清は流水中にて約12時間透析し、沈殿は蒸溜水中に再懸濁させ、遠心分離 (750×g, 15 min) して不溶性沈殿物を除去した。接種は健全オオムギを用いて行なった。結果は第7表に示した通りである。

すなわち、BSMV は acetone 10% ではほとんど沈殿しないが、15~20% でよく沈殿することが認められた。しかし、30% 以上ではウイルスが著しく不活性化した。

4. Chloroform : n-butanol (1:1) による純化

第8表 Chloroform : n-butanol 処理による BSMV の感染性

処理濃度 (%)	接種原希釈濃度			
	1	10	100	1000
対 照	12 12	12 12	7 12	5 12
5	12 15	4 12	4 12	2 10
10	4 12	1 15	0 15	0 13
25	0 13	0 15	0 15	0 12
50	0 15	0 20	0 13	0 15

実験第1. BSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液を遠心分離 (750×g, 30 min) して夾雑物を除去した。この粗汁液に5, 10, 25 および 50% の濃度となるように、冷却した chloroform と n-butanol の混合液 (1:1) を滴下しながら magnetic stirrer で攪拌した。操作は全て冷室中で行なった。5分間の処理後、遠心分離 (750×g, 5 min) して最上層を採取し、中層ならびに下層を捨てた。この上清液を常法により分画遠心し、分離したウイルスについて健全オオムギに対する接種試験を行なった。接種液の濃度は、原汁液を1として10倍階段稀釈を行ない、1~1000倍稀釈とした。

第8表に示したように、chloroform : n-butanol 混合液を粗汁液に加えた場合、5% 処理のものには無処理のものに次ぐ高い感染力を保ち、10% では著しく感染力が減少し25% にはまったく感染力が失われた。

IV. 考 察

tobacco mosaic virus (TMV) に蛋白沈殿剤を加えることにより感染力を失なわないでウイルスを沈殿させることができるようになり、化学的方法によるウイルスの分離、純化の研究が多くの人々により行なわれてきた^{3, 4-8, 10, 13-15, 21, 24, 25, 28, 29-31}。

すでに報告したように BSMV は ethylalcohol, acetone および phenol により沈殿し、適当な濃度ではウイルス活性にほとんど変化がないことが判り¹³、また、このウイルスが40% 硫酸で沈殿することが認められている。^{14, 16} BSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液に硫酸の飽和溶液を加えるとウイルスが沈殿するが、4/10 飽和以上の濃度では上清には感染性も抗原性も認められず、ほとんどすべてのウイルスが沈殿し、1/10~2/10 飽和ではウイルスの沈殿が不十分のようであった。一方、沈殿したウイルスの活性は4/10 飽和以上では硫酸濃度の上昇に伴って低下し、7/10 飽和以上では感染性はほとんど消失したが、抗原性は3/10 以上8/10 飽和の間ではまったく変化がないようであった。

同様に搾汁液に ethylalcohol を加えた場合、10% でウイルスの沈殿が認められたが、20~25% で沈殿させた場合に高い活性をもつウイルスが得られ、30% 以上では感染性、抗原性ともに低下して純化操作として不適当な濃度であることが判明した。acetone では25% 処理で上清に活性が見られず、感染性の高い分画は15~20% の処理の沈殿であった。罹病葉搾汁液に20~50% の ethanol を加えて不必要な蛋白成分を沈殿させて除くことが行なわれているが、turnip yellow mosaic virus のよう

に 30% 以上の ethanol で不活化がおこったり、あるいは植物蛋白成分とともにウイルスが沈殿したりするために、すべてのウイルスの純化操作に ethanol を用いることはできない^{6,15)}。しかし、TMV や squash mosaic virus ではウイルスの分離や濃縮に ethanol が用いられている^{5,6,29)}。

ウイルスの純化に際して、汁液中からウイルスを選択的に分離する方法と、汁液中の植物成分を取除く操作^{3,5,7,9,11-13,19,20,22,25,28)}とがあるが、SCHNEIDER²³⁾は TMV に感染したタバコの汁液中にある非感染性物質の変性を目的として、chloroform を用い、また、STEERE^{26,27)}は n-butanol と chloroform の等量混合液を用いて SCHNEIDER と同様の操作を行なった。このようにウイルスの純化に際して、n-butanol および chloroform を単独あるいは混合して用いる方法が広く行なわれている^{1,2,30,32)}。

BSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液中には多くの植物蛋白成分が含まれていると考えられ^{16,17)}、これを除去するために chloroform : n-butanol (1 : 1) 混合液を用いて行なった本実験から、混合液 5% 処理区ではウイルスの感染性はかなり高かったが、10% では著しく低下し、25% 以上ではまったく活性を失なった。しかし、5% 以上の処理により搾汁液中の植物蛋白成分はいずれも同様に変性、凝固をおこし、遠心上清が一様に清澄化したことから、通常の分画遠心の前処理として感染性がほとんど阻害されない 5% 処理が有効であると思われる。

V. 摘 要

1. BSMV は 4/10 飽和硫酸塩析で感染性および抗原性をほとんど阻害されずに分離できた。

2. ethanol では 25%、acetone では 20% 処理で、それぞれ活性の高いウイルスが得られた。

3. 搾汁液に 5% 量の chloroform : n-butanol (1 : 1) 混合液を加えて植物体成分のほとんどを除去することができ、この濃度の処理 (5 min) でウイルスは活性を保持した。

VI. 引用文献

1. BACHRACH, H. L. and SCHWERDT, C. E. (1952). *J. Immunol.* 69:551.
2. BANCROFT, J. B. and KAESBERG, P. (1960). *Biochim. Biophys. Acta.* 39:519.
3. BAWDEN, F. C., CHAUDHURI, R. P. and KASSANIS, B. (1951). *Ann. appl. Biol.* 38:774.
4. ——— and KLECZKOWSKI, A. (1948).

5. ——— and PIRIE, N. W. (1937). *Proc. Roy. Soc. B* 123:274.
6. ——— and ——— (1942). *Brit. J. expt. Path.* 23:314.
7. ——— and ——— (1943). *Biochem. J.* 37:66.
8. ——— and ——— (1945). *Brit. J. exptl. Path.* 26:277.
9. BLACK, L. M. (1955). *Phytopath.* 45:208.
10. COMMONER, B., MERCER, F. L., MERRILL, P. and ZIMMER, A. J. (1950). *Arch. Biochem.* 27:271.
11. FULTON, R. W. (1957). *Phytopath.* 47:521.
12. HAMPTON, R. E. and FULTON, R. W. (1961). *Virology* 13:44.
13. KASSANIS, B. (1955). *Ann. appl. Biol.* 43:103.
14. ——— and SLYKHUIS, J. T. (1959). *Ibid.* 47:254.
15. MARKHAM, R. and SMITH, K. M. (1949). *Parasitol.* 39:330.
16. 村山大記・横山竜夫 (1962 a). *日植病報.* 27:37.
17. ———・——— (1962 b). *日植病報.* 27:44.
18. ———・——— (1965). *北大農学部邦文紀要* 5:169.
19. POLSON, A. and SELZER, G. (1954). *Biochim. Biophys. Acta* 14:67.
20. PORTER, C. A. (1956). *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 18:704.
21. PRICE, W. C. (1954). *Ibid.* 16:196.
22. RICE, R. V., LINDBERG, G. D., KAESBERG, P., WALKER, J. C. and STAHMANN, M. A. (1955). *Phytopath.* 45:145.
23. SCHNEIDER, I. R. (1953). *Science* 117:30.
24. STANLEY, W. M. (1935). *Ibid.* 81:644.
25. ——— (1936). *Phytopath.* 26:305.
26. STEERE, R. L. (1953). *Ibid.* 43:485.
27. ——— (1956). *Ibid.* 46:60.
28. ——— (1959). *Adv. Virus Res.* 6:3.
29. TAKAHASHI, W. N. (1948). *Amer. J. Botany* 35:243.
30. 栃原比呂志 (1960 a). *日植病報.* 24:287.
31. ——— (1960 b). *日植病報.* 24:296.
32. YAMAZAKI, H., BANCROFT, J. B. and KAESBERG, P. (1961). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47:979.

Summary

Partial purification of barley stripe mosaic virus was carried out with some chemicals. Specific virus

antigen was successfully purified from the clarified juice of diseased barley plants by salting-out with ammonium sulphate at 40% saturation without significant loss of infectivity as well as antigenicity.

By addition of either 25% ethanol or 20% acetone, infectious virus preparations were precipitated and concentrated from the same juice.

Emulsifying with a 5 volume mixture of chloroform and n-butanol (1:1) into a 95 volume of crude juice from the infected plants resulted in eliminating normal plant proteins. Virus activity remained at least after 5 minutes' treatment of this concentration of the mixture.