



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | アルファルファモザイクウイルスに関する研究   |
| Author(s)        | 松本, 勤; MATSUMOTO, Tsutomu; 村山, 大記 他   |
| Citation         | 北海道大学農学部邦文紀要, 8(2), 132-174   |
| Issue Date       | 1972-02-29  |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/11832">https://hdl.handle.net/2115/11832</a> |
| Type             | departmental bulletin paper   |
| File Information | 8(2)_p132-174.pdf   |



# アルファルファモザイクウイルスに関する研究

松本 勤\*・村山大記

(北大農学部植物学教室)

## Studies on alfalfa mosaic virus

Tsutomu MATSUMOTO and Daiki MURAYAMA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received September 27, 1971

### I. 緒 言

わが国においても、近年畜産振興にともなう草地の開発が叫ばれ、牧草の生産を高めるための研究が進められている。しかし、その生産を阻害する要因としてウイルス病の被害もかなりにのぼっている。その中で諸外国ならびにわが国のマメ科牧草に広く発病の認められるものとしてアルファルファモザイクウイルスによる病害がある。

本ウイルスは寄主範囲も広く、罹病汁液の機械的接種とアブラムシによる虫媒伝播により容易に伝染し、また被害もきわめて大きいことが知られている。一方、本ウイルスは BANCROFT ら (1958) によって多成分性植物ウイルスとして、もっとも早く報告されたことからウイルス研究者の注目をひいていたウイルスである。

著者らは 1964 年より約 6 年間、アルファルファモザイクウイルスの数系統を用いて本ウイルスを研究し、ここに報告する次第である。

本報告は四章よりなり、第一章 (II) では本ウイルスを北海道のマメ科牧草より分離同定し、既報の分離株と共に寄主植物における病徴の差異を比較して本ウイルスの系統分けをした。第二章 (III) では病徴の差異によって分けた数種の AMV の系統を精製し、精製ウイルスの諸性質を各系統について比較した。第三章 (IV) では本ウイルスが多成分性植物ウイルスであることから感染性において他ウイルスと異なる特徴があることを明らかにした。第四章 (V) では核酸の質的差異を血清学的方向からアプローチし、本ウイルスの遺伝情報の分析に応用しようとして試みた。

本研究を行なうに当り種々御助力、御便宜を頂いた北海道大学農学部植物学教室四方英四郎助教授および小島誠助手、植物ウイルス研究所故児玉忠士博士、財団法人発酵研究所横山竜夫博士に対し衷心より感謝する次第である。また同大学医学部生化学第 1 講座平井秀松教授ならびに奥原英二助教授 (現、秋田大学医学部生化学講座教授) の蛋白質および核酸の免疫化学に関する御教示に対し衷心より感謝の意を表するものである。また種々御助力を頂いた同大学医学部生理学第 1 講座齋藤大雄氏、台湾省立中興大学韓又新副教授、北海道大学農学部植物寄生病学講座内記隆助手、同大学農学部植物ウイルス病学・菌学講座一同ならびに医学部生化学第 1 講座一同に対し厚く御礼申し上げる次第である。さらにまた AMV の分離株、インゲンの種子、キャリコ病罹病馬鈴薯ならびに抗血清を分譲された Purdue 大学 Dr. J. B. BANCROFT、千葉大学農学部 飯田格教授、東北農業試験場 飯塚典男氏、秦野タバコ試験場 都丸敬一博士、道立十勝農業試験場 坪木和男氏、八ヶ岳馬鈴薯原原種農場 平野弥助氏、本学医学部生化学第 1 講座 佐藤俊二氏ならびに西信三氏に対し衷心より感謝する次第である。

### II. 北海道のマメ科牧草から分離されたアルファルファモザイクウイルス (AMV) の系統

牧草ならびにジャガイモの生産は農業上きわめて重要であるが、これら作物に被害の大きいウイルス病としてアルファルファモザイクウイルス (AMV) による病害がある。

\* 現住所：秋田大学医学部生化学講座

AMV は WEIMER (1931) による報告以来、世界各地で分離されている (KOVACHEVSKI, 1942; FRY, 1952; KÖHLER ら, 1954; OSWALD ら, 1955; QUANTZ, 1956; GIBBS ら, 1961)。わが国においても正田ら (1953) によりアルファルファから本ウイルスが分離同定され、明日山ら (1955) により詳しく報告された。その後、比留木 (1961) はタバコから、飯塚ら (1961) はラジノクローバーから、都丸 (1963) はホワイトクローバーから、越水ら (1963) はダイズから、それぞれ AMV を分離した。小室ら (1963, 1964) はジャガイモ (品種ホイラー) より AMV を分離し、BLACK ら (1940) の報告した AMV の 1 系統である Potato calico 系統であることを明らかにした。北海道においてもアルファルファ、レッドクローバー、ラジノクローバーより本ウイルスが分離同定された (村山ら, 1965)。

著者らは北海道における本ウイルスの発生を確認し、分離された株の病徴、寄主範囲、物理的性質、血清反応ならびに干渉効果などを調べて既報の分離株と比較検討することにより本ウイルスの系統を明らかにする研究を行なった。

**A. 実験材料および方法**

**1. 既報の AMV 分離株ならびにその維持**

比較検討に供試した既報の分離株はつぎのとおりである。

AA-1: 飯田格, 飯塚典男両氏より分譲 (東北農試)

AL-9: 同上

タバコ B 系: 都丸敬一博士より分譲 (秦野たばこ試験場)

ATCC-106: Dr. J. B. BANCROFT より分譲 (米国 Purdue 大学)

これら AMV 分離株をインゲン (品種改良大手亡) ならびにササゲ (品種黒種三尺) にカーボランダム法で接種し、単一局部病斑からウイルス分離 (single lesion transfer) を数回繰り返したのち、タバコ (品種 KY-57) で増殖させ、罹病葉を 4°C のデシケーター中で乾燥して保存した。

**2. 北海道において分離された AMV 株の分離方法ならびにその維持**

アルファルファ、レッドクローバー、ラジノクローバーから AMV の分離を試みた。採集年月日、採集地、分離植物および分離植物の病徴は Table 1 に示すとおりである。

分離の方法はつぎのとおりである。AMV によって感染していると思われる植物を採取し、4°C で乾燥して保存した。罹病葉は乳鉢の中で磨砕し、pH 6.8 の 0.01 M リン酸緩衝液を用いて希釈した。これをササゲ (品種黒種三尺) の初生葉にカーボランダム法で接種した。接種後 2~3 日目に現われた局部病斑 1 個を切りとりインゲン (品種: 改良大手亡) の初生葉に接種した。このような方法で single lesion transfer を数回繰り返し、最後の局部病斑各 1 個をタバコ (品種: KY-57) に接種して分離を行なった。罹病タバコ葉は乾燥させて 4°C で保存し、実験に供した。

**Table 1.** The source plant, date and localities of collection, and symptom on the source plants.

| Source Plant  | Date          | Localities                                    | Symptom       | Name of Virus (Isolate) |
|---------------|---------------|---|---------------|-------------------------|
| alfalfa       | June 6, 1964  | Tsukisappu, Sapporo                           | mild mosaic   | HN-1                    |
| Ladino clover | July 24, 1964 | Kotoni, Sapporo                               | yellow mosaic | HN-2                    |
| alfalfa       | July 28, 1964 | University Farm, Hokkaido University, Sapporo | yellow mosaic | HN-3                    |
| alfalfa       | do.           | do.   | mild mosaic   | HN-4                    |
| red clover    | do.           | do.   | yellow mosaic | HN-5                    |
| red clover    | do.           | do.   | mild mosaic   | HN-6                    |

### 3. 病徴ならびに寄主範囲

分譲を受けた既報の分離株ならびに北海道において分離された分離株をあわせて10分離株について実験した。接種はカーボランダム法で行ない、9科18種の植物に接種した。接種した植物はビニールハウス内で生育させ、病徴は1カ月間観察した。感染の有無は病徴の有無にかかわらず、インゲン（品種：改良大手亡）に戻し接種して判定した。本実験は6月中旬から10月上旬までの間に行なったものである。なお、10分離株は同時におのおの植物に接種を行なって比較した。

### 4. 粗汁液中における AMV 分離株の物理的性質

希釈限界：HN-1, HN-2, HN-3, HN-4, HN-5, HN-6, ATCC-106, タバコ B 系の分離株をタバコ（品種：KY-57）に接種し、12日後罹病葉を収穫した。粗汁液は罹病葉を乳鉢で磨砕し、ガーゼ2枚を重ねてこしたものである。粗汁液の希釈は pH 7.4, 0.01 M リン酸緩衝液で行ない、希釈後、ただちにインゲン（品種：改良大手亡）に接種し、その局部病斑数は半葉法を用いて検定した。

耐熱性：耐希釈性の実験に供した8分離株をタバコ（品種：KY-57）に接種し、10日後罹病葉を収穫し実験に供した。供試粗汁液は1gの罹病葉を9mlの pH 7.4, 0.01 M リン酸緩衝液の中で磨砕し、ガーゼ2枚を重ねてこしたものである。このような方法で得た粗汁液は薄肉のガラス細管に入れ、両端をゴム栓を用いて封じ、温度調節した温湯中に10分間浸漬した。処理後ただちにインゲン（品種：改良大手亡）に接種し、その局部病斑数を半葉法で検定した。なお、無処理の粗汁液は温度処理した粗汁液を接種した後に接種した。

保存限界：タバコ（品種：KY-57）に HN-1, HN-3, HN-6 の各分離株を接種し、13日後罹病葉を収穫した。粗汁液は1gの罹病葉を9mlの pH 7.4, 0.01 M リン酸緩衝液の中で磨砕し、ガーゼ2枚を重ねてこした。このようにして得た粗汁液を 22°C の温度調節室に保存し、毎日一定時間にインゲン（品種：改良大手亡）に接種して、その局部病斑数でウイルス活性の検定を行なった。

### 5. 干渉効果

*Physalis floridana* ならびにタバコ（品種：KY-57）を用いて分離株間の干渉効果を調べた。*P. floridana* を用いた実験においては一次ウイルスとして無病徴あるいは軽微な chlorosis を生じる ATCC-106 を用い、二次ウイルスとして葉脈にそって明確な黄色条斑ならびに黄色モザイクを生ずる AA-1, HN-2, HN-4, HN-6 の各分離株を用いた。二次ウイルスの接種は一次ウイルス接

種後15日目に行なった。対照として、同時に二次ウイルスのみを *P. floridana* に接種した。

タバコ（品種：KY-57）を用いた実験においては一次ウイルスはほとんど病徴を示さない HN-4 を用い、AA-1, HN-2, HN-6, ATCC-106 の各分離株は mosaic ならびに necrosis を生ずるので二次ウイルスとして用いた。二次ウイルスの接種は一次ウイルス接種後10日目に行なった。対照として同時に二次ウイルスのみを接種したタバコ（品種：KY-57）と比較した。なお、*P. floridana* ならびにタバコ（品種：KY-57）に対する一次ウイルスの感染の有無は病徴による判定が困難なため、インゲン（品種：改良大手亡）への戻し接種で確かめた。

### 6. 血清学的方法による AMV 分離株の同定

血清反応は沈降反応重層法 (BANCROFT ら, 1960) および寒天ゲル中拡散法 (OUCHTERLONY, 1948) の方法を用いた。

抗血清の作製：Dr. J. B. BANCROFT から AMV 分離株 ATCC-106 に対する抗血清の分譲を受けた。この抗血清に対して AMV 分離株 AA-1 (東北農試, 飯田・飯塚両技官より分譲) が特異的に反応することを確認した。この分離株 AA-1 を BANCROFT ら (1960) の方法を用いて純化し、アジュバントを用いてウサギの筋肉中に毎週3回注射し、その後静脈中に3日間隔で2回注射を行なって抗血清を作った。なお、得られた抗血清の力価は沈降反応重層法で 0.1 mg/ml の精製 AMV (AA-1 分離株) に対し、512 倍の希釈倍数まで反応した。

沈降反応重層法に用いた各分離株の抗原の作製：供試した10分離株をタバコ（品種：KY-57）に接種した。接種後10日目に収穫した罹病葉を磨砕、搾汁して pH 7.4, 0.01 M リン酸緩衝液で10倍に希釈した。磨砕液はガーゼでこし、3,000 rpm 15分間遠心し、上清をふたたび 10,000 rpm 10分間遠心して上清をウイルス抗原とした。

寒天ゲル中拡散法に用いた各分離株の抗原の作製：供試した10分離株を12日間ないし3~4週間タバコ（品種：KY-57）に増殖させた。収穫した罹病葉1gに0.5 ml の割合で生理食塩水を加えて磨砕し、ガーゼでこしてウイルス抗原とした。

## B. 実験結果および考察

### 1. 分離株の寄主範囲および病徴の比較

供試植物における寄主範囲および病徴は Table 2 に示すとおりである。Table 2 に示したとおり、全分離株

Table 2. Comparative host range and symptomatology of the virus isolates.

| Virus Isolate               | HN-1 |          | HN-2 |          | HN-3 |          | HN-4 |          | HN-5 |          | HN-6 |          | ATCC-106 |            | Tobacco B |          | AA-1 |          | AL-9 |          |
|-----------------------------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|----------|------------|-----------|----------|------|----------|------|----------|
|                             | L    | S        | L    | S        | L    | S        | L    | S        | L    | S        | L    | S        | L        | S          | L         | S        | L    | S        | L    | S        |
| Bean (Kairyō Ōtebo)         | LL   | —        | LL       | —          | LL        | —        | LL   | —        | LL   | —        |
| Bean (Masterpiece)          | LL   | —        | LL       | —          | LL        | —        | LL   | —        | LL   | —        |
| Cowpea (Kurodane Sanjyaku)  | LL   | —        | LL       | —          | LL        | —        | LL   | —        | LL   | —        |
| Broad bean (Wase Soramame)  | LL   | —        | LL   | —        | LL   | Mo<br>N  | LL   | Mo<br>N  | LL   | —        | LL   | Mo<br>N  | LL       | —          | LL        | Mo<br>N  | LL   | Mo<br>N  | LL   | —        |
| Pea (Alaska)                | LL   | Lat      | LL   | Lat      | Lat      | Lat        | Lat       | Lat      | Lat  | Lat      | Lat  | Lat      |
| Soybean (Shiro Tsurunoko)   | VN   | Mo<br>VN | Lat      | Mo<br>VN   | VN        | Mo<br>VN | VN   | Mo<br>VN | VN   | Mo<br>VN |
| Azuki bean (Wase Dainagon)  | Lat  | Lat      | Lat  | Mo       | Lat  | Mo       | Lat  | Lat      | Lat  | Lat      | Lat  | Lat      | Lat      | Lat        | Lat       | Lat      | Lat  | Mo       | Lat  | Lat      |
| Tobacco (KY-57)             | N    | Mo       | N    | Mo       | Lat  | Mo       | Lat  | Lat      | N    | Mo<br>N  | N    | Mo<br>N  | N        | Mo<br>N    | N         | Mo<br>N  | N    | Mo<br>N  | N    | Mo<br>N  |
| Potato (Norin No. 1)        | LL   | —        | LL       | —          | LL        | —        | LL   | —        | LL   | —        |
| Tomato (Marglobe)           | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —        | —          | —         | —        | —    | —        | —    | —        |
| <i>Physalis floridana</i>   | Lat  | Mo<br>Ma | Lat      | Lat<br>Chl | Lat       | Mo<br>Ma | Lat  | Mo<br>Ma | Lat  | Mo<br>Ma |
| Cucumber (Kariwa Fushinari) | LL   | —        | LL   | Mo       | LL   | —        | LL   | —        | LL   | —        | LL   | —        | LL       | —          | LL        | —        | LL   | Mo       | LL   | —        |
| Pumpkin (Houko Kabocha)     | LL   | —        | LL       | —          | LL        | —        | LL   | —        | LL   | —        |
| <i>Vinca rosea</i>          | Lat  | Lat      | Lat  | Lat      | Lat  | Mo<br>Ma | Lat  | Lat      | Lat  | Mo<br>Ma | Lat  | Mo<br>Ma | Lat      | Lat        | Lat       | Mo<br>Ma | Lat  | Lat      | Lat  | Mo<br>Ma |
| <i>Gomphrena globosa</i>    | LL   | —        | LL   | —        | LL   | —        | RS   | —        | LL   | —        | LL   | —        | LL       | —          | LL        | —        | LL   | —        | LL   | —        |
| Carrot (Gosun Ninjin)       | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —        | —          | —         | —        | —    | —        | —    | —        |
| Aster (Ariake Ponpon)       | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —        | —          | —         | —        | —    | —        | —    | —        |
| Radish (Tokinashi)          | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —        | —          | —         | —        | —    | —        | —    | —        |
| Corn (Golden Cross Bantum)  | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —    | —        | —        | —          | —         | —        | —    | —        | —    | —        |

The following abbreviations are used: L=local infections, S=Systemic infection, LL=local lesions, Ma=malformation, Mo=mosaic or mottle, N=necrosis, RS=ringspots, VN=vein necrosis, Chl=chlorosis, Lat=latent infection, (—)=no infection as judged by the back-inoculation to bean.

が感染した植物はインゲン (品種: 改良大手亡, マスターピース), ササゲ (品種: 黒種三尺), ソラマメ (品種: 早生ソラマメ), ダイズ (品種: 白鶴の子), エンドウ (品種: アラスカ), アズキ (品種: 早生大納言), タバコ (品種: KY-57), ジャガイモ (品種: 農林一号), *P. floridana*, キウリ (品種: 刈羽節成胡瓜), カボチャ (品種: 東京南瓜), ニチニチソウ, センニチソウであった。全分離株が感染をおこななかった植物はトマト (品種: マーグローブ), ニンジン (品種: 早生5寸人参), ダイコン (品種: 時無大根), エゾギク, トウモロコシ (品種: ゴールデン・クロスバンタム) であった。なお, トマトについては既報の系統の間で結果が異なっており, Potato calico BLACK ら, 1940; 小室ら, 1963, 1964), タバコから分離した AMV 分離株 (比留木, 1961), AMV-425 (HAGEDORN ら, 1963), ホワイトクローバーから分離した AMV 分離株 (飯塚ら, 1969) では感染を認めているが, 感染を認めていない報告も多い (ZAUMEYER, 1938, 1952; BERKELEY, 1947; OSWALD, 1950; THOMAS, 1951; SILBER ら, 1965; 都丸ら, 1967)。また, インゲン (品

種: 改良大手亡, マスターピース), ササゲ (品種: 黒種三尺), ジャガイモ (品種: 農林一号), カボチャ (品種: 東京南瓜) は全分離株で分離株間の病徴に顕著な差異が認められなかった。分離株で病徴に差のあった植物はソラマメ (品種: 早生ソラマメ), エンドウ (品種: アラスカ), ダイズ (品種: 白鶴の子), アズキ (品種: 早生大納言), タバコ (品種: KY-57), *P. floridana*, キウリ (品種: 刈羽節成胡瓜), ニチニチソウ, センニチソウであった。

## 2. AMV 分離株の粗汁液中における物理的性質

希釈限界: 各分離株の希釈限界は Table 3 に示したとおりである。なお, 局部病斑数は8半葉の合計である。Table 3 に示したように HN-1, HN-2, HN-4 は  $1:10^5$  に希釈した時活性を消失した。しかし, HN-3, HN-5, HN-6 は  $1:10^5$  に希釈してもわずかに活性を保持しており,  $1:10^{5.5}$  の希釈において完全に失活した。ATCC-106 とタバコ B 系は  $1:10^4$  希釈以上における実験を行っていないが希釈限界は  $1:10^{4.5} \sim 1:10^{5.5}$  にあるものと推定される。したがって HN-2 と HN-4 は他の分離株に比較して希釈限界が低い傾向にあった。

Table 3. Tolerance to dilution of the virus isolates in crude extracts.

| Virus Isolate | Dilution of the crude extracts |                  |                  |                    |                  |                    |                  |                    |
|---------------|--------------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|
|               | 10 <sup>-1</sup>               | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3.5</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-4.5</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-5.5</sup> |
| HN-2          | N                              | N                | 1159             | 402                | 57               | 4                  | 0                | 0                  |
| HN-1          | N                              | N                | 1921             | 783                | 84               | 22                 | 0                | 0                  |
| HN-3          | N                              | N                | N                | 1697               | 305              | 101                | 3                | 0                  |
| HN-5          | N                              | N                | 1977             | 1033               | 541              | 291                | 38               | 0                  |
| HN-6          | N                              | N                | 2169             | 1460               | 726              | 293                | 25               | 0                  |
| Tobacco B     | N                              | N                | N                | 353                | 71               | —                  | —                | —                  |
| HN-4          | N                              | N                | 609              | 135                | 13               | 12                 | 0                | 0                  |
| ATCC-106      | N                              | N                | N                | 815                | 317              | —                  | —                | —                  |

The number represents the local lesions on 8 half-leaves of bean.

The N designates numerous lesions and the—no tests.

これまでに報告のあった希釈限界のもっとも低い系統は yellow patch (KREITLOW ら, 1949) で  $1:10^2$  であり, 希釈倍数の高いものは都丸ら (1967) の報告した系統の約  $1:10^5$  である。したがって著者らの結果は都丸ら (1967) とほぼ一致した。

耐熱性: 各分離株の耐熱性は Table 4 のとおりである。なお局部病斑数は8半葉の合計である。

Table 4 に示したように HN-2 と HN-4 は他に比較して  $50^\circ\text{C}$  でかなり不活性化し,  $55^\circ\text{C}$  では活性のほとん

どを消失した。しかし, HN-3 をのぞき, 他はわずかに活性を失なったのみである。 $60^\circ\text{C}$  では HN-2, HN-3, HN-4 は完全に活性を消失したが, 他はわずかに活性を保持していた。 $65^\circ\text{C}$  ではすべての分離株は完全に活性を失なった。したがって HN-2 と HN-4 は他の分離株に比較して熱に対する抵抗性が低いと考えられる。

既報の系統と比較すると HN-2 と HN-4 は OSWALD (1950), 正田ら (1953), 飯塚ら (1961) の報じた系統に類似していた。他の分離株は alfalfa mosaic 2 (PIERCE,

**Table 4.** Thermal inactivation of the virus isolates.

| Virus Isolate | Temperature (°C) |     |      |    |    | Control |
|---------------|------------------|-----|------|----|----|---------|
|               | 45               | 50  | 55   | 60 | 65 |         |
| HN-2          | N                | 391 | 7    | 0  | 0  | N       |
| HN-1          | N                | N   | N    | 15 | 0  | N       |
| HN-3          | N                | N   | 422  | 0  | 0  | N       |
| HN-5          | N                | N   | 1386 | 4  | 0  | N       |
| HN-6          | N                | N   | 2058 | 2  | 0  | N       |
| Tobacco B     | N                | N   | 1485 | 6  | 0  | N       |
| HN-4          | N                | 438 | 35   | 0  | 0  | N       |
| ATCC-106      | N                | N   | 1820 | 11 | 0  | N       |

The number represents total lesion number on 8 half-leaves of bean.

The N designates numerous lesions.

The control: The saps were kept at 4°C.

**Table 5.** Aging *in vitro* of the virus isolates in crude extracts.

| Virus Isolate | Length of aging (days) |   |      |      |     |    |   |   |
|---------------|------------------------|---|------|------|-----|----|---|---|
|               | 0                      | 1 | 2    | 3    | 4   | 5  | 6 | 7 |
| HN-1          | N                      | N | 2575 | 711  | 75  | 17 | 2 | 0 |
| HN-3          | N                      | N | 740  | 513  | 187 | 13 | 0 | 0 |
| HN-6          | N                      | N | N    | 3887 | 112 | 2  | 0 | 0 |

The number represents total lesion number on 8 half-leaves of bean.

The N designates numerous lesions.

1934), AMV pepper strain (BERKELEY, 1947), yellow patch (KREITLOW ら, 1949), yellow-dot virus (THOMAS, 1951), vein necrosis (ZAUMEYER ら, 1960), タバコ A ならびに B 系 (比留木, 1961), AMV-425 (HAGEDORN ら, 1963), Idaho-alfalfa mosaic virus ならびに alfalfa yellow spot mosaic virus (ZAUMEYER, 1963), タバコから分離した AMV の系統 (都丸ら, 1967) などとほぼ一致した。

保存限界: 各分離株の保存限界は Table 5 に示したとおりである。Table 5 に示したように HN-1 は 7 日目, HN-3 と HN-6 は 6 日目に活性を消失した。これまでに報告のあった系統については短かいもので alfalfa yellow spot mosaic virus (ZAUMEYER, 1963) の 12~24 時間, 長いもので alfalfa mosaic 2 の 9 日間であった。しかし多くの系統は保存限界が 3~5 日と報じられている。本実験に用いた分離株は比較的保存限界が長かった。これらの罹病植物の粗汁液の物理的性質は植物ウイルスを分類するために重要な手段でもある (ROSS, 1964)。しかし実験結果は粗汁液中の感染性を有するウイ

ルスの濃度, 環境ならびに検定植物のウイルス感染に対する感受性によってかなり影響される。とくに AMV は感染令によって罹病植物中のウイルス濃度ならびに単位ウイルス重量あたりの感染力が変化すると報告されている (KÜHN ら, 1961)。また, MILBRATH (1963) はこれまでに報告された耐熱性の差異を検討するために 44 の分離株を用いて実験した結果, この差異は系統間の差とウイルス濃度ならびに実験方法に基因するであろうと報告した。著者らも分離株による差異を認めたが, 希釈限界の結果から耐熱性の低かった HN-2 ならびに HN-4 はウイルス濃度も低かったので, 耐熱性の差異は分離株の特性のみでなくウイルス濃度にも影響されているものと思われる。さらに保存限界の結果においても粗汁液中のウイルス濃度ならびにウイルスの感染力に影響されることが報告された (YARWOOD, 1959)。したがって本研究においてもとくにこれらのことに留意して実験を行なったが, いずれの分離株も既報の AMV の物理的性質と類似していた。



形に生じた。しかし健全葉汁液に対しては沈降線は認められなかった。

なお、これらの実験では抗原として粗汁液を用いたために抗原ウイルスの濃度が一定でなく、抗体価の差異から分離株間の差異を論ずることはできない。しかしながら供試全分離株が血清反応においても AMV であることが同定された。

##### 5. 病徴による各分離株の群別

供試植物の病徴に差異の認められた各分離株を病徴にもとづいて2つに大別するとつぎのとおりである。

###### a. ダイズ (品種：白鶴の子)

(1) 接種葉に necrosis を示し、上葉に mosaic ならびに necrosis を示す分離株：HN-1, HN-2, HN-3, HN-4, HN-5, HN-6, タバコ B 系, AA-1, AL-9。

(2) 接種葉に無病徴感染し、上葉に mosaic ならびに necrosis を示す分離株：ATCC-106。

既報の系統はすべて感染すると報告されているが病徴2を示す分離株 ATCC-106 は pepper strain (BERKELEY, 1947) と類似していた。

###### b. タバコ (品種：KY-57)

(1) 接種葉に necrosis を示し、上葉に mosaic ならびに necrosis を生ずる分離株：HN-1, HN-2, HN-5, HN-6, ATCC-106, AA-1, AL-9, タバコ B 系。

(2) 接種葉、上葉ともに無病徴感染している分離株：HN-4。

病徴1はこれまでに報告された多くの系統のそれと類似していた (ZAUMEYER, 1938, 1952, 1963; KREITLOW ら, 1946; BERKELEY, 1947; OSWALD, 1950; HAGEDORN ら, 1963)。しかし HN-3 は接種葉に無病徴感染し、vein necrosis (ZAUMEYER ら, 1960) に類似していた。なお、病徴2は他に報告がないようである。

###### c. *P. floridana*

(1) 接種葉に無病徴感染し、上葉に明確な黄色条斑ならびに黄色モザイクを生じ、先端の葉が奇形になる分離株：HN-1, HN-2, HN-3, HN-4, HN-5, HN-6, タバコ B 系, AA-1, AL-9。

(2) 接種葉に無病徴感染し、上葉に無病徴感染あるいは淡い chlorosis を生ずる分離株：ATCC-106。

###### d. キウリ (品種：刈羽節成胡瓜)

(1) 接種葉に黄色斑点を生じ、上葉に黄色斑紋を生ずる分離株：HN-2, AA-1。

(2) 接種葉に黄色斑点を生じ、上葉に感染の認められなかった分離株：HN-1, HN-3, HN-4, HN-5, HN-6, ATCC-106, タバコ B 系, AL-9。

病徴1は pepper strain (BERKELEY, 1947) のそれに、また病徴2は yellow-dot virus (THOMAS, 1951) のそれに類似していた。その他 alfalfa mosaic virus 1A, 1B (ZAUMEYER, 1938), tuber necrosis virus (OSWALD, 1950), AMV-425 (HAGEDORN, 1963) はキウリに感染性を有すると報告されているが、キウリに感染しないと報告されているのも多い (BLACK ら, 1940; KREITLOW ら, 1949; ZAUMEYER, 1952, 1963; ZAUMEYER ら, 1960; SILBER ら, 1965)。

###### e. センニチソウ

(1) 接種葉に赤色の局部病斑を示し、上葉に黄色モザイクを生じたが、もどし接種の結果、上葉からウイルスが回収できなかった分離株：HN-1, HN-2, HN-3, HN-5, HN-6, ATCC-106, タバコ B 系, AA-1, AL-9。

(2) 接種葉に環状の necrosis を生じ、上葉に黄色斑紋を生じたが、もどし接種の結果、上葉からウイルスが回収できなかった分離株：HN-4。

###### f. ソラマメ (品種：早生ソラマメ)

(1) 接種葉に局部病斑を示し、上葉に mosaic を現わし、後に necrosis を示す分離株：HN-3, HN-4, HN-6, タバコ B 系, AA-1。

(2) 接種葉に局部病斑を示し、上葉に感染の認められなかった分離株：HN-1, HN-2, HN-5, ATCC-106, AL-9。

病徴1はこれまでに報告のあった多くの系統 (BERKELEY, 1947; HAGEDORN ら, 1963; ZAUMEYER, 1938, 1952, 1963; ZAUMEYER ら, 1960) と類似した。

病徴2は yellow-dot virus (THOMAS, 1951) と類似していた。

###### g. エンドウ (品種：アラスカ)

(1) 接種葉に necrotic spot を生じ、上葉は無病徴感染であった分離株：HN-1, HN-2, AL-9。

(2) 接種葉、上葉ともに無病徴感染していた分離株：HN-3, HN-4, HN-5, HN-6, ATCC-106, タバコ B 系, AA-1。

病徴1を示す分離株は ZAUMEYER (1938, 1952) の報告した alfalfa mosaic virus 1, alfalfa mosaic virus 1A, alfalfa mosaic virus 1B, alfalfa yellow mosaic と類似していた。

病徴2は接種葉に無病徴感染したと報告されている Idaho alfalfa mosaic virus ならびに alfalfa yellow spot mosaic virus (ZAUMEYER, 1963) と類似していた。

###### h. アズキ (品種：早生大納言)

**Table 8.** Classification of strains of alfalfa mosaic virus and their symptom expression.

| Test Plant                  | Type of Infection | Subgroup          |   |             |                |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|---|-------------|----------------|
|                             |                   | I<br>HN-2<br>AA-1 | II<br>HN-1, HN-3<br>HN-5, HN-6<br>AL-9<br>Tobacco B | III<br>HN-4 | IV<br>ATCC-106 |
| Soybean (Shiro Tsurunoko)   | L                 | N                 | N   | N           | Lat            |
|                             | S                 | Mo, N             | Mo, N   | Mo, N       | Mo, N          |
| Tobacco (KY-57)             | L                 | N                 | N   | Lat         | N              |
|                             | S                 | Mo, N             | Mo, N   | Lat         | Mo, N          |
| <i>P. floridana</i>         | L                 | Lat               | Lat   | Lat         | Lat            |
|                             | S                 | yellow Mo         | yellow Mo   | yellow Mo   | Lat or Chl     |
| Cucumber (Kariwa Fushinari) | L                 | CS                | CS  | CS          | CS             |
|                             | S                 | yellow Mo         | —   | —           | —              |
| <i>Gomphrena globosa</i>    | L                 | red LL            | red LL  | RS          | red LL         |
|                             | S                 | yellow Mo         | yellow Mo   | yellow Mo   | yellow Mo      |

The following abbreviations are used: L=local infection, S=systemic infection, N=necrosis, Lat=latent infection, Mo=mosaic, Chl=chlorosis, CS=chlorotic spots, LL=local lesions, RS=ringspot, (—)=no infection as judged by the back-inoculation to bean.

(1) 接種葉は無病徴感染し、上葉に黄色の mosaic を生ずる分離株: HN-2, HN-3, AA-1。

(2) 接種葉、上葉ともに無病徴感染している分離株: HN-1, HN-4, HN-5, HN-6, ATCC-106, タバコ B 系, AL-9。

i. ニチニチソウ

(1) 接種葉は無病徴感染し、上葉に黄色モザイクならびに奇形を生ずる分離株: HN-3, HN-5, HN-6, タバコ B 系, AL-9。

(2) 接種葉、上葉ともに無病徴感染する分離株: HN-1, HN-2, HN-4, ATCC-106, AA-1。

これらの検定植物のうちダイズ (品種: 白鶴の子), タバコ (品種: KY-57), *P. floridana*, キウリ (品種: 刈羽節成胡瓜), センニチソウの病徴の差異から 10 分離株を 4 群に分けた。結果は Table 8 に示すとおりである。Table 8 に示したとおり, I 群に含まれる分離株は HN-2, AA-1。II 群には HN-1, HN-3, HN-5, HN-6, タバコ B 系, AL-9。III 群には HN-4。IV 群には ATCC-106 が含まれた。I 群と II 群はキウリの病徴のみに差異が認められた。また II 群には 6 分離株が含まれ, もっとも発生が多いと思われる。III 群の HN-4 は I 群とはタバコ, キウリ, センニチソウ, II 群とはタバコ, センニチソウで病徴が異なった。IV 群の ATCC-106 は

I 群とはダイズ, *P. floridana*, キウリ, II 群とはダイズ, *P. floridana* で病徴が異なり, III 群の HN-4 とはキウリをのぞくすべての植物と病徴が異なった。

AMV の系統の分け方については HOUSTON ら (1951, 1953) ならびに GIBBS ら (1961) がインゲンにおける全身感染の有無により, MILBRATH ら (1954) はササゲにおける全身感染の有無により 2 群に分けた。また BANCROFT ら (1960) はインゲンとササゲを用いて 4 群に分けた。また飯塚ら (1965) はインゲン, ササゲならびにダイズの 3 種の植物を使用し, 3 群に大別している。本研究においては各分離株はインゲンならびにササゲに局部病斑を形成したものから分離したのでインゲンならびにササゲに全身感染する系統については検討していない。

しかし, 以上の実験結果から北海道においても AMV によるマメ科牧草の病害が確認され, 病徴による群別によって供試した AMV の分離株をいくつかの系統に分けることができた。

**III. アルファルファモザイクウイルス (AMV) の数系統の精製ならびに諸性質**

AMV の精製ならびに精製ウイルスの諸性質については他ウイルスに比較して古くから研究されている。ROSS

ら (1940) ならびに ROSS (1941) は凍結融解と分画遠心法で精製を行ない、本ウイルスの RNA とイオウの含量を定量した。また、LAUFFER ら (1940) も精製ウイルスの物理的性質をくわしく調べている。その後久しく精製ウイルスの研究が行なわれていなかったが、BANCROFT ら (1958, 1960, 1961) は STEERE (1956) の chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用によって AMV を精製し、分析用超遠心機を用いて AMV は top (73 S), middle (89 S), bottom (99 S) の 3 成分からなることを確かめた。彼らは 3 成分を蔗糖濃度勾配遠心法を用いて分画し、RNA 含量は top が 21%, middle が 24%, bottom が 20%, 分画していない試料は 21.5% であったと報告した。また、3 成分の血清学的関係を調べたが、まったく同じものであることを確かめた。粒子は幅が 20 m $\mu$  で均一であったが、長さは不均一で、top は bottom に比較して 55 m $\mu$  より短い粒子を含むと報じ、感染性は bottom 成分に認められたと報告した。KELLEY ら (1962, b) は新しく top-a 成分 (68 S) を見つけ、0.05 M MgCl<sub>2</sub> を用いることによって top-a 成分の分離に成功した。彼らは top-a と bottom の両成分の諸性質を比較し、核酸含量は top-a が 13.5%, bottom が 21% であり、ウイルス粒子の分子量は top-a が  $3.5 \times 10^6$ , bottom が  $7.4 \times 10^6$  であると報じた。また、top-a と bottom のアミノ酸分析ならびに自由電気泳動の結果から両成分の蛋白質の subunit は同じものであろうと報告した。さらに KELLEY ら (1962, a) は AMV をおだやかな化学的処理によって、蛋白質 subunit を調製し、この subunit は沈降恒数が 3 S、分子量が平均 38,000 で抗 AMV 血清に対しても反応を示すことを確かめた。GIBBS ら (1963) は AMV の電子顕微鏡観察を行ない、20~30 m $\mu$  (top-a) は 18%, 36 $\times$ 18 m $\mu$  (top-b) は 38%, 48 $\times$ 18 m $\mu$  (middle) は 9%, 58 $\times$ 18 m $\mu$  (bottom) は 35% であったとし、分析用超遠心機による schlieren pattern の面積比と似た結果を得たと報告した。さらに粒子の構造を調べ、これまでに知られている植物ウイルスとはまったく異なる構造を有していることを明らかにした。

AMV 核酸の塩基組成については、FRISCH-NIGGE-MEYER ら (1961) は uridylic acid が 35.5% で相当高く、guanylic acid が 17.15% と低い値を示し、purine/pyrimidine は 0.68 であったと報告した。一方、BANCROFT (1964) は purine/pyrimidine は 1.04 または 1.02 であったと報告した。さらに彼は AMV のすべての成分は同じ塩基組成比であったと報じた。しかし ROUWS ら

(1964) は top と bottom 成分の塩基組成比には明らかに差異があったと報告している。GILLASPIE ら (1965) は bottom には 21.9 S ( $1.6 \times 10^6$ ), middle と top-b には 17.4 S ( $1.0 \times 10^6$ ), top-a には 12 S または 15 S ( $0.47 \times 10^6$ ) の RNA がそれぞれ含まれており、感染性は bottom 成分の RNA に認められたと報じた。また、<sup>32</sup>P を短時間吸させた罹病タバコ葉から AMV を精製し、AMV 各成分の specific radioactivity を調べて各成分はウイルスの完熟する過程を示すものでないことを明らかにした。VAN VLOTEN-DOTING ら (1967) も bottom 成分には 27 S, top-a 成分には 14 S の RNA が含まれ、これらの塩基組成比に明確な差異を認めた。

AMV 各成分相互の量比について、BANCROFT ら (1960) は系統ならびに接種植物感染令による変動は認められなかったと報告した。一方、JASPARS ら (1966), 松本 (1966) ならびに村山ら (1968) は系統および感染令によって各成分相互の量比が異なる結果を得た。

JASPARS ら (1966) ならびに MOED ら (1968) は top-a と bottom 成分の蛋白質はまったく同じものであることを確かめた。また、抗 AMV 血清の中にはウイルス粒子、低分子の AMV 蛋白質ならびに両者の抗原に共通な 3 種の抗体が産生されていると報じた。

BOL ら (1969) は AMV 粒子中の RNA は他の植物ウイルスと異なり pancreas ribonuclease によってすみやかに分解されることを明らかにした。

最近、HULL ら (1969; a, b) は AMV の蛋白質ならびに核酸を調べ、また AMV 成分の構造について報告している。彼らは AMV 蛋白質のアミノ酸分析を行ない、さらに subunit の分子量が 32,600 であったと報告した。また、AMV-RNA は 24.3, 20.0, 17.3 ならびに 12.7 S の 4 成分を含むことを報告し、AMV の 5 成分 (top-z, 53 S; top-a, 68 S; top-b, 76 S; middle, 88 S; bottom, 99 S) の電子顕微鏡写真から各粒子の構造のモデルを示した。

わが国においては比留木 (1962) がタバコから、都丸 (1963) がエンドウから、児玉ら (1964) がタバコから chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用によって精製を行なっているが、精製ウイルスの諸性質についてはほとんど研究されていない。

本研究では病徴の異なる数種の系統の精製ウイルスを用い、紫外外部吸収、分析用超遠心機による AMV 各成分相互の量比、セルローズアセテート膜による電気泳動ならびに免疫学的方法 (重層法、補体結合反応、寒天ゲル中拡散法、免疫電気泳動法) によって AMV 粒子の諸性

質を検討し、さらに系統間の差異について論議する。

## A. 実験材料および方法

### 1. AMV の精製ならびに紫外部吸収

AMV の 3 系統 (HN-6, HN-4, ATCC-106) をタバコ (White Burley) に接種し、温室で 12~15 日間増殖させた。罹病葉は  $-30^{\circ}\text{C}$ ~ $-35^{\circ}\text{C}$  の凍結保存で 200 日間はウイルス活性に変化がなかったため、 $-30^{\circ}\text{C}$ ~ $-35^{\circ}\text{C}$  の低温室に凍結保存し、実験に供した。

精製方法は STEERE (1956) の chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用であるが、とくに本法は BANCROFT ら (1960) の方法を一部修正したものである。精製の手順は罹病葉の生体重に対し、0.5% の L-アスコルビン酸を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 2 倍量加えて磨砕し、ガーゼ 2 枚を重ねて搾汁する。この搾汁液に chloroform-n-butanol (1:1, v/v) を汁液の 1/3 量加え、スターラーで 15 分間攪拌した後、3,000 rpm, 15 分間遠心する。遠心上清はさらに 10,000 rpm (RP 30 ローター) 15 分間と 28,000 rpm (RP 30 ローター) 90 分間の分画遠心を 1 回または 2 回行った。最後の遠心沈澱に適切なウイルス濃度になるように 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてとかし、10,000 rpm (RP 30 または RP 40 ローター) 15 分間の遠心後、上清を精製ウイルスとした。なお、遠心機は久保田 KT-65 型を使用し、超遠心機は 40 P 型日立分離用超遠心機を使用した。

精製ウイルスの紫外部吸収は光電分光光度計 (EPV-2A 型日立光電分光光度計) で測定した。セルは 1 cm のものを用い、220~310 m $\mu$  の波長の範囲を測定した。

感染性はインゲン (改良大手亡) の初生葉にカーボランダムを用いて接種し、感染によって形成された局部病斑数で確かめた。

### 2. 分析用超遠心機による AMV 各成分相互の量比

AMV の増殖に用いた植物はタバコ (White Burley) とエンドウ (米国大莢) である。タバコとエンドウは温室で草丈約 15 cm に生育させたものを用いた。供試系統は HN-6, HN-4, PC-Y (potato calico 系統, ハケ岳馬鈴薯原原種農場より分譲されたホイラー種のキャリコ病罹病馬鈴薯から分離した), ATCC-106 の 4 分離株である。ウイルス接種源はウイルス接種後 6~8 日目の感染したタバコ上葉を磨砕し、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 10 倍に希釈して用いた。接種はカーボランダムを用いて行ない、ウイルスの増殖は調節室 (25~27 $^{\circ}\text{C}$ , 2,000 lux; 1 日, 15 時間照明) または温室 (5~6 月) で行なった。

ウイルスの精製法はすでに記したごとく、chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用である。精製ウイルス濃度の定量は 1 mg/ml が  $E_{260}^{1\%} = 4.87$  (FRISCH-NIGGEMEYER ら, 1961) として光度法により行なった。供試したウイルス濃度は約 6 mg/ml であるが HN-4 系統は約 4 mg/ml である。

成分相互の量比は分析用超遠心機による schlieren pattern のピーク下面積比によった。使用した分析用超遠心機は spinco model E と日立 UCA-1A である。ピーク下面積の測定は Nikon profile projector model 6C で 10 倍に拡大複写し、プランメーターを用いて行なった。面積比は百分率で表わした。

### 3. AMV の top ならびに bottom fraction の分離

top ならびに bottom 成分を得るために蔗糖濃度勾配遠心法 (BRASSE, 1953) を用いて行なった。蔗糖濃度勾配カラムは蔗糖濃度 10, 20, 30 および 40% のものを濃度勾配遠心用チューブに 1 ml ずつ積み重ね、冷室 (約 4 $^{\circ}\text{C}$ ) に一夜放置して作った。このような方法によって準備したカラムの上に 0.5 ml の精製ウイルス試料を重ね、40 P 型日立分離用超遠心機を用い RPS 40 ローターで 28,000 rpm, 3 時間遠心操作した。遠心操作後、チューブの横から注射針をつきさし、top ならびに bottom 成分をぬきとった。さらに均一な成分を含む分画を得るために蔗糖濃度 30, 40, 50 および 60% のカラムで 2 回目の遠心操作 (35,000 rpm, 4 時間) を行ない top と bottom fraction を得た。各 fraction の紫外部吸収 (220~310 m $\mu$ ) は EPV-2A 型日立光電分光光度計を用いて測定した。なお、本報告における top 成分は top-0, top-a ならびに top-b を含む分画である。

### 4. セルロースアセテート膜による電気泳動

セルロースアセテート膜は富士写真フィルム製のセパラックスを用いた。セパラックスを長さ 6 cm, 幅は試料数により適当に切り、陽極側から 3.5 cm の位置に鉛筆で軽く直線を引き原点とした。

泳動装置は常光産業製の微量分析用泳動装置を用い、緩衝液槽と支持台とは緩衝液を含んだ濾紙で橋渡しした。

緩衝液はベロナール緩衝液 (pH 8.6,  $\mu = 0.06$ ) を用いた。

膜は緩衝液の吸収が均一になるように膜の片方から緩衝液に静かに沈め、引き上げて濾紙で余分の液をとり、支持台にのせた。膜の支持は支持台の濾紙にのせるだけで十分であった。

供試した AMV の系統は HN-6, ATCC-106 ならび

に PC-Y の 3 系統である。精製 AMV (濃度 10 mg/ml) をウルトラマイクロピペットで吸い、膜の両側それぞれ 1 cm を残し、鉛筆の線にそって 15 cm の長さに 1.2~1.6  $\mu$ l の試料をつけた。

通電は膜幅 1 cm 当り 0.4 mA 定電流で約 90 分間行ない、泳動を終った膜はただちに染色した。

染色液は 0.8 g のボンソー 3 R (Ponceau 3 R) および 6 g のトリクロル酢酸 (TCA) を 100 ml の蒸留水に溶解したものを用いた。染色時間は 1 分 30 秒~3 分間行ない、染色後ただちに 1% 酢酸を用いて 4 回新しい液と取り換えながら余分な色素を脱色した。ウイルス試料は鮮明な赤色に染まって膜上に残った。膜は濾紙にはさんで自然乾燥させた。

## 5. 血清反応

### a) 重層法

抗 AMV 血清を作るために HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の各系統の精製ウイルス (1 mg/ml) を complete adjuvant と混合してウサギの筋肉に注射した。HN-6 系統は 1 mg ずつ 5 回, ATCC-106 ならびに PC-Y 系統は 1 mg ずつ 3 回, 毎週免疫し, 最終の注射後 7~10 日目に頸動脈より全採血した。各系統の抗血清は 10% のグリセリンを含む生理食塩水で 50 倍に希釈して用いた。

抗原は HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の各系統の精製ウイルスを用いた。抗原の希釈は生理食塩水を用い, 100  $\mu$ g/ml の濃度から倍数希釈して反応させた。なお, 対照として用いた健全タバコ植物からの抗原はウイルスの精製と同じ方法によって得たが, 10,000 rpm (RP 30 ローター), 15 分間と 28,000 rpm (RP 30 ローター), 90 分間の分画遠心を 1 回行なって得たものである。

重層法による沈降反応は内径 0.2 cm, 高さ 6 cm のガラス管の一方をふさいだ管を用い, 反応の観察が容易な高さまで抗血清を入れ, 抗血清の上にガラス細管で静かに抗原を重ねるものである。抗原を重ねると直ちに 37°C のゆぶねで 15 分間反応させ, 抗原と抗血清との境界に生ずる沈降物の有無で反応の結果を判定した。

### b) 補体結合反応

抗 AMV 血清ならびに抗原は重層法で用いたものと同じである。ただし, 抗血清は寒冷凝集素を除いた後, 56°C, 30 分間ゆぶねにつけて非動化した。また, 希釈液はペロナール緩衝食塩水 (VBS) を用いた。補体, 緬羊血球ならびに溶血素は北海道立衛生研究所より購入した。

補体結合反応は KOLMER の少量法を用いて行なっ

た。手順ならびに判定法はつぎのとおりである。

### 補体結合反応の手順

- (1) 抗血清……0.1 ml (抗血清の希釈=1:50)
- (2) 抗原……0.1 ml (100  $\mu$ g/ml の濃度から倍数希釈)
- (3) 2 単位の補体……0.2 ml
- (4) 以上を混和し, 4°C で 1 夜放置
- (5) 2.5% 緬羊血球浮遊液と 3 単位溶血素よりなる溶血系 (30 分室温にて感作したもの)……0.2 ml
- (6) 37°C のゆぶねで 30 分間
- (7) 判定

### 判定法

- (-)……100% 溶血 (完全溶血)
- (+)……一見 100% 溶血に近く試験管を振ると底からわずかな血球が煙のように上るもの
- (++)……25% の血球が不溶血で残る
- (+++)……50% の血球が不溶血で残る
- (++++)……75% の血球が不溶血で残る
- (O)……100% 不溶血 (完全不溶血, 遠心すると上清が無色透明)

### c) 寒天ゲル中拡散法 (OUCHTERLONY 法)

抗 AMV 血清ならびに抗原は重層法で用いたものと同じである。抗血清は希釈せずに用い, 抗原の精製ウイルスは 1 mg/ml の濃度で用いた。

寒天板は生理食塩水に寒天を 1% の濃度になるように溶かし, スライドガラスの上に約 3 ml を流して作った。

抗血清は寒天板の中央に幅 0.2 cm の溝を切って入れ, 抗原は溝の両側に直径 0.25 cm の穴をあけて入れた。溝と穴の間隔ならびに穴と穴の間隔は 0.5 cm とした。沈降線の観察は 3~5 日間行ない, 蛍光灯の光を寒天板に透過させて沈降線を明確にしてから写真撮影をした。

### d) 免疫電気泳動

HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y 系統に対する抗血清および抗原は重層法で用いたものと同じである。また, 抗ウサギ血清ネズミ血清ならびに抗ウサギ IgG ウマ血清は佐藤俊二氏ならびに西信三氏 (北海道大学医学部第一生化学教室) からそれぞれ分譲されたものである。抗血清は希釈せずに用い, 抗原の精製ウイルスは 5 mg/ml の濃度で用いた。寒天板は 1% 寒天をスライドガラス (7.6×2.6 cm) の上に約 3 ml 流して作った。なお, 1% 寒天はペロナール緩衝液中に溶かして作った。抗原ならびに抗体は直径 0.25 cm の穴および幅 0.2 cm の溝の中にマイクロピペットを用いて入れた。HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の各系統の精製ウイルスを電気泳動した時は穴と溝の間隔を 0.5 cm にし, 陽極側

から 4.6 cm の位置に穴をあけて原点とした。また、抗 AMV 血清を電気泳動した時は穴と溝の間隔を 0.4 cm にし、陽極側から 3 cm の位置に穴をあけて原点とした。

泳動装置は常光産業製の微量分析用泳動装置を用い、緩衝液槽と寒天板とは緩衝液を含んだ濾紙で橋渡しした。緩衝液はペロナール緩衝液 (pH 8.6,  $\mu=0.06$ ) を用いた。供試系統の精製ウイルスを電気泳動した時の通電は寒天板の幅 1 cm 当り 1 mA 定電流で約 3 時間行ない、泳動後、溝に抗血清を入れて反応させた。

また、抗 AMV 血清を電気泳動した時の通電は寒天板の幅 1 cm 当り 2 mA 定電流で約 3 時間行ない、泳動後、一方の溝に精製ウイルス、他溝に抗ウサギ血清ネズミ血清ならびに抗ウサギ IgG ウマ血清を入れて反応させた。沈降線の観察は 3~5 日間行ない、蛍光灯の光を寒天板に透過させて沈降線を明確にしてから写真撮影をした。

## B. 実験結果

### 1. AMV の精製ならびに紫外外部吸収

HN-6 系統を用いて精製を行ない、28,000 rpm, 90 分間の超遠心操作を 1 回行なったものと 2 回行なったものとを比較した。このようにして得た精製ウイルスを光電分光光度計を用い 220~310 m $\mu$  の波長範囲で測定すると Fig. 1 と Fig. 2 の結果が得られた。Fig. 1 と Fig. 2 に示すとおり植物成分は超遠心操作を 2 回繰返すことによつてほぼ除かれた。したがって本研究における AMV の精製は以後超遠心操作を 2 回行なう方法で行なうこととした。HN-6 系統と同様に ATCC-106 ならびに HN-4 の各系統も精製した。精製ウイルスの紫外外部吸収曲線は Fig. 3 ならびに Fig. 4 に示すとおりである。各系統の精製ウイルスは 260 m $\mu$  付近に吸収極大を持ち、240 m $\mu$  付近に吸収極小を持つ紫外外部吸収曲線を示した。吸光度から HN-6 は、 $E_{260}/E_{280}=1.668$ , ATCC-106 は  $E_{260}/E_{280}=1.764$ , HN-4 は  $E_{260}/E_{280}=1.759$  であった。インゲン (改良大手亡) の初生葉に各系統の精製ウイルス (10  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ) を接種した結果、強い感染力を示した。2 回の蔗糖濃度勾配遠心によつて得られた各系統の top と bottom fraction はほぼ同じ紫外外部吸収曲線を示した (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7)。感染性は bottom fraction のみ認められ、top fraction はまったく感染性を有していなかった。

### 2. 分析用超遠心機による AMV 各成分相互の量比

AMV 各成分相互の量比を調べるために、あらかじめタバコ (White Burley) におけるウイルスの移行ならびにウイルス感染後のウイルス増殖量と単位ウイルス量当

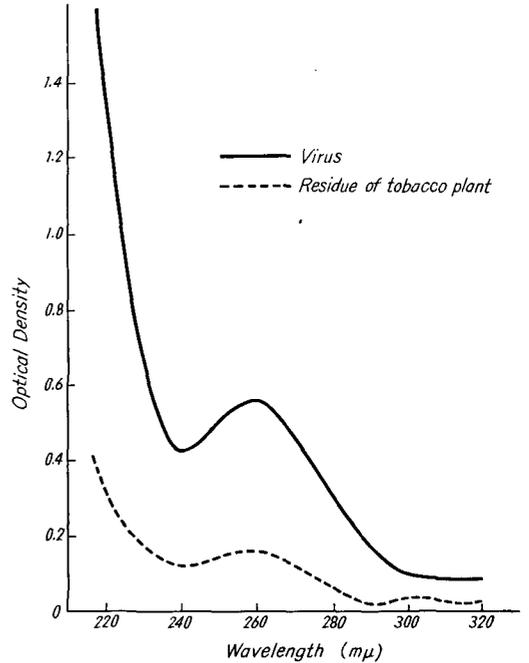


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of alfalfa mosaic virus (HN-6 strain) purified by one-time differential ultracentrifugation.

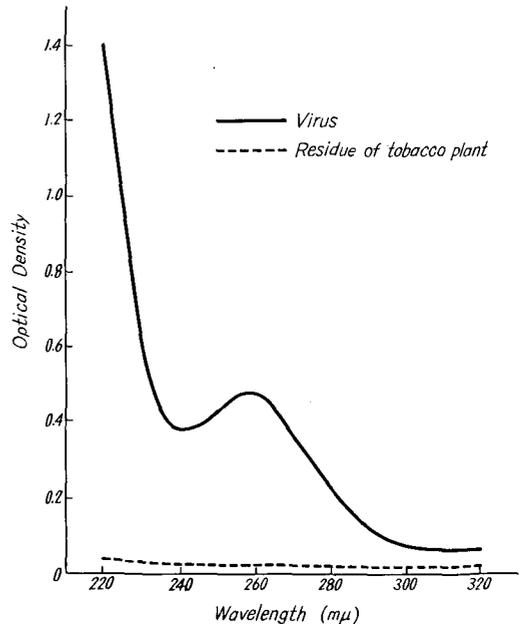
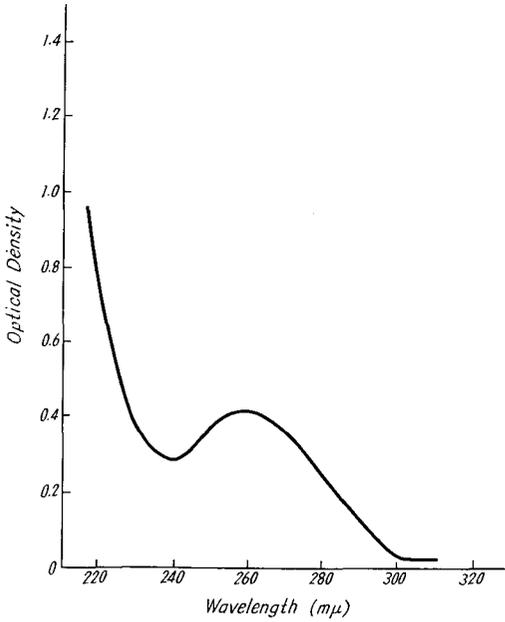
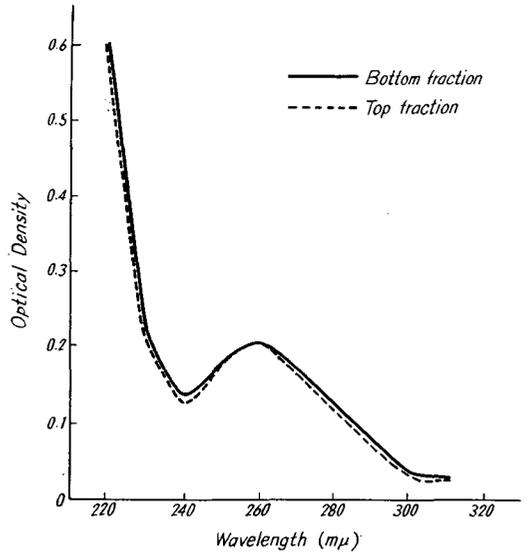


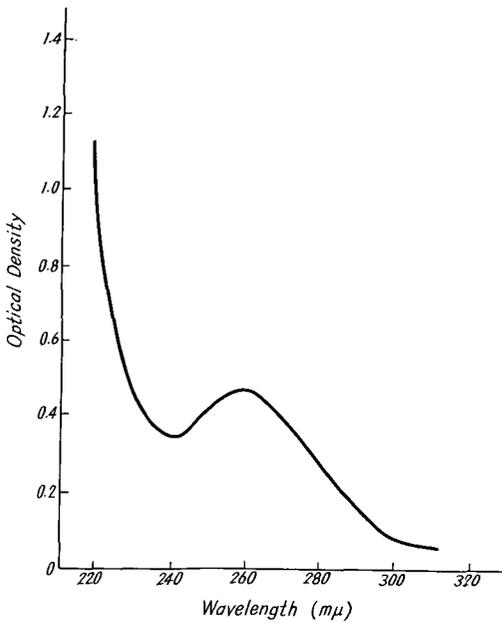
Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of alfalfa mosaic virus (HN-6 strain) purified by two-time differential ultracentrifugation.



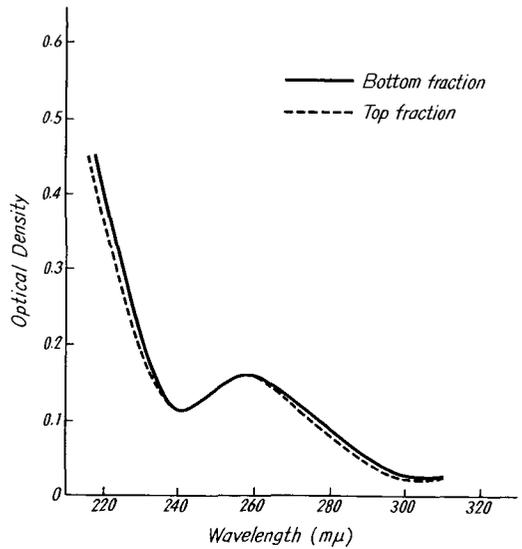
**Fig. 3.** Ultraviolet absorption spectrum of alfalfa mosaic virus (ATCC-106 strain) purified by two-time differential ultracentrifugation.



**Fig. 5.** Ultraviolet absorption spectrum of top and bottom fraction of alfalfa mosaic virus (HN-6 strain) prepared by density gradient centrifugation.



**Fig. 4.** Ultraviolet absorption spectrum of alfalfa mosaic virus (HN-4 strain) purified by two-time differential ultracentrifugation.



**Fig. 6.** Ultraviolet absorption spectrum of top and bottom fraction of alfalfa mosaic virus (HN-4 strain) prepared by density gradient centrifugation.

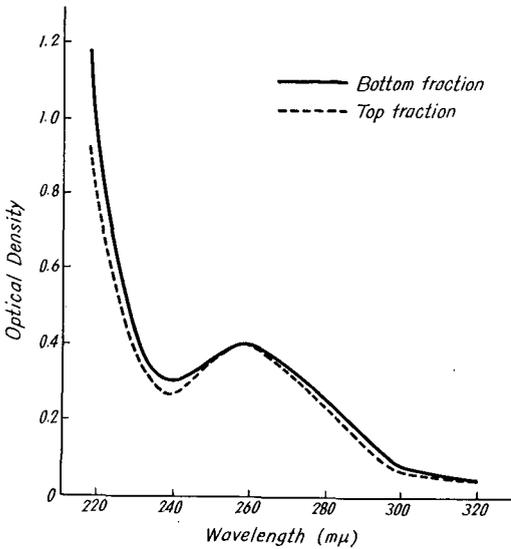


Fig. 7. Ultraviolet absorption spectrum of top and bottom fraction of alfalfa mosaic virus (ATCC-106 strain) prepared by density gradient centrifugation.

りの感染力の経時的变化を調べた。AMV 移行の実験には HN-6 系統を用い、ウイルスの増殖は調節室で行なった。ウイルス接種後の病徴観察は毎日行ない、ウイルス移行は各葉位を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で磨碎し、インゲン (改良大手亡) の初生葉に接種して生ずる局部病斑数で調べた。Table 9 に示したごとく、接種葉は接種後 3 日目のでかなりのウイルス増殖が認められた。7 日目頃より葉の色は黄変して、さらにネクロシスが加わり、10 日目頃には枯死する葉もあった。上葉では 4 ま

たは 5 の葉位に接種後 4~5 日目になってモザイクが生じ、もどし接種の結果、ウイルスの移行が認められたが、病徴の現われていない葉位ではウイルスの移行がまったく認められなかった。さらに 6 日目には 4 と 5 の葉位ははげしいモザイク病徴を示し、感染性も増した。7 日目には 4 と 5 の葉位はモザイクにネクロシスが加わり病徴もはげしくなったが 2 と 3 の葉位は病徴も認められず、もどし接種の結果からウイルスがまったく増殖していないことがわかった。以上の結果からタバコの上葉におけるウイルスの感染令は葉位によってかなり異なるので、とくに上葉を用いてウイルスの感染令と AMV 各成分相互の量比の関係を調べる時は注意すべきであることがわかった。

つぎにウイルス増殖量ならびに単位ウイルス量当りの感染性 (比活性) の経時的变化と AMV 各成分相互の量比の関係を明らかにするために、あらかじめタバコの接種葉におけるウイルスの増殖曲線とウイルスの比活性の経時的变化を調べた。供試系統は HN-6 および ATCC-106 である。ウイルスを接種したタバコは調節室におきウイルスの増殖を行なった。罹病葉の収穫は接種後 2 日目から 1 日おきに行ない、 $-30\sim-35^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。各感染令の罹病葉におけるウイルスの増殖量ならびに比活性の測定は各感染令の罹病葉から同時にウイルスを精製して比較した。比活性は  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度のウイルスをインゲン (改良大手亡) の初生葉に接種し、生じた局部病斑数で調べた。実験結果は Fig. 8 に示したとおりである。ウイルス量の増加は HN-6 系統が接種後 4 日目にすでに  $0.848\ \text{mg}/\text{g}$  (生体重) に達し、ATCC-106 系統の  $0.561\ \text{mg}/\text{g}$  (生体重) に比べて急速の増加で

Table 9. Translocation of alfalfa mosaic virus in tobacco plant var. White Burley.

| Days after inoculation Phyllotaxis | 3                          |                        | 4            |                        | 5            |                        | 6            |                        | 7            |                        |
|------------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|
|                                    | Local <sup>b)</sup> lesion | Symp <sup>c)</sup> tom | Local lesion | Symp <sup>c)</sup> tom |
| 1 <sup>a)</sup>                    | 425                        | SC                     | 503          | MY                     | 1289         | Y                      | 937          | Y                      | 607          | Y, N                   |
| 2                                  | 0                          | —                      | 0            | —                      | 0            | —                      | 0            | —                      | 0            | —                      |
| 3                                  | 0                          | —                      | 0            | —                      | 0            | —                      | 0            | —                      | 0            | —                      |
| 4                                  | 0                          | —                      | 1102         | Mo                     | 0            | —                      | 1531         | Mo                     | 1366         | Mo, N                  |
| 5                                  | 0                          | —                      | 0            | —                      | 1374         | Mo                     | 1754         | Mo                     | 1219         | Mo, N                  |

a). No. 1 means the first lower leaf inoculated.

b). Average number of local lesions produced on 8 half leaves of beans.

c). Mo: Mosaic, N: Necrosis, Y: Yellowing, MY: Mild yellowing, SC: Slight chlorosis, —: No symptom.

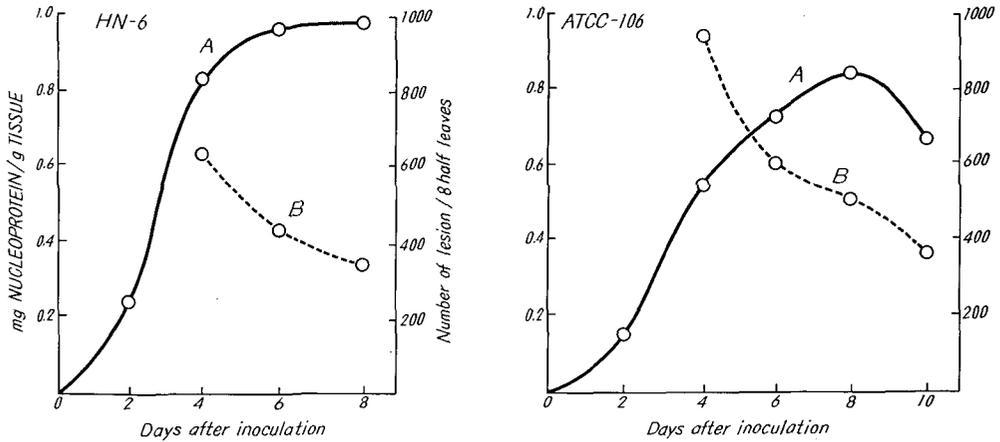


Fig. 8. The concentration of nucleoprotein and the specific infectivity of AMV (HN-6 and ATCC-106 strain) harvested from inoculated tobacco leaves at different times after inoculation. Curve A shows the amount of purified virus nucleoprotein (mg/g inoculated leaves of wet weight). Curve B shows the specific infectivity of the nucleoprotein (0.01 mg/ml) of AMV purified from inoculated tobacco leaves (total number of local lesions produced on 8 half leaves of bean).

あった。最高ウイルス量は両系統とも接種後8日目で、HN-6系統が0.996 mg/g (生体重)、ATCC-106系統が0.867 mg/g (生体重)であった。ATCC-106系統では接種後10日目にウイルス量が低下し、0.694 mg/g (生体重)となった。

ウイルスの比活性は接種後4日目から調べたがいずれの系統も4日目で最高を示し、その後低下した。Fig. 8に示すとおり、 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度のウイルスを接種したインゲン8半葉の局部病斑数はHN-6系統が接種後4日目で656であったが8日目には383に低下した。

ATCC-106系統も接種後4日目で978であったが10日目には240に低下した。しかし両系統間の感染性の比較は実験日が異なるためにできなかった。なお、HN-6系統は接種後8日目、ATCC-106系統は接種後10日目で接種葉の枯死が多くなったためにそれ以後のウイルス量ならびにウイルスの比活性については実験を行なわなかった。

ウイルス感染令とAMV各成分相互の量比の関係はタバコの接種葉におけるウイルスの増殖曲線ならびに比活性の実験からHN-6系統は接種後4日目と8日目、ATCC-106系統は接種後4日目と10日目を調べた。各成分相互の量比は分析用超遠心機によるschlieren patternのピーク下面積比による。実験結果はPlate IならびにTable 10に示すとおりである。なお、Table

10に示したtop成分はtop-a (68S)ならびにtop-b (73S)の両成分を含めたものである。Plate IならびにTable 10に示すとおりmiddle成分の量比は接種後4日目に比べて8日ならびに10日目で5%以上高くなった。この傾向はタバコ接種葉で増殖させたHN-4系統ならびに上葉で増殖させたHN-6系統についても同様であった。したがってmiddle成分はtopあるいはbottom成分より変動しやすい成分のように思われる。なお、タバコ上葉を用いた実験では前述のウイルス移行の実験結果からもっとも早く感染した葉位を用いた。

AMVの系統によって成分相互の量比に差異が認められるか否かをHN-6、ATCC-106、HN-4およびPC-Y (potato calico)の4系統について調べた。Table 10にて示したごとく、HN-4とPC-YはHN-6ならびにATCC-106に比べてtop成分が多い系統であることがわかった。また、HN-6とHN-4はATCC-106ならびにPC-Yに比べてschlieren patternのtop成分のピークが広く、区別ができた。この系統における特徴は調節室と温室、タバコ接種葉と上葉とのいずれの条件でウイルスを増殖させても認められた。また、寄主植物の差異の影響について、タバコとエンドウにHN-6系統を増殖させて比較したが成分相互の量比に差異は認められなかった。

**Table 10.** The relative amounts of the components of alfalfa mosaic virus.

| Virus strains | Test plants            | Test <sup>(1)</sup> leaves | Days after inoculation | Conditions of virus propagation | Components (%) <sup>(2)</sup> |        |        |
|---------------|------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------|--------|
|               |                        |                            |                        |                                 | Top                           | Middle | Bottom |
| HN-6          | Tobacco (White Burley) | L                          | 6                      | Greenhouse                      | 48                            | 21     | 31     |
| do.           | Pea (Beikoku Osaya)    | S                          | 6                      | do.                             | 48                            | 23     | 29     |
| do.           | Tobacco (White Burley) | L                          | 4                      | Controlled room                 | 47                            | 25     | 28     |
| do.           | do.                    | do.                        | 8                      | do.                             | 42                            | 30     | 28     |
| do.           | do.                    | S                          | 6                      | do.                             | 46                            | 20     | 34     |
| do.           | do.                    | do.                        | 10                     | do.                             | 42                            | 26     | 32     |
| ATCC-106      | do.                    | L                          | 4                      | do.                             | 44                            | 24     | 32     |
| do.           | do.                    | do.                        | 10                     | do.                             | 41                            | 31     | 28     |
| HN-4          | do.                    | do.                        | 5                      | do.                             | 60                            | 14     | 26     |
| do.           | do.                    | do.                        | 10                     | do.                             | 58                            | 21     | 21     |
| PC-Y          | do.                    | S                          | 6                      | do.                             | 59                            | 16     | 25     |

(1) L and S represent inoculated and systemically infected leaves, respectively.

(2) The percentage of the components was estimated from the areas under the schlieren peaks in the sedimentation diagrams.

### 3. セルロースアセテート膜による電気泳動

Plate I は HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の 3 系統の精製 AMV をセルロースアセテート膜 (セパラックス) を用いて電気泳動した泳動図である。泳動条件は陽極側から 3.5 cm の位置を原点として 1.2~1.6  $\mu\text{l}$  の精製 AMV (濃度 10 mg/ml) を 1.5 cm の長さにつけ、膜幅 1 cm 当り 0.4 mA 定電流で約 90 分間通電を行なったものである。Plate I に示すとおり 3 系統は原点から陽極側に泳動し、約 1.2 cm の幅に広いバンドを示したが、とくに原点から 0.5~0.6 cm の位置に濃いバンドがみられた。しかし、各系統の泳動図における明らかな差異は認められなかった。また、うすいバンドが植物蛋白

質の混入によるものか否かを調べるために、供試した精製ウイルスをさらに分画遠心して精製し、実験に用いたが泳動図は変わらなかった。

### 4. 血清反応

#### a) 重層法

HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の各系統に対する抗血清とそれぞれの系統の精製ウイルスとの反応を重層法を用いて比較した。これらの抗血清を 50 倍に希釈し、それぞれの抗血清に対し、3 系統の精製ウイルスを 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度から倍数希釈して反応させた。

Table 11, Table 12, Table 13 に示したとおり、抗 AMV (HN-6 系統) 血清ならびに抗 AMV (PC-Y 系統)

**Table 11.** The ring-interface precipitin test of strains of AMV against anti-AMV (HN-6 strain) serum<sup>(1)</sup>.

| strains                | virus concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |    |    |      |     |     |     |     |     |
|------------------------|---|----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        | 100   | 50 | 25 | 12.5 | 6.2 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 0.4 |
| HN-6                   | +   | +  | +  | +    | +   | +   | -   | -   | -   |
| ATCC-106               | +   | +  | +  | +    | +   | ±   | -   | -   | -   |
| PC-Y                   | +   | +  | +  | +    | +   | ±   | -   | -   | -   |
| Control <sup>(2)</sup> | -   | -  | -  | -    | -   | -   | -   | -   | -   |

(1) Antiserum dilution = 1:50.

(2) Ribosome prepared from tobacco leaves.

**Table 12.** The ring-interface precipitin test of strains of AMV against anti-AMV (ATCC-106 strain) serum<sup>(1)</sup>.

| strains                | virus concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |    |    |      |     |     |     |     |     |
|------------------------|---|----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        | 100   | 50 | 25 | 12.5 | 6.2 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 0.4 |
| HN-6                   | +   | +  | +  | +    | +   | +   | ±   | -   | -   |
| ATCC-106               | +   | +  | +  | +    | +   | +   | ±   | -   | -   |
| PC-Y                   | +   | +  | +  | +    | +   | +   | -   | -   | -   |
| Control <sup>(2)</sup> | -   | -  | -  | -    | -   | -   | -   | -   | -   |

(1) Antiserum dilution = 1:50.

(2) Ribosome prepared from tobacco leaves.

**Table 13.** The ring-interface precipitin test of strains of AMV against anti-AMV (PC-Y strain) serum<sup>(1)</sup>.

| strains                | virus concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |    |    |      |     |     |     |     |     |
|------------------------|---|----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        | 100   | 50 | 25 | 12.5 | 6.2 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 0.4 |
| HN-6                   | +   | +  | +  | +    | +   | -   | -   | -   | -   |
| ATCC-106               | +   | +  | +  | +    | +   | -   | -   | -   | -   |
| PC-Y                   | +   | +  | +  | +    | ±   | -   | -   | -   | -   |
| Control <sup>(2)</sup> | -   | -  | -  | -    | -   | -   | -   | -   | -   |

(1) Antiserum dilution=1:50.

(2) Ribosome prepared from tobacco leaves.

血清に対して3系統はいずれもそれぞれ3.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ならびに6.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで反応した。抗 AMV (ATCC-106 系統) 血清に対して ATCC-106 系統ならびに HN-6 系統は1.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで反応し、PC-Y 系統は3.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで反応した。対照として健全タバコ植物から調製した抗原との反応を調べたが、いずれの抗血清に対しても反応しなかった。これらの結果から供試した3系統のウイルスはいずれの系統の抗血清に対してもほとんど同程度の反応を示し、系統間における差異は認められなかった。

**b) 補体結合反応**

補体結合反応 (KOLMER の少量法) によって HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の系統に対する抗血清と各系統の精製ウイルスとの反応を比較した。抗血清ならびに抗血清の希釈度および精製ウイルスの濃度は重層法と同じである。Table 14, Table 15, Table 16 に示すとおり、抗 AMV (HN-6 系統) 血清に対して3系統はいずれも1.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで反応した。抗 AMV (PC-Y 系統) 血清に対しても3系統はいずれも0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで反応した。抗 AMV (ATCC-106 系統) 血清に対して ATCC-106 系統ならびに HN-6 系統は0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで反応し、PC-Y 系統は1.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで反応した。したがって重層法と同様に供試した3系統のウイルスはいずれの系統の抗血清に対してもほとんど同じ反応を示し、系統間における差異は認められなかった。なお、供試したいずれの系統の抗 AMV 血清においても補体結合反応が重層法に比べて鋭敏であり、とくに抗 AMV (PC-Y 系統) 血清において顕著であった。

**c) 寒天ゲル中拡散法 (OUCHTERLONY 法)**

HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の各系統に対する抗血清を用いて、これらの系統の精製ウイルスの抗原性を寒天ゲル中拡散法によって比較した。実験結果は

**Table 14.** C'-fixation reactions of strains of AMV against anti-AMV (HN-6 strain) serum<sup>(1)</sup>.

| strains                | virus concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |     |     |      |     |     |     |     |     |
|------------------------|---|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        | 100   | 50  | 25  | 12.5 | 6.2 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 0.4 |
| HN-6                   | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| ATCC-106               | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| PC-Y                   | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| Control <sup>(2)</sup> | -   | -   | -   | -    | -   | -   | -   | -   | -   |

(1) Antiserum dilution=1:50.

(2) Ribosome prepared from tobacco leaves.

**Table 15.** C'-fixation reactions of strains of AMV against anti-AMV (ATCC-106 strain) serum<sup>(1)</sup>.

| strains                | virus concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |     |     |      |     |     |     |     |     |
|------------------------|---|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        | 100   | 50  | 25  | 12.5 | 6.2 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 0.4 |
| HN-6                   | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| ATCC-106               | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| PC-Y                   | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | -   | -   | -   |
| Control <sup>(2)</sup> | -   | -   | -   | -    | -   | -   | -   | -   | -   |

(1) Antiserum dilution=1:50.

(2) Ribosome prepared from tobacco leaves.

**Table 16.** C'-fixation reactions of strains of AMV against anti-AMV (PC-Y strain) serum<sup>(1)</sup>.

| strains                | virus concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |     |     |      |     |     |     |     |     |
|------------------------|---|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        | 100   | 50  | 25  | 12.5 | 6.2 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 0.4 |
| HN-6                   | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| ATCC-106               | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| PC-Y                   | ###   | ### | ### | ###  | ### | ### | +   | -   | -   |
| Control <sup>(2)</sup> | -   | -   | -   | -    | -   | -   | -   | -   | -   |

(1) Antiserum dilution=1:50.

(2) Ribosome prepared from tobacco leaves.

Plate II, Fig. 1, Plate II, Fig. 2, Plate II, Fig. 3 に示すとおりである。各系統の精製ウイルスは ATCC-106 系統ならびに PC-Y 系統の抗血清に対して、それぞれ1本の沈降線を生じたが、抗 AMV (HN-6 系統) 血清に対する HN-6 系統の反応においては沈降線が末端部分において2本に分岐した (Plate II, Fig. 3)。しかしながら各系統間の沈降線は完全に癒合したので供試した

系統の抗原性に差異がないものと思われる。

#### d) 免疫電気泳動法

HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の各系統の精製ウイルスを免疫電気泳動して3系統の抗原性ならびに電気泳動的性質を比較した。実験結果は Plate II, Fig. 4, Plate II, Fig. 5, Plate II, Fig. 6 に示すとおりである。Plate II, Fig. 4 は HN-6 系統の精製ウイルスを穴に入れて通電した後、上の溝に抗 AMV (HN-6 系統) 血清を入れ、下の溝に抗 AMV (ATCC-106 系統) 血清を入れて行なった免疫電気泳動図である。Plate II, Fig. 4 に示すとおりいずれの抗血清に対する反応においても陽極側に4本の沈降線が現われ、各沈降線の易動度はほぼ同じであった。Plate II, Fig. 5 は ATCC-106 系統の精製ウイルスを穴に入れて通電した後、上の溝に抗 AMV (ATCC-106 系統) 血清を入れ、下の溝に抗 AMV (HN-6 系統) 血清を入れて行なった免疫電気泳動図である。Plate II, Fig. 5 も Plate II, Fig. 4 とほぼ同じ結果であった。Plate II, Fig. 6 は PC-Y 系統の精製ウイルスを穴に入れて通電した後、上の溝に抗 AMV (PC-Y 系統) 血清を入れ、下の溝に抗 AMV (HN-6 系統) 血清を入れて行なった免疫電気泳動図である。Plate II, Fig. 6 に示すとおり PC-Y 系統の精製ウイルスに対する抗 AMV (HN-6 系統) 血清の反応においては Plate II, Fig. 4 ならびに Plate II, Fig. 5 に示された結果とほぼ同じ沈降線が認められた。しかし抗 AMV (PC-Y 系統) 血清との反応においては易動度の等しい3本の沈降線が生じ、沈降線もうすいものであった。この差異は主に抗 AMV (PC-Y 系統) 血清の抗体価が他の2系統の抗血清に比べて低かったためであると思われる。したがって免疫電気泳動法による3系統の精製ウイルスの比較では明らかな差異は認められなかった。

つぎに AMV に対する沈降抗体がウサギ血清のいかなる免疫グロブリンのクラスに産生されたかを調べた。抗 AMV (HN-6 系統) 血清を穴に入れて通電した後、上の溝に HN-6 系統の精製ウイルスを入れ、下の溝に抗ウサギ血清ネズミ血清または抗ウサギ IgG ウマ血清を入れて免疫電気泳動を行なった。Plate II, Fig. 7 ならびに Plate II, Fig. 8 に示すとおり陰極側に精製 AMV に対して2本の沈降線が生じ、これらの沈降線は IgG の沈降線の位置と一致した。

#### 5. 考 察

AMV 粒子の物理化学的諸性質を研究することは本ウイルスの同定ならびに分類の基準をきめ、さらに本ウイルスの系統の研究の上にも欠くべからざるものである。

そのためには純度の高い精製ウイルスを得ることが重要である。AMV の精製は Ross ら (1940) ならびに Ross (1941) が凍結融解と分画遠心法を数回繰返す方法によって行なったが、その後 BANCROFT ら (1958, 1960), FRISCH-NIGGEMEYER ら (1961), 比留木 (1962), 都丸 (1963) ならびに児玉ら (1964) は STEERE (1956) の chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用によって精製を行なった。著者らも chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用によって精製を行なったが、とくに本法はおだやかな方法で精製するもので chloroform-n-butanol (1:1) をウイルス粗汁液の 1/3 量加え、分画遠心操作を2回繰返した。この方法によって著者らは本報告で明らかなようにきわめて純度の高い精製ウイルスを得ることができた。

精製 AMV の紫外部吸収についてはこれまでに BANCROFT ら (1960) の  $E_{260}/E_{280}=1.65$ , GIBBS ら (1963) の 1.7~1.8, ならびに児玉ら (1964) の 1.6 などの報告がある。著者らは HN-6, ATCC-106 ならびに HN-4 の各系統の紫外部吸収を測定したが、いずれの系統も同様な紫外部吸収曲線を示し、HN-6 は  $E_{260}/E_{280}=1.668$ , ATCC-106 は 1.764, HN-4 は 1.759 であった。ウイルス核酸の含量が同じであることは系統の基準として重要であるが、これらの系統の紫外部吸収の結果から核酸含量は既報の AMV の核酸含量と一致した。

AMV 各成分相互の量比について、BANCROFT ら (1960) は ATCC-106 と ATCC-109 の系統間では差異がなく、ウイルス感染令による成分相互の量比の変動も認められなかったと報告した。しかし、JASPARS ら (1966) は strain II (AMV 425), alfalfa yellow mosaic virus (yellow spot mosaic virus), ATCC-106 の3系統を比較し、strain II と alfalfa yellow mosaic virus は ATCC-106 と異なり top-a 成分 (68 S) の量比が高い系統であり、さらにウイルス感染令の進むにつれて top-a 成分の量比が増大することを報告した。さらに VAN VLOTEN-DOTING ら (1968) は AMV 各成分相互の量比を系統に特異的な遺伝形質として実験を行なった。本研究においても AMV 各成分相互の量比におよぼすウイルス増殖の環境 (温室および調節室) の影響ならびに異なる寄主植物 (タバコおよびエンドウ) でのウイルス増殖の影響を実験したが、これらの影響は認められなかった。一方、タバコの上葉ならびに接種葉のいずれにおいてもウイルス感染令にともなって middle 成分の量比がわずかに増大することがわかった。しかしながら、供試した HN-6, ATCC-106, HN-4 および

PC-Y の各系統はいずれも各成分相互の量比と schlieren pattern の形によって区別することができた。したがって AMV 各成分相互の量比はおもにウイルスの遺伝因子にもとずいて決定されると思われるので系統の識別の基準として用いることができる。

また、一般にウイルスの同定ならびに系統の判別に広く用いられている方法として血清反応がある。HN-6, ATCC-106 ならびに PC-Y の系統に対する抗 AMV 血清を得て、各系統間の抗原性の差異を重層法による沈降反応、補体結合反応ならびに寒天ゲル中拡散法を用いて調べた。しかしながら、いずれの方法においても各系統の抗原性に差異を認めることができなかった。これまでに BANCROFT ら (1960 b) も 24 の AMV の系統を重層法を用いて実験したが、4 系統にわずかな差異を認めただけであった。都丸ら (1968) は日本およびアメリカで分離された AMV の系統を交叉吸収試験によって調べ、両系統の抗原性に差異は認められなかったと報じ、飯塚ら (1969) も寒天ゲル中拡散法によって 3 系統の AMV に対する抗血清と 10 系統の AMV との反応を調べたが、いずれの抗血清と系統の組合せにおいても抗原性に差異がみられなかったと報告している。しかし VAN VLOTEN-DOTING ら (1968) は AMV 425 と yellow spot mosaic virus (YSMV) の 2 系統の間に寒天ゲル中拡散法ならびに交叉吸収試験によって抗原性に差異を認めており、AMV の系統はその多くが抗原性に差異はないが、抗原性の異なる系統もわずかにみられるものと思われる。

つぎにセルロースアセテート膜による電気泳動によって HN-6, ATCC-106, ならびに PC-Y の各系統を比較したが系統間の電気泳動的性質の差異は認められなかった。また、いずれの系統も陽極側に泳動し、とくに原点から 0.5~0.6 cm の位置に濃いバンドがみられた。しかしうすいバンドが濃いバンドの両側にかなり広い幅でみられることから、精製 AMV は電気泳動的にかなり不均一であると推察される。さらに寒天免疫電気泳動法を用いてこれらの系統の差異を比較したが、系統間における明らかな違いは認められなかった。免疫電気泳動における沈降線は 4 本生じたがいずれも陽極側で各沈降線の易動度もほぼ同じであった。しかし、抗体側にもっとも近い沈降線がきわめて長いことからセルロースアセテート膜を用いた電気泳動の結果と同様に精製 AMV は表面荷電がかなり不均一であると考えられる。一方、免疫電気泳動における沈降線の数が寒天ゲル中拡散法の結果よりも多くなったことから電気泳動中にウイルス粒子が

いくつかの段階にこわれることも推定され、そのために粒子の表面荷電ならびに抗原性も不均一になるのかもしれない。LAUFFER ら (1940) も精製 AMV を電気泳動し、他ウイルスと比較して均一でなかったと報告しているが、KELLEY ら (1962, b) は自由電気泳動によって 1 つの schlieren peak を示したと報告している。したがって電気泳動による不均一性についてはさらに検討しなければならない。BOL ら (1969) はアガロースゲルによる電気泳動を行ない、AMV の全成分は陽極側に泳動すると報じ、このことは HULL ら (1968) によって明らかにされているように AMV は粒子の表面近くに核酸が存在しているためだと報告した。著者らの行なったセルロースアセテート電気泳動ならびに寒天免疫電気泳動の結果も陽極側に泳動したことから BOL ら (1969) の結果と一致した。しかし、今後 AMV の系統間の差異をウイルス蛋白質の表面荷電の差で比較するためにはウイルス粒子の表面近くの核酸の影響をさけるためにウイルス粒子からウイルス蛋白質のみを調製して電気泳動する必要がある。

AMV と特異的に反応する沈降抗体がウサギ血清のいかなる免疫グロブリンであるかを確かめるために抗血清を免疫電気泳動によって調べた。実験結果から 2 本の沈降線はウサギ血清の IgG に対して反応していることがわかった。MOED ら (1968) も抗 AMV 血清を免疫電気泳動し、すくなくとも易動度の異なる 3 種類 (ウイルス粒子、低分子の AMV 蛋白質、両抗原に共通) の抗体が産生されたと報告している。著者らの実験結果からも AMV に対して複数の抗体が産生されていることが明らかとなったが、易動度の異なる抗体は認められなかった。

以上のように病徴の差異によって分けた AMV の数種の系統を精製し、紫外部吸収、分析用超遠心機による AMV 各成分相互の量比、セルロースアセテート膜による電気泳動、重層法による沈降反応、補体結合反応、寒天ゲル中反応ならびに免疫電気泳動によって精製ウイルスの諸性質を検討した。これらの方法の中で系統間に差異を認めることができたのは AMV 各成分相互の量比のみであった。しかし、これらの方法の主なものはウイルスの遺伝情報のわずかな部分を反映しているウイルス蛋白質を調べたにすぎない。さらに研究方法を開発し、各系統の精製ウイルスの諸性質を究明することはウイルスの同定ならびに分類の基準を定めるために役立つのみならず、分子レベルでのウイルスの増殖機構ならびにウイルスの遺伝学的研究の基礎として重要である。

#### IV. アルファルファモザイクウイルス (AMV) の感染性

AMV は多成分性植物ウイルスであるために各成分の感染性についてはこれまでに多くの論議がなされてきた。BANCROFT ら (1960) ならびに BANCROFT (1961) は感染性は bottom 成分にのみ認められたと報じた。しかし FRISCH-NIGGEMEYER ら (1961) は AMV の成分を2分画に分け、両分画は同じ程度の感染性を示したと報じ、GIBBS ら (1963) も粒子中の 18% をしめる 20~30 m $\mu$  の粒子以外は感染性を示したと報告している。さらに本ウイルスの感染性の特徴について WOOD ら (1965) は bottom 成分に middle または top 成分を混ぜて接種すると感染性が増大すると思われる結果を示した。村山ら (1967) も WOOD ら (1965) と同様な結果を得たが、異なる2系統 (HN-6, ATCC-106) の top と bottom fraction を組合せて接種した時も同様に感染性の増大が認められることを明らかにした。VAN VLOTEN-DOTING ら (1967, 1968) は top-a 成分 RNA ならびに bottom 成分 RNA を用いて同様な結果を得ており、また2系統の異なる top-a RNA と bottom RNA を混ぜることにより増加した局部病斑から分離したウイルスは両方の系統の遺伝形質を有する新しい系統であったと報じた。この新系統の病徴、各成分の量比ならびにウイルス蛋白質を決定するシストロンを分析した結果、各表現形質に対するシストロンは top-a RNA または bottom RNA に局在していると報告し、希釈実験からも各成分は自己増殖に必要なシストロンの一部を有する不完全粒子であるために各成分単独では感染しないことを証明した。

他の多成分性植物ウイルスについては cowpea mosaic virus (VAN KAMMEN, 1968) ならびにダイコンひだ葉モザイクウイルス (児玉, 1968) も各成分単独では感染せず、RNA を含む middle と bottom の両成分が依存しあって感染性を示すことが報告されている。このような特徴を有する AMV は広い寄主範囲で世界各地に分布し、多くの系統が存在することも知られている。本研究は感染性についてさらに究明するとともに、かかる特殊性を有する AMV の系統について論議することとする。

#### A. 実験材料および方法

##### 1. AMV の各系統の精製法

実験に用いた系統は HN-2, HN-4, HN-6, PC-Y お

よび ATCC-106 である。ウイルスの増殖は温室または調節室 (25~27°C, 2,000 lux, 1日15時間照明) で行ない、草丈約 15 cm に生育させたタバコ (White Burley) を用いてウイルスを増殖させた。ウイルス接種源は接種後、6~8日目の感染したタバコ上葉を磨砕し、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で10倍に希釈して用いた。ウイルスの精製法は III に示したごとく chloroform-n-butanol (1:1) 法と分画遠心法の併用である。精製ウイルスの定量は 1 mg/ml が  $E_{253}^{1\%} = 4.87$  (FRISCH-NIGGEMEYER ら, 1961) として光度法によった。

##### 2. AMV 成分の分画

AMV の top ならびに bottom 成分を蔗糖密度勾配遠心 (BRASSE, 1960) によって分けた。カラムは蔗糖濃度 10, 20, 30, および 40% のものを濃度勾配遠心用チューブに積み重ね、4°C で1夜放置して作った。また 20, 30, 40 および 50% ならびに 30, 40, 50 および 60% のカラムも同様にして作った。RPS 40 ローター (日立) を使用した時は各濃度の蔗糖溶液を 1 ml ずつ積み重ねてカラムを作り、RPS 25-A ローター (日立) を使用した時は濃度の高い方から 7, 7, 7, 4 ml を積み重ねてカラムを作った。蔗糖溶液は 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶して作った。このような方法で準備したカラムの上に 0.5 ml (RPS 40 ローター使用) または 1 ml (RPS 25-A ローター使用) の精製ウイルスを重ね、40 P 型日立分離用超遠心機を用いて遠心操作した。遠心時間ならびに回転数は RPS 40 ローターを使用した時は 28,000 rpm, 3時間または 35,000 rpm, 4時間であったが、RPS 25-A ローターを使用した時は 25,000 rpm, 3時間, 6時間あるいは 9時間であった。遠心後チューブに光を透過させ、肉眼でたしかめながら top 成分ならびに bottom 成分の層をチューブの横から注射針で抜きとり、得られた各分画を top ならびに bottom fraction とした。

##### 3. 感染性の検定

感染性の検定はインゲン (改良大手亡) ならびにササゲ (黒種三尺) の初生葉、あるいはセンニチソウに汁液接種し、感染によって出現する局部病斑数によった。感染力の比較はインゲンならびにササゲを用いた時は半葉法で行ない、センニチソウを用いた時は対葉法で行なった。

##### 4. 紫外線照射によるウイルスの不活性化

top ならびに bottom fraction を不活化するために 15 W の日立殺菌灯 (波長 253.7 m $\mu$ ) を用いて紫外線照射を行なった。照射法はベトリ皿 (径 9 cm) に 2 ml の精製ウイルス液 (0.1 mg/ml) を入れ殺菌灯の軸に沿って

振盪しながら 10 cm の距離から 2 分間照射した。照射ウイルスを接種した検定植物は 24 時間暗室におき、ウイルス活性の回復をさせた。

**B. 実験結果**

**1. top fraction ならびに bottom fraction の感染性**

HN-4, HN-6, ATCC-106 の各系統の精製ウイルスを 10, 20, 30 および 40% の蔗糖濃度のカラムを用いて 28,000 rpm, 3 時間遠心操作し, top ならびに bottom の層を遠心チューブの横から注射針で抜きとった。得られた top ならびに bottom fraction をさらに精製するためにふたたび 30, 40, 50 および 60% の蔗糖濃度のカラムを用いて, 35,000 rpm, 4 時間遠心操作した。このような方法で分けた各系統の top ならびに bottom fraction はウイルス濃度を一定にしてからインゲン (改良大手亡) の初生葉に接種し, 発現した局部病斑数で感染性を比較した。

**Table 17.** Infectivity of top and bottom fraction.

| strain   | fraction | $E_{260}^{cm}$ | number of local lesions* |
|----------|----------|----------------|--------------------------|
| ATCC-106 | top      | 0.20           | 0                        |
|          | bottom   | 0.20           | 1845                     |
| HN-4     | top      | 0.15           | 3                        |
|          | bottom   | 0.15           | 791                      |
| HN-6     | top      | 0.17           | 0                        |
|          | bottom   | 0.17           | 418                      |

\*. The number of local lesions produced on 12 half leaves of beans.

**Table 18.** Infectivity of top and bottom fraction on three kinds of test plants.

| Test plants<br>Fractions<br>Strains | Bean |        | Cowpea |        | <i>Gomphrena globosa</i> |        |
|-------------------------------------|------|--------|--------|--------|--------------------------|--------|
|                                     | Top  | Bottom | Top    | Bottom | Top                      | Bottom |
| HN-4                                | 0    | 381*   | 0      | 294    | 0                        | 4      |
| HN-6                                | 0    | 371    | 0      | 340    | 0                        | 3      |
| ATCC-106                            | 0    | 366    | 0      | 275    | —                        | —      |

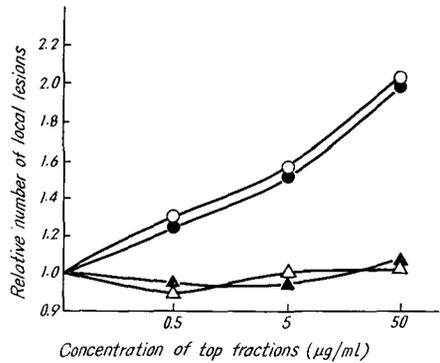
\*: The average number of local lesions on 8 half leaves of beans. The concentration of the inoculum was adjusted as 0.039 mg/ml.

Table 17 に示した結果から明らかなように, いずれの系統においても bottom fraction は感染性を有するが top fraction は感染性を有しないと思われる。しかし 2 回の濃度勾配遠心で分けた bottom fraction は 1 回のものに比べて感染性が 1/2 ないし 1/3 に低下した。top fraction は 1 回の濃度勾配遠心で分けたものも 2 回のものも同様に感染性を示さなかった。

さらに AMV の感染によって局部病斑を形成するインゲン (改良大手亡), ササゲ (黒種三尺) ならびにセンニチソウを用いて top ならびに bottom fraction の感染性を調べた。Table 18 に示したごとく bottom fraction は感染性を有するが top fraction は感染性を示さなかった。したがって AMV の top fraction は感染性を有しないと思われる。

**2. top fraction および bottom fraction の感染性における相互作用**

HN-6 と ATCC-106 系統を精製し, これを 1 回の蔗糖濃度勾配遠心法 (25,000 rpm, 3 時間, RPS 25-A ローター) で top と bottom fraction に分けた。この 2 つの fraction を混ぜてインゲン (改良大手亡) に接種し, その局部病斑数から bottom fraction の感染性に対する top fraction の影響を調べた。実験結果は Fig. 9 な



**Fig. 9.** Enhancement of the infectivity caused by mixing top and bottom fractions (HN-6 strain).

- : Inoculum mixed with top fraction of HN-6 strain.
- : Inoculum mixed with top fraction of ATCC-106 strain.
- △: Inoculum mixed with UV-irradiated top fraction of HN-6 strain.
- ▲: Inoculum mixed with UV-irradiated top fraction of ATCC-106 strain.

Top and bottom fraction were prepared by one-time density gradient centrifugation.

らびに Fig. 10 に示したとおりである。同一系統では bottom fraction の濃度 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を一定にして top

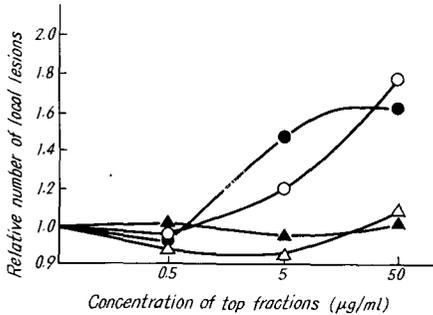


Fig. 10. Enhancement of the infectivity caused by mixing top and bottom fractions (ATCC-106 strain).

- : Inoculum mixed with top fraction of ATCC-106 strain.
- : Inoculum mixed with top fraction of HN-6 strain.
- △: Inoculum mixed with UV-irradiated top fraction of ATCC-106 strain.
- ▲: Inoculum mixed with UV-irradiated top fraction of HN-6 strain.

Top and bottom fraction were prepared by one-time density gradient centrifugation.

fraction の濃度を変えて混ぜた場合, top fraction の濃度が 0.5, 5, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と高くなるにしたがって局部病斑数の増加がみられた。同様に, 両系統の bottom fraction に対し, それぞれ異なる系統の top fraction を混ぜた場合にも同じ系統の top fraction を混ぜた場合と同じ程度に病斑数が増加した。病斑数の増加の程度は top fraction の濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で約 2 倍になった。HN-4, PC-Y の系統についても同様の実験を行なったが同じ結果が得られた。しかし top fraction のかわりにタバコモザイクウイルスの普通系統 (TMV-0) を混ぜた場合には AMV の局部病斑数の増加は認められなかった。一方, 紫外線照射で不活性化した top fraction を混ぜた場合にも bottom fraction の感染性の増加は認められなかった。また紫外線照射した bottom fraction に top fraction を混ぜた場合はまったく感染性を有しなかった。

ATCC-106 系統はインゲン (改良大手亡) の初生葉に他の系統に比較して小さな局部病斑を形成し, 他の系統によって作られた局部病斑と区別することができた。そこで HN-6 系統の bottom fraction に ATCC-106 系統の top fraction を混ぜて, 増加した局部病斑を調べたが HN-6 系統のそれと同じであった。一方, ATCC-106 系統の bottom fraction に HN-6 系統の top

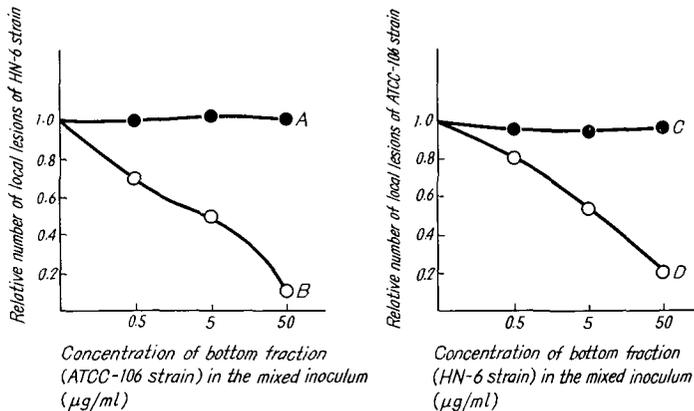


Fig. 11. Interference caused by mixing bottom fractions of different strains on beans.

- A: Inoculum prepared by the mixture of UV-irradiated bottom fraction of ATCC-106 strain and bottom fraction of HN-6 strain.
- B: Inoculum prepared by the mixture of bottom fractions of ATCC-106 strain and bottom fraction of HN-6 strain.
- C: Inoculum prepared by the mixture of UV-irradiated bottom fraction of HN-6 strain and bottom fraction of ATCC-106 strain.
- D: Inoculum prepared by the mixture of bottom fraction of HN-6 strain and bottom fraction of ATCC-106 strain.

fraction を混ぜて、増加したものは ATCC-106 系統の局部病斑を示した。しかし ATCC-106 系統と HN-2 系統の組合せの場合はいずれの系統にも属さない中間の大きさの局部病斑も多数形成され、局部病斑の大きさが一定しなかった。

HN-6 系統と ATCC-106 系統の bottom fraction を用い、一方の系統の bottom fraction の濃度を一定にし ( $5\mu\text{g}/\text{ml}$ )、他の系統の bottom fraction の濃度を変えて混ぜた場合、濃度の高くなるほど前者に対して干渉作用のあることが認められた。しかし紫外線照射で不活性化した bottom fraction は干渉作用を示さないようであった (Fig. 11)。

つぎに 4 回の蔗糖濃度勾配遠心 (25,000 rpm, 3 時間, 6 時間, 9 時間, 9 時間) によってさらに精製した bottom fraction を得て感染性について実験を行なった。単位ウイルス量当りの感染性は遠心回数の多くなるにしたがって低下し、4 回の遠心操作によって得られた bottom fraction は 1 回のものに比べて約  $1/7\sim 1/10$  の感染力で

あった。Fig. 12 ならびに Fig. 13 に示すとおり、このようにして得られた bottom fraction ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に 1, 10,  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  の top fraction を混ぜて接種するとともに感染性を回復した。HN-6 と ATCC-106 の異なる系統の top と bottom fraction を混ぜて接種した時にも同様な結果が得られた。

そこで top fraction または bottom fraction のどちらかを先に接種してから 30 分後と 10 時間後に別の fraction を接種した場合にも感染性の増加がみられるか否かを調べた。top fraction と bottom fraction は 1 回の蔗糖濃度勾配遠心によって分けたものを用い、対照として  $0.01\text{ M}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて半葉法 (インゲン初生葉) によって比較検討した。Table 19 ならびに Table 20 に示すとおり、いずれの場合にも感染性の増加は認められなかった。したがって top fraction と bottom fraction が別々に接種された時は 30 分間経過すると相互作用が認められないようである。

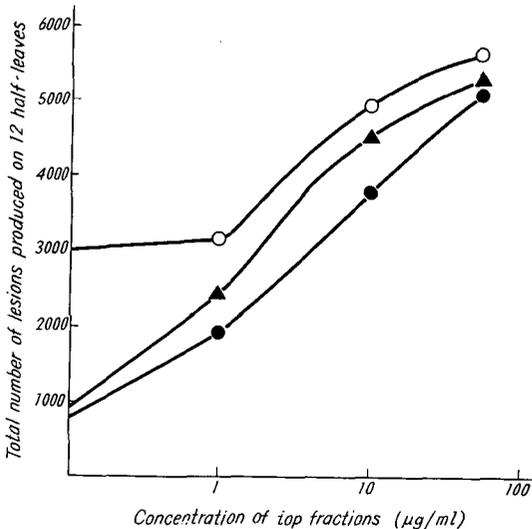


Fig. 12. Enhancement of the infectivity caused by mixing of top and bottom fractions (HN-6 strain).

- : Inoculum prepared by mixing of top (HN-6) and bottom fraction (HN-6) separated by one-time density gradient centrifugation.
- : Inoculum prepared by mixing of top (HN-6) and bottom fraction (HN-6) separated by four-time density gradient centrifugation.
- ▲: Inoculum prepared by mixing of top (ATCC-106) and bottom fraction (HN-6) separated by four-time density gradient centrifugation.

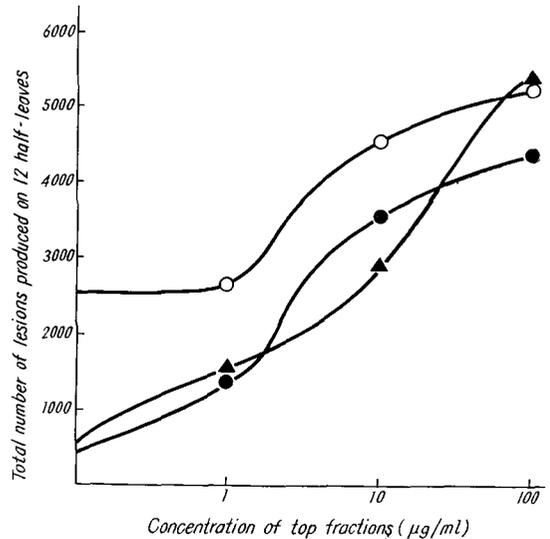


Fig. 13. Enhancement of the infectivity caused by mixing of top and bottom fraction (ATCC-106 strain).

- : Inoculum prepared by mixing of top (ATCC-106) and bottom fraction (ATCC-106) separated by one-time density gradient centrifugation.
- : Inoculum prepared by mixing of top (ATCC-106) and bottom fraction (ATCC-106) separated by four-time density gradient centrifugation.
- ▲: Inoculum prepared by mixing of top (HN-6) and bottom fraction (ATCC-106) separated by four-times density gradient centrifugation.

**Table 19.** Interaction between top and bottom fraction inoculated at different time.

| Primary inoculum         | Secondary inoculum | Intervals between primary and secondary inoculation |          |
|--------------------------|--------------------|---|----------|
|                          |                    | 1/2 hour  | 10 hours |
| Top (HN-6)<br>buffer     | Bottom (HN-6)      | 193*  | 216      |
|                          |                    | 212   | 242      |
| Top (ATCC-106)<br>buffer | Bottom (HN-6)      | 187   | 214      |
|                          |                    | 215   | 229      |
| Top (ATCC-106)<br>buffer | Bottom (ATCC-106)  | 239   | 248      |
|                          |                    | 240   | 257      |
| Top (HN-6)<br>buffer     | Bottom (ATCC-106)  | 215   | 227      |
|                          |                    | 187   | 244      |

\* The average number of local lesions produced on 12 half leaves of beans. The concentration of the virus was adjusted as 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Table 20.** Interaction between top and bottom fraction inoculated at different time.

| Primary inoculum  | Secondary inoculum       | Intervals between primary and secondary inoculation |          |
|-------------------|--------------------------|---|----------|
|                   |                          | 1/2 hour  | 10 hours |
| Bottom (HN-6)     | Top (HN-6)<br>buffer     | 169*  | 158      |
|                   |                          | 195   | 171      |
| Bottom (HN-6)     | Top (ATCC-106)<br>buffer | 182   | 239      |
|                   |                          | 192   | 244      |
| Bottom (ATCC-106) | Top (ATCC-106)<br>buffer | 124   | 172      |
|                   |                          | 118   | 179      |
| Bottom (ATCC-106) | Top (HN-6)<br>buffer     | 124   | 273      |
|                   |                          | 116   | 284      |

\* The average number of local lesions produced on 12 half leaves of beans. The concentration of the virus was adjusted as 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3. *in vitro* における top fraction ならびに bottom fraction のウイルス活性の耐性

精製 AMV (HN-6) を1回の蔗糖濃度勾配遠心で top fraction と bottom fraction に分け、*in vitro* における bottom fraction のウイルス活性の耐性を調べた。1回の蔗糖濃度勾配遠心で得られた bottom fraction は高い感染性を有していたが top fraction は感染性を有していなかった。bottom fraction を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のウイルス濃度にし、ミリポエフィルターで除菌後 30°C の恒温器中に放置した。これを 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように希釈してからインゲン (改良大手亡) の半葉に接種し、30°C で3日間経過した時の bottom fraction の感染性の消失を調べた。接種に用い

た top fraction と bottom fraction の濃度はそれぞれ 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調整した。Table 21 に示したとおり bottom fraction は1日めですでに最初の感染性の 27% に低下し、3日めでは 4% となった。感染性の低下した bottom fraction に 4°C で保存した top fraction を混ぜて接種し、その感染性を調べたが、もとの感染性を回復することができなかった。したがってこの不活性化は bottom fraction に特異的なウイルス活性の消失によるものと思われる。また bottom fraction のウイルス活性は 30°C、3日間でそのほとんどを消失することがわかった。

同様にして top fraction のウイルス活性の耐性について調べた。実験に用いた bottom fraction は他成分の混入を少なくするために2回の蔗糖濃度勾配遠心によ

**Table 21.** *In vitro* inactivation of bottom fraction of AMV (HN-6 strain).

| Inoculum <sup>(1)</sup>                  | Aging in days at 30°C         |              |              |             |
|--|-------------------------------|--------------|--------------|-------------|
|  | 0                             | 1            | 2            | 3           |
| Bottom fraction                          | 1802 <sup>(2)</sup><br>(100%) | 489<br>(27%) | 174<br>(10%) | 72<br>(4%)  |
| Bottom fraction+top fraction kept at 4°C | 2776<br>(100%)                | 695<br>(25%) | 517<br>(19%) | 196<br>(7%) |

- (1) Top and bottom fraction were prepared by one-time density gradient centrifugation and were kept at 4 and 30°C, respectively. The concentration of both fractions was adjusted as 5 µg/ml.
- (2) The figures represent total local lesions on 12 half leaves of beans.

**Table 22.** *In vitro* inactivation of top fraction of AMV (HN-6 strain).

| Inoculum                                      | Number of local lesions <sup>(1)</sup> |
|---|--|
| Bottom fraction <sup>(2)</sup>                | 228                                    |
| Bottom fraction+top-1 fraction <sup>(3)</sup> | 1455                                   |
| Bottom fraction+top-2 fraction <sup>(4)</sup> | 912                                    |

- (1) Figures represent total local lesions on 8 half leaves of bean plants.
- (2) Bottom fraction was prepared by two-time density gradient centrifugation. The concentration of top and bottom fraction was adjusted as 5 µg/ml.
- (3) Top-1 fraction was kept at 4°C for 3 days before inoculation.
- (4) Top-2 fraction was kept at 30°C for 3 days before inoculation.

って得たものである。この bottom fraction に 30°C で 3 日間経過した top fraction を混ぜて感染性を調べた。対照として 4°C に保存した top fraction を bottom fraction に混ぜて比較し、その感染性の差異から 30°C で 3 日間経過した top fraction の生物活性の消失程度を確かめた。Table 22 に示したとおり bottom fraction に 30°C で 3 日間経過した top fraction を混ぜて感染性を調べた結果 bottom fraction の感染性を約 4 倍増加させた。対照として 4°C に保存した top fraction を混ぜた時は約 6.4 倍の増加であったので、top fraction は 30°C で 3 日間を経過しても約 60% のウイルス活性を保持していたことになる。これらの実験から *in vitro* における top fraction のウイルス活性の耐性は bottom fraction に比較してきわめて強いことがわかった。

#### 4. *in vivo* における top fraction ならびに bottom fraction のウイルス活性の耐性

本ウイルスは感染後、時間の経過とともに *in vivo* における感染性が低下すると報告されている (KUHN ら, 1961)。そこで *in vivo* における不活性化を top frac-

tion と bottom fraction に分けて調べた。HN-6 系統をタバコ (White Burley) に接種し、温室 (10~11 月) でウイルスを増殖させ、接種後 18 日目のはげしいモザイク病徴を示す罹病葉と接種後 30 日目の感染令の古い罹病葉を選んで収穫した。これらの罹病葉からウイルスを精製し、1 回の蔗糖濃度勾配遠心分離で top fraction と bottom fraction に分けた。Table 23 に示すとおり接種後 18 日目の bottom fraction (5 µg/ml) は高い感染性を示したが接種後 30 日目の bottom fraction は感染性をほとんど消失していた。接種後 30 日目の bottom fraction ならびに接種後 18 日目の bottom fraction に接種後 18 日目の top fraction を混ぜて接種し、感染性の増加を調べた結果、接種後 18 日目の bottom fraction の感染性に比較して、接種後 30 日目の bottom fraction の感染性ははるかに低かった。これは *in vivo* における AMV の不活性化も bottom fraction に特異的なウイルス活性の消失によるものと思われる。

*in vivo* における top fraction の不活性化を調べるために接種後 18 日目と 30 日目の bottom fraction に

**Table 23.** *In vivo* inactivation of top and bottom fraction of AMV (HN-6 strain).

| Inoculum <sup>(1)</sup> | Number of local lesions <sup>(2)</sup> |         |
|-------------------------|--|---------|
|                         | Expt. 1                                | Expt. 2 |
| Bottom-1                | 592                                    | 682     |
| Bottom-1+top-1          | 1163                                   | 1263    |
| Bottom-1+top-2          | 1135                                   | 1128    |
| Bottom-2                | 1                                      | 30      |
| Bottom-2+top-1          | 32                                     | 129     |
| Bottom-2+top-2          | 27                                     | 96      |

- (1) Each fraction was prepared by one-time density gradient centrifugation. The concentration of top and bottom fraction was adjusted as 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Top-1 and bottom-1, and top-2 and bottom-2 were prepared from the infected tobacco plants of 18 and 30 days, respectively, after inoculation.
- (2) Figures represent total local lesions on 12 half leaves of beans.

接種後 18 日目と 30 日目の top fraction をそれぞれ混ぜて感染性の増加を比較した。しかし接種後 18 日目の top fraction の生物活性が接種後 30 日目のそれに比べてわずかに高い程度であった。接種後 30 日目の bottom fraction に 18 日目と 30 日目の top fraction を混ぜた時も同様であった。これらの結果から *in vivo* における AMV の不活性化は bottom fraction が top fraction に比較していちじるしいことが明らかとなった。

### 5. 考 察

本ウイルスの各成分の感染性についてはこれまでにいくつもの報告がある。しかし top fraction の感染性に関しては報告によって異なっている (BANCROFT ら, 1960, 1961., FRISCH-NIGGEMEYER ら, 1961., GIBBS ら, 1963)。これらの点を明らかにするために著者らは蔗糖濃度勾配遠心を 2 回繰返してより均一な成分を含む top fraction と bottom fraction を得た。さらに系統間の差異の有無を調べるために 5 系統を供試し、検定植物による差異についてもインゲン、ササゲ、センニチソウを用いて検討した。本報告で明らかとなり実験に用いた 5 系統の top fraction はすべて感染性を示さず、bottom fraction にのみ感染性が認められた。また異なる 3 種の検定植物においても同じ結果が得られた。したがって系統ならびに検定植物にかかわらず、本ウイルスの top fraction は感染性を有しないものと思われる。本ウイルスの増殖において感染性のない top fraction がいかなる役割も持たないものか否かについて WOOD ら (1965) は top 成分ならびに middle 成分を bottom 成

分に混ぜて接種すると感染力が増大すると思われる結果を得た。著者らも同様な実験を行ない、同様の結果を得たが、しかし紫外線照射した top fraction や TMV を混ぜても bottom fraction の感染性は増加しなかった。VAN VLOTEN-DOTING ら (1967) も bottom 成分 RNA のみを接種した時は感染性がきわめて低かったが top-a RNA を混ぜて接種すると感染性が増大することを報告した。したがって top fraction による感染性の増加は AMV の top fraction の核酸が関与するものと思われる。

VAN KAMMEN (1968) は多成分性植物ウイルスである cowpea mosaic virus (CPMV) が感染性を有するためには核酸を含有する middle と bottom の両成分が必要であり、単独では自己増殖に必要なシストロンをすべて有しない不完全なウイルス粒子であると報じた。AMV においても本報告で明らかとなり、4 回の蔗糖濃度勾配遠心によって得られた bottom fraction は 1 回行なったものに比べて約 1/7~1/10 の感染力に低下したが、top fraction を混ぜて接種するとその感染力に回復した。この現象は VAN KAMMEN (1968) によって報告された CPMV とまったく一致することから AMV の各成分も単独では感染性を有しない不完全ウイルス粒子と推察される。同様に VAN VLOTEN-DOTING ら (1968) もウイルスの希釈と感染力との関係から感染が成立するためには寄主のおのおのの感染部位に 1 個以上の AMV 粒子が必要であり、また top-a 成分の RNA または bottom 成分の RNA を単独に接種しても病徴発現もウイルス RNA の増殖も認められなかったことか

ら AMV の感染には少なくとも top-a RNA と bottom RNA の 2 種の成分が必要であると報告している。

つぎに異なる系統の top fraction と bottom fraction の感染性における相互作用を調べ、5 系統について実験を行なったが、いずれの系統の top fraction と bottom fraction の組合せにおいても感染性の増加が認められた。VAN VLOTEN-DOTING ら (1968) ならびに MAJORANA ら (1969) も異なる系統の bottom 成分と top 成分の組合せにより感染性の生ずることを報告しており、AMV はいかなる系統の top 成分と bottom 成分の組合せにおいても感染性を持つことができるのかもしれない。しかし同じ多成分性植物ウイルスである tobacco rattle virus (LISTER, 1966., FROST ら, 1967., SEMANCIK ら, 1968., SÄNGER, 1968) ならびに CPMV (VAN KAMMEN, 1968., BRUENING, 1969) では系統の組合せによって感染性を有するものと有しないものがあると報告されており、AMV の特殊性をさらに究明することが必要である。本研究においては異なる系統の組合せによって、top fraction ならびに bottom fraction に存在する遺伝形質をインゲンに形成される局部病斑の大きさから検討した。他の系統に比較して小さな局部病斑を形成する ATCC-106 系統と HN-4, HN-6, PC-Y 系統との組合せにおいては bottom fraction として用いた系統の病理が増加した。VAN VLOTEN-DOTING ら (1968) は 2 種類の異なる系統の top-a RNA と bottom RNA の組合せによって、両系統の形質を有する新しい系統を作り、病徴、ウイルス蛋白質ならびに各成分の量比を決定するシストロンを分析した結果、各表現形質に対するシストロンは top-a RNA または bottom RNA に局在していることを明らかにした。しかし MAJORANA ら (1969) はインゲンに局部病斑を形成する系統 (Me) と全身感染する系統 (Si) の組合せで実験し、Me の top 成分と Si の bottom 成分の組合せでは Me と同じ局部病斑を形成したが、Si の top 成分と Me の bottom 成分の組合せでは Me と異なる病斑が増加したと報告している。著者らも ATCC-106 系統と HN-2 系統の組合せにおいて、いずれの系統にも属さない中間型の病斑を多数認めた。この現象は用いた系統とその組合せによっては病斑決定のシストロンが各成分に局在していないことを意味し、各成分のゲノム分析にはさらに多くの系統を用いて検討されねばならないことを示唆している。

また、最近 VAN VLOTEN-DOTING ら (1970) は、AMV が感染性を有するためには top-b 成分、middle

成分ならびに bottom 成分の 3 成分が必要であったと報じ、これまでの彼等の研究において top-a 成分が感染性に必須であると報じた結果を否定した。したがって AMV の感染性についてはいまだ定説もなく、さらに研究されなければならないものと思われる。

top または bottom のどちらかの fraction を先に接種して感染性の増加の有無を調べたが、接種時間が 30 分間経過すると相互作用は認められなかった。30 分以内の時間差についても実験する必要があるが、AMV の感染には top と bottom の fraction がほぼ同時に接種されねばならないことが明らかとなった。このことは AMV の伝染ならびに感染機作を解明するうえで重要な事実であるように思われる。また KASSANIS (1966) はすでに satellite virus (SV) と tobacco necrosis virus (TNV) について同様な実験を行なっているが、TNV が先に接種された時は 5 時間以内に SV の接種が行なわれなければ SV は感染せず、SV が先の時は 5 日後に TNV が接種されても SV の感染が認められたと報告している。多成分性植物ウイルスである AMV、と TNV に依存して増殖する SV の感染においてかかる差異が認められることも興味ある問題である。

AMV の感染性の特徴をさらに究明するために *in vitro* ならびに *in vivo* におけるウイルス活性の耐性を top と bottom fraction に分けて検討した。*in vitro* ならびに *in vivo* のいずれにおいても top fraction のウイルス活性の耐性は bottom fraction に比較してきわめて強いことが明らかとなった。したがって *in vivo* において感染後時間の経過とともに感染性が低下するのはおもに bottom fraction に特異的なウイルス活性の消失に起因することがわかった。

以上のような感染性の特徴を有する AMV にはきわめて多くの系統が存在することがこれまでに報告されている。これは AMV が自然界において変異のおきやすいウイルスであるとも考えられる。すでに明らかなように、AMV の各成分は単独では感染性を有しないが、少なくとも top と bottom 成分が同時に接種された時には感染性を持ちうるようになり、さらにこれまでのところ、いかなる系統間の top と bottom の成分の組換えによっても感染性を示した。またそのうえ *in vitro* ならびに *in vivo* において bottom 成分が top 成分に比較してきわめて不活性化しやすいことは系統間の干渉作用による感染性の低下を少なくし、異なる系統間での遺伝子組換えを容易にする一因とも考えられる。したがって AMV に系統の多いことは自然界での突然変異に

加えて、遺伝子組換えによる変異がおこりやすい条件を特に持っているウイルスであるからかもしれない。今後、実際に野外において遺伝子組換えによる変異が多いか否かを実証しなければならないことはいうまでもない。

## V. アルファルファモザイクウイルス (AMV) RNA の血清学的研究

アルファルファモザイクウイルス (AMV) の系統ならびに AMV と他のウイルスとの近縁関係を調べる方法として生化学的にはウイルス蛋白質のアミノ酸組成ならびにアミノ酸配列の決定が考えられ、一方、蛋白質の差異をもっとも鋭敏、かつ簡単に区別できる血清学的方法もある。しかし、III における血清反応ならびに電気泳動の実験から AMV の蛋白質における系統間差異は認められなかった。その理由として AMV の蛋白質は小さい成分である top-a RNA の一部分の遺伝情報によって作られている (VAN RAVENSWAAY CLAASEN ら, 1967; VAN VLOTEN-DOTING ら, 1968) ためかもしれない。タバコモザイクウイルス (TMV) の人工変異株の研究では外被蛋白質の変換アミノ酸から逆に遺伝情報の解明が試みられ、分析された 200 株の人工変異株のうち 120 株は蛋白質には何ら変化がなかった。その理由として TMV-RNA は 6,400 個のヌクレオチドから構成されているが、TMV 外被蛋白質をコードするのに必要なヌクレオチドは全 RNA の 7.4% にすぎず、残りの RNA 部分はおそらく TMV の増殖に必要な他の蛋白質 (酵素蛋白質など) をコードするのであろうと考えられた (船津, 1966)。したがってウイルスの種類ならびに系統を研究するためには全 RNA の差異について調べることは重要である。核酸の質的相違はいまのところ塩基組成のモル比を分析する方法が一般的であるが塩基の配列順序ならびに高次構造とは無関係であるために不十分である。しかしながらウイルス RNA のすべての塩基配列を決定することは不可能に近い。そこで著者らは植物ウイルス RNA の質的相違の判定に血清学的方法を用いることができるか否かを AMV を材料として研究をはじめた。

核酸抗体に関する研究は最近約 10 年の間に行なわれた。PHILLIPS ら (1958) は DNA に富む *Brucella abortus* を注射して得た抗血清に対し DNase 処理した抗原が反応しなくなったと報告した。この実験によって DNA 抗体の産生がはじめて証明された。ほぼ同じ頃、Systemic lupus erythematosus (SE) の患者血清が精

製 DNA と沈降反応、passive cutaneous anaphylaxis ならびに補体結合反応することが発見された (SELIGMAN, 1958; DEICHER ら, 1960; STOLLAR ら, 1961)。また LEVINE ら (1958) も T<sub>4</sub> バクテリオファージを凍結融解してウサギに注射し、得られた抗血清が T<sub>4</sub> バクテリオファージ DNA に対して反応することを認めた。この報告がウイルス核酸抗体の最初のものである。一方、RNA 抗体の産生については BARBU ら (1960) が *E. coli* ならびに *Proteus vulgaris* のリボゾームをウサギと馬に注射して RNA と特異的に反応する抗血清を得たと報告している。しかしながら核酸のみを注射して核酸抗体を産生する試みは失敗していた (HÁSKOVÁ ら, 1959; COLTER ら, 1961; YACHNIN, 1962; WILSON ら, 1965)。しかし、PLESCIA ら (1964) は熱変性させた DNA に担体蛋白質としてメチル化牛血清アルブミンを結合させて注射し、DNA 抗体を得ることができたと報告し、さらに彼ら (1965) は同様に yeast sRNA 抗体の産生にも成功した。しかしながらこれまでの報告から核酸抗体の特異性は蛋白質に比較してきわめて低いものであった。したがってとくに AMV の系統ならびに他ウイルスとの近縁を RNA の血清学的方向から研究するためにはさらに RNA 抗体の特長を解明することが重要である。本報告においてはその基礎的研究として抗 yeast sRNA 血清、抗 yeast rRNA 血清ならびに抗 AMV-RNA 血清を作り、これら抗血清の反応性について検討した。

## A. 実験材料および方法

### 1. RNA の調製

供試した RNA は精製 yeast sRNA (Worthington 社)、精製 yeast rRNA (Nutritional Biochemicals 社)、GILLASPIE ら (1965) の方法に従って抽出した AMV-RNA ならびに KIRBY (1956) の方法にしたがって抽出した rat liver RNA である。

AMV-RNA の調製: AMV (HN-6 系統) は chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用で罹病タバコ葉から精製した。精製 AMV (10 mg/ml) から GILLASPIE ら (1965) の方法にしたがって SDS phenol 法で AMV-RNA を抽出した。抽出した RNA は 258 m $\mu$  に吸収極大を示し、231 m $\mu$  に吸収極小を示した (日立 139 分光光度計による)。また E<sub>260</sub>/E<sub>230</sub> = 2.29 であった。AMV-RNA 溶液中の蛋白質含量を LOWRY ら (1951) の方法によって調べたが 0.5% 以下であった。感染性をインゲンの初生葉に接種し調べたがウイルス中の核酸の感染性

の約0.05%であった。

rat liver RNA の調製：絶食させたネズミの肝臓 84 g から KIRBY (1956) の方法にしたがって抽出した。抽出した rat liver RNA は 260 m $\mu$  附近に吸収極大を示し、230 m $\mu$  附近に吸収極小を示した (日立自記分光光度計による)。また  $E_{260}/E_{230}=2.5$  であった。rat liver RNA 溶液中の蛋白質含量を Biuret 反応を用いて調べたが 1% 以下であった。

## 2. 抗 RNA 血清の産生

PLESCIA ら (1964) の方法にしたがい RNA (生理食塩水中に 0.1~0.5% の濃度になるように溶かしたもの) と同じ重量のメチル化牛血清アルブミン (蒸溜水中に 1~5% の濃度になるように溶かしたもの) を混ぜて白濁の complex を作り、等容量の complete adjuvant と混合してウサギの筋肉ないし皮下に注射した。yeast sRNA は 2.5 mg ずつ 8 回、yeast rRNA は 0.25 mg ずつ 9 回、AMV-RNA は 0.5 mg ずつ 5 回、AMV は 1 mg ずつ 5 回毎週免疫した。最終の注射後 7~10 日目に頸動脈より全採血して抗血清を得た。

## 3. 抗血清の解析

補体結合反応 (KOLMER の少量法) を用いて抗血清の力価ならびに各種の抗原に対する反応性を調べた。補体、緬羊血球ならびに溶血素は北海道立衛生研究所より購入した。希釈液は Veronal 緩衝食塩水 (VBS) を用いた。抗血清は寒冷凝集素を除いた後、30 分間、56°C の湯槽につけて非動化した。補体結合反応の手順は III と同じである。反応の判定は以下に示す 2 種の方法で行なった。

### 判定法 I

- (-)……100% 溶血 (完全溶血)
- (+)……一見 100% 溶血に近く試験管を振ると底からわずかな血球が煙のように上るもの
- (++)……25% の血球が不溶血で残る。
- (+++)……50% の血球が不溶血で残る。
- (++++)……75% の血球が不溶血で残る。
- (=====)……100% 不溶血 (完全不溶血, 遠心すると上清が無色透明)

### 判定法 II

一定希釈濃度 (1:50, 1:100) の抗血清に対する種々の抗原の反応性を調べる方法として異なる抗原量 (0.1~40  $\mu$ g) に対する補体結合反応の分光光度計による吸光度の測定値から求めた。その方法は補体結合反応終了後各管を遠心して不溶血球を除き、その上清に生理食塩水を加えて 3 ml とし、溶血して遊離した酸素ヘモグロビン

を 541 m $\mu$  の吸光度から測定した。グラフのたて軸の表示は対照における完全溶血の吸光度と反応の認められた上清の吸光度の差 ( $\Delta OD$ ) を 100 分率で表わしたものである。すなわち、100% 不溶血を 100% の補体結合量として表わした

## B. 実験結果

### 1. 抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清の産生:

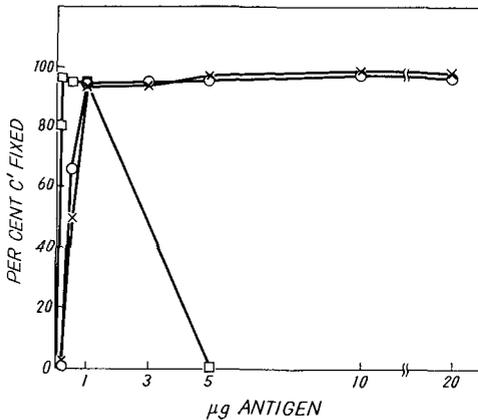
精製 yeast sRNA ならびに精製 yeast rRNA とメチル化牛血清アルブミンの complex をウサギに注射して各々の補体結合抗体を得た。これらの抗血清を yeast sRNA, yeast rRNA, AMV-RNA (HN-6 系統), rat liver RNA ならびに熱変性させた一本鎖サケ精子 DNA と補体結合反応 (KOLMER の少量法) をさせた。Table 24 は各抗原 (10  $\mu$ g) に対する抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清の力価を判定法 I に基づいて調べた結果である。Rabbit-A から得た抗 yeast sRNA 血清は同種の RNA に対して 256 倍に希釈した抗血清まで反応した。しかし異なる RNA に対しては yeast rRNA が 16 倍に希釈した抗血清ときわめて弱い反応を示したのみで AMV-RNA (HN-6 系統) ならびに rat liver RNA とは反応せず、きわめて特異性が顕著であった。一方、Rabbit-B から得た抗 yeast sRNA 血清は同種の RNA と 512 倍まで反応したが yeast rRNA に対しても 64 倍まで反応し、rat liver RNA ともきわめて弱い反応がみられた。2 匹のウサギから得た抗 yeast sRNA 血清の特異性における差異はウサギの個体差によるものと思われる。抗 yeast rRNA 血清は同種の RNA と 256 倍まで反応した。異なる RNA との反応では yeast sRNA と 64 倍まで反応し、AMV-RNA (HN-6 系統) ならびに rat liver RNA ともきわめて弱い反応が認められた。これらの結果から抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清は yeast sRNA ならびに yeast rRNA とそれぞれ、もっとも強く反応し、異なる RNA との反応に比べて明らかな差異が認められたことからかなり特異性のある抗血清が得られたものと思われる。

つぎに一定希釈濃度 (1:50 または 1:100) の抗 yeast sRNA 血清 (Rabbit-A) ならびに抗 yeast rRNA 血清に異なる抗原量 (0.1~40  $\mu$ g) で補体結合反応させた。反応の結果は判定法 II に基づいて示した。Fig. 14 に示したごとく抗 yeast sRNA 血清 (1:50) は 0.5  $\mu$ g の yeast sRNA に対して 66.5%, 1  $\mu$ g に対して 94.3% の補体結合反応が認められた。さらに 3  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g ならびに

**Table 24.** Titer of anti-sRNA serum and anti-rRNA serum in C'-fixation test

| Antiserum                              | Antigen<br>(10 $\mu$ g) | Dilution of Antiserum |      |      |       |       |       |        |
|--|-------------------------|-----------------------|------|------|-------|-------|-------|--------|
|  |                         | 1/16                  | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1024 |
| Anti-yeast<br>sRNA serum<br>(Rabbit-A) | Yeast sRNA              | ###                   | ###  | ###  | ###   | ##    | —     | —      |
|  | Yeast rRNA              | +                     | —    | —    | —     | —     | —     | —      |
|  | *AMV-RNA                | —                     | —    | —    | —     | —     | —     | —      |
|  | Rat liver RNA           | —                     | —    | —    | —     | —     | —     | —      |
|  | Control                 | —                     | —    | —    | —     | —     | —     | —      |
| Anti-yeast<br>sRNA serum<br>(Rabbit-B) | Yeast sRNA              | ###                   | ###  | ###  | ###   | ###   | ##    | —      |
|  | Yeast rRNA              | ###                   | ###  | +    | —     | —     | —     | —      |
|  | Rat liver RNA           | +                     | +    | —    | —     | —     | —     | —      |
|  | Control                 | +                     | —    | —    | —     | —     | —     | —      |
| Anti-yeast<br>rRNA serum               | Yeast rRNA              | ###                   | ###  | ###  | ###   | +     | —     | —      |
|  | Yeast sRNA              | ##                    | +    | +    | —     | —     | —     | —      |
|  | AMV-RNA                 | +                     | +    | —    | —     | —     | —     | —      |
|  | Rat liver RNA           | +                     | +    | —    | —     | —     | —     | —      |
|  | Control                 | +                     | —    | —    | —     | —     | —     | —      |

\* AMV: Alfalfa Mosaic Virus (HN-6 strain)

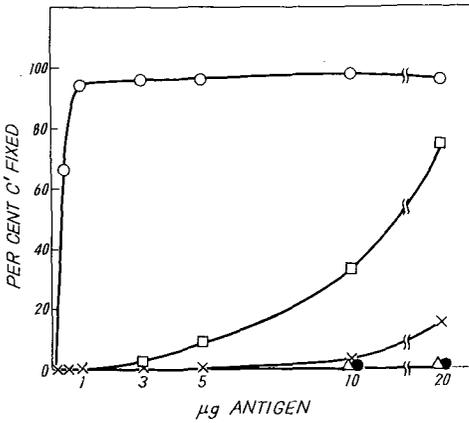


**Fig. 14.** C'-fixation reactions of anti-yeast sRNA serum with: O, yeast sRNA; x, complex of yeast sRNA and methylated bovine serum albumin; □, methylated bovine serum albumin.

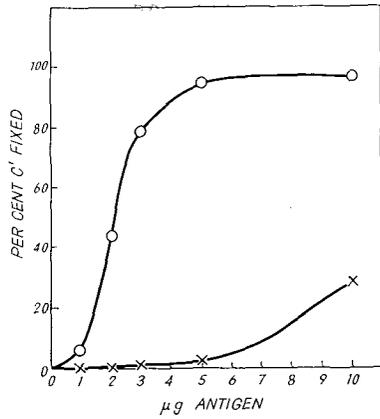
Antiserum dilution=1:50

20  $\mu$ g の yeast sRNA と反応させたがそれぞれ 95.3%, 95.3%, 97.6% ならびに 95.8% であった。同様にして免疫源として用いた yeast sRNA とメチル化牛血清アル

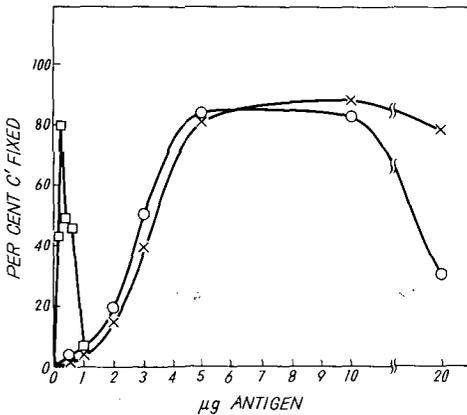
ブミンの complex に対する反応性を調べたが yeast sRNA に対する反応といちじるしく類似した。担体蛋白質として用いたメチル化牛血清アルブミンに対しては 0.2  $\mu$ g の抗原量で 96.2% となり反応が最大に達したが 5  $\mu$ g ではほとんど反応が認められなかった。Fig. 15 は抗 yeast sRNA 血清に AMV-RNA (ATCC-106 系統), yeast rRNA, rat liver RNA ならびに熱変性させた一本鎖サケ精子 DNA を反応させた結果である。異なる RNA に対しては yeast rRNA が 10 ならびに 20  $\mu$ g の抗原量でそれぞれ 2.8 ならびに 15.5% とわずかに反応が認められたが, AMV-RNA ならびに rat liver RNA との反応は認められなかった。一方, 熱変性させた一本鎖サケ精子 DNA が 10  $\mu$ g ならびに 20  $\mu$ g の抗原量でそれぞれ 33.5 ならびに 74.8% の補体結合反応が認められ, 異なる RNA に対する反応より強かった。抗 yeast rRNA 血清 (1:100) に対する yeast rRNA の反応性を調べた結果が Fig. 16 である。抗 yeast rRNA 血清は 5 ならびに 10  $\mu$ g の yeast rRNA に対してそれぞれ 83.1% ならびに 82.5% の強い反応が認められたが 20  $\mu$ g では 30.7% となり, 反応が弱くなった。yeast rRNA とメチル化牛血清アルブミンの complex を抗原として用いた場合も yeast rRNA との反応とほぼ同様の傾向が



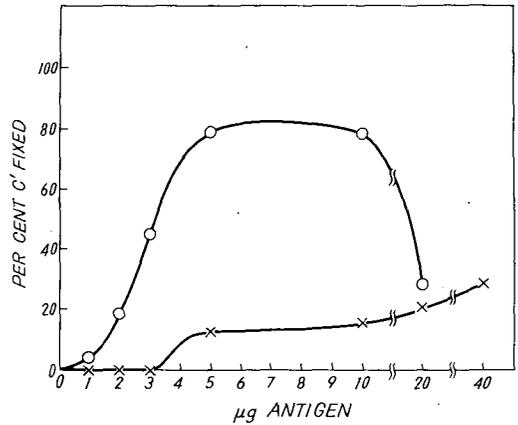
**Fig. 15.** C'-fixation reactions of anti-yeast sRNA serum with: ○, yeast sRNA; ×, yeast rRNA; □, heat denatured salmon sperm DNA; △, rat liver RNA; ● AMV-RNA (ATCC-106 strain).  
Antiserum dilution=1:50



**Fig. 17.** C'-Fixation reactions of anti-yeast rRNA serum with: ○, yeast rRNA; ×, AMV-RNA (HN-6 strain).  
Antiserum dilution=1:50



**Fig. 16.** C'-fixation reactions of anti-yeast rRNA serum with: ○, yeast rRNA; ×, complex of yeast rRNA and methylated bovine serum albumin; □, methylated bovine serum albumin.  
Antiserum dilution=1:100



**Fig. 18.** C'-fixation reactions of anti-yeast rRNA serum with: ○, yeast rRNA; ×, heat denatured salmon sperm DNA.  
Antiserum dilution=1:100

認められた。メチル化牛血清アルブミンに対する反応は 0.2 μg の抗原量で 79.1% に達し、もっとも強い反応を示したが 1 μg の抗原量ではほとんど反応が認められなかった。抗 yeast rRNA 血清 (1:50) と異なる RNA との反応を調べた結果、AMV-RNA (HN-6 系統) が 10 μg の抗原量で 27.9% の反応が認められ、熱変性させた一本鎖サケ精子 DNA との反応では 100 倍に希釈した抗血清に対し 10, 20 ならびに 40 μg の抗原量に対して

それぞれ 14.4, 19.9 ならびに 27.4% の反応が認められた (Fig. 17, Fig. 18)。

## 2. 抗 AMV-RNA 血清の産生

AMV-RNA (HN-6 系統) とメチル化牛血清アルブミンの complex をウサギに注射して AMV-RNA と反応する補体結合抗体を得た。Table 25 は各抗原 (10 μg) に対する抗血清の力価を判定 I に基づいて調べた結果である。Rabbit-2 から得られた抗血清は AMV-RNA に対して 32 倍まで反応が認められた。しかし、精製 AMV-RNA に対しても 128 倍まで反応が認められた。したがって AMV-RNA から取り除くことができなかったウイルス

Table 25. Titer of anti-AMV-RNA serum in C'-fixation test.

| Antiserum                        | Antigen<br>(10 µg) | Dilution of Antiserum |      |      |       |       |       |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------|------|------|-------|-------|-------|
|                                  |                    | 1/16                  | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 |
| Anti-AMV-RNA serum<br>(Rabbit-2) | *AMV-RNA           | ⊘                     | +    | -    | -     | -     | -     |
|                                  | AMV                | ⊘                     | ⊘    | ⊘    | +     | -     | -     |
|                                  | Yeast sRNA         | ⊘                     | ⊘    | ⊘    | -     | -     | -     |
|                                  | Yeast rRNA         | ⊘                     | +    | -    | -     | -     | -     |
|                                  | Rat liver RNA      | ⊘                     | -    | -    | -     | -     | -     |
|                                  | Control            | +                     | -    | -    | -     | -     | -     |
| Anti-AMV-RNA serum<br>(Rabbit-4) | AMV-RNA            | ⊘                     | ⊘    | ⊘    | -     | -     | -     |
|                                  | AMV                | ⊘                     | ⊘    | ⊘    | +     | -     | -     |
|                                  | Yeast sRNA         | ⊘                     | ⊘    | +    | -     | -     | -     |
|                                  | Yeast rRNA         | ⊘                     | ⊘    | -    | -     | -     | -     |
|                                  | Rat liver RNA      | ⊘                     | +    | -    | -     | -     | -     |
|                                  | Control            | +                     | -    | -    | -     | -     | -     |

\* AMV: Alfalfa Mosaic Virus (HN-6 strain)

蛋白質が存在し、抗ウイルス蛋白質抗体も同時に産生されたように思われる。また yeast sRNA に対しては 64 倍まで、yeast rRNA に対しては 32 倍まで反応が認められ、AMV-RNA に対してよりも抗体価が高かった。rat liver RNA に対してもわずかに反応が認められた。一方、Rabbit-4 から得られた抗血清は AMV-RNA に対しては 64 倍まで反応し、精製 AMV に対しては 128 倍まで反応が認められた。yeast sRNA に対しては 64 倍

まで反応が認められたが、AMV-RNA に対する反応に比較して、わずかに弱かった。また yeast rRNA ならびに rat liver RNA に対しても弱い反応が認められた。

つぎに一定希釈濃度 (1:50) の抗 AMV-RNA 血清 (Rabbit-4) に AMV-RNA (1~10 µg) を反応させた。反応の結果は判定法 II に基づいて示した。Fig. 19 に示したごとく 5 µg の AMV-RNA に対して 16.1%、10 µg に対しては 83.1% の補体結合反応が認められた。

### 3. モノリボヌクレオチドによる阻害試験

抗 yeast sRNA 血清 (1:50) に対する yeast sRNA (10 µg) ならびに抗 yeast rRNA 血清 (1:50) に対する yeast rRNA (10 µg) の補体結合反応におけるモノヌクレオチドの阻害効果を調べた。供試したモノヌクレオチド (興国人絹パルプ株式会社) は 5'-GMP-Na<sub>2</sub>、5'-CMP-Na<sub>2</sub>、5'-UMP-Na<sub>2</sub> ならびに 5'-AMP-Na<sub>2</sub> の 4 種である。阻害試験の方法は抗血清にモノヌクレオチド (10, 30, 50 µg) を混ぜ 4°C で 24 時間放置後、抗原、補体ならびに溶血系を加える順序で行なった。しかしながら 4 種のモノヌクレオチド (10, 30, 50 µg) はいずれも補体結合反応を阻害しなかった。

### 4. 考 察

本報告で明らかのように抗 yeast sRNA 血清、抗 yeast rRNA 血清ならびに抗 AMV-RNA 血清が得られた。抗 yeast sRNA 血清に対する yeast sRNA との補体結合反応は 0.5 µg の抗原量に対して 66.5%、1~20

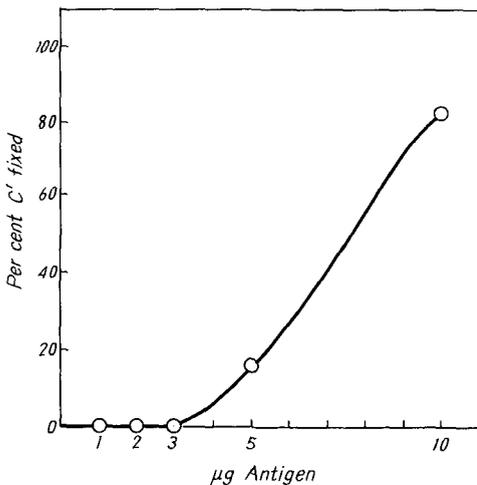


Fig. 19. C'-fixation reactions of anti-AMV-RNA (HN-6 strain) serum with AMV-RNA (HN-6 strain).  
Antiserum dilution = 1:50 (Rabbit-4)

$\mu\text{g}$  の抗原量にに対していずれも 95% 前後の補体結合反応が認められた。これらの結果は PLESCIA ら (1965) の報告と類似している。一方、抗 yeast rRNA 血清に対する yeast rRNA は 5 ならびに 10  $\mu\text{g}$  の抗原量に対してそれぞれ 83.1% ならびに 82.5% の反応が認められた。しかし 20  $\mu\text{g}$  では 30.7% となり、反応が弱くなった。これまでに報告された DNA 抗体、RNA 抗体ならびに合成 polyribonucleotide 抗体の反応の多くは反応が最大に達してからさらに過剰の抗原量を加えると反応が弱くなるようである (SEAMAN ら, 1965; LEVINE ら, 1960)。しかしながら抗 sRNA 抗体のように過剰の抗原を加えても反応が低下しなかったという報告もある (PLESCIA ら, 1964)。これらの差異は抗原として用いた核酸の種類によっても認められるようであるがウサギの個体差によることもあった (奥原ら, 1969)。また yeast sRNA は対応するアミノ酸数と同じ数の混合抗原であるために sRNA に対して産生された抗体は rRNA よりも不均一であることも考えられる。

抗 RNA 血清は PLESCIA ら (1964) の方法にしたがって RNA とメチル化牛血清アルブミン (MBSA) の complex をウサギに注射して得られたので RNA-MBSA complex に対する反応も調べた。しかし抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清に対する RNA-MBSA complex の反応は核酸のみとの反応とほぼ同様の傾向が認められた。しかし PLESCIA ら (1964) ならびに奥原ら (1969) の報告によると抗 calf thymus DNA 血清ならびに抗サケ精子 DNA 血清に対する DNA-MBSA complex の反応は DNA のみを反応させたよりも強かった。また STOLLAR (1967) は DNA との反応が知られている systemic lupus erythematosus (SLE) 患者血清を calf thymus DNA, calf thymus nucleoprotein ならびに種々の比率の histone-DNA complex に対して反応させ、この血清は少なくとも 2 種類の抗原と反応すると報告した。さらに阻害試験ならびに吸収試験の結果から native DNA は抗原決定群の主な部分であったと報じている。したがって本報告においても同様に complex に対して特異的に反応する抗体が産生されているか否かは今後明らかにする必要がある。

抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清に対して MBSA を反応させた結果、0.2  $\mu\text{g}$  の抗原量で反応が最大に達し、1~5  $\mu\text{g}$  の抗原量ではほとんど反応が認められなかった。この結果から担体蛋白質に対して反応する抗体も同時に産生されていることが認められ

た。これは PLESCIA ら (1964) ならびに奥原ら (1969) の報告と一致した。

抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清の反応における特異性を調べるために異なる RNA との交叉反応を補体結合反応を用いて実験した。抗 yeast sRNA 血清に対しては yeast rRNA がわずかに反応したが AMV-RNA ならびに rat liver RNA との反応はほとんど認められなかった。抗 yeast rRNA 血清に対しては yeast sRNA, AMV-RNA ならびに rat liver RNA がいずれもわずかに反応した。したがってこれらの抗血清は異なる RNA とも反応するが反応の強さにおいて同じ RNA と比較して明確な差異が認められた。さらに熱変性させた一本鎖サケ精子 DNA に対しても反応が認められ、PLESCIA ら (1965) によって報告された抗 yeast sRNA 血清における反応性と似ていた。核酸抗体の特異性についてはこれまでに多くの報告があるが抗 RNA 血清、抗 DNA 血清ならびに抗合成ポリヌクレオチド血清のいずれにおいても同じ核酸と異なる核酸に対する反応性に差異が認められている。また、抗原決定群に関する研究も活発に行なわれ TANENBAUM ら (1963), SELA ら (1964), SEAMAN ら (1965), BUTLER ら (1965), PLESCIA ら (1965), ならびに奥原ら (1969) はおもに核酸構成成分の塩基が抗原決定群に関与していると報告している。しかしながら本報告における抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清は 4 種のモノヌクレオチドによって反応が阻害されなかった。この結果は PLESCIA ら (1965) の報じた抗 yeast sRNA 血清と異なっている。SLE 患者血清に対する B. natto DNA の反応 (STOLLAR ら, 1962) ならびに抗サケ精子 DNA 血清に対するサケ精子 DNA の反応 (奥原ら, 1969) におけるピリミチンオリゴヌクレオチド (反応に用いた DNA を酸水解し、DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーによってオリゴヌクレオチドの chain の長さにしたがって分画したもの) の阻害試験の結果、モノヌクレオチドによって阻害効果はほとんど認められなかったがオリゴヌクレオチドの chain の長さの増加にともなって阻害効果が増大する傾向を示したと報告している。本報告の抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清においてもさらにオリゴヌクレオチドの阻害試験を行なう必要がある。一方、BARBU ら (1960), PANIJEL (1963 a) ならびに PANIJEL (1963 b) は *E. coli* ならびに *Proteus vulgaris* のリボソームを馬に注射して得られた抗血清を用いて実験を行ない、核酸の抗原決定群が主に塩基であるとする説に対して polyribose-

phosphate backbone に局在し、核酸の高次構造が関与しているのではないかと報じた。したがって核酸抗体の特異性をきめる抗原決定群に関してはまだ一致した結論が得られていないが本研究においても今後さらに追求されなければならない点である。

抗 AMV-RNA 血清に対する各種 RNA ならびに精製 AMV との補体結合反応によって明らかにされたごとく、AMV-RNA との反応は弱いものであった。また yeast sRNA, yeast rRNA ならびに rat liver RNA とも反応し、各 RNA との反応の強さに顕著な差異が認められず、きわめて特異性のないことがわかった。さらに精製 AMV とも反応することから AMV-RNA 中に定量分析によって検出できなかった微量のウイルス蛋白質が混在し、ウイルスに対して反応する抗体も同時に産生されたものと考えられる。しかしながら抗 AMV-RNA 血清 (希釈: 50 倍) に対する AMV-RNA (10  $\mu$ g) の反応を混入 AMV 蛋白質 (0.5% 以下) との反応とみなすには供試した AMV-RNA 中の蛋白質が微量 (0.05  $\mu$ g 以下) であることから否定される。一方、抗体価の高い抗 AMV 血清は供試した AMV-RNA が反応しないことからかかる疑問は否定されるものと考えられる。抗 AMV-RNA 血清の特異性がきわめて低いことは AMV-RNA の抗原決定群が他の RNA と類似していることも考えられる。HERNANDEZ ら (1968) は担体蛋白質を用いず yeast sRNA をそのままウサギに注射して得た抗血清は yeast sRNA に対して反応しなかったが pancreas ribonuclease によって分解したオリゴヌクレオチドと反応した。さらに yeast sRNA とメチル化牛血清アルブミンの complex に対する pancreas ribonuclease の影響を *in vitro* において調べた結果 yeast sRNA の 44% が分解されたと報告した。AMV-RNA も分子中に存在する水素結合によって複雑な高次構造を形成している可能性もあり、HERNANDEZ ら (1968) の結果から AMV-RNA もメチル化牛血清アルブミンとの結合が不完全であるためにウサギ体内の ribonuclease によって分解されやすく、AMV-RNA のほかに AMV-RNA の分解産物に対する多数の抗体も同時に産生されたために特異性が低かったとも推察できる。したがって特異性の高い植物ウイルス RNA 抗体を産生するためには特異性の高い抗原決定群だけを分離し、適当な担体と結合させて抗体を作ることであり、また RNA をどのように完全に保護した状態で抗体産生細胞に認識させるかであろう。

## 摘 要

1) 北海道のアルファルファ、レッドクローバー、ラジノクローバーから単一局部病斑の接種を数回繰返す方法によってアルファルファモザイクウイルス (AMV) と思われる 6 分離株を得た。これらの 6 分離株は HN-1, HN-2, HN-3, HN-4, HN-5, HN-6 と命名した。

2) これらの分離株ならびに分譲をうけた ATCC-106, タバコ B 系, AA-1, AL-9 の各分離株を 9 科 18 種の植物を用いて寄主範囲ならびに病徴を比較した。

3) 各分離株の粗汁液中における物理的性質を調べた。希釈限界は HN-1, HN-2 および HN-4 が  $1:10^5$  に希釈した時活性を消失し、HN-3, HN-5 ならびに HN-6 は  $1:10^{5.5}$  に希釈した時活性を消失した。ATCC-106 とタバコ B 系は  $1:10^4$  希釈以上における実験を行っていないが、希釈限界は  $1:10^{4.5} \sim 1:10^{5.5}$  にあるものと推定される。耐熱性は HN-2, HN-3 ならびに HN-4 が  $60^\circ\text{C}$  で完全に活性を消失したが HN-1, HN-5, HN-6, ATCC-106, タバコ B 系はわずかに活性を保持していた。しかし  $65^\circ\text{C}$  ではすべての分離株は活性を失った。保存限界は  $22^\circ\text{C}$  で HN-1 は 7 日目、HN-3 および HN-6 は 6 日目に活性を消失した。

4) *Physalis floridana* ならびにタバコ (KY-57) を用いて分離株間における干渉効果を調べた結果、ほぼ完全な干渉効果が認められた。

5) 抗 AMV (AA-1 系統) 血清に対して供試した 10 分離株の血清反応を重層法ならびに寒天ゲル中拡散法を用いて実験した。10 分離株は血清学的にも AMV と同定された。

6) ダイズ (白鶴の子), タバコ (KY-57), *Physalis floridana*, キウリ (刈羽節成胡瓜), センニチソウにおける病徴に基づいて 10 分離株を 4 群に分けた。I 群に HN-2, AA-1, II 群に HN-1, HN-3, HN-5, HN-6, タバコ B 系, AL-9, III 群に HN-4, IV 群に ATCC-106 の各分離株が含まれた。したがって北海道においても AMV によるマメ科牧草の病害が確認され、病徴による群別によって供試した AMV の分離株をいくつかの系統に分けることができた。

7) Chloroform-n-butanol 法と分画遠心法の併用によって AMV の精製を行なった。植物成分は 2 回の超遠心操作を繰返すことにより除かれ、きわめて純度の高い精製ウイルスを得ることができた。

8) 精製 AMV (HN-6, ATCC-106, HN-4) の紫外線吸収を測定したが、いずれの系統も同様な紫外線吸収

曲線を示した。これらの系統の紫外外部吸収の結果から既報の AMV の核酸含量と一致した。また 2 回の蔗糖濃度勾配遠心によって分画した top と bottom fraction はほぼ同じ紫外外部吸収曲線を示した。

9) AMV 各成分相互の量比が系統、異なる寄主植物 (タバコおよびエンドウ) ならびにウイルス感染合によって異なるか否かを調べた。各系統間の比較では HN-4 ならびに PC-Y (キャリコ系統) が HN-6 ならびに ATCC-106 よりも top 成分の多い系統であった。しかし、HN-6 をタバコならびにエンドウで増殖させて成分相互の量比を比較したがほとんど差異は認められなかった。一方、middle 成分の量比はウイルス感染合にともなわずかに増大した。

10) セルロースアセテート膜 (セパラックス) による電気泳動によって HN-6、ATCC-106 ならびに PC-Y の各系統を比較した。3 系統は原点から陽極側に泳動し、とくに原点から 0.5~0.6 cm の位置に濃いバンドがみられた。しかし各系統の泳動図における明らかな差異は認められなかった。

11) HN-6、ATCC-106 ならびに PC-Y の系統に対する抗 AMV 血清を得て、系統間の抗原性の差異を重層法による沈降反応、補体結合反応ならびに寒天ゲル中拡散法を用いて調べた。しかし、いずれの方法においても各系統の抗原性に明らかな差異を認めることができなかった。

12) 精製 AMV (HN-6、ATCC-106、PC-Y) の免疫電気泳動を行なった結果、いずれの系統も陽極側に 4 本の沈降線が現われ、各沈降線の易動度はほぼ同じであった。したがって免疫電気泳動法による 3 系統の精製ウイルスの比較でも明らかな差異は認められなかった。つぎに抗 AMV (HN-6) 血清を免疫電気泳動した結果、陰極側に精製 AMV と反応する 2 本の沈降線が生じ、これらの沈降線は易動度から IgG の沈降線の位置と一致した。

13) 蔗糖濃度勾配遠心を 2 回繰返して得た top と bottom fraction の感染性について 3 系統を供試し、3 種の検定植物を用いて実験した。top fraction はいずれの系統も感染性を示さず、bottom fraction にのみ感染性が認められた。

14) 1 回の蔗糖濃度勾配遠心によって分けた top fraction と bottom fraction を混ぜてインゲンに接種すると bottom fraction の感染力が約 2 倍に増大した。しかし top fraction のかわりに紫外線照射した top fraction や TMV を混ぜても bottom fraction の感

染性は増加しなかった。

15) 4 回の蔗糖濃度勾配遠心によって得られた bottom fraction は 1 回のものに比べて約 1/7~1/10 の感染力に低下したが top fraction を混ぜて接種するとその感染力に回復した。したがって AMV の bottom fraction も単独では感染性を有しない不完全ウイルス粒子と推察された。

16) 異なる 5 系統の top fraction と bottom fraction の組合せで混ぜて接種しても感染性の増加が認められた。

17) 他の系統に比較して小さな局部病斑を形成する ATCC-106 系統と HN-4、HN-6、PC-Y 系統との組合せにおいては bottom fraction として用いた系統の病斑が増加した。しかし ATCC-106 系統と HN-2 系統の組合せにおいてはいずれの系統にも属さない中間型の病斑を多数認めた。

18) top または bottom のどちらかの fraction を先に接種して感染性の増加の有無を調べたが、接種時間が 30 分間経過すると相互作用は認められなかった。

19) *in vitro* における bottom fraction に特異的なウイルス活性は 30°C、3 日間でそのほとんどを消失したが、top fraction は 30°C で 3 日間を経過しても約 60% のウイルス活性を保持していた。*in vivo* においても top fraction のウイルス活性の耐性は bottom fraction に比較してきわめて強かった。したがって *in vivo* において感染後、時間の経過とともに感染性が低下するのは主として bottom fraction に特異的なウイルス活性の消失に起因することがわかった。

20) RNA とメチル化牛血清アルブミンの complex をウサギに注射して抗 yeast sRNA 血清、抗 yeast rRNA 血清ならびに抗 AMV-RNA (HN-6 系統) 血清を得た。

21) 抗 yeast sRNA 血清に対する yeast sRNA との反応は 0.5  $\mu$ g の抗原量に対して 66.5%、1~20  $\mu$ g の抗原量に対して、いずれも 95% 前後の補体結合反応が認められた。異なる RNA との交叉反応では yeast rRNA がわずかに反応したが AMV-RNA ならびに rat liver RNA との反応はほとんど認められなかった。熱変性させた一本鎖サケ精子 DNA に対しては反応が認められた。

22) 抗 yeast rRNA 血清に対する yeast rRNA は 5 ならびに 10  $\mu$ g の抗原量に対して、それぞれ 83.1% ならびに 82.5% の反応が認められた。しかし、20  $\mu$ g では 30.7% となり反応が弱くなった。異なる RNA との交

又反応では yeast sRNA, AMV-RNA ならびに rat liver RNA がいずれもわずかに反応した。熱変性させたサケ精子 DNA に対しても弱い反応が認められた。したがって抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清は異なる RNA とも反応するが、反応の強さにおいて同じ RNA と比較して明確な差異が認められた。

23) 抗 AMV-RNA 血清に対する AMV-RNA の反応は弱いものであった。さらに yeast sRNA, yeast rRNA ならびに rat liver RNA とも反応した。また、各 RNA との反応の強さに顕著な差異が認められず、きわめて特異性のないものであった。

24) 抗 yeast sRNA 血清ならびに抗 yeast rRNA 血清に対する yeast sRNA ならびに yeast rRNA との補体結合反応は4種のモノリボヌクレオチドによって阻害されなかった。

#### 引用文献

- 1) 明日山秀文・小室康雄・正田宏二 (1955). Alfalfa mosaic virus に関する研究. 栃内, 福士還暦記念論文集, 101-107.
- 2) BANCROFT, J. B. (1961). Association of infectivity with alfalfa mosaic virus bottom component only. *Virology* **14**, 296-297.
- 3) BANCROFT, J. B. (1964). The base ratio of alfalfa mosaic virus nucleic acid. *Virology* **22**, 641-643.
- 4) BANCROFT, J. B. and KAESBERG, P. (1958). Size and shape of alfalfa mosaic virus. *Nature* **181**, 720-721.
- 5) BANCROFT, J. B. and KAESBERG, P. (1960). Macromolecular particles associated with alfalfa mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta.* **39**, 519-528.
- 6) BANCROFT, J. B., MOORHEAD, E. L., TUIITE, J. and H. P. Liu. (1960, b). The antigenic characteristics and the relationship among strains of alfalfa mosaic virus. *Phytopath.* **50**, 34-39.
- 7) BARBU, E. and PANIJEL, J. (1960). Presence of antibodies to ribonucleic acid in anti-ribosome immune serum. *Compt. Rend.* **250**, 1382-1384.
- 8) BERKELEY, G. H. (1947). A strain of the alfalfa mosaic virus on pepper in Ontario. *Phytopath.* **37**, 781-789.
- 9) BLACK, L. M. and PRICE, W. C. (1940). The relationship between viruses of potato calico and alfalfa mosaic. *Phytopath.* **30**, 444-447.
- 10) BOL, J. F. and VELDSTRA, H. (1969). Degradation of alfalfa mosaic virus by pancreatic ribonuclease. *Virology* **37**, 74-85.
- 11) BRAKKE, M. K. (1953). Zonal separations by density-gradient centrifugation. *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 275-290.
- 12) BRUENING, G. (1969). The inheritance of top component formation in cowpea mosaic virus. *Virology* **37**, 577-584.
- 13) BUTLER, V. P., Jr., TANENBAUM, S. W. and BEISER, S. M. (1965). A study of the cross-reactivity of antipurin-6-oyl serum with deoxyribonucleic acid (DNA). *J. Exp. Med.* **121**, 19-38.
- 14) COLTER, J. S. and ELLEM, K. A. O. (1961). Antigenicity of deoxyribonucleic acids from mouse liver and from the Ehrlich ascites tumour. *Nature* **190**, 550-551.
- 15) DEICHER, H. R. G., HOLMAN, H. R., KUNKEL, H. G. and OVARY, Z. (1960). Passive cutaneous anaphylaxis reactions with a systemic lupus erythematosus serum factor and isolated DNA. *J. Immunol.* **84**, 106-111.
- 16) 船津軍喜 (1968). タバコモザイクウイルスの人工変異株と遺伝情報. *生物と化学* **4**, 114-121.
- 17) FRISCH-NIGGEMEYER, W. and STEERE, R. L. (1961). Chemical composition of partially purified alfalfa mosaic virus. *Virology* **14**, 83-87.
- 18) FROST, R. R., HARRISON, B. D. and WOODS, R. D. (1967). Apparent symbiotic interaction between particles of tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.* **1**, 57-70.
- 19) FRY, P. R. (1952). Occurrence of lucerne-mosaic virus in New Zealand. *N. Z. J. Sci. Tech., A.* **34**, 320-326.
- 20) GIBBS, A. J., NIXON, H. L. and WOODS, R. D. (1963). Properties of purified preparations lucerne mosaic virus. *Virology* **19**, 441-449.
- 21) GIBBS, A. J. and TINSLEY, T. W. (1961). Lucerne mosaic virus in Great Britain. *Plant Pathol.* **10**, 61-62.
- 22) GILLASPIE, A. G. and BANCROFT, J. B. (1965). Properties of ribonucleic acid from alfalfa mosaic virus and related components. *Virology* **27**, 391-397.
- 23) HAGEDORN, D. J. and HANSON, E. W. (1963). A strain of alfalfa mosaic virus severe on *Trifolium pratense* and *Melilotus alba*. *Phytopath.* **53**, 188-192.
- 24) HAŠKOWÁ, V., HILGERT, I., HRUBEŠOVÁ, M.

- and POKORNÁ, Z. (1969). Antigenic properties of tissue deoxyribonucleic acid. *Folia Biol. (Prague)* **5**, 304-311.
- 25) HERNANDEZ, R., BÜRGIN-WOLFF, A. and JUST, M. (1968). Antibodies to enzymatic breakdown products of yeast tRNA. *European J. Biochem.* **6**, 23-28.
- 26) 比留木忠治 (1961). アルファルファモザイクウイルスによるタバコの新ウイルス病“タバコ/アルファルファモザイク病”. *日植病報* **26**, 215.
- 27) 比留木忠治 (1962). アルファルファモザイクウイルスの精製とその病原性の持続. *日植病報* **27**, 76.
- 28) HOUSTON, B. R. and OSWALD, J. W. (1951). Mosaic disease of Ladino clover in California. *Phytopath.* **41**, 940.
- 29) HOUSTON, B. R. and OSWALD, J. W. (1953). The mosaic virus disease complex of Ladino clover. *Phytopath.* **43**, 271-276.
- 30) HULL, R., HILLS, G. J. and MARKHAM, R. (1969, b). Studies on alfalfa mosaic virus. II. The structure of the virus components. *Virology* **37**, 416-428.
- 31) HULL, R. and JOHNSON, M. W. (1968). The precipitation of alfalfa mosaic virus by magnesium. *Virology* **34**, 388-390.
- 32) HULL, R., REES, M. W. and SHORT, M. N. (1969, a). Studies on alfalfa mosaic virus. I. The protein and nucleic acid. *Virology* **37**, 404-415.
- 33) 飯塚典男・飯田 格 (1961). Ladino clover から分離した alfalfa mosaic virus について. *日植病報* **26**, 69.
- 34) 飯塚典男・飯田 格 (1965). アルファルファモザイクウイルスの系統について. *日植病報* **30**, 89.
- 35) 飯塚典男・飯田 格 (1965). 牧草病害に関する研究. III. アルファルファモザイクウイルスによるラジノクローバのモザイク病. *東北農業試験場報告* **37**, 43-122.
- 36) JASPARS, E. M. J., and MOED, J. R. (1966). The complexity of alfalfa mosaic virus. In “Viruses of Plants” (A. B. R. BEEMSTER and J. DIJKSTRA., eds.), pp. 188-195. North-Holland Publ., Amsterdam.
- 37) JONES, F. R. and SMITH, O. F. (1953). Sources of healthier alfalfa. U. S. Dept. Agr. Yearbook pp. 228-237.
- 38) KASSANIS, B. (1966). Properties and behaviour of satellite virus. In “Viruses of Plants” (Beemster, A. B. R. and Dijkstra, J. eds.), pp. 177-187.
- 39) KELLEY, T. S. and KAESBERG, P. (1962, a). Preparation of protein subunits from alfalfa mosaic virus under mild conditions. *Biochim. Biophys. Acta.* **55**, 236-237.
- 40) KELLY, J. J. and KAESBERG, P. (1962, b). Biophysical and biochemical properties of top component a and bottom component of alfalfa mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 865-871.
- 41) KIRBY, K. S. (1956). A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* **64**, 405-408.
- 42) 児玉忠士 (1968). ダイコンひだ葉モザイクウイルスの3成分の純化と諸性質. *日植病報* **34**, 207.
- 43) 児玉忠士・森 武・草柳達夫・村山大記 (1964). アルファルファモザイクウイルス一系統の諸性質について. *日植病報* **29**, 281.
- 44) KÖHLER, E. and KLINKOWSKI, M. (1954). Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Virus Krankheiten. Paul Parey, Berlin.
- 45) 越水幸男・飯塚典男 (1963). 大豆のウイルス病に関する研究. *東北農試研究報告* **27**, 1-103.
- 46) 小室康雄・川田 武・平野弥助・室木真澄 (1963). ジャガイモのキャリコ病 (アルファルファ・モザイクウイルス) の発生. *日植病報* **28**, 86.
- 47) 小室康雄・川田 武・平野弥助・室木真澄 (1964). ジャガイモのキャリコ病の発生. *日植病報* **29**, 199-205.
- 48) KOVACHEUSKI, I. B. (1942). Die Bundblätligkeit der Pakrika Pflanze. *Vorl. Mitt. Z. Pfl. Krank.* **52**, 533-540.
- 49) KREITLOW, K. W. (1955). Virus diseases of grassland crops. *Plant Disease Reprtr.* **39**, 343.
- 50) KREITLOW, K. W. and PRICE, W. C. (1949). A new virus disease of Ladino clover. *Phytopath.* **39**, 517-528.
- 51) KÜHN, C. W. and BANCROFT, J. B. (1961). Concentration and specific infectivity changes of alfalfa mosaic virus during systemic infection. *Virology* **15**, 281-288.
- 52) LAUFFER, M. A. and ROSS, A. F. (1940). Physical properties of alfalfa mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 3296-3300.
- 53) LEVINE, L., BARLOW, J. L. and VAN VUNAKIS, H. (1958). An internal protein in T<sub>2</sub> and T<sub>4</sub> bacteriophages. *Virology* **6**, 702-717.
- 54) LEVINE, L., MURAKAMI, W. T., VAN VUNAKIS, H. and GROSSMAN, L. (1960).

- Specific antibodies to thermally denatured deoxyribonucleic acid of phage T<sub>4</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **46**, 1038-1043.
- 55) LISTER, R. M. (1966). Possible relationships of virus-specific products of tobacco rattle virus infections. Virology **28**, 350-353.
- 56) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- 57) MAJORANA, G. and PAUL, H. L. (1969). The production of new types of symptoms by mixtures of different components of two strains of alfalfa mosaic virus. Virology **38**, 145-151.
- 58) 松本 勤 (1966). アルファルファモザイクウイルスの系統に関する研究. 北海道大学大学院農学研究科修士論文.
- 59) MILBRATH, J. A. (1963). An investigation of thermal inactivation of alfalfa mosaic virus. Phytopath. **53**, 1036-1040.
- 60) MILBRATH, J. A. and MCWHORTER, F. P. (1954). Response of cowpea varieties to strains of alfalfa mosaic virus. Phytopath. **44**, 498.
- 61) MOED, J. R. and VELDSTRA, H. (1968). Alfalfa mosaic virus: Comparative investigation of top component and bottom component by means of fingerprinting and immunological techniques. Virology **36**, 459-466.
- 62) 村山大記・児玉忠士・松本 勤 (1965). アルファルファモザイクウイルスの系統に関する研究. 第1報. 諸系統の病徴ならびに血清学的性質について. 日植病報 **30**, 89.
- 63) 村山大記・松本 勤 (1967). アルファルファモザイクウイルス (AMV) における2つの component の感染性に対する相互作用. 日植病報 **33**, 99.
- 64) 村山大記・松本 勤 (1968). アルファルファモザイクウイルス (AMV) 成分相互の量比について. 日植病報 **34**, 368.
- 65) 奥原英二・松本 勤 (1969). 核酸の免疫化学的研究. 免疫化学シンポジウム **3**, 1-4.
- 66) OSWALD, J. W. (1950). A strain of alfalfa mosaic virus causing vein and tuber necrosis in potato. Phytopath. **40**, 973-991.
- 67) OSWALD, J. W., ROZENDAAL, A. and VAN DER WANT, J. P. H. (1955). The alfalfa mosaic virus in the Netherlands, its effect on potato and a comparison with the potato aucuba mosaic virus. Proc. Second Conf. Potato Virus Disease. Lisse-Wageningen.
- 68) OUCHTERLONY, O. (1948). In vitro method for testing the toxinproducing capacity of diphtheria bacteria. Acta. Path. microbiol. scand. **25**, 186-191.
- 69) PANIJEL, J. (1963, a). Précipitation immunologique des polynucléotides synthétiques et multiplicité des anticorps anti-RNA. Compt. Rend. **256**, 4540-4543.
- 70) PANIJEL, J. (1963, b). Précipitation des ribopolynucléotides homopolymères par les divers anticorps du sérum anti-RNA. Compt. Rend. **257**, 3064-3067.
- 71) PANIJEL, J., SOULEIL, C. and CAYEUX, P. (1966). Immunochemical characterization of polyribonucleotides. Science **152**, 773-775.
- 72) PHILLIPS, J. H., BRAUN, W. and PLESCIA, O. J. (1958). Antigenicity of a bacterial deoxyribonucleic acid. Nature **181**, 573-575.
- 73) PIERCE, W. H. (1934). Viruses of the bean. Phytopath. **24**, 87-115.
- 74) PLESCIA, O. J., BRAUN, W. and PALCZUK, N. C. (1964). Production of antibodies to denatured deoxyribonucleic acid (DNA). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **52**, 279-285.
- 75) PLESCIA, O. J., PALCZUK, N. C., CORA-FIGUEROA, E., MUKHERJEE, A. and BRAUN W. (1965). Production of antibodies to soluble RNA (sRNA). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **54**, 1281-1285.
- 76) PRICE, W. C. (1940). Comparative host ranges of six plant viruses. Amer. J. Bot. **27**, 530-541.
- 77) QUANTZ, L. (1956). Zum Nachweis des Luzernemosaikvirus in Deutschland und Italien. Phytopath. Z. **28**, 83-103.
- 78) ROSS, A. F. (1941). Purification and properties of alfalfa mosaic virus protein. Phytopath. **31**, 394-410.
- 79) ROSS, A. F. (1964). Identification of plant viruses. in "Plant Virology" (CORBETT, M. K. and SISLER, H. D. eds.) pp. 68-92. University of Florida Press, Gainesville, Florida.
- 80) ROSS, A. F. and STANLEY, W. M. (1940). Properties and purification of alfalfa mosaic virus. Phytopath. **30**, 20-21.
- 81) ROUWS, A. G., JASPARS, E. M. J. and VELDSTRA, H. (1964). The base composition of ribonucleic acids from alfalfa mosaic virus components. Virology **23**, 283-286.
- 82) SÄNGER, H. L. (1968). Characteristics of to-

- bacco rattle virus. 1. Evidence that its two particles are functionally defectionally defective and mutually complementing. *Molec. Gen. Genetics* **101**, 346-367.
- 83) SEAMAN, E., VAN VUNAKIS, H. and LEVINE, L. (1965). Antigenicity of polyribonucleotides. *Biochemistry* **4**, 1312-1318.
- 84) SELA, M., UNGAR-WARON, H. and SHECHTER, Y. (1964). Uridine-specific antibodies obtained with synthetic antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **52**, 285-292.
- 85) SELIGMANN, M. (1958). Immunological studies on disseminated lupus erythematosus. *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.* **3**, 558-584.
- 86) SEMANCIK, J. S. and KAJIYAMA, M. R. (1968). Enhancement of tobacco rattle virus stable form infection by heterogenous short particles. *Virology* **34**, 170-172.
- 87) SILBER, G. and HEGGESTAD, H. E. (1965). A strain of alfalfa mosaic virus occurring naturally on field tobacco. *Phytopath.* **55**, 1108-1113.
- 88) STEERE, R. L. (1956). Purification and properties of tobacco ringspot virus. *Phytopath.* **46**, 60-69.
- 89) STOLLAR, B. D. (1967). Studies on nucleoprotein determinants for systemic lupus erythematosus serum. *J. Immunology* **99**, 959-965.
- 90) STOLLAR, D. and LEVINE, L. (1961). Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in a lupus erythematosus serum. *J. Immunology* **87**, 477-484.
- 91) STOLLAR, D., LEVINE, L., LEHRER, H. I. and VAN VUNAKIS, H. (1962). The antigenic determinants of denatured DNA reactive with lupus erythematosus serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 874-880.
- 92) 正田宏二・小室康雄・明日山秀文 (1953). Alfalfa モザイクウイルスに関する研究 I. alfalfa から分離されたウイルスの寄生性と物理的性質. *日植病報* **17**, 90-91.
- 93) TANENBAUM, S. W., and BEISER, S. M. (1963). Pyrimidine-specific antibodies which react with deoxyribonucleic acid (DNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **49**, 662-668.
- 94) THOMAS, H. R. (1951). Yellow dot, a virus disease of bean. *Phytopath.* **41**, 967-974.
- 95) 都丸敬一 (1963). ホホワイトクローバから分離されたアルファルファモザイクウイルス. *日植病報* **28**, 283.
- 96) 都丸敬一・宇田川晃 (1967). タバコから分離されたアルファルファモザイクウイルスの系統. *日植病報* **33**, 99.
- 97) TOMARU, K., VAN SLOGTEREN, D. H. M. and NOORDAM, D. (1968). Serological relationship among isolates of alfalfa mosaic virus isolated in Japan and U. S. A. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **34**, 298-301.
- 98) VAN KAMMEN, A. (1968). Relationship between the components of cowpea mosaic virus. 1. Two ribonucleoprotein particles necessary for the infectivity of CPMV. *Virology* **34**, 312-318.
- 99) VAN RAVENSWAAY CLAASEN, J. C., VAN LEENWEN, A. B. J., DUIJTS, G. A. H. and BOSCH, L. (1967). In vitro translation of alfalfa mosaic virus RNA. *J. Mol. Biol.* **23**, 535-544.
- 100) VAN VLOTEN-DOTING, L., DINGJAN-VERSTEEGH, A. and JASPARS, E. M. J. (1970). Three nucleoprotein components of alfalfa mosaic virus necessary for infectivity. *Virology* **40**, 419-430.
- 101) VAN VLOTEN-DOTING, L. and JASPARS, E. M. J. (1967). Enhancement of infectivity by combination of two ribonucleic acid components from alfalfa mosaic virus. *Virology* **33**, 684-693.
- 102) VAN VLOTEN-DOTING, L., KRUSEMAN, J. and JASPARS, E. M. J. (1968). The biological function and mutual dependence of bottom component and top component of alfalfa mosaic virus. *Virology* **34**, 728-737.
- 103) WEIMER, J. L. (1931). Alfalfa mosaic. *Phytopath.* **21**, 122-123.
- 104) WILSON, R. H., JUREVICS, V. and SCHRAM, A. C. (1965). Antigenicity of calf thymus deoxyribonucleic acid. *Federation Proc.* **24**, 185.
- 105) WOOD, H. A. and BANCROFT, J. B. (1965). Activation of a plant virus by related incomplete nucleoprotein particles. *Virology* **27**, 94-102.
- 106) YACHNIN, S. (1962). Non-antigenicity of synthetic polyribonucleotides and apurinic acid. *Nature* **195**, 1319.
- 107) YARWOOD, C. E. and SYLVESTER, E. S. (1959). The half-life concept of longevity of plant pathogens. *Plant Disease Repr.* **43**, 125-128.

- 108) ZAUMEYER, W. J. (1938). A streak disease of peas and its relation to several strains of alfalfa mosaic virus. *J. Agr. Research* **56**, 747-772.
- 109) ZAUMEYER, W. J. (1952). Another strain of alfalfa mosaic virus systemically infectious on beans. *Phytopath.* **42**, 344.
- 110) ZAUMEYER, W. J. (1963). Two new strains of alfalfa mosaic virus systematically infectious to bean. *Phytopath.* **53**, 444-449.
- 111) ZAUMEYER, W. J. and PATINO, G. (1960). Vein necrosis, another systematically infectious strain of alfalfa mosaic virus in bean. *Phytopath.* **50**, 226-231.

### Summary

1) From the naturally occurring pathogen of alfalfa, red clover and Ladino clover in Hokkaido, six virus isolates were obtained by the serial local lesion transfer technique. These isolates were designated HN-1, HN-2, HN-3, HN-4, HN-5 and HN-6, and were compared with the previously reported AMV isolates (ATCC-106, Tobacco B, AA-1 and AL-9).

2) Comparative host range and symptom expression of these isolates were examined on 18 species (9 families) of test plants.

3) Properties *in vitro* of these isolates were examined. The isolates HN-1, HN-2 and HN-4 lost the infectivity at a dilution of  $1:10^5$ , whereas HN-3, HN-5 and HN-6 lost at a dilution of  $1:10^{5.5}$ . The dilution experiment with ATCC-106 and Tobacco B also suggests that their dilution end points may be within a range between  $1:10^{4.5}$  and  $1:10^{5.5}$ . The thermal inactivation points of HN-2, HN-3 and HN-4 were at  $60^\circ\text{C}$ , whereas HN-1, HN-5, HN-6, ATCC-106 and Tobacco B were at  $65^\circ\text{C}$ . The aging *in vitro* of HN-1, HN-3 and HN-6 were tested at  $22^\circ\text{C}$ . HN-1 and other two isolates (HN-3 and HN-6) were noninfectious in the crude extracts after 7 and 6 days storage, respectively.

4) Using *Physalis floridana* and tobacco plants (KY-57), the cross protection tests among these isolates were performed, and showed almost complete interference.

5) Ten isolates used reacted with anti-AMV (AA-1 isolate) serum in the ring-interface precipitin test and double diffusion test. Consequently, all

the isolates were identified as AMV from the results of the serological tests and the other experiments described above.

6) On the basis of symptom expression on 5 different plants (soybean, tobacco, *Physalis floridana*, cucumber and *Gomphrena globosa*), the AMV isolates studied in this work were classified into 4 subgroups. The subgroup I includes HN-2 and AA-1, the subgroup II, HN-1, HN-3, HN-5, HN-6, Tobacco B and AL-9, the subgroup III, HN-4, and the subgroup IV, ATCC-106, respectively. The isolates classified each subgroup may be looked on as different AMV strain.

7) The purification of the virus was made with the treatment of chloroform-n-butanol (1:1, v/v) and 2 cycles of differential centrifugation (10,000 rpm for 15 minutes and 30,000 rpm for 90 minutes). The purified AMV obtained by the procedure contained negligible quantity of the residue of tobacco plant.

8) Ultraviolet absorption spectra of the purified AMV strains (HN-6, ATCC-106 and HN-4) were very similar to those of the AMV strains reported upto the present. The results suggest that the contents of nucleic acid of these AMV strains are within those of known AMV strains. The ultraviolet absorption spectra of top and bottom fractions of the AMV strains used were much the same, too.

9) It was studied whether the relative amount of ribonucleoprotein components of AMV varied according to the virus strains, the host plants and the age of plants after inoculation or not.

In comparison with different virus strains multiplied in tobacco plant, HN-4 and PC-Y (potato calico strain) contained much more top component than HN-6 and ATCC-106. However, HN-6 strain grown in both tobacco and pea plants showed the similar ratio of the components. The ratio of the middle component increased according to the age of tobacco plants after inoculation.

10) The purified viruses of HN-6, ATCC-106 and PC-Y strain were compared by the cellulose acetate electrophoresis. Each strain migrated toward an anode, and formed the single deep band at the position of 0.5 to 0.6 cm from the origin. However, the distinctive differences of electrophoretic mobilities among three AMV strains could not be found.

11) Using the anti-AMV serum to each of HN-6, ATCC-106 and PC-Y strain, comparative tests among reactions with these strains described above were performed by the serological techniques of the ring-interface precipitin tests, the complement fixation reactions and the double diffusion tests. Significant differences of the antigenicities of these strains could not be found.

12) The purified viruses of HN-6, ATCC-106 and PC-Y strain were compared by the immunoelectrophoresis. All the strains produced four precipitin lines against anti-AMV serum on the agar plate of the anodable side. These precipitin lines were almost the same on the electrophoretic mobilities. Therefore, there were no distinctive differences among the three AMV strains from the results of the immunoelectrophoresis.

The anti-AMV (HN-6 strain) serum also was examined by immunoelectrophoresis. Two precipitin lines formed by reaction with the purified AMV (HN-6 strain) were in the cathodable side. On the basis of the electrophoretic mobility, these lines correspond to the precipitin line to IgG.

13) The infectivity of top-and bottom fraction separated by twotimes density gradient centrifugation was tested by using three kinds of AMV strains and test plants. From these results, it was observed that bottom fraction was infectious, but not top fraction.

14) When the mixtures of top and bottom fractions separated by one-time density gradient centrifugation were inoculated on leaves of beans, the infectivity of the bottom fraction increased doubly. Whereas, the mixing with UV-irradiated top fraction or tobacco mosaic virus instead of the top fraction were unable to give the enhancement of the infectivity of the bottom fraction.

15) The infectivity of bottom fraction separated by four-times density gradient centrifugation, which decreased up to about one-seventh to one-tenth of the infectivity of bottom fraction separated by one-time density gradient centrifugation, recovered the original infectivity by the addition of the top fraction. This result suggests that the bottom fraction alone is noninfectious.

16) When the mixtures of top and bottom fractions prepared from the different strains were inoculated, the infectivity of the bottom fraction increased.

17) Using ATCC-106 strain which produced smaller local lesions on beans than the other strains used, the mixtures of top or bottom fraction from ATCC-106, and those from each of HN-4, HN-6 and PC-Y were inoculated. The increased local lesions were similar to these of the strain used as bottom fraction.

However, in the case of the combination between ATCC-106 and HN-2, the local lesions which would not characterize the used strains increased.

18) Either top or bottom fraction was inoculated of bottom or top fraction. No interaction of top and bottom fraction inoculated at different time was found.

at half-one hour and ten hours prior to inoculation

19) When the bottom fraction (HN-6 strain) prepared by one-time density gradient centrifugation was kept at 30°C for 3 days in the incubator, the specific activity of the bottom fraction was almost lost. Whereas, the top fraction kept under the same condition retained about sixty percent of the specific activity. The top fraction-specific activity *in vivo* also was stable than that of the bottom fraction, as the results of *in vitro* inactivation of the top and bottom fraction. These results indicated that *in vivo* inactivation of AMV principally depended on the inactivation of bottom fraction.

20) Anti-yeast sRNA serum, anti-yeast rRNA serum and anti-AMV-RNA (HN-6 strain) serum were obtained by the immunization of rabbits with complexes of these RNAs and methylated bovine serum albumin.

21) In complement fixation reaction of anti-yeast sRNA serum diluted at 1:50 with yeast sRNA varying 0.1 to 20  $\mu$ g, 66.5 and about 95 per cent complement fixation were given at the antigen of 0.5 and 1 to 20  $\mu$ g, respectively.

The anti-yeast sRNA serum slightly reacted with yeast rRNA and heat-denatured salmon sperm DNA, but not AMV-RNA and rat liver RNA.

22) In complement fixation reaction of anti-yeast rRNA serum diluted at 1:100 with yeast rRNA varying 0.5 to 20  $\mu$ g, 83.1, 82.5 and 30.7 per cent complement fixation were given at the antigen of 5, 10 and 20  $\mu$ g, respectively. The amount of the antigen required for maximum complement fixation was 5  $\mu$ g. The anti-yeast rRNA serum weakly reacted with yeast sRNA, AMV-RNA, rat

liver RNA and heat-denatured salmon sperm DNA, too. However, the clear difference was found in the reactions with the homologous antigen and the heterologous antigens.

23) Anti-AMV-RNA serum reacted with not only AMV-RNA but also yeast sRNA, yeast rRNA and rat liver RNA in complement fixation reaction, and the titer of this antiserum was lower than those of anti-yeast sRNA serum and anti-yeast rRNA serum.

Moreover, there were no distinct differences among the titers of the anti-AMV-RNA serum reacted with AMV-RNA and the other RNAs stated above. From the results, the anti-AMV-RNA serum was not specific for AMV-RNA.

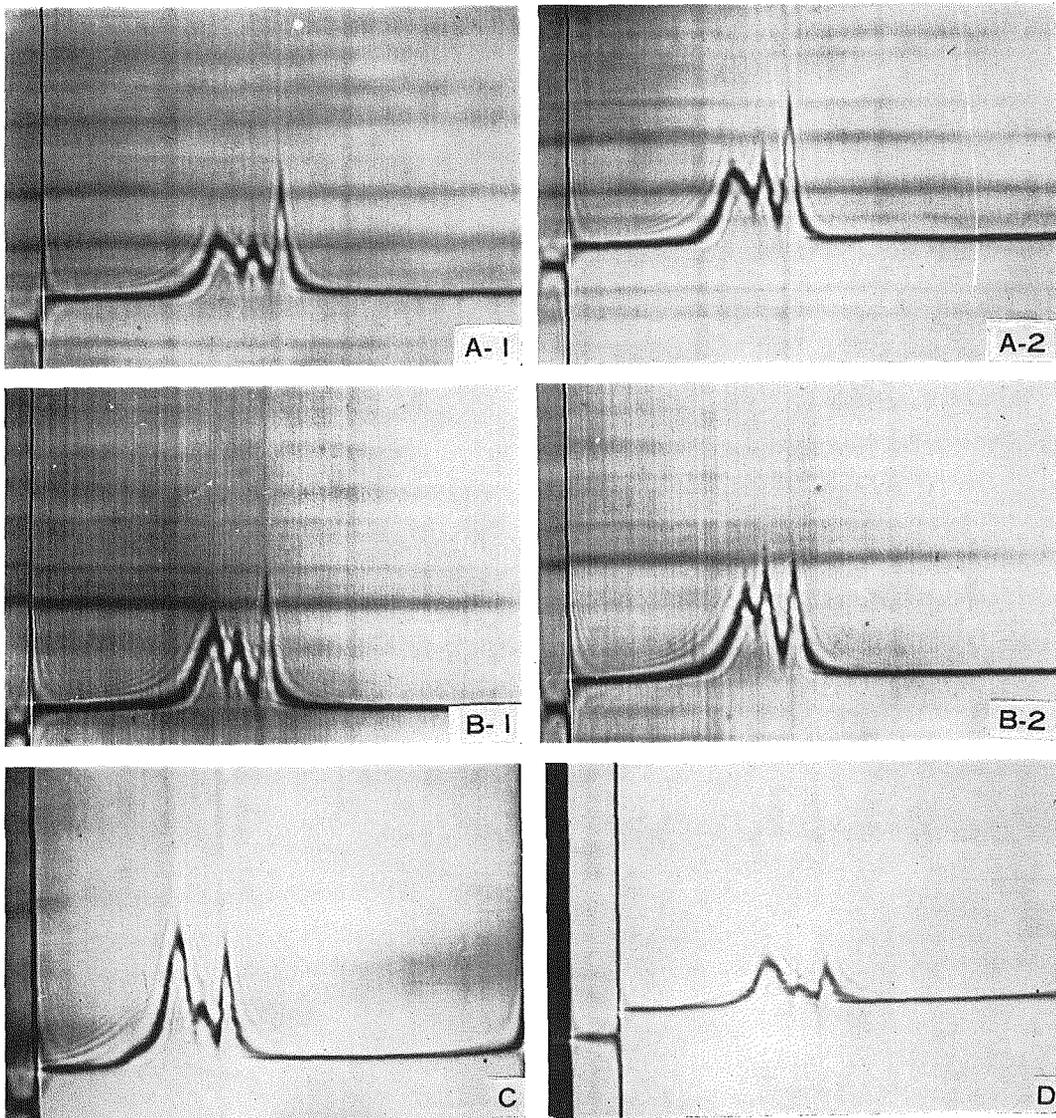
24) The complement fixation reactions of anti-yeast sRNA serum and anti-yeast rRNA serum with yeast sRNA and yeast rRNA were not inhibited by the addition of four kinds of mononucleotides.

## Explanation of plates

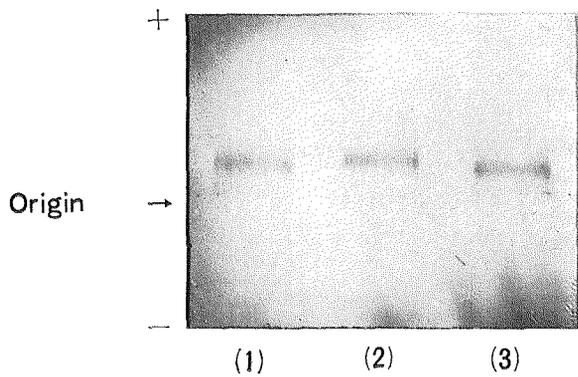
### Plate I

1. Photographs were taken 10 minutes after centrifugation (35,000 rpm); sedimentation was shown from left to right. The components from right to left are bottom, middle and top component. The sedimentation diagrams of HN-6 strain prepared from systemically infected tobacco leaves 6 and 10 days after inoculation were shown in A-1 and A-2, respectively. The sedimentation diagrams of ATCC-106 strain prepared from inoculated tobacco leaves 4 and 10 days after inoculation were shown in B-1 and B-2. The sedimentation diagrams of PC-Y strain prepared from systemically infected tobacco leaves 6 days after inoculation and HN-4 prepared from inoculated tobacco leaves 5 days after inoculation were shown in C and D, respectively.
2. Cellulose acetate electrophoresis of strains of alfalfa mosaic virus  
(1): HN-6 (2): ATCC-106 (3): PC-Y

1



2



**Plate II**

1. Double diffusion test of anti-AMV (HN-6 strain) serum with: (1), HN-6; (2), ATCC-106; (3), PC-Y.  
As=antiserum
2. Double diffusion test of anti-AMV (ATCC-106 strain) serum with: (1), ATCC-106; (2), HN-6; (3), PC-Y.  
As=antiserum
3. Double diffusion test of anti-AMV (PC-Y strain) serum with: (1), PC-Y; (2), HN-6; (3), ATCC-106.  
As=antiserum
4. Immunelectrophoretic pattern of AMV (HN-6 strain)  
Upper trough: anti-AMV (HN-6 strain) serum  
Lower trough: anti-AMV (ATCC-106 strain) serum
5. Immunelectrophoretic pattern of AMV (ATCC-106 strain).  
Upper trough: anti-AMV (ATCC-106 strain) serum  
Lower trough: anti-AMV (HN-6 strain) serum
6. Immunelectrophoretic pattern of AMV (PC-Y strain).  
Upper trough: anti-AMV (PC-Y strain) serum  
Lower trough: anti-AMV (HN-6 strain) serum
7. Immunelectrophoretic pattern of rabbit anti-AMV (HN-6 strain) serum (1)  
a: AMV (HN-6 strain)  
b: Rat anti-whole rabbit serum  
1,2: Precipitin lines against AMV (HN-6 strain)  
3: Precipitin lines against rat anti-whole rabbit serum
8. Immunelectrophoretic pattern of rabbit anti-AMV (HN-6 strain) serum (2)  
a: AMV (HN-6 strain)  
b: Horse anti-IgG rabbit serum  
1,2: Precipitin lines against AMV (HN-6 strain)  
3: Precipitin line against horse anti-IgG rabbit serum

