

蛍光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究 (2)

キュウリモザイクウイルスの接種葉における増殖・分布

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	細川,大二郎 森,寛一
発行元	日本植物病理學會
巻/号	48巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 444-451
発行年月	1982年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



螢光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究 II キュウリモザイクウイルスの接種葉における増殖・分布

細川大二郎*・森 寛一**

Daijiro HOSOKAWA* and Kanichi MORI**: Studies on Multiplication
and Distribution of Viruses in Plants by Use of Fluorescent
Antibody Technique II. Multiplication and Distribution of
the Virus in Tobacco Leaves Inoculated with
Cucumber Mosaic Virus

Abstract

Multiplication and distribution of the virus in tobacco leaves mechanically inoculated with cucumber mosaic virus were examined by the fluorescent antibody technique. The epidermis which had been peeled off from the inoculated leaves was fixed and the inner side cell wall of epidermis was partially digested by cell wall degrading enzymes. The epidermis was then stained with a fluorescent antibody. Primarily infected cells were observed in the epidermis 9 to 10 hr after inoculation at 25°C; the majority of the primarily infected cells were ordinary epidermal cells but some were subsidiary cells of stomatal guard cells. The virus antigen gradually spread concentrically from the primarily infected cells to surrounding cells. The rate of spreading of the antigen was 8.4 μm , 20.3 μm and 26.3 μm per hour at 20°C, 25°C and 30°C, respectively. In epidermal cells the antigen was first detected in the nucleolus-like bodies and thereafter it became distributed in cytoplasm and increased in its intensity of fluorescence. The virus appeared to move from an infected cell to an adjacent cell was observed to occur after a considerable amount of virus antigen had accumulated in the cytoplasm of the infected one. On the bases of the observation of leaf sections it is assumed that the virus first spread from the primarily infected site to both horizontal and vertical directions simultaneously, passing from cell to cell. After the virus reached the lower epidermis, it spread mainly in the horizontal direction.

(Received December 9, 1981)

Key Words: fluorescent antibody technique, CMV, distribution.

緒 言

摩擦接種法によりウイルスを接種するとウイルスは接種の際に植物体の表面に生じた微細な傷から細胞内に侵入すると考えられている。宿主細胞内に侵入したウイルスは、細胞内で増殖するとともに細胞間を移行することにより、組織内へ広く分布する。この組織内

におけるウイルスの増殖・分布の経過については多くの研究があるが¹³⁾、組織・細胞学的な面からの研究は比較的少なく不明の点も多い。本実験においてはキュウリモザイクウイルスの接種葉における増殖・分布を螢光抗体法を用いて組織・細胞学的な面から検討した。

本報告をとりまとめるにあたり、東京大学農学部教

* 東京農工大学農学部 Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan

** 現在：日本きのこ研究所 Present address: Mushroom Research Institute of Japan, Kiryu, Gunma 376, Japan

授與良清博士(現玉川大学農学部教授), 当研究室教授高坂渾爾博士(現在植物防疫協会), 同助教授渡辺実博士(現教授)には種々御指導を賜わった。また実験を行うに当り, 草野友延氏(現在 Tufts University)には種々御協力いただいた。ここに衷心より感謝の意を表する。

材料および方法

供試ウイルスにはキュウリモザイクウイルス黄斑系(CMV-Y)を用いた。

供試葉には8~10葉期のタバコ(品種: Xanthi)の中位葉を用いた。ウイルスの接種は, CMV を接種したタバコの5~10日後に展開した発病葉を1/15 M りん酸緩衝液(0.02 M Diethyldithiocarbamate [DIECA] 添加, pH 7.0) で磨砕し, その搾汁液を接種源として, 切りとったタバコ葉の表面あるいは裏面からカーボランダムを用いて摩擦接種法により行った。接種葉はシャーレ内のぬれた紙上におき, 陽光定温器内(蛍光灯連続照明, 約 3,000 Lux) で, 20, 25 および 30°C の温度に保った。

蛍光抗体の調製は前報¹¹⁾と同様にして行った。

表皮細胞の蛍光抗体による染色はつぎのようにして行った。接種葉からウイルス接種面の表皮を剝離し, 冷アセトンまたは冷アルコールで30~60分間固定し, りん酸緩衝液(pH 7.0) で充分に洗浄したのち, スライドガラス上に剝離面を下にしてのせ, スライドガラスとの間に細胞壁分解酵素液を流しこんで酵素処理を行った。同酵素処理は, まず0.5%マセロチム液(マセロチム R-10, 近畿ヤクルト製造KK, pH 5.2) で28°C, 10分間行い, 蒸留水で洗ったのち, さらに2%セルラーゼ液(セルラーゼ・オノヅカ R-10, 近畿ヤクルト製造 KK, pH 5.4) で32°C, 30~40分間行った。酵素処理した表皮は, スライドガラス上にのせたままPBS (0.01M りん酸緩衝生理食塩水, pH 7.2) で数回洗浄したのちスライドガラス面から蛍光抗体を流しこみ, 室温または35°C で2時間染色し, PBS で洗浄したのち緩衝グリセリン液〔グリセリン9: 炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.1) 1〕で封入した。

葉肉組織におけるウイルス抗原の追跡には, 接種葉から, 1×1cm の大きさの葉片を切り取り, 前報の方法¹¹⁾によって凍結切片にしたのち, 蛍光抗体で染色した。

結 果

1. 表皮組織におけるウイルスの増殖・分布

1) 第1次感染細胞

表皮細胞に最初に特異蛍光が認められたのは接種9~10時間後であった。この時期には特異蛍光陽性細胞が2~数個ずつかたまて表皮の各所に点在して認められた(Plate I-1, 2)。この特異蛍光陽性部位には, 常に他の細胞より特異蛍光が強い細胞が1個存在し, そこから周囲の細胞にウイルス抗原が拡がりつつあるように観察された。この特異蛍光の最も強い細胞が第1次感染細胞であり, 接種されたウイルスが最初にこの細胞に侵入し増殖したのち, 隣接細胞へ順次移行し, そこで増殖したものである。

表皮には, 普通の表皮細胞, 気孔孔辺細胞とその副細胞, 毛茸などの細胞が存在する。第1次感染細胞と思われる細胞はほとんどの場合, 普通の表皮細胞であったが(Plate I-1, 2), まれに気孔孔辺細胞の副細胞の場合も認められた。また, 表皮には接種の際の摩擦により破壊された毛茸基部細胞が多数観察されたが, この基部細胞が第1次感染細胞となった例は認められなかった。

第1次感染細胞と思われる細胞の表面には, 蛍光顕微鏡および光学顕微鏡により検出できるほどの負傷部はなく, また, 隣接細胞にも著しく大きな負傷部は認められなかった。

2) 表皮組織におけるウイルスの増殖・分布

接種葉から経時的に表皮を剝離して観察し, 特異蛍光が第1次感染細胞から周囲の細胞へ拡がる状態を観察した。最初特異蛍光は第1次感染細胞から周囲の6~7個の隣接細胞へ拡がるが, この場合特異蛍光の拡がり始める時期は細胞により遅速があった(Plate I-2)。このためしばらくの間は特異蛍光は周囲の細胞へ不規則な状態で拡がった(Plate I-3)。これは表皮の細胞の側壁が波状に屈曲しており, 隣接細胞との縫合部の広さや状態が細胞により異なるためと考えられた。しかし, 特異蛍光がある程度の範囲に拡がってしまうと, 特異蛍光はほぼ同心円状の拡がりを示した(Plate I-4)。これは表皮の個々の細胞の間ではその縫合部の広さや状態などが異なっているが, 広い範囲をみれば, その拡がり方はほぼ均一になるためと思われる。

表皮で特異蛍光が拡がりつつある部位の近くでは, 周縁部から内部へむかって種々の感染段階の細胞が連続して存在し, それらの細胞の観察によりウイルスの細胞内増殖と細胞間移行の経過を知ることができた。細胞がウイルスに感染すると, 特異蛍光はまず最初に核内の核小体と思われる部位に認められた(Plate I-

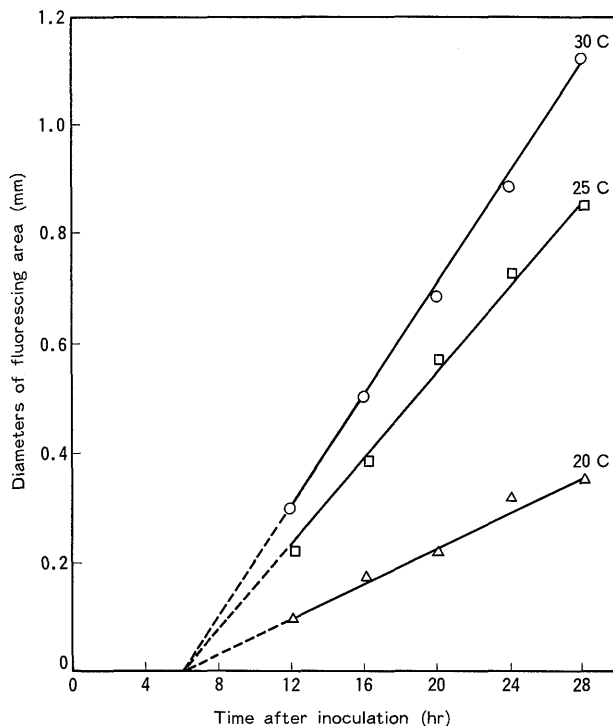


Fig. 1. Rate of spreading of virus antigen in lower epidermis of tobacco leaves inoculated with cucumber mosaic virus determined by fluorescent antibody staining.

5, 6, 7)。その後、この部位での輝度が高まり、ウイルス抗原が多量に集積することが示唆された。さらに感染が進むと、特異蛍光は細胞質内にも認められるようになった。特異蛍光は最初は細胞質の一部に認められ(Plate I-6)、やがて全体に拡がり、その輝度が増加した(Plate I-5, 6, 7)。この頃になると隣接細胞でも、前記の核小体と思われる部位に特異蛍光が認められるようになり、次いで前記と同様の経過で特異蛍光が細胞内に広く拡がり、その輝度を増した。このような過程が繰り返されて、ウイルス抗原が細胞から細胞へと拡がった。

感染が進んだ細胞では、核と細胞質に特異蛍光が認められたが、核での特異蛍光の輝度は核小体と思われる部位で高く、核質内では低かった。またこれらの細胞の核では核小体と思われる部位が2～3個に増加していることが多く、ウイルス感染の影響と推察された(Plate I-8)。細胞質では特異蛍光は全体に様に分布するが、プラスチド内には認められなかった。

3) ウイルスの細胞間の移行速度

経時的に剝離した表皮の観察によると、ウイルス抗

原が第1次感染細胞を中心にして、ほぼ同心円状に周囲の細胞に拡がる状態が観察されたので、このウイルス抗原の拡がりから、ウイルスの細胞間の移行速度を測定した。測定は20, 25および30°Cで行った。その結果を Fig. 1 に示す。ウイルスは測定した時間内ではいずれも等速度で移行し、その速度は20°Cで8.4 μm /時間、25°Cで20.3 μm /時間、30°Cで26.3 μm /時間であった。

また、この場合、各温度の直線を左側に外挿するといずれの直線も横軸と約6時間のところで交わり、その点で収束した。

2. 葉肉組織におけるウイルスの増殖・分布

1) ウイルスの感染性の増加とウイルス抗原検出との関係

接種葉から経時的に葉片を切りとり、一部の葉片はりん酸緩衝液(0.02M DIECA 添加, pH 7.0)を加えて磨砕し、その搾汁液をササゲに接種し、ウイルスの感染性を調べ、他の葉片については蛍光抗体法によりウイルス抗原を検出した。

Table 1 に示すようにウイルスの感染性は接種8時

Table 1. Infectivity assay and examination by fluorescent antibody staining of tobacco leaves inoculated with cucumber mosaic virus

Sample (hours after inoculation)	Virus infectivity ^{a)}	Specific fluorescence ^{b)}
0	1.1	—
4	0.4	—
8	2.2	—
12	48.7	+
16	71.3	+
20	171.1	+
24	184.0	+
28	243.3	+
32	245.1	+
36	>300.0	+

a) Inoculated tobacco leaves were homogenized in 1/15M phosphate buffer, pH7.0 (1:10w/v) and infectivity of the extract was assayed on primary cowpea leaves. Infectivities were expressed as mean local lesion number per leaf.

b) —: negative, +: positive

間後から高くなり始めたが、蛍光抗体法によっても接種12時間後から特異蛍光を示す細胞が組織内に観察され始めた。その後、ウイルスの感染性は急速に高まり、それとともに葉内に特異蛍光を示す細胞が多数観察され、ウイルスの増殖にともなってウイルス抗原の集積がおこっていることを示していた。

2) 葉肉組織内におけるウイルス抗原の分布経過

葉の横断切片の観察から得られた葉肉組織内におけるウイルス抗原の分布経過を Fig. 2 に示した。葉肉組織内では接種12時間後に特異蛍光が認められるようになったが、この時期には、特異蛍光は葉の垂直方向では表皮から柵状細胞、ときには、これに隣接する海綿状細胞において観察され、葉の水平方向でも約10細胞位の幅に広がって認められた。接種16時間後には、ウイルス抗原は葉の垂直方向へは表側表皮→柵状組織→海綿状組織→裏側表皮へと順次広がって観察され、また同時に葉の水平方向へもさらに広く分布して認められた。この場合、特異蛍光の水平方向への拡がりの幅はウイルスの侵入が早い組織ほど広がっており、葉の横断切片では特異蛍光を示す細胞がV字型に

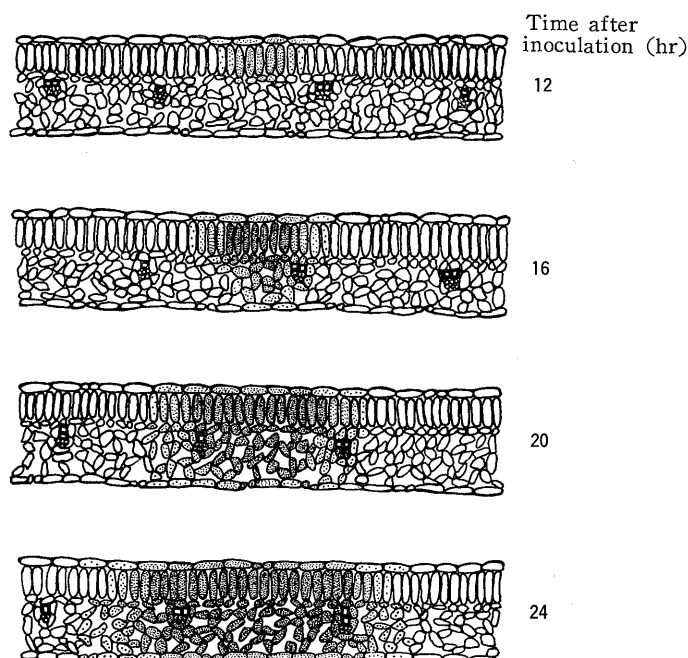


Fig. 2. Diagrammatic expression of progressive distribution of virus antigen in tobacco leaves inoculated with cucumber mosaic virus (at 25°C), examined by the fluorescent antibody staining (transverse section). The cells containing specific fluorescence is stippled. The intensity of the specific fluorescence are expressed by the density of stippling. The smaller vascular bundles were often observed in the sections and these xylem elements are indicated in thick solid-black lines.

分布して認められた。また特異蛍光の輝度も感染の早い中心部の細胞ほど強かった。この時期にはウイルス抗原が葉内の維管束部に達しているのがしばしば観察された。しかし、横断切片の観察からはウイルスの節部移行については明らかに出来なかった。接種20時間後には水平方向の特異蛍光の分布幅はいずれの組織でもほぼ等しくなった。この時期以後、ウイルス抗原の葉の水平方向へ拡がる速度は、表側表皮、柵状組織、海綿状組織、裏側表皮でほぼ同じであったが、柵状組織ではこの拡がり方が2,3細胞遅れている場合がしばしば認められた。

ウイルスの細胞内での増殖と細胞間の移行経過は、表皮細胞の場合ほど明瞭には観察できなかったが、表皮とはほぼ同様の経過をとるようであった。感染の進んだ細胞では、特異蛍光が細胞内全体に認められたが、葉緑体には認められなかった。このため葉緑体の多い柵状組織および海綿状組織の細胞では特異蛍光が細胞質内で蜂巣状に分布して観察された。

考 察

摩擦接種法の場合、ウイルスは摩擦により植物体の表面に生じた微細な傷から細胞内に侵入し、感染がおこると考えられている。この場合、ウイルスが侵入し最初に増殖した細胞が第1次感染細胞であり、これは表皮の細胞であるとされている¹³⁾。しかし、これまでこの第1次感染細胞が具体的に表皮のどの細胞であるかは明確でなかった。本実験では、接種葉の表皮を剝離しその剝離面の細胞壁を細胞壁分解酵素で部分的に消化したのち、蛍光抗体で染色することによって感染初期に第1次感染細胞を検出することができた。第1次感染細胞はまれに気孔孔辺細胞の副細胞のことがあったが、ほとんどが普通の表皮細胞であった。Kontaxis・Schlegel¹⁹⁾、Herridge・Schlegel¹⁹⁾は¹⁴C標識タバコモザイクウイルス(TMV)のラジオ・オートグラフィーの結果から毛茸基部細胞がウイルスの感染部位であると考えた。本実験では接種葉の表面に接種の際に破壊された毛茸基部細胞が多数認められたが、ここが第1次感染細胞となる例は認められなかった。したがって、毛茸基部細胞に集積した¹⁴C-TMVが実際に感染に関与していたかどうかは疑問である。

感染細胞ではウイルス抗原が最初に核小体と思われる部位に認められた。この部位のウイルス抗原はその集積状態から推してその場で合成されたもののようと思われるが、明白な証拠はない。またこの部位は蛍光顕微鏡による観察では核小体と思われたが、核小体で

あるかどうかについては他の観察法によっても検討する必要がある。電子顕微鏡観察によれば、CMV粒子がプロトプラストでは核と核小体に認められている⁷⁾が、感染葉では核に観察され、核小体では確認されていない^{4,8,14)}。核小体はリボソームRNAの合成部位であるので、ウイルス抗原あるいはウイルス粒子の核小体への集積は細胞機能への影響が大きいと考えられる。核小体と思われる部位に続いて細胞質にもウイルス抗原が認められた。しかし、これが核小体と思われる部位で合成され移行したものか、あるいは細胞質内で別個に合成されたものかは明らかでなかった。

ウイルス抗原が隣接細胞へ移行する場合には、核小体と思われる部位につづいて細胞質にも特異蛍光が認められ、その輝度が増加し始めた頃になって初めて、これに隣接する細胞の核小体と思われる部位に特異蛍光が認められるようになった。次いでこの細胞でも特異蛍光が細胞質に現れ、その輝度が増加する。この過程が繰り返されて、ウイルス抗原が細胞から細胞へと拡がった。このようにウイルスが隣接細胞に移行する場合にはウイルスの移行方向に、核小体と思われる部位にのみ特異蛍光が認められるような感染初期の細胞が連続して分布することはなく、ウイルスは細胞内である程度増殖したのちに隣接細胞へ移行するようであり、ウイルスの細胞間の移行は細胞内での増殖と密接に関連して進行しているものと考えられる。

ウイルスの細胞間の移行速度は、すでに種々の方法で測定されているが、ウイルスの種類や系統間あるいは温度条件により異なるようである。Rappaport・Wildman¹²⁾はTMV-Nicotiana glutinosaの組合わせで局部病斑の拡大速度から移行速度を求め、ウイルスの系統の違いにより6~13 μ m/時間の範囲でその速度が異なることを報告している。Uppal¹⁵⁾はTMV-タバコの組合わせについて、葉の表側表皮にウイルスを接種し、裏側表皮にウイルスが検出されるまでの時間から8 μ m/時間の値を得ている。Harrison・Jones⁵⁾はpotato mop-top virus-タバコの組合わせで、局部病斑の拡がりから移行速度を求め、14Cで16 μ m/時間、22Cで38 μ m/時間であったと報告している。Welkie・Pound¹⁶⁾および江原・三沢²⁾はCMV-ササゲで、Harrison⁴⁾はタバコネクロシスウイルス-インゲンで、Misawa・Fukuda¹⁰⁾はアルファルファモザイクウイルス-タバコのそれぞれの組合わせで、表皮から葉肉組織へのウイルスの移行が温度により影響されることを報告している。本実験においては、表皮におけるウイルス抗原の拡がりからウイルスの細胞間移

行速度を測定した結果、20℃で8.4 μm /時間、25℃で20.3 μm /時間、30℃で26.3 μm /時間であり、温度により移行速度が異なった。

前述のように本実験の結果では、ウイルスの細胞間の移行がウイルスの細胞内での増殖と密接に関連しているように思われた。しかし、potato mop-top virus-タバコの組合わせでは14℃より22℃で細胞間の移行は速かったが、ウイルスの増殖量は14℃で高くなっている⁹⁾。ウイルスは、細胞内あるいは細胞間を自から能動的に移行することではなく原形質流動などにより運ばれて移行すると考えられる。したがって、ウイルスの細胞間の移行速度が温度により異なるのは、ウイルスの細胞内での増殖とともに細胞内あるいは細胞間の物質の移動を支配している細胞の機能にも温度が影響を及ぼすためと推測される。

葉肉組織ではウイルス抗原が初めウイルスの侵入部位から葉の水平方向と垂直方向に同時に拡がり、裏面表皮に達したのちは主として水平方向の細胞間に拡がった。水平方向へはウイルス抗原が葉内のいずれの組織でもほぼ同様の速度で拡がったが、柵状組織では、2、3細胞遅れている場合が多かった。これについては、(1)柵状組織の細胞が幅の狭い円柱状なので、ウイルスが水平方向に移行するのに他の組織より多くの細胞を通る、あるいは、(2)細胞の水平方向における接触が不良で⁹⁾ この方向へのウイルスの移行が困難であり、ウイルスはまず表皮あるいは海綿状組織の細胞を経由して柵状組織の細胞に移行するなどの理由が考えられるがいずれかは明らかでない。

摘 要

キュウリモザイクウイルスとタバコの組合わせで、接種葉におけるウイルスの増殖・分布を蛍光抗体法を

用いて検討した。

ウイルスを接種した面の表皮を剝離し、剝離面の細胞壁を細胞壁分解酵素（ペクチナーゼおよびセルラーゼ）で部分的に分解したのち、蛍光抗体で染色すると、表皮細胞内のウイルス抗原を検出することができた。

表皮には25℃において接種9～10時間後に特異蛍光が観察され、この特異蛍光陽性部にその輝度の強さから第1次感染細胞と推定される細胞を認めた。第1次感染細胞はまれに気孔孔辺細胞の副細胞のこともあったが、ほとんどが普通の表皮細胞であった。ウイルスは第1次感染細胞から時間の経過とともに周囲の表皮細胞へほぼ同心円状に拡がった。この場合のウイルスの移行速度は20℃で8.4 μm /時間、25℃で20.3 μm /時間、30℃で26.3 μm /時間であった。ウイルスに感染した細胞では、ウイルス抗原が最初に核小体と思われる部位に認められるが、のち細胞質に現われ全体的に分布し、その量が増加した。細胞質にウイルス抗原が現われ、その量が増加し始めた時期になると、この細胞に隣接した細胞の核小体と思われる部位にもウイルス抗原が認められるようになった。その後、この細胞でも前記の経過でウイルスが増殖し、この過程がくりかえされてウイルスが細胞から細胞へ移行し、増殖した。感染の進んだ細胞ではウイルス抗原が核、核小体と思われる部位、細胞質内に観察されたが、プラスチド内には認められなかった。感染細胞では核小体と思われる部位が2、3個に増加している場合が多く、ウイルス感染の影響が推察された。

葉肉組織では、ウイルス抗原が最初ウイルスの侵入部位から葉の水平方向および垂直方向に同時に細胞から細胞へと拡がり、裏面表皮に達したのちは、葉の水平方向の細胞間に主として拡がるようであった。

引 用 文 献

1. 江原淑夫・三沢正生 (1973). 植物病害研究 8: 245-260.
2. 江原淑夫・三沢正生 (1975). 日植病報 41: 15-23.
3. 原 襄 (1972). 植物の形態. 裳華房, 東京. pp. 211.
4. Harrison, B. D. (1956). Ann. appl. Biol. 44: 215-226.
5. Harrison, B. D. and Jones, R. A. C. (1971). Ibid. 67: 377-387.
6. Herridge, E. A. and Schlegel, D. E. (1962). Virology 18: 517-523.
7. Honda, Y., Matsui, C., Otsuki, Y. and Takebe, I. (1974). Phytopathology 64: 30-34.
8. Honda, Y. and Matsui, C. (1974). Ibid. 64: 534-539.
9. Kontaxis, D. G. and Schlegel, D. E. (1962). Virology 16: 244-247.
10. Misawa, T. and Fukuda, T. (1971). Tohoku J. Agr. Res. 22: 147-155.
11. 森 寛一・細川大二郎・渡辺 実 (1982). 日植病報 48: 433-443.
12. Rappaport, I. and Wildman, S. G. (1957). Virology 4: 265-274.

13. Schneider, I. R. (1965). *Adv. Virus Res.* 11: 163-221.
14. 土居養二・與良 清 (1972). *日植病報* 38: 216.
15. Uppal, B. N. (1934). *Indian J. Agr. Sci.* 4: 865-873.
16. Welkie, G. W. and Pound, G. S. (1958). *Virology* 5: 362-370.

Explanation of Plate

Plate I.

Progressive distribution of the virus antigen in the epidermis of tobacco leaves inoculated with cucumber mosaic virus at 25C. Areas containing virus antigen show yellow-green fluorescence.

1. Epidermis at 10 hr after inoculation. The primarily infected cell possesses the brightest fluorescence. ($\times 690$).
2. Epidermis at 10 hr after inoculation. The virus antigen is spreading from the primarily infected cell to adjacent cells. ($\times 410$).
3. Epidermis at 12 hr after inoculation. ($\times 300$).
4. Epidermis at 24 hr after inoculation. ($\times 210$).
- 5-7. Distribution of virus antigen in the regions where infection is progressing. In the infected cells, virus antigen appeared first in the nucleolus-like bodies (arrows) and then accumulated in the cytoplasm. (5: $\times 720$, 6: $\times 1,400$, 7: $\times 1,400$).
8. Epidermis at 28 hr after inoculation. The nuclei that contain 2-3 nucleolus-like bodies (arrows) were observed. ($\times 820$).

Plate I

