

オギで見出された双球状ウイルス

オギ条斑ウイルス(miscanthus streak virus, MiSV)について

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	山下,修一 野仲,信行 難波,成任 土居,養二 與良,清
発行元	日本植物病理學會
巻/号	51巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 582-590
発行年月	1985年12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



オギで見出された双球状ウイルス; オギ条斑ウイルス (miscanthus streak virus, MiSV) について*

山下修一**・野仲信行**・難波成任**・土居養二**・與良 清***

Shuichi YAMASHITA, Nobuyuki NONAKA**, Shigetou NAMBA**, Yoji DOI**
and Kiyoshi YORA***: Miscanthus Streak Virus, a Geminivirus
in *Miscanthus sacchariflorus* Benth. et Hook*

Abstract

A previously undescribed geminivirus, miscanthus streak virus (MiSV), was found in dip preparations from *Miscanthus sacchariflorus* Benth. et Hook. showing leaf streak and stunting, collected at Matsudo of Chiba prefecture in 1978. The virus was purified by homogenization using 0.1 M phosphate buffer (pH 5.6) containing 0.1% thioglycolic acid and 1% triton X-100, followed by chloroform clarification (20%), and then three cycles of differential centrifugations. The virus was purified as a well-defined band by sucrose density gradient centrifugation. The purified preparations showed an UV absorption spectrum characteristic of a nucleoprotein. The sedimentation coefficient of the virus determined by analytical centrifugation was about 75 S. The virus particles were about 18×30 nm in size and contained DNA suggested by diphenyl amine test. The DNA was suggested to be single-strand. In agar gel diffusion test, the antiserum (titer 128) of the virus formed a single band against the homologous antigen. The virus was serologically unrelated to maize streak virus and chloris striate mosaic virus of leafhopper-borne geminiviruses, and to cassava latent virus and tobacco leaf curl virus of whitefly-borne geminiviruses. The virus particles were observed as singles or aggregates in the nucleus, cytoplasm and vacuole of various cells. Obvious paired particles were often found in the nucleus and cytoplasm. In the vacuole, geometrical crystalline arrays formed from paired particles were also observed. So, the paired particles were considered to be natural nature of the virus. The virus was not transmitted by sap inoculation, and its vector was not known so far.

(Received August 20, 1985)

Key Words: miscanthus streak virus, graminious geminivirus, *Miscanthus sacchariflorus*.

緒 言

1978年夏、千葉県松戸市矢切で葉に白色条斑を示すオギ (*Miscanthus sacchariflorus* Benth. et Hook.) が見出され、その病株から電顕で小球形粒子が対になった双球状 (ダイマー) のウイルスが検出された。本

ウイルスは粒子形状から、アフリカ各地やインドでトウモロコシなどのイネ科植物に広く発生する maize streak virus (MSV)^{1,18)} に近縁のウイルスと想定され、先に報告²⁴⁾ した。

MSV は Storey¹⁹⁾ によって1925年に見出され、ヨコバイ (*Cicadulina* 属) で永続伝搬される。ウイルス粒子は永年不明であったが、Bock ら²⁾ は数種の MSV

* 本研究の一部は文部省科学研究費 (奨励研究 A: 376025) によった。

** 東京大学農学部 Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

*** 現在: 玉川大学農学部 Present address: Faculty of Agriculture, University of Tamagawa, Machida, Tokyo 194, Japan

感染植物から小球形粒子が対をなした双球状ウイルスを最初に報告した。

その後、同様な粒子形態と性状を有するウイルスはヨコバイ および コナジラミ 伝搬のウイルスでも知られ、それらの多くは単鎖の環状 DNA を含むことが明らかにされ、これらは今日 geminiviruses として分類され、MSV はそのタイプウイルスになっている^{10,13)}。

著者らはオギで見出された双球状ウイルスについてさらに血清学的性質を MSV およびその後報告された chloris striate mosaic virus (CSMV)⁹⁾ などの既知の geminiviruses との間で調べたところ、いずれのウイルスとも血清学的関係は認められず、新たにオギ条斑ウイルス (miscanthus streak virus, MiSV) とするのが妥当と思われた。よって、その性状と細胞内所在をここに報告する。本研究を行うに当たり、抗血清を分譲していただいた Dr. K. R. Bock (Kenya agriculture research institute) ならびに Dr. R. I. B. Francki (University of Adelaide) に厚く御礼申し上げます。

材料および方法

ウイルス感染オギは千葉県松戸市矢切の江戸川東部で野生していたもので、病株を温室に保存あるいは適時現地で採集して本研究に供試した。健全オギは東京都板橋区で採集した。ウイルスの探索は 2% PTA 溶液 (pH 6.0) による DN 法で行った。

ウイルスの純化は -80°C に凍結したオギ病葉を 0.1% チオグリコール酸、1% トリトン X-100 を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 5.6) で磨砕抽出後、ガーゼでろ過し、クロロホルム (20%) による清澄化を行った。さらに、分画遠心 (8,000 rpm, 10分/40,000 rpm, 90分) を 3 回反覆し、得られた部分純化試料を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、同緩衝液で調製した 10—40% ショ糖液で密度勾配遠心 (RPS-25, 24,000 rpm, 90分) を行った。純化ウイルスについては紫外線吸収 (日立 124)、シュリーレン法による沈降係数 (日立 282) を調べた。ウイルス粒子は等量の 2% PTA 溶液 (pH 6.0) でネガティブ染色して、電顕 (日立 HU-12) を観察した。核酸の定性試験は純化ウイルスを用い、ジフェニールアミン反応を Burton 法、オルシノール反応を Meibbaum 法⁹⁾ で行った。

抗血清は ショ糖密度勾配遠心で得た純化ウイルスをウサギに筋肉注射 1 回 (アジュバント使用)、静脈注射 4 回をそれぞれ 1 週間ごとに、最後の静脈注射

後 10 日目に全採血し、常法により抗血清を作製した。力価および血清試験は 0.85% NaCl, 0.01% sodium azide を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で調製した 1% 寒天による寒天ゲル拡散法で行った。

超薄切片の作製は病葉から切り出した小片を 4% グルタルアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.0) で 5 時間前固定後、1% オスミック酸で 4 時間後固定し、アルコールシリーズで脱水し、常法によりエポキシ樹脂に包埋した。ガラスナイフで作製した超薄切片は酢酸ウランで 30 分間、クエン酸鉛で 5 分間電子染色して、電顕観察した。

結 果

病徴と発生

病株では葉身やときに葉鞘に微細な白色斑点が脈に沿って生じた。葉身では症状が進むと斑点が融合し、明瞭な白色条斑となり、激しい場合はストリークを生じた。これらの病徴は新葉で顕著であった。病株は萎縮するが、叢生などの異状分けつはとくにみられなかった (Plate I-1a, b, c)。本病は現地では 1978—1984 年の 6 カ年とも同様な発生状況を示し、これはオギが宿根性のためと思われた。本病の発生地域でトウモロコシや他のイネ科植物について調査したが、類似病徴の植物は認められなかった。

ウイルスの接種試験

オギ病葉から 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で調製した粗汁液および純化ウイルスを用いてカーボランダムによる機械的接種をオギ、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、オオムギ、イネ、ブロムグラス、タバコ、*Nicotiana glutinosa*、ペチュニア、トマト、キュウリ、インゲンマメ、ダイズ、ササゲ、ツルナ、ダイコン、センニチコウに試みたが、いずれにも感染は認められなかった。

ウイルスの純化と性状

オギ病葉を DN 法で観察したところ、小球形粒子が 2 個会合した双球状ウイルスが見出された。本ウイルスは ショ糖密度勾配遠心で単一のパンドを形成し (Fig. 1)、シュリーレン法による分析遠心でも単一のピークを示し (Fig. 2)、その沈降係数 ($S_{20,w}$) は約 75 S であった。純化ウイルスはウイルス特有の核蛋白の紫外線吸収 (max 260 nm, min 240 nm, A260/A280 = 1.6) を示した (Fig. 3)。

本ウイルスは前述の操作で比較的容易に純化され、病葉あるいは純化試料を凍結 (-80°C) —融解しても

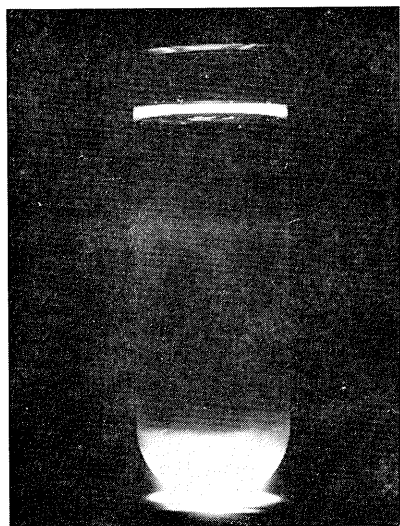


Fig. 1. A band of MiSV particles formed by sucrose density gradient centrifugation.

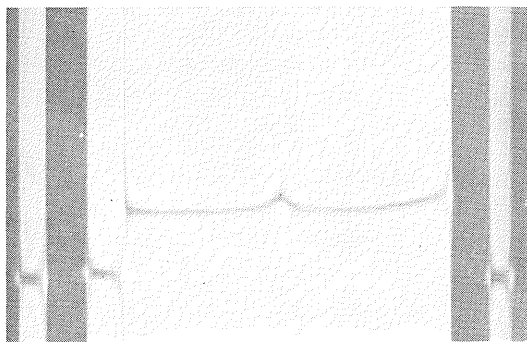


Fig. 2. Schlieren pattern of purified preparation of MiSV after 9 min at 35,000 rpm in analytical ultracentrifugation. Sedimentation is from left to right.

双球状粒子の形態は保持された。純化ウイルスは前固定せずに PTA 溶液でネガティブ染色しても粒子の崩壊はみられず、大多数が双球状粒子として観察された (Plate I-2a, b)。単粒子は極く少ないが、ときに認められた。これらは双球状粒子が解離あるいは支持膜上で直立したのかは明らかでない。双球状粒子の大きさは DN 法のそれと同じく、幅約 18 nm、長さ約 30 nm であった。ウイルス核酸はジフェニールアミン反応陽性、オルシノール反応陰性で、その核酸は DNA と判定された。

血清試験

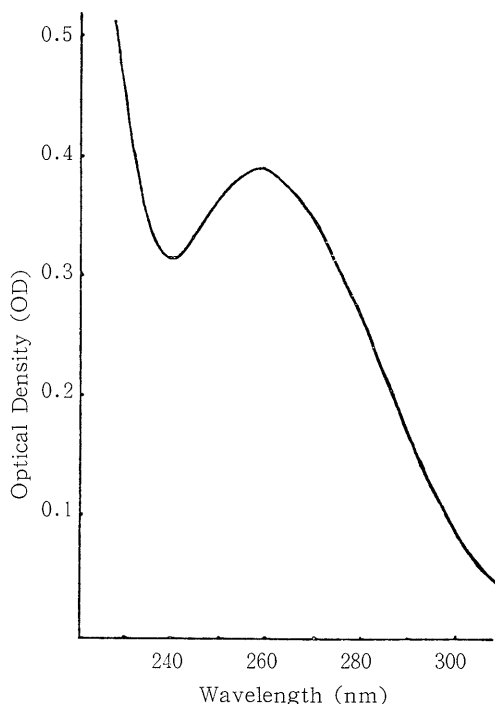


Fig. 3. UV absorption spectrum of purified preparation of MiSV.

本ウイルスの抗血清は寒天ゲル拡散法で同一抗原と単一バンドを形成し、その力価は 128 倍であった。本ウイルスはヨコバイ伝搬の 2 種のイネ科植物の geminiviruses, すなわち maize streak virus (MSV) 抗血清 (力価128倍, Dr. Bock から分譲) および chloris striate mosaic virus (CSMV) 抗血清 (力価128倍, Dr. Francki から分譲) との間には血清学的類縁は認められなかった (Fig. 4)。一方、本ウイルスの抗血清は MSV および CSMV を抗原にした場合も反応は認められなかった (Dr. Bock, Dr. Francki, 私信)。また、本ウイルスはタバココナジラミ伝搬の cassava latent virus (CLV) 抗血清 (力価128倍, Dr. Bock から分譲) とは反応せず、わが国のタバコ巻葉ウイルス (tobacco leaf curl virus; TLCV, 宮崎県小林市で採集して純化) とも血清学的関係は認められなかった。

細胞内ウイルスの電顕観察

本ウイルスは主に病葉の節部各種細胞、維管束鞘細胞、葉肉細胞の核、細胞質、液胞内に散在、集塊あるいは結晶して観察された。

核内のウイルスは通常密な集塊をなす例が多いが (Plate I-3)、ときに双球状粒子が集合したと思われる

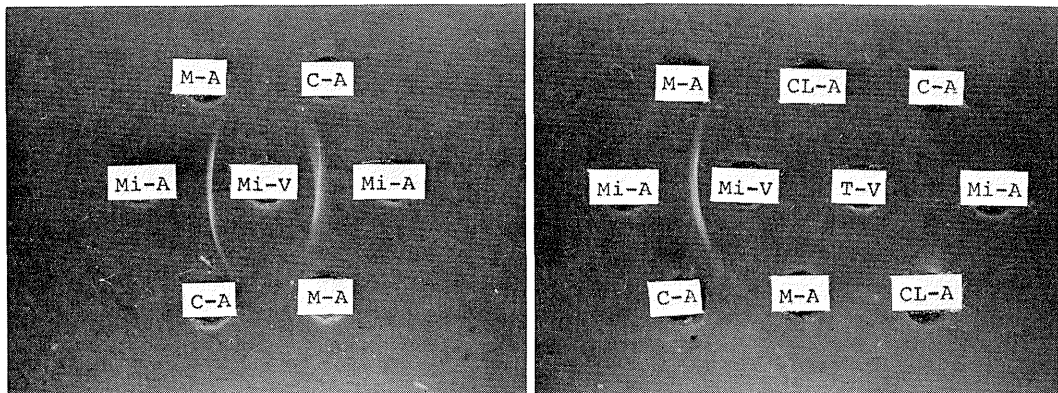


Fig. 4. Serological agar gel diffusion test among five geminiviruses. Antigens; Mi-V: purified MiSV, T-V: purified tobacco leaf curl virus (TLCV). Antisera; Mi-A: MiSV antiserum, M-A: maize streak virus (MSV) antiserum, C-A: chloris striate mosaic virus (CSMV) antiserum, CL-A: cassava latent virus (CLV) antiserum.

構造体が層状配列した像も観察された (Plate I-4)。切片試料によるこれらの粒子は幅約 16 nm, 長さ約 26 nm であった。感染細胞の核ではクロマチンが核膜近くに偏在する例も多く観察され、これは一種の内部病変と思われた。細胞質内のウイルスは一般に観察しにくいがしばしば集塊して認められた (Plate II-5)。本ウイルスは液胞内でも散在あるいは集塊して高頻度で観察され、それらの多くは双球状粒子として存在しているものと思われた (Plate II-6)。液胞内ではウイルス粒子が集合して種々の幾何学的な結晶配列をなす像が観察された (Plate II-7, Plate III-8, 9)。これらの配列は双球状粒子が構成単位となり、切断面の方向でさまざまな形態を示すものと思われ、これらに近接し配列に組込まれていない双球状粒子も認められた。ときに、導管内に存在する粒子も観察された (Plate III-10)。

考 察

著者らはオギから見出された geminivirus を粒子形状から maize streak virus (MSV)^{1,2)} と想定して先に報告²⁴⁾ した。その後、オーストラリアでイネ科の *Chloris gayana* から geminivirus が報告され新たに chloris striate mosaic virus (CSMV) と命名^{4,5)} されたことから、これら 2 種のイネ科植物の geminiviruses との直接の比較が望まれた。

オギの双球状ウイルスは病葉から 2% PTA 溶液 (pH 6.0) を用いた DN 法で比較的容易に検出され、

予め固定処理しなくても粒子の崩壊はみられなかった。なお、DN 法でタバコ巻葉ウイルス (tobacco leaf curl virus, TLCV) もトマト、ヒヨドリバナ、スイカズラ感染葉から検出できた (未発表)。本ウイルスはオギ病葉から比較的容易に純化され、清澄化に用いたクロロホルムや凍結融解にも耐性を示し、既知の geminiviruses より stable と思われた。純化ウイルスはショ糖密度勾配遠心、分析遠心で単一のピークを示し、それらの試料は多数の双球状粒子を含み、細胞内所見も併せ本ウイルスは双球状粒子が本来の形態と思われた。純化ウイルスはジフェニールアミン反応陽性で、本ウイルスは DNA を含むことが知られた。本報告では DNA の単鎖、複鎖の検討はしなかったが、これまでに核酸の分析された geminiviruses はいずれも単鎖 DNA でそれらの多くは環状とされている^{4,6,7,10,22)}。本ウイルスはその後の研究によると環状の単鎖 DNA を含むことが明らかになった¹⁴⁾。

本ウイルスはオギ病葉で各種細胞の核、細胞質、液胞内に散在、集塊、結晶して観察され、局在性は認められなかった。核内の層状配列、液胞内の散在、幾何学的な結晶配列の像から、本ウイルスは寄主細胞内でも双球状粒子として存在しているものと思われた。既知の geminiviruses の多くは核内に局在して観察され、これが本グループの特徴ともされている^{2,3,11,12,20,23)}。最近、CSMV では核内のほか、細胞質、液胞内に存在する像が報告されている⁹⁾。オギのウイルスでは液胞内で幾何学的な結晶配列が観察されたが、このような所見は従来 geminiviruses では知られていな

い。ウイルス感染細胞では核内でクロマチンが核膜近くに偏在する例が多く観察されたが、これは他の geminiviruses でも報告されている^{3,5,11,12,15,16,23)}。

本ウイルスの血清学的性質をヨコバイ伝搬の MSV, CSMV ならびにコナジラミ伝搬の CLV, TLCV の4種の geminiviruses との間で調べたが、いずれとも類縁関係は全く認められなかった。今日、geminiviruses としてヨコバイおよびコナジラミ伝搬の10余種が知られている。前者では *Cicadulina* 伝搬の MSV (アフリカ, インド)^{1,18)}, *Nesocultha* 伝搬の CSMV (オーストラリア)^{4,8)}, *Circulifer* 伝搬の beet curly top virus (アメリカ)²²⁾, *Orosius* 伝搬の tobacco yellow dwarf virus と bean summer death virus (オーストラリア)²¹⁾ などがある。これらは全て通常の汁液接種は困難とされ、それらの分類は媒介虫、寄主範囲、血清学的性質が主な基準となっている。

本研究でオギから見出された geminivirus は媒介虫としてヨコバイが推定されるが、予備的な試験として現地で採集した数種のヨコバイでは伝搬は認められず、また上記のヨコバイ類の発生などについては我が国では殆んど調べられておらず、媒介虫の解明と本ウイルスの病原性の確認は今後に残された。イネ科植物の geminiviruses のうち、MSV および CSMV はイネ科植物にかなり広い寄生性を示すが、両ウイルスとも *Miscanthus* 属に接種した試験はない。本研究では MSV, CSMV の寄主とされるイネ科植物について現地調査したが、類似症状を示す植物は見出されなかった。オギのウイルスはその純化試料と抗血清を用いた試験で MSV, CSMV とは血清学的類縁関係が全く認められなかった。Geminiviruses では同一ウイルスでも寄主植物の種類で沈降帯に spur を生じることが MSV²⁾ や TLCV¹⁷⁾ で知られているが、この場合でも反応が全く陰性であることはない。よって、本研究の geminivirus は既知のものと区別するのが妥当と思われる。そこで、ウイルスをオギ条斑ウイルス (miscan-

thus streak virus, MiSV), 病名をオギ条斑病 (miscanthus streak) としたい。

摘 要

1978年夏、千葉県松戸市で採集した白色条斑を示すオギ (*Miscanthus sacchariflorus*) から小球形粒子が対をなす双球状ウイルス (geminivirus) が DN 法で見出された。

本ウイルスは病葉から 0.1% チオグリコール酸, 1% トリトン X-100 を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 5.6) で磨砕抽出, クロロホルム (20%) 清澄化, 分画遠心, ショ糖密度勾配遠心することで単一バンドとして純化された。

純化ウイルスは核蛋白の紫外線吸収 (max 260 nm, min 240 nm, A₂₆₀/A₂₈₀=1.6) を示し、その沈降係数 (S_{20,w}) は約 75 S であった。ウイルス粒子は大多数が双球状粒子として観察され、その大きさは幅約 18 nm, 長さ約 30 nm であった。

本ウイルスは同抗血清 (力価128倍) と明瞭な単一沈降帯を生じたが、ヨコバイ伝搬の maize streak virus (ケニア), chloris striate mosaic virus (オーストラリア), ならびにコナジラミ伝搬の cassava latent virus (ケニア), タバコ巻葉ウイルス (tobacco leaf curl virus, 日本) などの geminiviruses と血清学的関係は認められなかった。

本ウイルスは病葉の各種細胞の核, 細胞質, 液胞内に散在, 集塊あるいは結晶して観察された。核, 液胞内では双球状粒子からなる層状配列や幾何学的な結晶配列も観察された。

本ウイルスは機械的接種は困難で、媒介虫は明らかでないが、血清試験, 粒子形状, 細胞内所見から既知の geminiviruses とは異なるとわれ、オギ条斑ウイルス (miscanthus streak virus, MiSV) と命名し、病名をオギ条斑病 (streak) とした。

引 用 文 献

1. Bock, K. R. (1974). C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 133.
2. Bock, K. R., Guthrie, E. J. and Woods, R. D. (1974). Ann. appl. Biol. 77: 289-296.
3. Esau, K. and Magyarosy, A. C. (1979). J. Ultrastruct. Res. 66: 11-21.
4. Francki, R.I.B. and Hatt, T. (1980). C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 221.
5. Francki, R.I.B., Hatt, T., Grylls, N. E. and Grivell, C. J. (1979). Ann. appl. Biol. 91: 51-59.
6. Goodman, R. M. (1977). Nature 266: 54-55.
7. Goodman, R. M. and Bird, J. (1978). C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 192.
8. Grylls, N. E. (1963). Aust. J. Agr. Res. 14: 143-153.

9. 水野重樹 (1969). 核酸の一般の分離. 定量法. 東京大学出版会, pp. 79-86.
10. Harrison, B. D., Barker, H., Bock, K. R., Guthrie, E. J., Meredith, G. and Atkinson, M. (1977). *Nature* 270 : 760-762.
11. Kim, K. S. and Flores, E. M. (1979). *Phytopathology* 69 : 980-984.
12. Kim, K. S., Shock, T. L. and Goodman, R. M. (1978). *Virology* 89 : 22-33.
13. Matthews, R.E.F. (1979). *Intervirology* 12 : 193-194.
14. 野仲信行・難波成任・山下修一・土居養二 (1985). *日植病報* 51 : 58-59 (講要).
15. 尾崎武司・井上忠男 (1978). *日植病報* 44 : 167-178.
16. 尾崎武司・井上忠男 (1978). *日植病報* 44 : 385 (講要).
17. 尾崎武司・小島博文・井上忠男 (1979). *日植病報* 45 : 62-69.
18. Raychaudhuri, S. P., Seth, M. L., Renbro, B. L. and Nickel, J. L. (1976). *Proc. Maize Virus Dis. Coll. Workshop.*, Ohio Agric. Res. and Dev. Center, pp. 69-77.
19. Storey, H. H. (1925). *Ann. appl. Biol.* 12 : 422-439.
20. Sylvester, E. S., Richardson, J. and Nickel, J. L. (1973). *Plant Dis Repr.* 57 : 414-416.
21. Thomas, J. E. and Bowyer, J. W. (1980). *Phytopathology* 70 : 214-217.
22. Thomas, P. E. and Mink, G. I. (1979). *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*. No. 210.
23. Thongmeearkom, P., Honda, Y., Saito, Y. and Syamananda, R. (1981). *Phytopathology* 71 : 41-44.
24. 山下修一・土居養二・與良 清 (1979). *日植病報* 45 : 128 (講要).

Explanation of plates

Plate I

1. Stunting symptom (a) and streaked (b) and sometimes ragged (c) leaf symptoms on naturally infected *Miscanthus sacchariflorus*.
2. Electron micrographs of purified preparation of MiSV. a: $\times 118,000$. b: $\times 270,000$.
3. Loosely aggregated masses of MiSV particles in the nucleus. $\times 14,000$.
4. Parallel arrays of MiSV particles in the nucleus. $\times 22,000$. Inset shows a high magnification of paired particles of them ($\times 160,000$).

Plate II

5. Aggregated masses of virus particles in the cytoplasm and also in the nucleus. $\times 52,000$.
6. Single and aggregated virus particles in the vacuole. $\times 85,000$. Inset shows high magnification of some paired particles ($\times 210,000$).
7. Geometrical arrays composed of paired particles in the vacuole. $\times 42,000$.

Plate III

- 8,9. Geometrical arrays composed of paired particles in the vacuole as Plate II-7. 8: $\times 34,000$. Inset shows a high magnification of a part of the plate ($\times 140,000$). 9: $\times 32,000$.
10. Single and aggregated virus particles in the xylem vessel. $\times 60,000$.

Abbreviations

V; virus particles, N; nucleus

Plate I

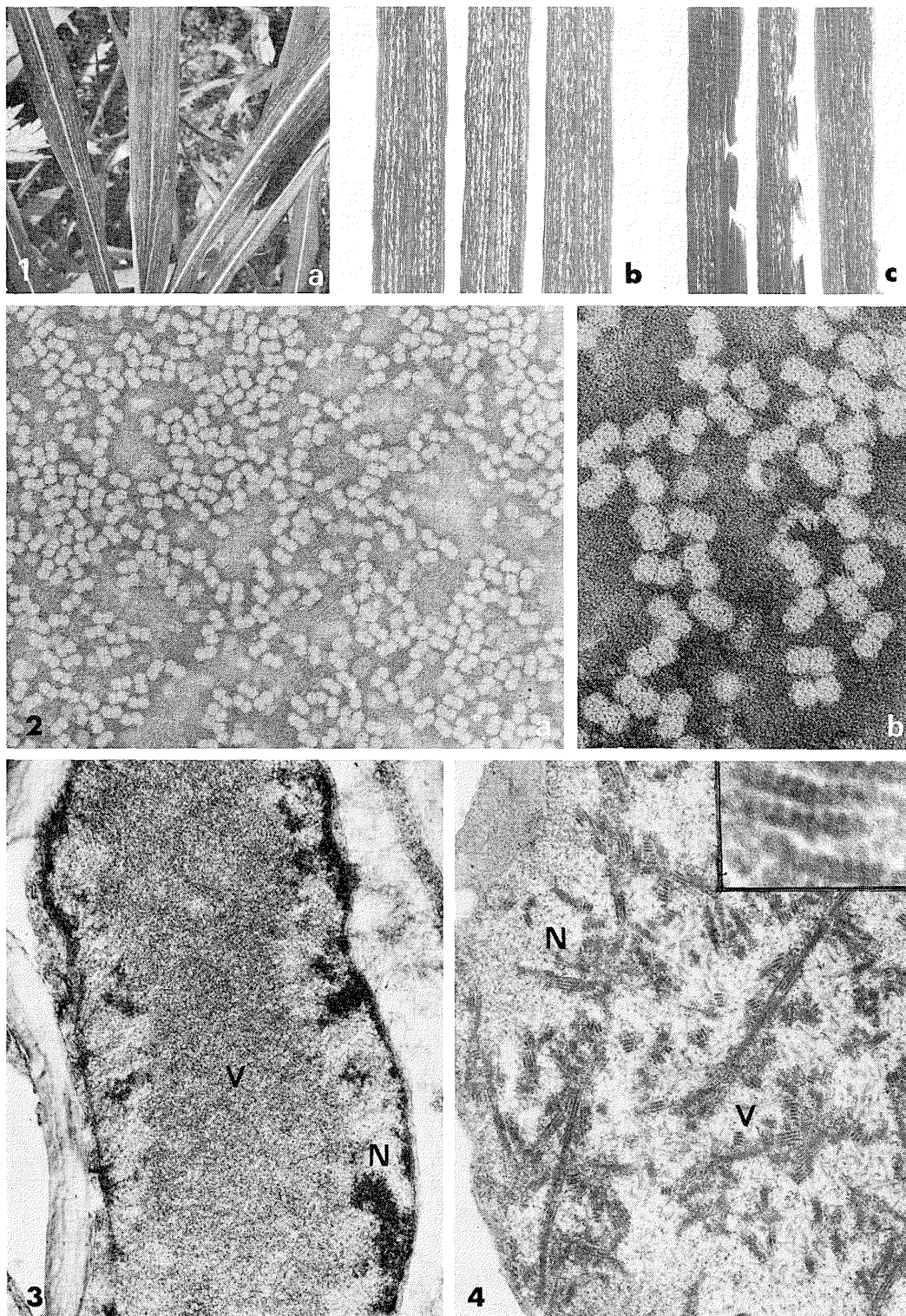


Plate II

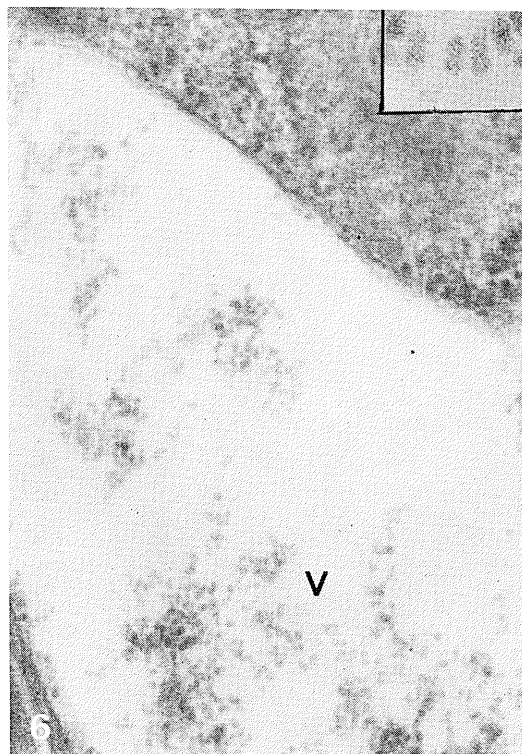
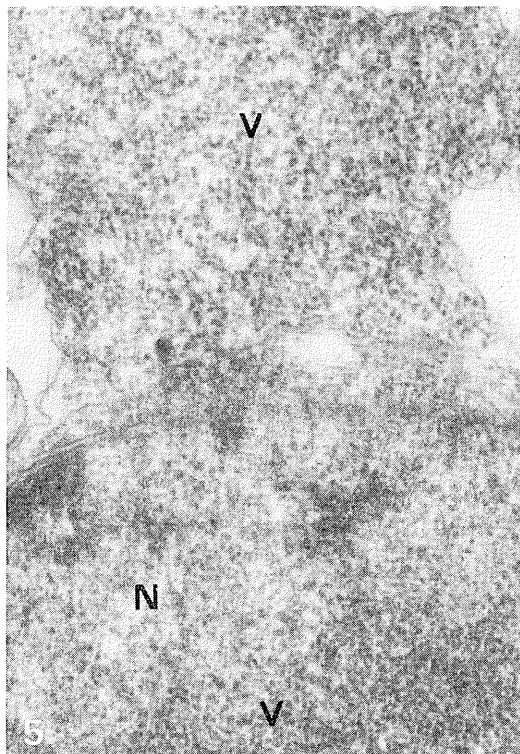


Plate III

