土壤伝染性ムギモザイク病ウイルスの 純化ならびに電子顕微鏡観察

斎藤 康夫*・高梨 和雄*・岩田 吉人*

YASUO SAITO, KAZUO TAKANASHI and Yoshito IWATA:

Purification and morphology of Japanese soil-borne wheat mosaic viruses.

I. 緒 言

わが国の土壤伝染性ムギモザイク病のうち、コムギ縞萎縮病(コムギイエローモザイク病)とムギ類萎縮病(ムギ類グリーンモザイク病)とは病徴、X体の形態その他に顕著な差が認められることから、土壤伝染法などの性質に類似点があるにもかかわらず、一応別種のウイルスとして取扱われて来た。しかし米国では、H. H. McKinney は wheat mosaic-rosette virus, wheat yellow mosaic virus をそれぞれ *Marmor tritici* var. *typicum* McKinney, *Marmor tritici* var. *fulvum* McKinney として分類し系統として扱っている。また平井ら³⁾はコムギ縞萎縮病々葉を超薄切片として電顕によつて観察したが、ウイルス像を認めていない。著者らはウイルスの純化を行い、形態を明らかにすることは、両者間の類縁関係を明らかにし、また今後研究をすすめるための基礎となると考えて実験を行なつた。

実験を行なうに当り病土、病株を恵与いただいた農林省関東東山農業試験場病理研究室員各位ならびに茨城県農業試験場石岡試験地 渡辺文吉郎技師、電子顕微鏡撮影に種々御援助をうけた専売公社秦野たばこ試験場 日高博士および病理研究室員各位、家畜衛生試験場 高橋力男技官、ラテックス粒子を御分与下さつた北大農学部 四方英四郎助教授に深謝の意を表する。

II. 供試ウイルスと純化法

1) 供試ウイルス コムギ縞萎縮病(WYMV)、ムギ類萎縮病(WGMV)の2種類のウイルスを用いた。WYMVは茨城県農業試験場石岡試験地から採取した病土を入れた農業技術研究所内コンクリート枠に発病した畠田小麦病葉より精製したが、病葉は黄化、かすり状細斑モザイク、えそなど典型的な縞萎縮病の病徴

を呈していた。WGMVは埼玉県鴻巣市関東東山農業試験場圃場で rosette, 捲縮, 条斑など典型的のグリーンモザイク症状を呈していた早小麦病葉より精製した。

2) 純化法 病葉を氷結後、M/10 phosphate buffer (pH 7.0)を加えて homogenize した後ガーゼでろ過し、クロロホルムを20%容加え強振後15分間振盪した。これを静置後、低速遠沈(3,000 rpm 15分)すると3相に分れる。最上層はウイルスを含む液相であり、中間層は植物体蛋白とクロロホルムとがゲルを作り固体相となり、最下部の層は過剰のクロロホルムが葉緑素を溶解して緑色の液相となつている。その最上層をピペットを用いて採取した。この操作によつてウイルス蛋白を健全蛋白よりほぼ分離できたが、なお不純物を含むのでさらに純化するため differential centrifugation を行なつた。高速遠沈は Spinco E型により行ない、29,500 rpm (56,000 g) 1時間、低速遠沈は 3,000 rpm (1,000 g) 15分でこれを3回くりかえした。得られた pellet は無色透明ゼリー状で、これを水に溶解すると蛋白白光を呈する。以上の操作を図示すると第1図の通りである。

このようにして精製したウイルスは、コムギに病原性を有し、それぞれコムギ縞萎縮病、ムギ類萎縮病に特有の病徴をあらわした。

III. ウイルスの電子顕微鏡観察

上記の方法で得られた精製ウイルスを蒸留水で稀釈し、コロジオン膜をはつたメッシュ上に滴下して乾燥させ、クロム蒸着または白金・パラジウム蒸着による shadowing を行なつた。sample 中にラテックス粒子(Dow polystyrene latex No. LS-063-A, 粒子直径 557 mμ)を加え、これを基準として長さの測定を行なつた。

WYMV, WGMV につき各 300 個を測定した。結果は第2図の通りであり、WYMV, WGMV とともに

* 農業技術研究所

第 1 図 純 化 操 作

第 2 図 WYMV, WGMV 粒子の長さの分布

桿状粒子で、WYMV は長さ 120~180 mμ (mode 150~160 mμ) が多く、幅は 25 mμ であった。WGMV は 120~180 mμ (mode 170 mμ) が多く、幅は 25 mμ であり、両者間に明らかな形態的差異は認められない。なお健全植物にはかかる桿状粒子は認められなかった。

IV. 考 察

WYMV, WGMV 両者間に形態的な差を認めない

ことは伝染法、その他の諸性質の共通であることと相まって、この両ウイルスの類縁関係が非常に密接であることを暗示する。Gold, McKinney ら¹⁾は米国で土壌伝染性コムギウイルス病の病植物汁液を直接 grid に spray することによって病原ウイルスの形態を観察しているが、wheat mosaic-rosette virus, wheat yellow mosaic virus は長さ 128 mμ (mode), 幅 24.6~26.1 mμ の桿状粒子としている。わが国のウイルスと比較すると、幅はほぼ一致し、長さがやや短い。

またこれより先 Hebert²⁾ は、硫酸による塩析法を用いて桿状粒子を電顕観察している。それによると幅約 28 m μ 長さ 400~700 m μ で、わが国のウイルスと比較して長さが著しく長い、これは end-to-end aggregation のためではないかと考えられる。

V. 摘 要

- 1) コムギ萎縮病、ムギ類萎縮病の両ウイルスをクロロホルム処理、分割遠心法によつて純化した。
- 2) 両ウイルスの形態を電子顕微鏡観察により比較した。その結果、両者とも桿状粒子で WYMV は長さ 120~180 m μ (mode 150~160 m μ) が最も多く、WGMV は長さ 120~180 m μ (mode 170 m μ) が最

も多い。幅は両者とも 25 m μ で、両ウイルス間に明らかな形態的差異を認めなかつた。

(1960. 9. 28. 受理)

引用文献

- 1) Gold, A. H., Scott, H. A. and McKinney, H. H. (1957). Plant Disease Repr. 41 (4): 250~253.
- 2) Hebert, T. T. and Coleman, N. T. (1955). (Abst.) Phytopath. 45: 348.
- 3) Hirai, T. and Matsui, C. (1956). Forsch. Gebiet Pflanzenkrankh., Kyoto, 6 (2): 61~72.

Summary

Purification of two soil-borne viruses, namely wheat yellow mosaic virus and wheat green mosaic virus, was made. The morphology of these viruses was examined by the electron microscope.

Purification procedure was as follows: juice from the diseased leaves was emulsified by adding one-fifth volume of chloroform. The emulsion was then centrifuged to give three layer separation. The top aqueous layer was found to contain the virus, the bottom chloroform layer contained the chlorophyll, and the middle compact plug formed by the chloroform gel contained protein and cellular debris. The virus was further purified by three cycles of differential centrifugation. The final preparation was infectious for wheat plants when rubbed on the leaves with carborundum.

Electron microscopic examination of the purified preparation showed the presence of straight rod-shaped particles in both viruses. These particles were not found in a preparation from healthy plant leaves.

The most frequent length of the virus particles was 120-180 m μ (mode 150-160 m μ) in the wheat yellow mosaic, and 120-180 m μ (mode 170 m μ) in the wheat green mosaic. The average width of both viruses was 25 m μ . As shown by these results, the two viruses were indistinguishable in size and shape of particles.

(National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo, Japan)

Plate I.

1. コムギ縞萎縮病ウイルス (WYMV) $\times 25,000$
2. ムギ類萎縮病ウイルス (WGMV) $\times 25,000$