短 報

Tobacco mosaic virus-bean strain (TMV-B) の性質 :

熱変性および等電点

谷 口 武*・加藤寿郎**・山口 昭*

Tnkeshi TANIGUCHI*, Toshiro KATO** and Akira YAMAGUCHI* : Properties
of Tobacco Mosaic Virus, Bean Strain (TMV-B) :
Heat-Denaturation and Isoelectric Point

Tobacco mosaic virus-bean strain (TMV-B) (ミシガン州立大学 H. H. Murakishi 博士から分与) は、アルカリに対して TMV 普通系統 (TMV-OM) よりも粒子の分解が起こりやすく、その場合に、リボヌクレアーゼ (RNase) 添加によって構造の強化がおこる¹⁾。また、TMV-B は TMV-OM によるインゲン葉の局部病斑形成に対して、強い干渉作用を示し、この作用は超音波処理をした TMV-B を用いても消失しない²⁾。さらに、TMV-OM と TMV-B の間で混合再構成が可能であり、再構成によって活性のある粒子をうる事ができ³⁾、たんぱく質の電気復屈折を調べた結果、この両系統の間にいちじるしい差が認められた⁴⁾。

以上が TMV-B についてすでに報告した概要であるが、本実験では熱に対する性質を中心に検討を加えた結果、TMV-OM と若干の差異が認められたので報告する。

実験材料および方法

ウイルス : TMV-OM に感染したタバコ植物 (*Nicotiana tabacum* L. 品種 Bright Yellow) を凍結したのち、蒸留水で磨砕し遠心 (10,000 rpm, 20 分) する。得られた上清を硫酸沈殿 (1/4 飽和) 数回、等電点沈殿 (pH 3.4) 1-2 回行なって TMV-OM を純化した。

TMV-B に感染したインゲン (*Phaseolus vulgaris* L. 品種改良大手亡) を凍結、磨砕後遠心し、その上清を硫酸沈殿 (1/4 飽和) 5-10 回、等電点沈殿 (pH 4) 1-2 回行なって TMV-B を純化した。このウイルスの純化の過程では、TMV-OM に比べて着色物質が抜けにくい、硫酸沈殿の回数を増し、等電点沈殿すると、着色物質の大部分は不溶性となって除くことができた。ただし、このときの等電点は実験の項で述べるように、普通系統と異なる pH 4 を用いた。

RNase : Nutritional Biochemical Co. 製の ribo-

Table 1. Effect of RNase added to tobacco mosaic virus-bean strain (TMV-B) inoculum on the symptom produced on detached bean leaves

Inoculum	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Symptom ^{a)}
	TMV-B	RNase	
A	125	100	—
B	125	10	—
C	125	1	±
D	125	0.1	+
E	125	0.01	+

a) — : No symptom, + : clear symptom (see text), ± : no symptom or sometimes mild symptom.

* 名古屋大学農学部 Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, Japan.

** 住友化学工業(株)宝塚研究所 Takarazuka Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Takarazuka, Hyogo, Japan.

1) Taniguchi, T., Yamaguchi, A. and Hirai, T. (1967). Virology 33 : 757-759. 2) Taniguchi, T. and Yamaguchi, A. (1969). Phytopathology 59 : 1767-1768. 3) 後藤孝男・谷口 武・平井篤造(1970). 日植病報 36 : 187. (講要) 4) Taniguchi, M., Kobayashi, S. and Yamaguchi, A. (1969). Biochim. Biophys. Acta 188 : 140-146.

nuclease を水溶液として用いた。

実験結果および考察

1. 切り取り葉の病徴

インゲンの初生葉を切りとり、ウイルスを摩擦接種後蒸留水を入れたシャーレに浮かべて、連続照明下(約 7,000 ルックス, 25°C)で 3-4 日放置する。

TMV-OM では局部病斑を生ずるが、TMV-B を接種した切りとり葉では局部病斑を生ぜず、葉脈にそって淡赤色を呈し、葉脈間部が部分的に黄化するにとどまる。この病徴は鉢植え植物に接種したときよりも急速に現われ、しかもいちじるしかった。

RNase を普通系統に混ぜて接種すると、局部病斑形成数が低下することは古くから知られている^{5,6)}。そこで、TMV-B による上記病徴発現に対する RNase の作用をみた。Table 1 から明らかなように、TMV-

B と全身感染宿主(インゲン)との組合せにおいても、接種源に RNase が混入していると感染阻害が生じる。

2. TMV-B の等電点

TMV-B の純化の過程で、ウイルス試料に 0.1N HCl を加えて等電沈殿させるとき、TMV-OM の等電点(pH 3.4)より高い pH で最大のにごりを生ずることがわかった。

そこで、より正確な沈殿領域を知るために、以下の実験を行なった。

TMV-B 溶液に適当量の 0.1N または 1N の HCl を加え、その pH を測定し、ただちにこの溶液の濁度を 550 m μ の光学密度で測った(Fig. 1)。この結果から明らかなように、この系統の等電点は pH 4 付近にあり、普通系統の等電点 pH 3.4 とは大きな開きがある。

また、TMV-B を蒸留水で透析すると、チューブの中で白濁する現象がみられ、これは普通系統ではおこらない。この白濁したウイルス試料に少量の中性緩衝

Fig. 1. Turbidity of tobacco mosaic virus-bean strain (TMV-B) solutions at various pH.

Original TMV-B solution was mixed with various amount of 0.1N or 1N HCl and OD_{550m μ} of each solution was estimated.

Fig. 2. Effect of heat-treatment on virus strains TMV-OM and TMV-B, at various temperatures for 15 minutes, as shown by relative amounts of unprecipitated material after centrifugation (8,000 rpm for 15 minutes).

The relative amount is expressed by the ratio of OD_{260m μ} of treated solution and OD_{260m μ} of untreated solution.

Fig. 3. Effect of heat-treatment on virus strains TMV-OM and TMV-B, at various temperatures for 10 minutes, as shown by the ratio $OD_{260m\mu}/OD_{280m\mu}$ of supernatant of treated virus solution.

液を加えると、すみやかに溶解することから、白濁の原因は等電点が高いことによると考えられる。

3. ウイルスの熱変性

両ウイルスの熱に対する耐性を調べた。ウイルス溶液 (0.3 mg/ml) を 50-90°C, 15 分間加熱し、急冷してから遠心 (8,000 rpm, 20 分間) して変性たんぱく質を除き、その上清の $OD_{260m\mu}$ を測定した (Fig. 2)。この実験で用いた溶媒は 0.1M, pH 7.0 リン酸緩衝液で、図中の各点は 3 回の平均を示す。

TMV-B の曲線を TMV-OM と比較すると、前者の変性は普通系統より幾分低温から始まり、しかも TMV-B の変性曲線は TMV-OM よりもゆるやかな形を示している。

ウイルスを高温処理すると、粒子から核酸が遊離することは古くから知られている⁷⁾。本実験では前述したウイルス試料を、各温度で 10 分間加熱し、遠心後得た上清の $OD_{260m\mu}$ と $OD_{280m\mu}$ との比をとり、その上清に含まれるたんぱく質と核酸の割合を推定した (Fig. 3)。

両ウイルスともに 80°C, 10 分間加熱すると、その上清の OD の比の値は 2.0 に近くなる。この溶液に含まれる物質の大部分は核酸であると考えられる。しかし、70-75°C では TMV-B の値は TMV-OM よりも小さい。このことは TMV-B は高温条件での核酸の放出がややおこりにくいことを示している。

以上述べた両ウイルスの性質の違いは、当然その粒子の構造あるいはたんぱく質の安定性の差に由来するものと考えられるが、それらの詳細については明らかではない。

すでに報告したように、両系統のアルカリに対する耐性の違い¹⁾から、たんぱく質-たんぱく質、あるいは核酸-たんぱく質の結合に差があることが推定される。電気複屈折の結果⁴⁾はこの可能性をさらに強くしている。また、等電点の大きな差は粒子の化学組成の変化を示しており、これらの要因がからみあって、両系統の熱に対する性質の違いが生じたものと考えられる。
(1971 年 3 月 31 日受理)

7) Cohen, S. and Stanley, M. W. (1942). J. Biol. Chem. 144 : 589-598.