学会賞受賞者講演

タバコにおけるキュウリモザイクウイルスに関する研究*

都 丸 敬 一**

Keiichi TOMARU**: Studies on the Cucumber Mosaic
Virus in Tobacco Plant.

わが国のタバコには現在9種類21系統のウイルスの発生が明らかにされているが、これらのウイルス病のうちキュウリモザイクウイルス (CMV) によるモザイク病はタバコモザイク病と並んで最も被害の多いウイルス病となっている。

CMV は1910年代に米国において、キュウリから最初に分離報告されて以来、世界各地で多くの種類の植物に広く発生することが報告されている。わが国では小室、明日山 (1950, 1954) のキュウリからの分離株についての報告が最初である。タバコでは Johnson (1926), Valleau and Johnson (1928) が CMV の寄主としてタバコを挙げ、またタバコから CMV を分離報告しているが、わが国のようにタバコに CMV の発生が多いことは、欧米諸国ではその例がなく、わが国の特色である。

筆者が秦野たばこ試験場においてこの研究を始めた1952年時には、本ウイルスによる被害は激甚を極め、タバコ作の大きな障害となっていたが、病原ウイルスについては不明の点が多かった。本研究は CMV 防除のための基礎資料を得る目的から行なったものである。

畑における本ウイルス病の病徴には各種のものがあ、これらの病徴と病原ウイルスの異同を調べる研究から系統の存在が明らかとなり、また感染後のタバコの病徴にも変化のあることが知られた。さらに病原ウイルス研究上の基礎となる生物学的定量法を検討し、これによって感染植物における病徴の推移とウイルス濃度との関連を追求した。以下にその概要を述べることとする。

タバコに発生する CMV の系統

野外の主として病徴の異なる自然発病株から病原ウイルスの分離を試みた結果、CMV 普通系 (CMV-O)、黄斑系 (CMV-Y)、軽症系 (CMV-C)、マメ科系 (CMV-LE) および黄色微斑系 (CMV-YM) の5系統の発生が明らかとなった。これらの系統は CMV-LE を除いては、タバコの病徴に CMV-O との差があり、畑で識別は比較的容易である。CMV-Y は鮮かな黄色斑紋、および奇形を、CMV-YM は黄色微斑、CMV-C は感染初期の症状は激しいが、後期には外観ほぼ正常に近くなるなどの特徴がある。畑では一般には CMV-O および CMV-C の発生が多く、その他の系統の発生は少ないのが現状である。また、これらの系統は *Nicotiana glutinosa* ササゲ、ヒャクニチソウなどの判別植物の反応の相違からも区別できる。CMV-LE は CMV-O とタバコ上の病徴は同様であるが、ササゲ、インゲンなどに全身的なモザイクを示す点が CMV-O と異なっている。小室 (1966) は各種作物から得られた CMV を5系統群に分けているが、上記の系統のうちマメ科系は小室のマメ科系統群に、その他は普通系統群に類別されるものと思われる。

これらの系統の感染タバコ葉汁液について耐熱性、耐希釈性、耐保存性を調べた結果、系統間に大きな差はないが、CMV-Y は他の系統にくらべてやや安定した性質を持ち、CMV の研究上有利な系統であることがわかった。米国ではハウレンソウからの分離株である Y strain が広く用いられているが、この Y strain も最近では CMV-Y と略記されることが多い。したがって、本系統を用いた研究では、系統の由来を明記

* 昭和50年4月3日 本大会で行なわれた学会賞受賞講演の要旨

** 日本専売公社中央研究所 Central Research Institute, Japan Tobacco and Salt Public Corporation, Yokohama, Japan.

しないと混乱を招く恐れがある。最近高浪, 都丸 (1973) は CMV-O と CMV-Y とのウイルス粒子の超遠心沈降パターンは全く同一であるが, 数種のアミノ酸残基数に差のあることを明らかにしている。これらの5系統に米国産 CMV えそ系 (CMV-N) を加えた6系統および tomato aspermy virus (井上ら, 1968), キク微斑ウイルス (栃原, 1970) 等のいずれにおいて感染葉からも直接フェノール抽出した RNA 成分は, 対照のリン酸緩衝液磨砕汁より高い感染力を示し, この性質は CMV 群ウイルスの特色として同定標準のひとつとなしうることを明らかにした。さらに寒天ゲル拡散法を用いた血清反応から, これらの6系統は血清学的に相互に近縁であると結論された。その後, 桐山 (1972) はこれら CMV 系統の血清反応を検討し, 中和反応によって CMV-O, Y, C 間の差を判別しうることを示している。

系統間の干渉試験では干渉の程度を, 二次ウイルスによる局部病斑数から算出した数値で示すことを試みたが, CMV-C を除く4系統に米国産 CMV-N を加えた5系統間では干渉の程度は98%以上を示し完全であった。CMV-C は CMV-YM を除くその他の系統に対して, やや不完全な干渉効果を示し, 類縁がやや遠いことを推察させたが, CMV-C の増殖, 移行がその他の系統より緩やかであることがこの現象の原因とも考えられた。

CMV の生物定量

CMV の諸性質を明らかにするには, その定量法を確立することが必須であると考え, ササゲを検定植物として生物定量法を検討した。ササゲの品種, 苗令, 接種原の調製法, 濃度, 接種前後の温度および光の影響, 接種後葉面の水洗, 水洗後の乾燥等による影響, 本法による定量の精度などを検討した結果, 25°C で播種後10日頃のササゲ (品種黒種三尺) の初生葉を用い, 対葉法で20対40枚の葉によって CMV 濃度 (ウイルス活性) の15~20%の差異を確実に判別できることを明らかにした。苗令による感受性の差は大きく, 病斑数は14日苗では急激に低下した。ササゲの初生葉は葉形が小さく, 主脈の隆起も少ないので, 半葉法に代えて対葉法を採用した。また羅病葉の真空冷凍乾燥を試み, 乾燥試料が長期間ウイルス活性を保つことを明らかにした。1957年の乾燥試料は18年後の現在でも活性を保っている。これを標準接種原として用いることにより, ササゲの感受性の個体差を消去し, 異なる時期に行なった定量実験の結果を相互に比較するこ

とが可能となった。真空凍結乾燥によるウイルスの保存は本研究で初めて試みられたものであるが, 現在では植物ウイルスの保存に一般的に用いられている。

CMV のタバコにおける増殖と病徴の推移

タバコに CMV を接種すると, 系統によって多少の差はあるが, 感染後病徴の激しさが一定のパターンをもって推移し, ある時期には外観健全に近い葉を生ずることが観察される。この病徴の推移とタバコ体内のウイルス濃度の消長との関係を知るために, ササゲによる定量法を用いて検討した。

タバコに CMV-O を接種すると, 接種後8~10日 (25°C) で感染葉搾汁液中のウイルス濃度は最大となり以後急激に低下して20~23日頃最低となり, その後再び上昇する cyclic pattern が認められた。病徴はこれよりやや遅れて変化し, ウイルス濃度が最低のときは上位葉の病徴はほとんどマスクする。17°C では25°C より時間的な遅れがあり, 変化は緩やかである。他の系統でも基本的なパターンは同様であるが, CMV-C (25°C) は CMV-O の17°C におけるような緩やかな推移を示した。このようなウイルス濃度の推移は, 窒素レベルを変えた水耕タバコでも認められ, 実験の限りでは窒素レベルが高いほどその推移が明瞭であった。タバコの生長がほとんど停止した無窒素区のタバコでも基本的には同様な推移が認められた。したがって, 植物体の生長に伴う希釈がウイルス濃度の低下の主因とは考えられない。また各葉位の葉および根のそれぞれについても同様なウイルス濃度の推移が認められることから, 葉におけるウイルス濃度の低下は根などの特定組織へのウイルスの移行蓄積の故ではないと考えられた。

ウイルス濃度推移の機作

上述のウイルス濃度の推移が, 感染葉を磨砕する際のウイルスの不活化が要因となっているかを知るために, 全身感染頂葉について KCN, thioglycolic acid あるいは Na-diethyldithiocarbamate を酸化酵素の活性阻害剤として添加磨砕し, またフェノールによって直接抽出した CMV-RNA 成分の感染力の推移を調べた。これらの処理によってもウイルス濃度の推移のパターンに基本的な差は認められなかった。また血清反応によるウイルス濃度の測定および精製したウイルスの収量の測定でも同様な推移が確かめられた。磨砕時のウイルス不活化を完全に阻止し得たかどうか確認は困難であるが, これらの実験結果から感染タバコ

体内における CMV 活性の推移は、ウイルスの増殖阻害あるいは不活化が主因と考えられた。土居ら (1972) は感染後期には電顕観察によっても組織内のウイルス存在量がきわめて少ないことを認めている。

次いで、*in vitro* で CMV を不活化することの知られている polyphenoloxidase の活性の推移を頂葉について測定した。その結果、本酵素活性の推移はウイルス濃度の推移と逆の相関があり、本酵素の生体内における CMV の増殖阻害あるいは不活化が示唆された。本酵素は銅酵素で、銅欠乏培養液に育てたタバコではその活性が認められないことが報告 (代谷ら, 1964) されている。そこで、銅欠乏培養液に育てたタバコについて、CMV 濃度と病徴の推移を調べたところ、正常培養液に育てたタバコと同様なパターンを示し、本酵素がウイルス濃度の推移と直接の関連を持たないことが明らかとなった。

初めに述べたように、わが国ではタバコに CMV の

発生が多いが、病徴の程度には激甚のものから、軽微なものまで種々の段階があり、また病徴の型にも緑色あるいは黄色斑紋、えそ、奇形など各種のものが認められる。本研究においてはこのような CMV によるタバコの病徴の種々なる様相を病原ウイルスの系統の面からと、感染後の病徴の推移の面から解明し、本ウイルスによるタバコのモザイク病の診断、同定および防除の基礎とすることができた。また本研究によって CMV の生物学的定量法が確立され、感染タバコ体内におけるウイルス濃度の消長が明らかにされたことは、系統の類別とともに、その後の研究の発展、すなわち CMV の精製純化 (Takanami and Tomaru 1969, 桐山 1972), 吹付法による CMV の簡易大量接種法 (高浪, 都丸 1971), 血清反応 (桐山, 1972), アブラムシによる伝搬と防除法 (中沢, 1972), CMV 粒子の物理化学性 (高浪, 都丸, 1973), CMV-RNA の成分および化学組成 (高浪, 1972, 1975) およびその他の CMV に関する研究の基盤となることができたものと考えている。