免疫学的方法によるイネ萎縮病ウイルス 罹病イネ中のウイルス RNA の検出

松本 勤^{*}・奥原英二^{**}

仙北俊弘^{***}・四方英四郎^{***}

Tsutomu MATSUMOTO^{*}, Eiji OKUHARA^{**}, Toshihiro SENBOKU^{***} and
Eishiro SHIKATA^{***}: Immunological Detection of Virus-Specific
RNA in Rice Dwarf Virus-Infected Rice Plants

Abstract

In a quantitative complement fixation test, antisera of rabbits immunized with complexes of PolyA·PolyU and methylated bovine serum albumin (MBSA), or with those of PolyI·PolyC and MBSA, which had been shown to react specifically with double-stranded RNA, were allowed to react with two kinds of bulk nucleic acids from the rice dwarf virus (RDV)-infected rice plants and from the healthy rice plants. The reactivity with the healthy rice plant-samples was very weak but in the infected rice plant-samples sixty-sixfold greater reactivity was found. To ascertain whether the reactive material in the infected rice plant-samples was RDV-RNA, both bulk nucleic acids from the healthy and the infected rice plants were fractionated by methylated albumin kieselguhr (MAK) column chromatography into RDV-RNA, tRNA, rRNA and DNA, and then the reactivity of each fraction was examined. Most of the reactivity was observed with RDV-RNA fraction.

Thus the immunological method was demonstrated to be a useful tool for detection of RDV-RNA even in the presence of a great excess of other nucleic acid forms in the RDV-infected rice plants.

(Received December 11, 1974)

緒 言

抗核酸抗体は一般にきわめて特異性のないものと考えられてきたが、最近2本鎖の合成ポリリボスクレオチド (PolyA·PolyU ならびに PolyI·PolyC) にメチル化牛血清アルブミン (MBSA) を結合させ、これをウサギに注射して得られた抗血清が2本鎖 RNA に特異的に反応することが報告された^{10,11,12,14}。これらの抗血清はただちにウイルス核酸の研究にも応用され、アルボウイルスの増殖型 RNA (RF) ならびにレオウイルス RNA の検出が補体結合反応および蛍光抗体法によって研究された^{13,16,17}。また、植物ウイ

ルス学の分野においても、これらの抗血清を用いて potato spindle tuber viroid の検出が試みられ、その実験で対照として用いたイネ萎縮病ウイルス RNA が強く反応することが確かめられたのをはじめ¹⁵、Fiji disease ウイルスに感染したサトウキビ罹病葉中の2本鎖 RNA の検出ならびに mycovirus のスクリーニングが報告された^{1,8}。

筆者らもすでに2本鎖 RNA に特異的に反応する抗体の産生に成功しているが⁶、本研究においてはこれらの抗血清によって罹病イネ中のイネ萎縮病ウイルス RNA (2本鎖 RNA)⁷ が補体結合反応によってきわめて特異的に検出できることを報告する。本研究を

^{*} 秋田県立農業短期大学 Akita Prefectural College of Agriculture, Ohgata-Mura, Akita, Japan.

^{**} 秋田大学医学部生化学講座 Department of Biochemistry, Akita University, School of Medicine, Akita, Japan.

^{***} 北海道大学農学部植物学教室 Department of Botany, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

行なうに当り、核酸の免疫化学の方法を植物ウイルス学の分野に応用することを示唆して下さった北海道大学農学部植物学教室、村山大記名誉教授に対し厚く御礼申し上げる次第である。また、種々ご協力をいただいた国立予防衛生研究所、山田堅一郎博士ならびに植物ウイルス研究所、木村邦夫博士に対し深謝の意を表する。

実験材料および方法

イネ萎縮病ウイルス罹病イネ：罹病イネは保毒ツマグロヨコバイによって水稻農林8号に接種し、温室において接種後60日を経たものである。健全イネは水稻農林8号を罹病イネと同じ時期に同じ期間、温室で生育させて供試した。

罹病イネならびに健全イネからの核酸の抽出：Kodama ら³⁾の方法に従って行なった。10gの凍結状態のイネを細かく切り、これに35mlの0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.7)ならびに35mlの水飽和フェノールを加えてワーリングブレンダーにより約3分間磨砕した。磨砕したイネ組織をさらに乳鉢ですりつぶし、これを3,000回転、5分間遠心した。得られた遠心上清に対し、さらに2回のフェノール処理を行ない、つぎにエーテルを加えてフェノールを除去した後、2.5倍容のエタノールを加えて核酸の沈殿を得た。この沈殿は使用の際に0.15M NaClまたは0.2M NaCl-0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.7)に溶解し、不溶物を遠心分離(3,000回転、5分間)によって除いた後、罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸として用いた。

イネ萎縮病ウイルス(RDV)ならびにRDV-RNAの調製：RDVの精製は木村ら²⁾の方法に準じて行なった。RDV罹病葉に0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.0)を2倍量加えて磨砕し、クロロホルム処理(搾汁液の20%)の後、分画遠心34,000×g、60分間を2回くり返して部分精製を行なった。これをさらに蔗糖濃度勾配遠心分離28,000×g、60分間によって2層に分画し、下層分画を集めて精製RDVとした。精製RDVからのRDV-RNAの調製はMiura ら⁷⁾の方法に従って行なった。

メチル化アルブミン(MAK)カラムクロマトグラフィー：罹病イネ核酸および健全イネ核酸のMAKカラムによる分画はKodama ら³⁾の方法に従って行なった。4~5mgの核酸を10mlの0.2M NaCl-0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.7)に溶解し、この試料をMAKカラム(2.6×22cm)に吸着させた後、これを0.2M NaCl-0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.7)から1.4M NaCl-

0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.7)の直線的食塩濃度勾配によって溶出した。溶出液は全部で800ml用いた。また、溶出速度を66ml/hrとし、フラクションコレクターによって4mlずつ採集した。これらの実験は室温で行なった。

抗PolyA・PolyU-MBSA血清ならびに抗PolyI・PolyC-MBSA血清の調製：免疫に用いた合成ポリリボヌクレオチド(PolyA, PolyU, PolyI, PolyC)はMiles Chemical Corp. から購入した。PolyA・PolyUならびにPolyI・PolyCの合成2本鎖ポリリボヌクレオチドの調製はSchwartz and Stollarの方法¹²⁾に従った。また、PolyA・PolyU-MBSAまたはPolyI・PolyC-MBSA複合体の調製法ならびに免疫方法はPlescia ら⁹⁾に従ってつぎのように行なった。すなわち、0.25mg/ml (2×sscに溶かしたもの)の濃度のPolyA・PolyUまたはPolyI・PolyCにこれと同じ重量のMBSA(蒸留水中に10mg/mlの濃度になるように溶かしたもの)を混ぜて白濁の複合体を作った。つぎに、0.5mgのPolyA・PolyU-MBSA複合体、またはPolyI・PolyC-MBSA複合体をFreundのcomplete adjuvantと共にウサギ(日本白色種)の筋肉に週1回ずつ連続して5回注射した。全採血は最終の注射後1週間めに行なった。得られた抗血清は56°Cで30分間非動化し、寒冷凝集素を除いてから使用時まで-20°Cに凍結保存した。

補体結合反応：補体結合反応¹⁸⁾はつぎのようにして行なった。0.1mlの抗血清に0.1mlの核酸抗原を加え、さらに0.2mlの補体(2単位)を加えてから、これを4°Cで一夜放置する。翌朝これに溶血素(3単位)によって感作されたヒツジ血球浮遊液を0.2ml加えてよく混和し、37°Cで30分間反応させた。反応の判定は松本・村山の方法⁵⁾によった。

実験結果

A. 抗PolyA・PolyU-MBSA血清ならびに抗PolyI・PolyC-MBSA血清の2本鎖RNAに対する反応性

抗PolyA・PolyU-MBSA血清ならびに抗PolyI・PolyC-MBSA血清に対するPolyA・PolyU, PolyI・PolyC, 精製RDVから調製したRDV-RNA, 罹病イネ核酸のMAKカラムクロマトグラフィーによって得たRDV-RNA, PolyA, PolyU, PolyC, パン酵母tRNA (Miles Chemical Corp.), パン酵母rRNA (Nutritional Biochemicals Corp.), サケ精子DNA (和光純薬)の交叉反応の結果はTable 1に示すと

Table 1. Cross-reactions of anti-PolyA•PolyU-MBSA serum and anti-PolyI•PolyC-MBSA serum with various nucleic acids in complement (C') fixation

Immunizing antigen	Antigen (1 µg/0.1 ml)	Reciprocal dilution of antiserum					
		64	128	256	512	1024	2048
PolyA•PolyU-MBSA	PolyA•PolyU	≡	≡	≡	≡	≡	—
	PolyI•PolyC	≡	≡	≡	≡	—	—
	RDV-RNA (1)	≡	≡	≡	≡	—	—
	RDV-RNA (2)	≡	≡	≡	≡	—	—
	PolyA	—	—	—	—	—	—
	PolyU	—	—	—	—	—	—
	PolyC	—	—	—	—	—	—
	Yeast tRNA	—	—	—	—	—	—
	Yeast rRNA	—	—	—	—	—	—
	Salmon sperm DNA	—	—	—	—	—	—
PolyI•PolyC-MBSA	PolyI•PolyC	≡	≡	≡	≡	≡	—
	PolyA•PolyU	≡	≡	≡	≡	≡	—
	RDV-RNA (1)	≡	≡	≡	≡	≡	—
	RDV-RNA (2)	≡	≡	≡	≡	≡	—
	PolyA	—	—	—	—	—	—
	PolyU	—	—	—	—	—	—
	PolyC	—	—	—	—	—	—
	Yeast tRNA	—	—	—	—	—	—
	Yeast rRNA	—	—	—	—	—	—
	Salmon sperm DNA	—	—	—	—	—	—

PolyA•PolyU: Polyadenylate-Polyuridylate, homopolymer duplex.

PolyI•PolyC: Polyinosinate-Polycytidylate, homopolymer duplex.

MBSA: Methylated bovine serum albumin.

RDV-RNA (1): Rice dwarf virus-ribonucleic acid prepared from the purified virus.

RDV-RNA (2): Fractionated by the MAK column chromatography of bulk nucleic acids from the RDV-infected rice plants.

≡: The highest grade of the reaction in C' fixation according to Matsumoto and Murayama⁵⁾.

—: No reaction.

PolyA•PolyU に対して抗血清希釈で 1,024 倍まで反応し、異なる 2 本鎖 RNA である PolyI•PolyC ならびに RDV-RNA に対しても 512 倍まで反応を示した。同様に、抗 PolyI•PolyC-MBSA 血清においても PolyI•PolyC, PolyA•PolyU ならびに RDV-RNA の 2 本鎖 RNA に対して 1,024 倍まで反応した。しかしながら、これらの抗血清は供試した 1 本鎖 RNA ならびに DNA とはまったく反応が認められなかった。これらの結果から、本研究に用いた抗血清は 2 本鎖 RNA に対してきわめて特異的に反応することが確かめられた。

B. 抗 PolyA•PolyU-MBSA 血清ならびに抗 PolyI•PolyC-MBSA 血清による罹病イネ中の RDV-RNA の検出

1. 罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸の反応性

罹病イネならびに健全イネの各々からフェノール法によって全核酸を抽出し、抗 PolyA•PolyU-MBSA 血清ならびに抗 PolyI•PolyC-MBSA 血清に対する罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸の反応性の差異を補体結合反応によって比較した。Fig. 1. に示すとおり、罹病イネ核酸はこれらの抗血清に対し、きわめて少量の抗原量 (0.075 µg/0.1 ml) から反応を示したが、

健全イネ核酸では罹病イネ核酸の約66倍の抗原量(5 μ g/0.1 ml)を用いないと反応しなかった。このように、これらの抗血清に対する罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸の反応性には顕著な差異が認められた。

2. 罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸の MAK カラムクロマトグラフィーによる分画および各核酸分画の反応性

罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸を MAK カラムクロマトグラフィーによって RDV-RNA, DNA, tRNA, rRNA に分画した (Fig. 2)。その結果は Kodama ら³⁾の報告と一致した。つぎに斜線によって示した RDV-RNA, DNA, tRNA, rRNA の各分画を集め、濃縮ならびに 0.15 M NaCl に対する透析の後、これら各種核酸の補体結合反応による反応性を調べた。

Fig. 1. Complement (C') fixation of anti-PolyA·PolyU-MBSA serum (○) and anti-PolyI·PolyC-MBSA serum (●) with bulk nucleic acids from the rice dwarf virus-infected rice plants (—), and from the healthy rice plants (---).
Antiserum dilution=1:100.

Fig. 2. The methylated albumin kieselghur (MAK) column chromatography of bulk nucleic acids from the rice dwarf virus-infected rice plants (A) and from the healthy rice plants (B). Four to 5 mg of the nucleic acid preparations were dissolved in 10 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 6.7) containing 0.2 M NaCl, and placed on the MAK column (the bed volume: 2.6×22 cm) at room temperature. The column was eluted with a linear gradient formed from 400 ml each of 0.05 M phosphate buffer (pH 6.7) containing 0.2 and 1.4 M NaCl. Fractions (4 ml) were collected with a flow rate of 66 ml/hr. Each eluate indicated by shaded area was collected, and used for complement fixation.

Fig. 3. Complement (C') fixation of anti-PolyA·PolyU-MBSA serum (A) and anti-PolyI·PolyC-MBSA serum (B) with various types of the nucleic acids fractionated by the MAK column chromatography of bulk nucleic acids from the rice dwarf virus-infected rice plants and from the healthy rice plants.

×: RDV-RNA, ●: DNA (RDV-infected), ○: DNA (healthy),
▲: tRNA (RDV-infected), △: tRNA (healthy), ■: rRNA (RDV-infected), □: rRNA (healthy).

Antiserum dilution=1:100.

各分画の反応性は Fig. 3 に示したとおりである。すなわち、抗 PolyA·PolyU-MBSA 血清ならびに抗 PolyI·PolyC-MBSA 血清は RDV-RNA 分画に対して最も強い反応を示し、きわめて微量な抗原量 (0.009 μg/0.1 ml ~ 0.018 μg/0.1 ml) から反応を示した。また反応の強さも精製 RDV から調製した RDV-RNA に対する反応と同じであった (Table 1)。罹病イネ核酸から分画された DNA, tRNA, rRNA の各分画も反応を示したが供試抗血清は 2 本鎖 RNA に対してのみ特異的に反応すること、さらに健全イネ核酸から分画された DNA, tRNA ならびに rRNA の反応がきわめて弱いなどから、罹病イネ核酸のこれらの分画における反応はおもに RDV-RNA の混入によるものと思われる。以上の結果から抗 PolyA·PolyU-MBSA 血清ならびに抗 PolyI·PolyC-MBSA 血清に対する罹病イネ核酸中の反応物質の主体は RDV-RNA であることが確かめられた。

考 察

抗 PolyA·PolyU-MBSA 血清ならびに抗 PolyI·PolyC-MBSA 血清は一般に 2 本鎖 RNA に対してきわめて特異的に反応することから、数種のウイルスにおいて罹病組織中のウイルス 2 本鎖 RNA の検出

ならびに定量に用いられてきた。しかしながら抗血清標品によっては 1 本鎖 RNA ならびに DNA に対しても反応するという報告もあり⁴⁾、抗血清標品によって特異性に差異があるように思われる。

そこで、本研究に用いた抗血清の反応性における特異性を研究したが抗 PolyA·PolyU-MBSA 血清ならびに抗 PolyI·PolyC-MBSA 血清のいずれも 2 本鎖 RNA とのみ反応し、供試した 1 本鎖 RNA ならびに DNA とはまったく反応を示さなかった。本研究では筆者らの調製した抗血清標品と Lacour ら⁴⁾ のそれとの特異性の差異が抗原の調製技術によるものか、または遺伝的要因にもとづくウサギの個体差によるものかは明らかにできなかったがきわめて興味深いことである。

つぎにこれらの抗血清を用いて罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸の反応性を比較したところ、罹病イネ核酸が特に強く反応し、両者の反応性に顕著な差異が認められた。さらに罹病イネ核酸を MAK カラムクロマトグラフィーによって分画し、各分画の反応性を調べたところ、RDV-RNA 分画に特に強い反応が認められた。また、DNA, tRNA ならびに rRNA の各分画に対してもわずかに反応が認められたが、供試抗血清は 2 本鎖 RNA に対してのみ特異的に反応する

ことから、これらの分画における反応は RDV-RNA の混入によるものと思われる。したがって罹病イネ核酸における反応物質の主体は RDV-RNA であると結論できる。

一方、健全イネ核酸中にもきわめて微量な反応物質の存在することが認められた。すでに Stollar^{15,16)} らもウイルスに感染していないヒト KB 細胞、ハムスター BHK 21 細胞ならびにトマト葉から抽出した核酸中に微量の反応物質があることを確認しており、これはウイルスに感染していない細胞中にもきわめて微量の2本鎖 RNA が存在するためであると報告している。本研究における健全イネ核酸中の反応物質については詳しい実験を行っていないが供試抗血清の反応性における特異性から健全イネ中にもきわめて微量の2本鎖 RNA が存在する可能性もある。

以上の研究から免疫学的方法によって RDV 罹病イネ核酸中の RDV-RNA を特異的に検出できることが証明された。また、この免疫学的方法をさらに研究することにより、これらの抗血清に対する精製 RDV から調製した RDV-RNA の反応の強さを対照として、罹病イネ核酸中の RDV-RNA を正確に定量することも可能であると考え。したがってこの方法は、(1) 罹病イネ核酸から RDV-RNA を分離しなくとも RDV-RNA のみを特異的に検出できること、(2) ng 単位のごく微量な RDV-RNA の検出が可能であることなどの特徴があり、きわめて有用な方法である。

摘 要

2本鎖 RNA に対して特異的に反応する抗 PolyA・PolyU-MBSA 血清ならびに抗 PolyI・PolyC-MBSA 血清を用いてイネ萎縮病ウイルス罹病イネ中のウイルス RNA の検出を補体結合反応によって研究した。

これらの抗血清に対する罹病イネ核酸ならびに健全イネ核酸の反応性を比較したところ罹病イネ核酸はきわめて強い反応を示したが、健全イネ核酸では罹病イネ核酸の66倍の抗原量を用いないと反応が認められなかった。すなわち両者の反応性に顕著な差異が認められた。

つぎに罹病イネ核酸における強い反応性が RDV-RNA によることを証明するために、メチル化アルブミンカラムによって罹病イネ核酸を RDV-RNA, DNA, tRNA, rRNA の各分画に分け、各各に対する反応性を調べた。その結果、RDV-RNA 分画に対し

て特に強い反応を示すことが確認された。

したがって、この免疫学的方法によって罹病イネ核酸から RDV-RNA を分離しなくとも RDV-RNA の検出ができ、さらに、ng 単位のごく微量な RDV-RNA が検出できるのできわめて有用な方法である。

引用文献

- 1) Francki, I. B. and Jackson, A. O. (1972). *Virology* 48: 275-277.
- 2) 木村郁夫・児玉忠士・鈴木直治 (1968). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 34: 206.
- 3) Kodama, T., Kimura, I. and Suzuki, N. (1967). *Biochemical regulation in diseased plants or injury: (Hirai, T. et al. eds.)* *Phytopath. Soc. Japan, Tokyo* pp. 59-70.
- 4) Lacour, F., Michelson, A. M. and Nahon, E. (1968). *Nucleic Acids in Immunology (Ed. Plescia, O. J. and Braun, W.)* pp. 32-46. Springer-Verlag, New York.
- 5) 松本 勤・村山大記 (1972). *北大農邦文紀要* 8: 132-174.
- 6) 松本 勤・奥原英二 (1972). *生化学* 44: 408 (講要).
- 7) Miura, K., Kimura, I. and Suzuki, N. (1966). *Virology* 28: 571-579.
- 8) Moffitt, E. M. and Lister, R. M. (1973). *Ibid.* 52: 301-304.
- 9) Plescia, O. J., Braun, W. and Palczuk, N. C. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52: 279-285.
- 10) Plescia, O. J., Strampp, A. and Kwiatkowski, Z. (1969). *Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 28: 695 (Abst.).
- 11) Schur, P. H. and Monroe, M. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63: 1108-1112.
- 12) Schwartz, E. F. and Stollar, B. D. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35: 115-120.
- 13) Silverstein, S. C. and Schur, P. H. (1970). *Virology* 41: 564-566.
- 14) Stollar, B. D. (1970). *Science* 169: 609-611.
- 15) Stollar, B. D. and Diener, T. O. (1971). *Virology* 46: 168-170.
- 16) Stollar, V. and Stollar, B. D. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 65: 993-1000.
- 17) Stollar, B. D. and Stollar, V. (1970). *Virology* 42: 276-280.
- 18) ウイルス実験学総論 (国立予防衛生研究所学会友会編) 丸善, 東京 pp. 196-228.