植物ウイルス抗原抗体反応の電子顕微鏡観察

四方英四郎*・小島 誠*

Eishiro SHIKATA* and Makoto KOJIMA*: Immune Electron
Microscopy of Plant Viruses

Abstract

Electron microscopic detection of rod-shaped (tobacco mosaic virus) and elongated viruses (potato virus X, bean yellow mosaic and bean common mosaic viruses) by leaf-dip serology was carried out. Antigen antibody reaction was clearly observed when homologous antisera were used, but not when unrelated sera were used. Individual particles reacted with the specific antibodies appeared rough surface and increased their width. Aggregates of tobacco mosaic virus particles were frequently shown in the homologous antiserum mixture. Immune electron microscopic observation of small isometric viruses, such as potato leafroll and soybean dwarf viruses revealed specific clumping in homologous reaction, but not in heterologous reaction, when purified preparations of both viruses and their antibodies were mixed. The role of IgM and IgG antibodies in serological reactions of bean yellow mosaic virus and potato leafroll virus was studied by both ring interface test and immune electron microscopy. The results showed that IgG component could be responsible for the homologous reaction.

(Received October 20, 1977)

緒 言

抗原抗体反応を電子顕微鏡（以下電顕）で観察する試みは、Andersonらによるタバコモザイクウイルスとその抗血清を用いた実験が最初である²⁾。しかし、その超微構造はBrennerらによるネガティブ染色法⁶⁾の開発によってようやく明らかにされた。Laffertyらはインフルエンザウイルスを用い、その抗原抗体反応をネガティブ染色により観察し、超微構造を明らかにした¹⁰⁾。また、Lawnは *Salmonella typhimurium* の鞭毛について、その抗原抗体反応の像をネガティブ染色で示した¹¹⁾。植物ウイルスではBallらが、dip法⁵⁾に抗原抗体反応を導入し、直接電顕でウイルスを同定する leaf-dip serology を提唱した³⁾。電顕の普及に伴い、植物ウイルスの同定に dip 法によるウイルス粒子の観察が一般化してきたが、Potyvirus 群などのように同じ形態を持つウイルスの場合、dip 法だけでウイルスを同定することは困難である。その点、ウイルスに対する特異抗体を使用する leaf-dip

serology は、特異性が明確で、個々の粒子の同定ができるので、ウイルス検出精度が高く、きわめて有用な方法と考えられる。

本報告は、桿状、糸状、小球形など数種植物ウイルスを用い、それらウイルス抗血清との反応をネガティブ染色により観察した結果をとり纏めたものである。また、一部のウイルスについては、抗血清から分離した免疫グロブリン各成分との反応についても検討した。

材料および方法

供試ウイルス 桿状ウイルスとしてタバコモザイクウイルス (TMV-OM)，糸状ウイルスとしてジャガイモ X ウイルス (PVX)，インゲン黄斑モザイクウイルス (BYMV-CS)，インゲンモザイクウイルス (BCMV)，小球形ウイルスとしてジャガイモ葉巻ウイルス (PLRV)，ダイズ矮化ウイルス (SDV-D) を用いた。

供試抗血清 実験には当教室保存の以下の各抗血

* 北海道大学農学部 Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

清を用いた。抗 TMV 血清（沈降反応混合法による力価1/512¹⁵⁾）、抗 PVX 血清（microprecipitin test による力価1/8192¹²⁾）、抗 BYMV-CS血清（重層法による力価1/1024¹⁸⁾）、抗 PLRV 血清（重層法による力価1/4096¹⁴⁾）、抗 SDV-D 血清（重層法による力価1/2048⁹⁾）の4種である。

血清反応と電顕観察 PLRV, SDV 以外のウイルスについては、直接罹病植物の葉片を用い、支持膜上の抗血清（酢酸アンモニウムで1,000倍に希釈）に dip し、温室条件で40°C, 30分間反応させた。支持膜はカーボン蒸着ホルムバール膜を glow discharge 処理し、膜面を親水性にしたものを使用した⁷⁾。反応後、2%PTA (pH 7.0) でネガティブ染色した。

PLRV, SDVについては、感染植物からそれぞれ精製した試料を使用した。最終沈渣を少量の酢酸アンモニウムで懸濁し、希釈抗血清を加え、4°Cで16時間小試験管内で反応させた。反応液をよく振って、一部を支持膜上にのせ、2%PTAによる染色をした。試料は JEM100B (80KV) 電顕で観察した。

免疫グロブリンの分離 抗 BYMV-CS 血清、抗 PLRV 血清を用い、Sephadex G200 によるゲル濾過法¹⁷⁾により免疫グロブリン各成分を分離した。下降式カラム (26.4×350mm) に抗血清1mlを重層し、0.1MTris-HCl (1M NaCl, 0.002% sodium azide を含む, pH8.0) で、流速10-20ml/hr で4°Cで溶出を行なった。各成分は電顕による実験の前に、重層法により力価の測定を行った。その後、抗体各成分は0.001M 酢酸アンモニウムに対して透析し、抗原抗体反応に供した。

結 果

抗血清との反応

桿状ウイルス 桿状ウイルスとして、TMV を用いた抗原抗体反応の結果、TMV 粒子が太くなり、その表面は抗体の付着によって粗面となった。また、抗体による粒子の凝集が見られ、凝集塊の周辺が濃く染り、個々の粒子のコントラストが低下した（図版 I-a）。一方、抗 TMV 血清中に PVX を単独あるいは TMV と同時に dip した場合、PVX 粒子の表面は平滑で、抗体の付着は認められなかった（図版 I-b）。

糸状ウイルス 抗 PVX 血清中に PVX を dip すると、ウイルス粒子の表面に抗体が均一に付着し、TMV の場合ほど粗面にならなかった（図版 I-c）。

上記実験と逆に、抗 PVX 血清中に TMV を単独または PVX と同時に dip した場合、TMV 粒子の表面

は平滑で、凝集もみられなかった（図版 I-d）。

次に、BYMV について反応を観察したが、TMV と PVX との中間的なものであった。すなわち、粒子全体を抗体が包んでいたが、PVX の場合ほど密ではなかった（図版 I-e）。heterologous な組合せとして、抗 BYMV 血清中に、TMV, BYMV と形態が同一の BCMV を加えても、抗体の付着がなく、粒子のコントラスト低下もみられなかった（図版 I-f, g）。

小球形ウイルス 精製 PLRV 粒子は抗 PLRV 血清（100倍希釈）と反応して立体的な凝集塊（clump）を形成し、個々の粒子のコントラストは低下した（図版 I-h）。対照として、抗 PLRV 血清に SDV を加えた場合、特異的な凝集塊はみられなく、粒子は分散していた。一方、逆に抗 SDV 血清（100倍希釈）中では SDV 粒子は同じく立体的な凝集塊を形成した。抗 SDV 血清による PLRV 粒子の凝集は認められなかった。

いずれの場合でも、抗血清をより希釈した場合（500-1,000倍）、数個のウイルス粒子が抗体により連結している像が観察された（図版 I-i）。

IgG 抗体との反応

BYMV の反応 Fig. 1 は抗 BYMV 血清のセファデックスゲル濾過クロマトグラフィーの結果である。ピーク I は IgM 分画、ピーク II は IgG 分画、ピーク III はアルブミン分画を示す。各分画につき、重層法により血清反応の有無を検討したところ、IgG 分画にのみ反応が認められ、その力価は1/4096であった。

次いで、精製ウイルス試料に IgM, IgG 分画をそれぞれ加え、37°Cで30分間小試験管中で反応させたのち、ただちにそれぞれを支持膜にとり、PTA 染色後、電顕観察した。その結果、重層法同様、IgG 分画とのみ反応が見られ、その像は抗血清との反応と同様であった（図版 II-b）。すなわち、ウイルス粒子の全面を被うように IgG 抗体が付着している。個々の IgG 抗体の付着の様子は判然としないが、BYMV 粒子の幅150-170Åに対して、反応後の粒子の幅が300-350Åと増大していることから、抗体部分の長さはおよそ75-90Åと計算された。

PLRV の反応 上記同様、抗 PLRV 血清から、セファデックスゲル濾過により、免疫グロブリン各成分を分離した（Fig. 2）。重層法による力価測定の結果、IgG 分画のみ反応し、力価は1/2048であった。透析後、精製ウイルス試料に各 IgM, IgG 分画を加え、4°Cで16時間、小試験管中で反応させた。電顕観察の結果、上記実験同様、IgG 抗体とのみ反応がらみ

Fig. 1. Gel filtration on Sephadex G 200 of antiserum against bean yellow mosaic virus.

Fig. 2. Gel filtration on Sephadex G 200 of antiserum against potato leafroll virus.

れた。IgGのみによっても、特異的な粒子の凝集塊が認められた（図版Ⅱ-e,f）。高濃度で反応させた場合、IgG抗体が粒子の表面に付着して、いわゆる“halo”を呈している像が認められた（図版Ⅱ-f）。PLRV粒子の直径約320Åに比べて、反応後の粒子の直径（haloを含む）は約700Åと増大し、付着しているIgG抗体の長さ約190Åと計算された。

考 察

ネガティブ染色により、桿状、糸状、小球形ウイルスに特異的な抗原抗体反応像が電顕で容易に観察され

た。従来のdip法では識別できなかった同一形態を有するウイルスの検出も特異抗体の使用により、正確かつ簡便に行なうことができた。本実験の結果からleaf-dip serology³⁾の有用性を指摘したい。

ただし、この際、使用する支持膜上のウイルスの均一な分散が重要である。すなわち、カーボン蒸着膜は疎水性であるため、染色液の分散が悪く、均一にウイルスが分散した試料を得ることが困難である。本実験では試料の分散を良くするため、glow discharge処理により、膜表面を親水性にした支持膜を使用した^{7,13,16)}。

小球形ウイルスについては、PLRV, SDVの精製試料を用い、その抗体との反応の様相を観察したにとどまるが、大小種々の凝集塊 (clump) の形成が顕著であったことから、これら低濃度で検出の困難とされているウイルス群についても、抗血清が得られるならば、leaf-dip serology によるウイルス検出も可能となるものと考えられる。

数種植物ウイルスを用いた実験で、homologous な反応には IgG 抗体が、heterologous (血清学的類縁関係が弱い) な弱い交叉反応には IgM 抗体が関与していることが指摘されている⁴⁾。また動物ウイルスのあるものでは、homologous な反応においても IgM 抗体が直接関与する場合も知られている¹⁾。植物ウイルスでも、キュウリモザイクウイルスがその IgM 抗体と反応することが報告されている⁸⁾。しかし、その報告の中では IgG 抗体の反応性については言及していないので、IgG 抗体との反応の有無は明らかでない。本実験においては、抗 BYMV, 抗 PLRV 各血清からの免疫グロブリン各成分との反応から、homologous な反応においては、IgG 抗体が主として関与していることが判明した。IgM 抗体に関しては全く反応に関与していないのかどうか、詳細な検討が必要である。

ネガティブ染色による電顕像から、IgM, IgG 抗体による反応の差異は、反応しているウイルス粒子間の間隔がひとつの目安となる。すなわち、IgM が関与している場合、IgG の場合より、その間隔が広く、紐状構造が認められる¹⁾。BYMV での実験では IgG 抗体に相当する長さが 75-90 Å で、PLRV の実験では 190 Å と、かなりその大きさに差が認められた。wart virus や polyoma virus 実験例では、IgG 抗体は直線状の構造で、その大きさは 35-40×250 Å であると報告されている¹⁾。一方、IgG 抗体そのものの構造に関する研究では、35×120~150 Å と報告されている¹⁹⁾。IgG 抗体の大きさ、その反応部位、抗原との連結様式などについては今後さらに検討を加えたい。

電顕下でその反応を観察する場合でも、抗原抗体反応はそれぞれの濃度によって、その様相が異なる。このことについて Almeida らは次のように説明している¹⁾。すなわち、抗原過剰域では、抗体付着が少なく、抗体の両端が各抗原に結合して、余り大きな凝集塊を形成しない。一方、抗体過剰域では、個々の抗原の周囲が抗体により完全に被われ (球形粒子では halo を呈する)、そうした粒子が不規則に立体的に絡り合うため、個々の粒子は不鮮明で、コントラストも低下する。最適域では、抗体が抗原にほどよく結合し、架橋反応により、連結が大きくなり、比較的大きな凝集塊が形成される。この説明に符合するような像が、PLRV と IgG 抗体との反応で得られている (図版 II-e, f)。以上の点からみて、leaf-dip serology などには、できるだけ希釈した抗血清 (重層法などによる希釈終末点近傍) の使用が望しいと思われる。それにより、凝集塊も適当な大きさになるため、像も明るく、反応が鮮明に観察される。

摘 要

leaf-dip serology により、タバコモザイクウイルス、ジャガイモ X ウイルス、インゲン黄斑モザイクウイルスの検出を行なった。いずれの場合も、特異抗体がウイルス粒子表面に付着し、粗面となり、コントラストが低下した。TMV では粒子の凝集塊が顕著に観察された。各ウイルスは異種抗血清中では全く反応が認められなかった。また、ジャガイモ葉巻ウイルス、ダイズ矮化ウイルスなど小球形ウイルスにつき精製試料を用い、それら特異抗血清との反応を観察したところ、大小種々の凝集塊が容易に見出された。抗 BYMV 抗 PLRV 各血清からの免疫グロブリン各成分の反応性を重層法と免疫電顕法で調べたところ、両ウイルスとも IgG 抗体とのみ反応した。その反応像は、前記抗血清との反応と同様であった。

引 用 文 献

1. Almeida, J. D. and Waterson, A. P. (1969). Adv. Virus Res. 15: 307-338.
2. Anderson, T. F. and Stanley, W. M. (1941). J. Biol. Chem. 139: 339-344.
3. Ball, E. and Brakke, M. K. (1968). Virology 36: 152-155.
4. Bercks, R., Querfurth, G. and Lessemann, D. (1974). Phytopath. Z. 80: 233-243.
5. Brandes, J. (1957). Nachrbl. deut. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) 9: 151-152.
6. Brenner, S. and Horne, R. W. (1959). Biochim. Biophys. Acta 34: 104-110.
7. 深井孝之助・保坂康弘・西村昭子 (1972). J. Electron Microscopy 21: 331-332.
8. 桐山 清 (1972). 盛岡たばこ試報告 8: 39-98.
9. Kojima, M. and Tamada, T. (1976). Phytopath. Z. 85: 237-250.

10. Lafferty, K. J. and Qertelies, S. (1963). *Virology* 21 : 91-99.
11. Lawn, A. M. (1967). *Nature (London)* 214 : 1151-1152.
12. 李淳炯・仙北俊弘・小島 誠・四方英四郎 (1976). *日植病報* 42 : 92-93. (講要)
13. Milne, R. G. and Luisoni, E. (1975). *Virology* 68 : 270-274.
14. Murayama, D. and Kojima, M. (1974). *Proc. Japan Acad.* 50 : 322-327.
15. 村山大記・横山竜夫・川村明義・川島豊作 (1965). *日植病報* 30 : 131-135.
16. 中曾根恒一・仙北俊弘・小島 誠・四方英四郎 (1977). *北大邦文紀要* (印刷中)
17. 高橋守信 (1973). *免疫化学* (右田俊介編) 中山書店, 東京 pp. 78-85.
18. Uyeda, I., Kojima, M. and Murayama, D. (1975). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 41 : 192-203.
19. Valentine, R. C. and Green, N. M. (1967). *J. Mol. Biol.* 27 : 615-617.

Explanation of plates

Plate I

- a-b. Electron micrographs of leaf-dip preparations mixed with antiserum against tobacco mosaic virus (TMV).
 TMV rods are attached with the homologous antibodies (a).
 Potato virus X (PVX) particles remain clear (b, arrow).
 PTA stain $\times 84,000$
- c-d. Electron micrographs of leaf-dip preparations mixed with antiserum against PVX. PVX particles are attached with the homologous antibodies (c).
 Two PVX particles are combined and covered with antibodies, and TMV rod remains clear (d, arrow). PTA stain $\times 84,000$
- e-g. Electron micrographs of leaf-dip preparations mixed with antiserum against bean yellow mosaic virus (BYMV).
 BYMV particles are attached with the homologous antibodies (e).
 Bean common mosaic virus particles remain clear (f).
 BYMV particle is covered with antibodies but TMV rod remains clear (g, arrow).
 PTA stain e, f $\times 75,000$; g $\times 52,500$
- h-i. Electron micrographs of purified preparation of potato leafroll virus (PLRV) mixed with its antiserum.
 Homologous antigen-antibody complex with a relatively large PLRV aggregate (h).
 A small clumping of PLRV particles (i). PTA stain $\times 84,000$

Plate II

- a-b. Electron micrographs of purified preparation of BYMV.
 BYMV particles are coated with IgG antibodies (b) and BYMV particles without antibodies (control) (a). PTA stain $\times 200,000$
- c-d. Electron micrographs of purified preparation of PLRV.
 PLRV particles without antibodies showing a clear hexagonal profile (c).
 Each particle in a three-dimensional aggregate without antibody shows a clear profile as compared with e and f (d).
 Particle structure in the homologous reaction is not clearly seen. A clump of each particle is made by bridging side by side with IgG antibodies (100-fold dilution) (e).
 Virus particles are thoroughly coated with IgG antibodies (undiluted), showing "halo" patterns. PTA stain c $\times 200,000$; d $\times 120,000$; e $\times 20,000$; f $\times 125,000$