螢光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の 研究 IV. キュウリモザイクウイルスの タバコにおける全身感染過程の追跡

細川大二郎*・森 寛一**

Daijiro HOSOKAWA* and Kanichi MORI**: Studies on Multiplication
and Distribution of Viruses in Plants by the Use of Fluorescent
Antibody Technique IV. Process of Systemic Infection in
Tobacco Plants Inoculated with Cucumber Mosaic Virus

Abstract

Multiplication and distribution of cucumber mosaic virus during the development of systemic infection in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) inoculated to the middle leaf were investigated by the use of fluorescent antibody technique. After the virus multiplied in the inoculated leaf, the virus antigen was first detected in the upper stem and leaves, and later in the lower stem and roots. In the early stage of a long distance movement of the virus, the virus antigen was first observed in separate areas along the phloem. This mode of virus movement differed from that in the parenchyma tissue, in which the virus moved from cell to cell, suggesting that the virus move a long distance through sieve tubes. Thereafter the virus progressively spread from the infection site in the phloem to surrounding tissues and caused the systemic infection. In the upper leaves, the appearance of symptoms such as vein clearing and yellowing followed the distribution of virus antigen in the tissues. After the virus antigen had distributed throughout all the tissues in a certain part of the plant, it gradually decreased.

(Received August 13, 1982)

Key Words: CMV, *Nicotiana tabacum*, fluorescent antibody technique.

緒 言

ウイルス病の多くは、全身感染の状態となる。これは宿主体内に侵入したウイルスが細胞内での増殖と細胞間の移行とをくりかえして全身に広く分布するためである。このような感染様式はウイルス感染の特徴の一つであり、このためウイルスの全身への感染については、すでに多くの研究がある。これらによってウイルスの全身への移行順序（方向）、その速度や通路などが明らかにされた¹⁾。しかし、組織・細胞学的な面

からの研究は比較的少なく、宿主植物に侵入したウイルスが組織・細胞内でどのような分布状態をとって全身的な感染がおこるかなどについては十分明らかにされていない。本実験においては、キュウリモザイクウイルスとタバコの組合せについて、全身的な感染がおこる過程での植物体内におけるウイルスの増殖・分布を螢光抗体法を用いて組織・細胞学的な面から追跡した。

本報告をとりまとめるにあたり東京大学農学部教授 與良 清博士（現玉川大学農学部教授）、当研究室教授

* 東京農工大学農学部 Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

** 現在：日本きのこ研究所 Present address: Mushroom Research Institute of Japan, Kiryu, Gunma 376, Japan.

高坂津爾博士（現植物防疫協会），同助教授 渡辺 実博士（現教授）には種々御指導を賜わった。ここに衷心より感謝の意を表する。

材料および方法

ウイルスはキュウリモザイクウイルス黄斑系(CMV-Y)を用い，接種は感染タバコ葉の搾汁液を接種源として摩擦接種法により行った。ウイルスの増殖・分布の追跡に用いたタバコ（品種 Xanthi）は第8葉が完全展開した時期に第7葉に CMV を接種し，温室内（自然温度）に置き，その後，経時的に毎回3～5個体を用い，Fig. 1 に示す部位から葉では中央部から0.5～1×1cmの大きさに，茎，葉柄では1cmの長さに，根では側根の基部，中央部及び先端部から1cmの長さに組織片を切り採った。これらの組織片は生のまま40～45℃に溶解した20%ゼラチンに入れて固めたのち，前報の方法⁸⁾によって，凍結切片（厚さ30～40μm）を作製して，蛍光抗体で染色し，組織内におけるウイルス抗原の分布を追跡した。蛍光抗体は前報⁸⁾と同様のものを用いた。

結 果

Fig. 1 に示す I～Ⅶの各部位における特異蛍光の分布状態を特異蛍光が観察された時期が早い順に記す。

接種葉 (Fig. 1-IV)：接種1日後には特異蛍光が葉の表皮の最初の感染部位から葉内にかなり拡く分布して観察された。この時期にはすでに特異蛍光が維管束部に達している場合もしばしば観察された。その後，ウイルス抗原は前報⁸⁾に記したと同様の経過で葉内に広く拡がった。接種4日後には葉内のほとんどの細胞に特異蛍光が認められ，その輝度も増した。その後しばらくは，組織・細胞内の特異蛍光の分布状態および輝度にはほとんど変化がなかったが，接種8日後には細胞内の特異蛍光の輝度が低下し，12日後には葉内に特異蛍光を示さない細胞が多数観察された。この場合，ウイルス抗原は表皮および柵状組織の細胞で認められなくなるのが早く海绵状組織の細胞では若干遅い傾向があった。個々の細胞の内部では，特異蛍光はいずれの部位からでも，ほぼ同時に認められなくなるようであった。

接種葉の上部の茎 (Fig. 1-II)：タバコは複並立維管束であり，茎の横断切片では木部の内外に内部節部と外部節部がみられ，維管束の内側には髄が外側には皮層，表皮がみられる。ウイルス抗原は接種4日後に

節部の細胞に最初に観察された (Plate I-1, 4)。この場合，ウイルス抗原は内外両節部にほぼ同時に観察され始めたが (Plate I-1, 5)，この時期に特異蛍光が茎内のすべての節部に同時に認められることはなかった。特異蛍光の認められる節部は茎内の一部にかたよっており (Plate I-5)，これらの節部は直接接種葉に連絡している節部であろうと推察された。またこの時期に茎の縦断切片をみると特異蛍光の認められる部分は節部に沿い 300μm から 1cm あるいはそれ以上の間隔をおいて，分布しているのが観察された (Plate I-1, 2)。その後，特異蛍光は節部から周囲の細胞へ拡がった (Plate I-2)。接種7～8日後には導管を除いて茎内のほとんどの部位に特異蛍光が認められるようになり (Plate I-3, 6)，表皮では毛茸細胞にも強い特異蛍光が認められた (Plate I-3)。

この時期から接種10日後頃までは，茎組織内の特異蛍光の分布状態とその輝度にはほとんど変化がなかった。しかし，その後は細胞内の特異蛍光の輝度が低下した。

接種葉の上位の未展開葉 (Fig. 1-I)：これらの葉

Fig. 1. Diagram of a tobacco plant (cv. Xanthi) examined by means of fluorescent antibody technique. IV: Inoculated leaf.

には接種5日後に葉脈透化がみられ、その後、2～3日間に葉身全体が退緑黄変した。これらの葉では、特異蛍光が接種4日後に中央脈、2次脈および2次間脈などの節部細胞に最初に観察された(Plate I-7)。しかし、この場合、特異蛍光の認められた葉脈は少数であった。接種5日後にはさらに多くの葉脈に特異蛍光が認められるようになり、特異蛍光が節部からその周囲の細胞、さらに lamina へと拡がった(Plate I-8)。そして、この時期の葉では葉脈透化が明瞭に認められた。その後、ウイルス抗原は lamina へ広く分布し(Plate I-9)、接種7～8日後には葉身のほとんどの細胞に特異蛍光が観察されるようになった(Plate II-1, 2)。これに伴って lamina にも退緑黄変の病徴が拡がった。このようにして、葉身全体に特異蛍光が認められるようになってからしばらくの間は葉内における特異蛍光の分布状態とその輝度には著しい変化は認められなかった。しかし、接種12～15日後になると葉内の特異蛍光の輝度が低下し、やがて葉内に特異蛍光を示さない部位が広く観察されるようになった。この場合、葉内のウイルス抗原が減少しても、葉の病徴はほとんど変化しなかった。

接種葉の上位の完全展開葉 (Fig. 1-III)：葉には葉脈透化や退緑の病徴は現われなかったが、ウイルス抗原は接種4～5日後に検出され始め、その後の組織内での分布経過はIの葉とほぼ同様であった。またこの葉の葉柄 (Xanthi タバコは無葉柄とされているが、葉基部の中央脈が太い部位を葉柄とした) でも、接種4～5日後に向軸方向及び背軸方向の少数の節部に最初に特異蛍光が認められ (Plate II-3)、その後周囲の細胞へ拡がって、組織全体に感染がおこるのが観察された (Plate II-4)。

接種葉の下部の茎 (Fig. 1-VI)：横断切片でみると、多数の導管が輪状に配列し、その内外両側に節部が認められるが、特異蛍光は接種6日後にこれらの節部に最初に認められた。特異蛍光は外部節部からは皮層および表皮へ、内部節部からは髄へ拡がり、接種8～10日後頃には、この部位の導管以外の柔組織全体に特異蛍光が認められるようになった。

根 (Fig. 1-VII)：根では特異蛍光が接種6日後に基部の節部近傍に最初に認められ (Plate II-5)、その後、時間の経過とともに、周囲の細胞に拡がった。接種8日後には、根端部以外のほとんどの部位に特異蛍光が認められた (Plate II-6)。

接種葉の下位の葉 (Fig. 1-V)：ウイルス抗原は接種7～8日後に節部とその近傍に観察され、その後、

周囲の細胞へ分布した。

考 察

ウイルスが全身感染する場合に、遠隔部で最初に感染がみられるのが、節部細胞であることはすでに他のウイルスでも認められているが^{4,5,9)}、CMV の場合にもタバコの遠隔の茎・葉・根のいずれの部位でもウイルス抗原が初め節部の細胞に認められ、その後、そこから周囲の組織へ拡がり全身感染のおこる様子が観察された。

この場合、遠隔部へウイルスが移行し始めた時期には、植物体内で感染部位が節部に沿って種々の間隔を置いて断続的に生じているのが認められた。すでに、Samuel,¹⁰⁾ Kunkel,⁷⁾ Capoor²⁾ もウイルスが遠隔部へ移行する初期には、中間に非感染部位が生じることを接種検定により認めているが、組織学的にもこの状態が観察された。前述のように葉肉組織などの普通の柔組織内をウイルスが移行する場合には、細胞から細胞へと感染が連続的に進行することが認められたので、このようにウイルスの遠隔部への速い移行の場合に中間に非感染部位が生じたのは、ウイルスが節部柔細胞ではなく節管を通して、柔細胞とは異なる様式で移行するためと考えられる。すなわち、この場合、ウイルスの移行速度が速いことから、ウイルスは節管内を増殖することなく移行すると考えられているが¹¹⁾、成熟した節管は原形質が大部分退化し、内部のほとんどは節管液が充満し、また節管の細胞は篩孔により互いに連絡している³⁾ ので、ウイルスは節管内を増殖することなくそのまま遠隔部へ移行でき、そこで隣接する柔細胞に侵入して初めて増殖するため、感染部位が節部に沿って断続的に生じるものと思われる。しかし、この節部に断続的にみられる最初の感染部位は節部の特別な部位であるとは思われなかった。むしろウイルスは節管の多くの部位から隣接細胞へ侵入できると考えられ、ウイルスが遠隔部へ移行し始めた時期には、接種葉から節管に入るウイルスの量が少ない上に節管液の速い流れとともに体内に拡がるため、節管から隣接細胞へ侵入する機会は少なく、感染部位が断続的に生じるものと思われる。

ウイルスは植物体中を遠隔部へ移行する場合に接種葉から最初茎の基部および根の方向へ移行し、その後に上部の茎、葉に節部に沿って移行するという説¹⁰⁾と、上部の茎葉と茎基部および根の両方向に同時に移行するという説^{3,7)}とがある。しかし、本実験ではウイルス抗原は上部の茎と葉で早く検出され、茎の基部、

根ではこれよりおそかった。これまでこの種の実験では植物体のそれぞれの部位を経時的に切り取って一定期間培養し、ウイルスの有無が調べられている。この場合、その部位へ移行したウイルスが少量であっても、培養により増殖するので、その部位へのウイルスの移行の有無を調べることができる。しかし、蛍光抗体法では、接種葉から節管を経由して遠隔部へ移行したウイルスが節管からその隣接細胞へ侵入し、そこでかなりの量まで増殖したのちに、初めてその部位へのウイルスの移行が検出できる。したがって観察結果からは上記の下部と上部への移行速度の差については明らかにできなかった。しかし、次のことは推察される。すなわち、上部の茎や新葉では節管内を移行してきたウイルスが、隣接の柔細胞に容易に侵入し、そこで活発に増殖する。しかし、茎基部や根ではウイルスが節管から隣接柔細胞へ侵入するのに時間がかかるか、あるいは細胞内での増殖がおそい。

CMV 黄斑系がタバコに感染すると、展開しつつある上位葉に葉脈透化の症状が最初に観察され、その後、lamina の部位にも退緑黄変の症状が広がるが、これは、ウイルスが接種葉から節管を経由して上位葉に移行し、節部の周囲の組織で最初に増殖し、その後、lamina の部分へ広がったためであり、これらの葉での病徴の出現が組織内でのウイルスの増殖・分布と密接に関連していることが認められた。

CMV では感染組織から検出されるウイルス活性が後期に低下することが知られているが¹²⁾、本実験でも

タバコ体内の各部位で、ウイルス抗原が組織内に広く分布したのち、減少することが認められ、ウイルス活性の低下と同時にウイルス抗原の減少もおこっているようであった。

摘 要

キュウリモザイクウイルス (CMV) をタバコの中位葉に接種し、全身への感染がおこる経過を蛍光抗体法を用いて組織・細胞学的な面から追跡した。遠隔のいずれの部位においても、ウイルス抗原は最初節部に認められ、その後そこから周囲の組織へ拡がり、全身感染のおこる状態が観察された。ウイルスが遠隔部へ移行・増殖し始めた時期には、ウイルス抗原が節部にそって、300 μ m から 1cm あるいはそれ以上の間隔において断続的に認められた。この結果は、ウイルスが葉肉組織など通常の柔組織を拡がる場合には、ウイルス抗原の認められない細胞が中間に生じることにはなかったため、ウイルスが遠隔部へ移行する際には、節部柔細胞ではなく節管内を、柔細胞の場合とは異なる様式で移行していることを示していると思われた。遠隔部でウイルス抗原が検出され始める時期は、接種葉より上位の茎と葉で早く、下位の茎、葉および根では遅かった。上位の葉では葉脈透化および lamina の退緑病徴が、組織内のウイルスの拡がりにもなって現れた。いずれの部位でもウイルス抗原は組織内全体に広がったのち、日数が経過すると減少した。

引用文献

1. Bennett, C. W. (1956). Ann. Rev. Plant Physiol. 7: 143-170.
2. Capoor, S. P. (1949). Ann. appl. Biol. 36: 307-319.
3. Esau, K. (1977). Anatomy of Seed Plants. John Wiley and Sons, New York and London, 550 p.
4. Hatta, T. and Matthews, R. E. F. (1974). Virology 59: 383-396.
5. 日野稔彦・吉井 甫 (1968). 日植病報 34: 61-68.
6. 細川大二郎・森 寛一 (1982). 日植病報 48: 441-451.
7. Kunkel, L. O. (1939). Phytopathology 29: 684-700.
8. 森 寛一・細川大二郎・渡辺 実 (1982). 日植病報 48: 433-443.
9. 村山大記・横山竜夫・川村明義・川島豊作 (1965). 日植病報 30: 131-135.
10. Samuel, G. (1934). Ann. appl. Biol. 21: 90-111.
11. Schneider, I. R. (1965). Adv. Virus Res. 11: 163-221.
12. 都丸敬一 (1967). 秦野たばこ試報告 58: 19-26.

Explanation of Plates

Plate I.

Distribution of the virus antigen in tobacco plant inoculated to middle leaf with cucumber mosaic virus. Areas containing the virus antigen show yellow-green fluorescence.

1. Longitudinal section of the upper stem 4 days after inoculation. The virus antigen (arrows) was first detected in separate areas along the phloem. $\times 60$.
2. Longitudinal section of the upper stem 4 days after inoculation. Virus antigen has spread from the initial infection site of phloem to the surrounding tissues. $\times 105$.
3. Longitudinal section of the upper stem 8 days after inoculation. Virus antigen has spread to all cells of stem tissues except the xylem elements. $\times 105$.
4. Cross section of the upper stem 4 days after inoculation. Virus antigen (arrow) was first detected in a few phloem cells. $\times 420$.
5. Cross section of the upper stem 4 days after inoculation. Virus antigen was observed in a few phloem cells (arrows), which were considered to be connected directly to the inoculated leaf. $\times 105$.
6. Cross section of the upper stem 7 days after inoculation. Virus antigen has spread from the initially infected phloems to surrounding tissues. $\times 120$.
7. Cross section of the upper leaf 4 days after inoculation. Virus antigen was first detected in the phloems of vein. $\times 95$.
8. Cross section of the upper leaf 5 days after inoculation. Virus antigen has spread from the initially infected phloems of the vein to the lamina. $\times 95$.
9. Cross section of the upper leaf 6 days after inoculation. $\times 95$.

Plate II.

- 1,2. Cross section of the upper leaf 8 days after inoculation. Virus antigen has spread to all cells of leaf tissue except the xylem elements. 1: $\times 95$, 2: $\times 95$.
3. Cross section of the petiole of the fully expanded upper leaf 4 days after inoculation. Virus antigen (arrows) was first detected in the adaxial phloems and the abaxial phloems. $\times 115$.
4. Cross section of the petiole of the fully expanded upper leaf 8 days after inoculation. Virus antigen has spread to all cells of petiole tissues except the xylem elements. $\times 115$.
5. Longitudinal section of the root 6 days after inoculation. Virus antigen was first detected in phloems. $\times 100$.
6. Longitudinal section of the root 8 days after inoculation. Virus antigen has spread to all cells of root tissues except the xylem elements. $\times 100$.

Abbreviation

P: phloem X: xylem

Plate I

Plate II