エンドウ茎えそウイルス感染エンドウ細胞内 にみられる病変*

尾崎 武司**・井上 忠男**

Takeshi OSAKI and Tadao INOUE: Cytopathological Changes of Pea Plants Infected
with Pea Stem Necrosis Virus

Abstract

Pea stem necrosis virus (PSNV) particles were isometric and 34 nm in diameter, and showed rounded outlines with rough surfaces when they were examined in electron microscope after negative-staining using uranyl acetate. In ultrathin sections, large numbers of virus particles were consistently scattered within the ground cytoplasm in cells of most tissues of infected pea leaves. Crystalline arrays of virus particles were observed only in necrotic cells. No virus particles were detected in nuclei, chloroplasts or mitochondria. A characteristic feature in infected cells was the formation of small vesicles, bounded by a single membrane, at the peripheries of the mitochondria which are superficially quite similar to multivesicular bodies induced by some other plant viruses. Possible affinities of PSNV with the tombusvirus group are discussed and it is suggested that PSNV may be grouped with certain other single-component viruses such as carnation mottle or galinsoga mosaic viruses.

(Received January 14, 1988)

Key words: pea stem necrosis virus, cytopathology, fine structure, *Pisum sativum*.

緒 言

エンドウ茎えそウイルス (pea stem necrosis virus, PSNV)^{14,15,20,21)} については最近、ウイルス粒子の物理化学的性状等が明らかとなり²⁴⁾, tombusvirus グループへの所属が示唆されているが明確な分類学的な位置づけはなされていない。本報告は PSNV および諸性状の類似する saguaro cactus virus (SCV, tombusvirus グループの tentative メンバー¹⁹⁾) の粒子形態と感染細胞内の病変を比較検討し、PSNV の tombusvirus グループへの所属の是非について考察したものである。

実験材料および方法

PSNV は 1976 年和歌山県御坊市で採集し、電顕観察により他のウイルスが混合感染していないことを確

認後、エンドウに継代接種して保存していたものである。なお、一部はシリカゲルによる乾燥保存試料を適宜エンドウに汁液接種し供試した。SCV²⁸⁾ はサンカクチュウ (*Hylocereus trigonus*) に接木したヒボタン (*Gymnocalycium mihanovichii* var. *friedrichii*) の生育異常株よりセンニチコウに接種し全身感染した上葉から、また、対照として用いたインゲンマメ南部モザイクウイルス (southern bean mosaic virus, SBMV)²⁵⁾ はダイズの微斑モザイク症状株から分離したもので、これらは各々 *Chenopodium quinoa* とダイズに継代接種して保存した。PSNV, SCV および SBMV の純化はおののお Osaki ら²⁴⁾, Nelson & Tremaine²²⁾ および Hull¹²⁾ の方法に準じて行った。

純化ウイルスは 3% 酢酸ウラニルで逆染色し電顕 (日立 H-300, H-600) 観察を行った。超薄切片の作成には PSNV を接種したエンドウの上葉 (接種 3 週間

* 本報告の概要は昭和 56 年度日本植物病理学会関西部会で発表した。

** 大阪府立大学農学部 College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591, Japan

後) および SCV を接種した *C. quinoa* の接種葉 (接種 6 日後) を供試した。病葉から切り出した小片を 6% グルタルアルデヒドで 4 時間前固定後、1% 四酸化オスmiumで 2 時間後固定し、エタノール系列で脱水後、常法によりスパー樹脂に包埋した。ガラスナイフで作成した超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色し電顕観察した。

実験結果

1. ウイルス粒子の形態観察

PSNV と SCV の個々の粒子は丸味を帯びた輪郭を呈し、表面は粗で、タンパク質小単位の突起があることが示唆され (Plate I-1, 2), 粒子径もほぼ同一で両者の形態による識別は困難であった。一方, tombusviruses とは粒子構造が異なるとされている SBMV 粒子の輪郭は六角形を呈し (Plate I-3) 粒子径もやや小さく (約 30 nm), 両ウイルスと容易に区別することができた。なお, キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, 29 nm) 粒子をマーカーとして測定した PSNV の粒子径は約 34 nm であった (Plate I-1)。

2. 超薄切片像の電顕観察

PSNV 感染エンドウ葉ではウイルス粒子は表皮, 葉肉, 師部等の各種細胞の細胞質中に多量に存在したが, 核その他の小器官内には観察されなかった。ウイルス粒子は死細胞以外ではすべて散在していた (Plate I-4)。超薄切片像による粒子径は約 26 nm であり, リボソームより明らかに大きく電子密度が高いことから容易に区別することができた。一方, 葉肉や師部細胞の死部ではウイルス粒子の多くは結晶状に配列し, 大小さまざまな集塊を形成していた (Plate I-5)。

PSNV 感染細胞内における小器官の顕著な病変はミトコンドリアの変形とミトコンドリア内での multivesicular body (MVB) の出現であった。多くのミトコンドリアは膨潤し, 円, 長円形等のさまざまな形態を呈していた (Plate I-6)。このようなミトコンドリアのストロマは膨潤し, 電子密度がやや増して不透明となっていた (Plate I-6, 7)。一般にクリステの数は減少し, クリステ内膜間のスペースが拡張する像がしばしば観察された (Plate I-6, 7)。とくに顕著な病変は変形したミトコンドリアの周辺部に形成される多数の小胞であった。この小胞は単層膜を有して円～卵型をなし, 径は約 200 nm 前後のものが多く, ミトコンドリアの外膜と内膜の間に形成されていた (Plate II-8～11)。個々の小胞は電子密度が低く中空にみえる場合 (約 40%), 低電子密度の顆粒状物質を含む場合 (約

20%) および繊維状物質を含む場合 (約 30%) の三つのタイプが観察された (Plate II-8)。小胞は外膜に沿って並び, 外膜の陥入により生成したものと考えられた。このような小胞はミトコンドリアの中心部に存在する電子密度の低い明層領域 (Plate II-11) や, 細胞質中にフリーな状態で存在する (Plate II-12) 場合もあった。しかし, 細胞質中の小胞はミトコンドリア由来か, ゴルジ体由来かについては不明であった。なお, このような病変は感染細胞中のすべてのミトコンドリアに認められるわけではなく, 約 40% のミトコンドリアは正常であった。その他の小器官では葉緑体でグラナ構造の崩壊や澱粉粒の蓄積等の異常が認められる場合があったものの, 核やミクロボディを含めてこのような小胞の生成は認められなかった。

一方, SCV 感染 *C. quinoa* ではウイルス粒子は各種細胞質中に多量に存在し, PSNV と同様な所見が得られた (Plate II-13)。しかし葉緑体の変形, ストロマメラ数の減少, ミトコンドリアのクリステの膨潤等の異常が認められる場合はあったが, MVB 様の封入体はいずれの小器官あるいは細胞質中にも観察されなかった。

考 察

PSNV は沈降定数 118S の単一成分よりなり, 外被タンパク質の分子量は 38,000 ダルトンで, 核酸は分子量 1.53×10^6 ダルトンの一本鎖 RNA を含む²⁴⁾。このような性状は tombusvirus グループのウイルス¹⁹⁾のなかでもとくに tentative メンバーの turnip crinkle virus (TCV)¹¹⁾, SCV²³⁾, 未分類の galinsoga mosaic virus (GMV)^{2,4)} および Hull¹³⁾ が提唱した carnation mottle virus (CMoV) グループのウイルスに酷似している。粒子径は GMV が 35 nm, SCV が 32 nm, TCV や CMoV グループのウイルスが 28～30 nm と多少幅があるが, いずれも definitive メンバーのウイルスと同様に粒子表面に突起があると考えられている^{4,8,16)}。本実験でも PSNV は SCV と同様に表面は粗で tombusviruses や CMoV などと同様な微細構造を有するものと考えられた。

一般に tombusvirus グループのウイルスの場合は, 感染細胞内に multivesicular body (MVB) と総称される細胞質内封入体形成が一つの特徴となっており, この小胞がウイルス RNA の複製の場であろうと考えられている^{3,16,27)}。しかし, 本グループの definitive メンバーのなかでもウイルスの種類により MVB の由来は異なる。tomato bushy stunt virus (TBSV)^{1,8)} や

cymbidium ringspot virus²⁵⁾ などではマイクロボディ由来であり, carnation Italian ringspot virus (CIRSV)⁸⁾ ではミトコンドリア由来とされている。さらに tentative メンバーの TCV²⁶⁾ や GMV⁸⁾ でも MVB はミトコンドリア由来である。一方, SCV や CMoV 感染細胞内ではいかなる MVB も形成されない^{10, 26)}。本実験で観察された PSNV 感染細胞内の MVB は明らかにミトコンドリアに由来し, TCV および GMV の場合と同様な所見が得られた。しかし, CIRSV を含めて definitive メンバーのウイルスはすべて核内に粒子が検出されているが^{3, 4, 16-18)}, TCV, SCV および GMV では核内には存在しない。これらの感染細胞内所見からみても PSNV は TCV や GMV に近似する。TCV, SCV および GMV は definitive メンバーのウイルスとは生物学的性質が異なり, 血清学的関係^{2, 16)} や塩基配列の類似性⁶⁾ も認められていない。また, definitive メンバーのウイルスは TBSV のサテライト RNA の複製を介助することができるが, これらのウイルスは介助能をもたない⁵⁾。このようなことからこれらのウイルスの tombusvirus グループへの所属を疑問視する研究者もある^{4, 6, 8, 16, 26)}。PSNV も上述のように感染細胞内所見は TCV や GMV に酷似するが, ミトコンドリア内の小胞形成は必ずしも本グループ特有のものではなく, 棒状ウイルスであるキュウリ緑斑モザイクウイルス (cucumber green mottle mosaic virus)⁹⁾ やタバコ茎えそウイルス (tobacco rattle virus)⁷⁾ の感染細胞内にも見いだされている。したがって, このような細胞内病変のみを分類基準の一つとして取り上げることは無理があると考えられ, 粒子の形態や理化学的性状, 細胞内所見等もあわせて総合的に判断する必要がある。

最近, 国際ウイルス分類委員会 (ICTV) でウイルス粒子の理化学的性状や複製機構から CMoV をタイプ

メンバーとする carmovirus グループの設置が承認された (四方, 私信)。本グループのなかには TCV, SCV および GMV など 16 種のウイルスが含まれているが, 伝搬様式や細胞内病変など必ずしも一致しているとはいえない。したがって本グループは将来再編される可能性も考えられるが, 現時点では PSNV は carmovirus グループに所属させるのが妥当であろうと考えられる。

摘 要

エンドウ茎えそウイルス (pea stem necrosis virus, PSNV) と saguaro cactus virus (SCV) の粒子形態と細胞内所在様式ならびに病変について電顕観察を行った。

PSNV は約 34 nm の球状で, 個々の粒子は丸味を帯び SCV との識別は困難であった。PSNV 感染エンドウ葉ではウイルス粒子は各種細胞の細胞質中に多量に存在したが, 核などの小器官内には観察されなかった。なお, え死部以外ではウイルス粒子はすべて散在していた。PSNV 感染細胞内の多くのミトコンドリアは変形し, ストロマの拡張, クリステ数の減少, クリステ内膜間のスペースの拡張などの異常が観察された。変形したミトコンドリアの内膜と外膜の間には径約 200 nm 前後の単層膜を有する円～楕円形の小胞 (multivesicular body, MVB) が多数観察された。個々の MVB は中空に見える場合, 顆粒状物質を含む場合および核酸様の繊維物質を含む場合の三つのタイプが観察された。SCV 感染 *C. quinoa* ではウイルス粒子は PSNV の場合と同様な所在様式を示したが, ミトコンドリアには顕著な病変は認められなかった。

PSNV は本実験結果とその他の諸性状から, 現時点では最近設置された carmovirus グループへ所属させることが妥当であると考えられた。

引 用 文 献

1. Appiano, A., Pennazio, S. and Redolfi, P. (1978). *J. gen. Virol.* 40: 277-286.
2. Behnken, G.M., Francki, R.I.B. and Gibbs, A.J. (1982). *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. No. 256.
3. Difranco, A., Russo, M. and Martelli, G.P. (1984). *J. gen. Virol.* 65: 1233-1237.
4. Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. (1985). *In Atlas of Plant Viruses*. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 181-197.
5. Gallitelli, D. and Hull, R. (1985). *J. gen. Virol.* 66: 1533-1543.
6. Gallitelli, D., Hull, R. and Koenig, R. (1985). *Ibid.* 66: 1523-1531.
7. Harrison, B.D., Stefanac, Z. and Roberts, I.M. (1970). *Ibid.* 6: 127-140.
8. Hatta, T., Francki, R.I.B. and Grivell, C.J. (1983). *Ibid.* 64: 687-692.
9. Hatta, T. and Ushiyama, R. (1973). *Ibid.* 21: 9-17.
10. Hollings, M. and Stone, O.M. (1970). *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. No. 7.

11. Hollings, M. and Stone, O.M. (1970). *Ibid.* No. 109.
12. Hull, R. (1977). *Virology* 79: 50-57.
13. Hull, R. (1977). *J. gen. Virol.* 36: 289-295.
14. 井上忠男・尾崎武司・中曽根 渡・匠原監一郎 (1977). 日植病報 43: 371 (講要).
15. 井上忠男・尾崎武司・匠原監一郎・中曽根 渡 (1977). 同上 43: 372 (講要).
16. Martelli, G.P. (1981). *In Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis* (Kurstak, E. ed.). Elsevier/North Holland, Biomedical Press, Amsterdam. pp. 61-90.
17. Martelli, G.P. and Russo, M. (1972). *J. gen. Virol.* 15: 193-203.
18. Martelli, G.P. and Russo, M. (1973). *J. Ultrastr. Res.* 42: 93-107.
19. Matthews, R.E.F. (1982). *Intervirology* 17: 1-199.
20. 中野昭信・家村浩海・岸 国平 (1976). 日植病報 42: 82 (講要).
21. 中野昭信・家村浩海 (1978). 同上 44: 97-98 (講要).
22. Nelson, M.R. and Tremaine, J.H. (1975). *Virology* 65: 309-319.
23. Nelson, M.R., Yoshimura, M.A. and Tremaine, J.H. (1975). *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. No. 148.
24. Osaki, T., Ozaki, K. and Inouye, T. (1988). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 210-216.
25. 尾崎武司・柳 和郎・井上忠男 (1986). 日植病報 53: 419 (講要).
26. Russo, M. and Martelli, G.P. (1982). *Virology* 118: 109-116.
27. Russo, M., Difranco, A. and Martelli, G.P. (1983). *J. Ultrastr. Res.* 82: 52-63.
28. 白井 満 (1982). 大阪府立大学農学部卒業論文.

Explanation of plates

Plate I

1. Purified particles of PSNV stained with uranyl acetate. Arrows point to particles of CMV added as a size standard ($\times 200,000$).
- 2 and 3. Purified particles of SCV (2) stained with PTA ($\times 140,000$) and SBMV (3) for comparison ($\times 140,000$).
4. Section through pea mesophyll cells infected with PSNV. The cytoplasm contains numerous virus particles ($\times 45,000$).
5. Crystalline aggregates of virus particles in a necrotic cell of pea infected with PSNV ($\times 25,000$).
- 6 and 7. Enlarged view of mitochondria showing disorganization of cristae and development of peripheral vesiculation (arrows). Note the rupture of the outer membrane of mitochondria (arrow head). Fig. 6 ($\times 25,000$), Fig. 7 ($\times 35,000$).

Plate II

- 8 and 9. A severely altered and extensively vesiculated mitochondrion. Arrows in Fig. 8 point to fibril-containing perimitochondrial vesicles, which are similar in appearance with mitochondrial DNA fibrils (★) in Fig. 9. Fig. 8 ($\times 55,000$), Fig. 9 ($\times 20,000$).
10. A group of coalescing mitochondria ($\times 20,000$).
11. Detail of a mitochondrion showing peripheral vesicles. Similar vesicles are present in the electron-lucent area (arrow, $\times 75,000$).
12. Vesicular structures in cytoplasm similar to the perimitochondrial ones. Arrows indicate vesicles containing fibril ($\times 40,000$).
13. Section through a *Chenopodium quinoa* mesophyll cell infected with SCV. Many virus particles scattered within cytoplasm at random ($\times 20,000$).

Plate I

Plate II