プロテイン A-金コロイド法によるジャガイモ X ウイルス感染 タバコ細胞内のウイルス抗原局在の観察

細川大二郎*・渡辺 実*

Daijiro Hosokawa* and Minoru Watanabe*: Ultrastructural
Localization of Viral Antigen in Tobacco Cells Infected
with Potato Virus X by Protein A-Gold Technique

Abstract

After two middle leaves of 5-6 leaf stage of *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN were inoculated with potato virus X (PVX), the distribution of viral antigens in the cells of young upper leaves, which were approximately 1 cm long at the time of mechanical inoculation, was tested by immunoelectron microscopy with protein A-gold. Six days after inoculation, gold labels were first localized on the areas of cytoplasm in the vicinity of the nascent small laminate inclusion components (LIC). As the infection progressed, small aggregates of virus particles were found in these areas. At later stages of infection (10 days after inoculation), LIC developed and the virus particles occurred in large aggregates near the LIC or scattered among sheets of the LIC. Gold labels were intensively found on those virus particles. Furthermore, most of the cytoplasmic areas devoid of virus particles were also labeled, suggesting the occurrence of an excess of the viral antigen. However, the beads and sheets of LIC were free from labels. No labeling was also present inside the nuclei, chloroplasts, mitochondria and microbodies. The vacuoles were also usually free from labels, although they sometimes did contain gold labels near the cytoplasm which held a large number of virus particles.

(Received May 19, 1988)

Key words: potato virus X, *Nicotiana tabacum*, protein A-gold technique.

緒 言

ジャガイモ X ウイルス (PVX) 感染細胞におけるウイルス抗原の分布については、すでに Shalla and Shepard⁷⁾, Shalla and Petersen⁶⁾ によりフェリチン抗体法を用いて検討されている。しかし、これらの場合、包埋前染色法 (pre-embedding method) が用いられたため、フェリチン抗体の細胞内への浸透が困難であり、詳細な検討は行われていない。最近、包埋用樹脂の開発やプロテイン A-金コロイドなどを用いた免疫染色法の改良により包埋後染色法 (post-embedding method) で好結果が得られるようになった⁴⁾。包埋後染色法では樹脂に包埋した試料を超薄切片にしたのち

免疫染色を行うので、細胞あるいは細胞器官内の抗原も切片上に露出していると考えられ、抗体の細胞あるいは細胞器官内への浸透の問題はなくなる。

本実験においては、プロテイン A-金コロイドを用いた包埋後染色法により、PVX 感染タバコ細胞内におけるウイルス抗原の局在を検討した。

本実験を行うにあたり、包埋後染色法についてご教示賜った山梨医科大学志田寿人博士に感謝の意を表す。

材料および方法

供試植物 タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) を用いた。タバコは鉢植にして温室内 (20~

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

28°C)で栽培した。

供試ウイルス ジャガイモ X ウイルス (PVX) 強系統を用いた。ウイルスの接種はカーボランダムを用いて摩擦接種法により行った。ウイルスの精製は感染タバコ葉から Shepard and Secor の方法⁹⁾により行った。

ウイルス抗血清の作製 ウイルス抗血清は家兎を免疫動物として用い、精製ウイルスを Freund's complete adjuvant と混合し筋肉に注射し、さらに1ヵ月後に静脈注射により追加免疫する方法により作製した。抗血清の力価は微沈降反応で 1:1,024 であった。

プロテイン A-金コロイドの作製 金コロイドは Frens の方法²⁾に従って塩化金酸をクエン酸ソーダで還元して作製した。金コロイドの平均直径は 16 nm であった。

プロテイン A-金コロイドは Slot and Geuze の方法⁹⁾に従って作製した。すなわち、金コロイド液 30 ml を 0.1 M 炭酸カリウム液で pH 5~6 に調整し、これにプロテイン A (Sigma) 150 µg を混合してから 60,000×g 60 分間の遠心を行った。これによりプロテイン A-金コロイドを濃縮すると同時に遊離のプロテイン A を除去した。さらに、このプロテイン A-金コロイドは PBS (0.1 M リン酸緩衝液, 150 mM NaCl, pH 7.2) に懸濁し、再び 60,000×g, 60 分間の遠心を行った。沈殿したプロテイン A-金コロイドは少量の PBS [0.2 mg/ml ポリエチレングリコール (平均分子量 20,000) を含む] に懸濁し、0.1% NaN₃ を加え、4°C に保存した。

組織の固定、包埋および免疫染色 PVX 感染タバコ葉は安全カミソリを用いて、0.5×2 mm の大きさに細切した。この葉片は 4% パラホルムアルデヒド-0.5% グルタルアルデヒド混合液または 2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) により室温で 2 時間固定した。固定した葉片は 0.1 M NH₄Cl に 1 時間浸漬してから 30, 50, 75, 85% (以上 4°C), 95, 100% (以上 -20°C) のエタノールにそれぞれ 1 時間浸漬し、脱水したのち、100% エタノールとアセトン混合液 (1:1)、アセトンと LR-Gold (Polaron Equipment Ltd.) 混合液 (2:1, 1:1, 1:2) にそれぞれ 1 時間、LR-Gold に 24 時間、-20°C で浸漬し、ビームカプセル内の LR-Gold に入れた。この LR-Gold の重合は -20°C で紫外線照射により行った。

包埋ブロックは超ミクロトームで薄切しフォルムボール膜をはったニッケル製グリッド (150 メッシュ) に載

せた。

切片は 1% 卵アルブミンを含む PBS に 30 分間浸漬し、ただちに PVX 抗血清 (PBS で 400~800 倍に希釈) と室温で 2 時間反応させ、その後 PBS で 4 回洗浄した。さらに切片はピンク色がほとんど見えなくなる程度に PBS (1% 卵アルブミンを含む) で希釈したプロテイン A-金コロイドと室温で 1 時間反応させてから、PBS と蒸留水で洗浄し、一夜乾燥させ、2% 酢酸ウラニルで 10 分間、クエン酸鉛で 1 分間染色した。切片の観察は日本電子 JEM-100C 型電子顕微鏡により行った。

プロテイン A-金コロイド法の染色の特異性は 1) 精製ウイルスで吸収した抗血清を用いた場合、2) 正常血清を用いた場合、3) 抗血清を処理せずプロテイン A-金コロイドのみ処理した場合、4) 健全植物の切片を染色した場合にわずかな非特異反応のみ認めるか、まったく染色されないことで確認した。

結 果

5 葉期のタバコの中位葉 2 枚に PVX を摩擦接種し、接種時に葉長が約 1 cm であった上位葉の細胞におけるウイルス抗原の局在を経時的に追跡した。

細胞には接種 6 日後に初めて金粒子の標識が認められた。この時期には少数の金粒子の標識が細胞質に形成され始めた薄板状封入体 (laminate inclusion components, LIC) の近傍に認められた (Fig. 1)。

その後、薄板状封入体は発達し、その近傍には金粒子の標識が増加したが、やがてこの部位の一部にウイルス粒子の小さな集塊が認められるようになり、ウイルス粒子には多数の金粒子が標識された (Fig. 2, 3)。しかし、薄板状封入体には金粒子の標識は認められなかった (Fig. 2, 3)。

さらに感染の進んだ細胞 (接種 10 日以後) には多数の発達した薄板状封入体が認められるようになった。この時期の薄板状封入体には, Shalla and Shepard⁷⁾ が報告しているように、1) 顆粒の付着した薄板状の構造体が多数重なってうず巻状になり、その中心にウイルス粒子が集塊をなしているもの、2) 顆粒の付着した薄板状の構造体が多数重なって、その間隙にウイルス粒子が少数散在するもの、3) 顆粒の付着していない薄板状の構造体が多数重なり、その間隙にウイルス粒子が少数散在するものが認められた (Fig. 4, 5)。これらの場合、薄板状封入体の近傍には大きなウイルス粒子の集塊が認められることが多かった。こうした部位では、金粒子の標識はウイルス粒子の集塊上や薄

板状の構造体の間に散在するウイルス粒子上には多数観察された (Fig. 4, 5, 6, 7) が、薄板状の構造体とそれに付着した顆粒上には認められなかった (Fig. 4, 5, 6, 7)。

この時期でも核、葉緑体、ミトコンドリア、マイクロボディのいずれにも金粒子の標識は認められなかった (Fig. 4, 5, 8, 9, 10)。しかし、細胞質基質 (cytosol) ではウイルス粒子が分布していない部位にも多数の金粒子の標識が認められた (Fig. 4, 5, 8, 10, 11)。液胞内には多くの場合、金粒子は標識されなかった (Fig. 10, 11)。しかし、細胞質に大きなウイルス粒子の集塊が存在する近傍の液胞には金粒子が標識されることがあり (Fig. 4)、金粒子の分布状態から、ウイルス抗原が細胞質から液胞内に移行遊離したように思われた。

考 察

本実験では、PVX 感染タバコ葉を LR-Gold に包埋し、薄切したのち、PVX 抗体とプロテイン A-金コロイドにより免疫染色する包埋後染色法を用いて、細胞内のウイルス抗原の局在を検討した。この場合、切片内のウイルスの抗原性はよく保存されており、細胞の微細構造も良好であった。前記のように包埋後染色法では切片作製後に免疫染色を行うので、細胞内あるいは細胞器内への抗体の浸透の問題はなくなる。本法は細胞壁を有する細胞の免疫組織細胞化学には適した方法であり、本法を用いより詳細な抗原局在部位の検討が可能になると思われる。

PVX 感染細胞において、ウイルス抗原は細胞質内の発達初期の薄板状封入体の周囲に最初に観察され、その後、この部位にウイルス粒子が集積するようになった。Shalla ら⁵⁾、Allison ら¹⁾、Honda ら³⁾ は PVX 感染細胞に形成される薄板状封入体がウイルス粒子より後に出現することから、ここはウイルス抗原の合成の場ではないと考えた。本実験においては全身感染葉を用いたためウイルス粒子と薄板状封入体の形成時期を詳しくは追跡できなかった。しかし、薄板状封入体が形成され始めると、その周囲にウイルス抗原が集積し、やがてそこにウイルス粒子の集積がみられることから、薄板状封入体がウイルスの増殖に密接に関連していることが考えられた。しかし、薄板状封入体の薄板とそれに付着した顆粒にはウイルス抗原は含まれていないと報告されており^{5,6)}、本実験においても同様の結果を得たので、薄板状封入体は、ウイルス抗原の合

成の場ではないと考えられる。

感染の進んだ細胞では金粒子の標識は、細胞質に集積したウイルス粒子上に多数認められたが、ウイルス粒子の認められない細胞質基質のほとんどの部位にも多数観察された。これは感染の進んだ細胞では、ウイルスの外被蛋白質が多量に合成され、これが遊離のままの状態では細胞質に集積していることを示している。すでに Shalla and Shepard は⁶⁾ 血清学的方法により、PVX 粒子から解離させた外被蛋白質 (D-protein) の抗体と反応する遊離蛋白質が感染細胞に集積することを報告している。この場合、ウイルス粒子と D-protein とは抗原性が異なるので、本実験で細胞質内に検出された遊離のウイルス抗原は D-protein とは分子の高次構造が異なるのかもしれない。

核、葉緑体、ミトコンドリア、マイクロボディにはいずれの時期にもウイルス粒子もウイルス抗原も認められず、これらの細胞器官はウイルス抗原の合成の場ではないと考えられた。

摘 要

ジャガイモ X ウイルス (PVX) 感染細胞におけるウイルス抗原の局在をプロテイン A-コロイド法を用いて検討した。

金粒子の標識は細胞質に形成され始めた薄板状封入体の周囲に最初に観察された。その後、薄板状封入体は発達し、金粒子の標識の認められた部位の一部にウイルス粒子の小さな集塊が観察されるようになった。感染の進んだ細胞では細胞質に多数の薄板状封入体が発達し、その近傍にはウイルス粒子が大きな集塊となり、あるいは散在して観察された。これらでは金粒子の標識がウイルス粒子上と、さらに細胞質基質ではウイルス粒子の分布していない部位にも多数観察され、ウイルス抗原が遊離の状態では多量に集積すると考えられた。しかし、薄板状封入体の薄板とそれに付着した顆粒には金粒子の標識は認められなかった。また核、葉緑体、ミトコンドリア、マイクロボディには金粒子の標識は観察されず、これらの器官はウイルス抗原の合成の場ではないと考えられた。液胞内には多くの場合、金粒子の標識は認められなかったが、細胞質にウイルス粒子が多数集積した近傍の液胞には、ウイルス抗原が細胞質から液胞内へ遊離した状態で分布することがあった。

引用文献

1. Allison, A.V. and Shalla, T.A. (1974). *Phytopathology* 64: 784-793.
2. Frens, G. (1973). *Nature (Phys. Sci.)* 241: 20-22.
3. Honda, Y., Kajita, S., Matsui, C., Otsuki, Y. and Takebe, I. (1975). *Phytopath. Z.* 84: 66-74.
4. Polak, J.M. and Varndell, I.M. (eds.) (1984). *Immunolabelling for Electron Microscopy*. Elsevier, Amsterdam.
5. Shalla, T.A. and Petersen, L.J. (1973). *Phytopathology* 63: 1125-1130.
6. Shalla, T.A. and Shepard, J.F. (1970). *Virology* 42: 1130-1132.
7. Shalla, T.A. and Shepard, J.F. (1972). *Ibid.* 49: 654-667.
8. Shepard, J.F. and Secor, G.A. (1969). *Phytopathology* 59: 1838-1844.
9. Slot, J.W. and Geuze, H.J. (1981). *J. Cell Biol.* 90: 533-536.

Explanation of plates

- Fig. 1. Immunogold electron micrograph of tobacco leaf cells infected with potato virus X (PVX) 6 days after inoculation. Gold labels were first found in the cytoplasm near the nascent laminate inclusion components (LIC). (Bar=0.5 μ m).
- Fig. 2, 3. Immunogold electron micrographs of tobacco leaf cells infected with 7 days after inoculation. Small (Fig. 2) and large (Fig. 3) aggregates of virus particles occurred near LIC. Gold labels were seen over aggregates of virus particles and cytoplasm near LIC. (Bar=0.5 μ m).
- Fig. 4-11. Immunogold electron micrographs of tobacco leaf cells infected with PVX 10 days after inoculation.
- Fig. 4, 5. Numerous developed LIC and virus particles occurred in the cells. Gold labels were found over virus particles and throughout the cytoplasm, but beads and sheets of LIC were free from labels. Nuclei and chloroplasts also remained unlabeled. Gold labels were sometimes found in vacuoles near the cytoplasm which contains numerous virus particles. (Bar=1 μ m).
- Fig. 6, 7. Portion of developed LIC. Virus particles accumulated in their large aggregates near LIC or dispersed among sheets of LIC. Gold labels were found over the virus particles and cytoplasm, but beads and sheets of LIC were free from labels. (Bar=1 μ m).
- Fig. 8. Gold labels were found in a thin layer of cytoplasm between the chloroplast and cell wall or vacuoles. Chloroplasts remained unlabeled. (Bar=1 μ m).
- Fig. 9, 10. Mitochondrion and microbody remained unlabeled. (Bar=0.5 μ m, 1 μ m in Fig. 9, 10 respectively).
- Fig. 11. Most of the cytoplasmic areas devoid of virus particles were heavily labeled. (Bar=0.5 μ m).

Abbreviations: Ch, chloroplast; CW, cell wall; LIC, laminate inclusion components; M, mitochondrion, Mb, microbody; N, nucleus; No, nucleolus; V, virus; Va, vacuole.

Plate I

Plate II

Plate III

Plate IV