タバコ品種 Ambalema のタバコモザイクウイルス抵抗性:

接種葉およびプロトプラストにおけるウイルスの増殖

陳 海如*・細川 大二郎*・渡辺 実*

Hai Ru CHEN*, Daijiro HOSOKAWA* and Minoru WATANABE*: Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco Cultivar Ambalema: Multiplication of the Virus in Leaf Tissues and Mesophyll Protoplasts

Abstract

The growth curve of tobacco mosaic virus (TMV) in inoculated leaves of tobacco cv. Ambalema was far low compared to that of susceptible cv. Xanthi. The virus concentration in Ambalema leaves at 12 days after inoculation is one-eighth or less of the level attained in Xanthi leaves. The amount of TMV in Ambalema leaves increased 2.5- to 3-fold when actinomycin D was applied immediately or 1 day after inoculation, but not increased by the application at 10 days or later after inoculation, suggesting that the virus resistance of Ambalema may depend on transcription from host DNA. Ambalema protoplasts isolated from the inoculated leaves at various time showed a steady increase in the fraction of infected cells (as judged by TMV-specific fluorescent antibody staining) to a value of approximately 31.5% at 15 days after inoculation, but in the protoplasts from Xanthi, the fraction of infected cells rapidly increased to value of approximately 80% at 7 days after inoculation and remain close to that value thereafter. In this case, the level of virus accumulation per infected protoplast of Ambalema was far less than that of Xanthi. When these protoplasts were incubated for 72 hr, the level of virus accumulation per infected protoplast increased 3.4- to 5.0-fold in Ambalema and 1.7- to 2.1-fold in Xanthi. The increase of the fraction of infected protoplasts and the amounts of virus were observed in protoplasts isolated from the leaves which virus multiplication were increased by treatment with actinomycin D. When protoplasts isolated from healthy leaves were infected with TMV, protoplasts from Ambalema had a percentage of infection similar to and supported a slightly lower accumulation of virus than Xanthi protoplasts. Actinomycin D did not effect the multiplication of TMV in the protoplasts isolated from both tobacco cultivars. It was concluded that the resistance of Ambalema tobacco to infection by TMV involves the reduced accumulation in cell and spread of the virus in host tissues, but this ability to reduce virus accumulation were not formed in protoplasts.

(Received September 18, 1989)

Key words: *Nicotiana tabacum* cv. Ambalema, tobacco mosaic virus, resistance.

緒 言

タバコ品種 Ambalema はタバコモザイクウイルス (TMV) に耐病性であり、ウイルスは全身的に感染するが、ほとんど病徴を現さない。この Ambalema の

耐病性については、これが2対の劣性遺伝子 *rml* および *rm2* により支配されていること¹⁰⁾、接種葉における TMV の増殖が、感受性品種に比べ感染初期では遅いが、後期にほぼ同程度となること¹¹⁾、またプロトプラストにおける TMV の感染率と増殖量が感受性品種

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

のそれに比べ低いこと⁸⁾などが報告されている。しかし、この耐病性の機構の詳細は不明のままである。本実験では Ambalema の接種葉および葉内プロトプラストにおける TMV の増殖とそれらに及ぼすアクトノマイシン D (AMD) の影響を感受性品種 Xanthi と比較して、検討した。本実験を行うにあたり、エレクトロポレーション法によるウイルスの接種についてご教示いただいた東京大学理学部岡田吉美教授（現帝京大学教授）ならびに渡辺雄一郎博士に感謝の意を表する。

材料および方法

供試植物 *Nicotiana tabacum* L. cv. Ambalema および Xanthi を用いた。これらは鉢植にして温室内 (22~28°C) で育成した。

供試ウイルス タバコモザイクウイルス普通系 (TMV-OM) を用いた。ウイルスは *N. tabacum* L. cv. Xanthi で増殖させ、分画遠心法により精製した。TMV-RNA は精製ウイルスからフェノール-SDS 法により調製した⁷⁾。

アクトノマイシン D によるウイルス接種葉の処理方法 TMV を摩擦接種したタバコ葉からコルクボーラを用いて葉ディスク（直径 12 mm）を切り取り、これを 9 cm シャーレ内の AMD 溶液に接種面を上にして浮遊させ、白色蛍光灯照射（約 1,500 lux）下で、28°C に保った。この場合 AMD はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解後、水で希釈した。対照には同濃度の DMSO を含む蒸留水を処理した。

タバコ葉肉プロトプラストの調製とウイルスの接種 タバコ葉を中性洗剤で洗い、70% アルコールに 2 分間浸漬し、滅菌蒸留水で洗浄したのち、裏面表皮を剝離した。このタバコ葉をプロトプラスト分離用酵素液 [0.5% Macerozyme R10, 1.5% Cellulase Onozuka RS (ヤクルト), 0.6 M マンニット, pH 5.6] に浮遊させ、28°C で、3 時間処理した。酵素処理後プロトプラストはナイロンメッシュでろ過し、100×g, 5 分間の遠心により集め、0.6 M マンニット溶液を用いて 3 回遠心により洗浄を行った。プロトプラストの生存率はフェノサフラニンによる染色法²³⁾により測定した。葉肉プロトプラストへのウイルスの接種はエレクトロポレーション法²²⁾を用いて行った。ウイルスを接種したプロトプラストは Nagata and Takebe の培養液¹⁷⁾に懸濁し、28°C で培養した。プロトプラストのウイルス感染率は蛍光抗体法を用いて測定した¹⁹⁾。

ウイルス濃度の測定 ウイルス感染葉は生体重を測

定したのち、りん酸緩衝液 (pH 7.2) を加えて乳鉢で磨砕した。プロトプラストは、その数をトーマ血球計算盤を用いて測定したのち遠心により集め、これにりん酸緩衝液を加えてテフロンホモジナイザーで磨砕した。磨砕液は 10,000×g, 15 分間の遠心を行ってから、その上清を用いてウイルス濃度を測定した。ウイルス濃度の測定は ELISA 法と生物検定法により行った。ELISA 法は Clark and Adams の方法⁵⁾に準じて行った。この場合、精製 TMV を用いて標準曲線を作製し、405 nm の吸光度からウイルス量を算定した。ウイルスの抗体は精製 TMV を抗原として、家兎を用いて作製した。抗体からの γ-グロブリンの調製は硫酸塩折法により行った。生物検定ではインゲンを検定植物として用い、対葉法により行った。対葉には 1 μg/ml の TMV を接種し、比感染価を求めた。

結果

接種葉におけるウイルスの増殖とそれに及ぼすアクトノマイシン D の影響

TMV (10 μg/ml) を摩擦接種した Ambalema および Xanthi 葉におけるウイルスの増殖量を経時的に測定した。その結果を Fig. 1 に示した。Ambalema におけるウイルスの増殖曲線は Xanthi に比べ著しくゆるやかであり、接種 12 日後のウイルス濃度は葉生体重 1 g 当たり 69 μg で、Xanthi の約 1/8 であった。

つぎに TMV を摩擦接種した Ambalema 葉から 2 時間、1, 3, 5, 10, 15 日後に葉ディスクを切り取

Fig. 1. Time course of TMV multiplication in the inoculated leaves of *Nicotiana tabacum* cvs. Ambalema (●) and Xanthi (■). Concentration of TMV was measured by ELISA.

り、これを AMD 溶液 (10 または 50 $\mu\text{g/ml}$) に 3 日間浮遊させたのち、ウイルス量を測定した。その結果を Fig. 2 に示した。接種 2 時間および 1 日後の葉ディスクの AMD 処理ではウイルス量が対照に比べ 2.5~3 倍に増加した。しかし、その後 AMD のウイルス増殖促進の効果は減少し、接種 10 日以後の葉ディスクではそれが認められなくなった。

また TMV を接種した Ambalema と Xanthi 葉から 2 時間後に葉ディスクを切り取り、これを AMD 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$) に浮遊させ、経時的にウイルス濃度を測定した。その結果を Fig. 3 に示した。Ambalema および Xanthi で AMD の処理によるウイルスの増殖促進が接種 1 日後から測定した 5 日後まで認められたが、その割合は Xanthi に比べ Ambalema で大きかった。

接種葉から分離したプロトプラストにおけるウイルスの感染率と増殖量

接種葉内におけるウイルスの拡がりや細胞内でのウイルスの増殖量を検討するため、TMV を接種した Ambalema および Xanthi 葉から 3, 7, 10, 15 日後にプロトプラストを分離し、その直後と 3 日間培養し

たのちにウイルスの感染率と増殖量を測定した。その結果を Table 1 に示した。

分離直後に測定したプロトプラストのウイルス感染率は Ambalema では接種後日数の経過とともに増加したが、接種 15 日後でも 32% と低かった。一方、Xanthi ではこのウイルス感染率は接種 7 日後に約 80% となり、その後はほとんど変化しなかった。またプロトプラスト 10^6 個当りのウイルス量も Ambalema は Xanthi に比べ著しく低かった。さらに蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量を求めると、Ambalema ではその値が接種 3 日後から 15 日後までほとんど変化せず、Xanthi のそれに比べ著しく低かった。

一方、これらのプロトプラストを 72 時間培養したのち、ウイルスの感染率と増殖量を測定した場合には、Ambalema では、分離直後よりプロトプラストのウイルス感染率が増加し、プロトプラスト 10^6 個当りのウイルス量は、4.6~6.0 倍に増加し、蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量も 3.4~5.0 倍となった。Xanthi ではプロトプラストのウイルス感染率は接種 3 日後で増加が認められた以外は変化がなく、プロトプラスト 10^6 個当りのウイルス量と蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量の増加も約 2 倍で Ambalema に比べ低かった。

Fig. 2. Effect of actinomycin D [10 $\mu\text{g/ml}$ (■) and 50 $\mu\text{g/ml}$ (●)] applied at different time intervals after inoculation on the relative concentration of TMV in *Nicotiana tabacum* cv. Ambalema. The relative virus concentration was expressed as a percentage of the amount found in control leaves (distilled water treatment). Concentration of TMV was measured by ELISA.

Fig. 3. Effect of actinomycin D applied just after inoculation on multiplication of TMV in *Nicotiana tabacum* cvs. Ambalema (a) and Xanthi (b). Concentration of TMV was measured by ELISA. ●: actinomycin D (50 $\mu\text{g/ml}$), ■: control (treated with distilled water).

Table 1. Infection percentage of protoplasts and TMV content in protoplasts isolated from inoculated leaves

Tobacco cultivar	Infection length (days)	Just after isolation of protoplasts			72 hr after incubation of protoplasts		
		Infected protoplasts (%)	TMV content		Infected protoplasts (%)	TMV content	
			ng/1×10 ⁶ protoplasts	pg/infected protoplast a)		ng/1×10 ⁶ protoplasts	pg/infected protoplast a)
Ambalema	3	9.5	42.0	0.44	10.5	233 (5.5) b)	2.21 (5.0)
	7	16.2	90.5	0.59	20.1	548 (6.0)	2.72 (4.6)
	10	28.1	120.1	0.43	38.5	595 (4.9)	1.54 (3.6)
	15	31.5	138.5	0.44	41.8	635 (4.6)	1.51 (3.4)
Xanthi	3	50.0	715.0	1.48	71.5	2100 (2.9)	2.98 (2.1)
	7	80.8	2050.0	2.53	81.1	4300 (2.1)	5.30 (2.1)
	10	82.0	2560.0	3.12	83.5	4600 (1.8)	5.50 (1.7)
	15	82.5	2750.0	3.33	83.7	4890 (1.8)	5.81 (1.7)

a) TMV-specific fluorescent antibody positive protoplasts.

b) The ratios of virus content at 72 hr after incubation of protoplasts to that at just after isolation of protoplasts.

Table 2. The percentage of infected protoplasts and virus content in protoplasts isolated from tobacco leaves which virus multiplication were stimulated by actinomycin D (AMD)

Tobacco cultivar	Treatment	Infected protoplasts (%)	TMV content	
			ng/1×10 ⁶ protoplasts	pg/infected protoplast a)
Ambalema	AMD	46.5	261.0	0.56
	control	31.7	121.0	0.38
Xanthi	AMD	77.4	1640.0	2.05
	control	73.5	1240.0	1.65

a) TMV-specific fluorescent antibody positive protoplasts.

前記のように Ambalema の接種葉を AMD で処理すると TMV の増殖が促進されるが、この場合、葉内においてウイルスの感染細胞が増加したのか、細胞内におけるウイルスの増殖が促進されたのかを検討するため、TMV を接種した Ambalema 葉および Xanthi 葉から 2 時間後に葉ディスクを切り取り、これらを AMD 溶液 (10 µg/ml) に 3 日間浮遊させたのち、プロトプラストを分離しウイルスの感染率と増殖量を測定した。その結果を Table 2 に示した。Ambalema では AMD 処理葉ディスクからのプロトプラストでウイルスの感染率が対照の 1.5 倍となった。またプロトプラスト 10⁶ 個当りのウイルス量と蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当り平均ウイルス量もそれぞれ対照の約 2.2 倍と 1.5 倍となった。Xanthi では、AMD 処

理葉ディスクからのプロトプラストの感染率、10⁶ 個当りウイルス量、および蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量が対照に比べやや増加したが、Ambalema に比べその割合は低かった。

健全葉から分離したプロトプラストにおけるウイルスの感染と増殖

Ambalema および Xanthi 葉から分離したプロトプラストにエレクトロポレーション法により TMV-RNA を接種し、ウイルスの感染率と増殖量を測定した。その結果を Figs. 4, 5 に示した。プロトプラストのウイルス感染率は Ambalema と Xanthi ではほとんど差が認められなかった。また ELISA 法で測定したウイルスの増殖量についても Ambalema が Xanthi よりやや低い傾向にあったが、その差は少なかった。

Fig. 4. Time course of percentage of the protoplasts in which TMV-infection was established. ●: Ambalema, ■: Xanthi.

Fig. 5. Time course of TMV multiplication in protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* cvs. Ambalema (●) and Xanthi (■). Concentration of TMV was measured by ELISA.

さらにウイルス接種 72 時間後のプロトプラストにおけるウイルス量をインゲンを用いた局部病斑法により測定したところ、Ambalema と Xanthi の比感染価がそれぞれ 0.5 と 0.6 でその差は少なかった。また蛍光抗体法でプロトプラストを染色した場合にも蛍光の輝度は両者でほぼ同程度であった。さらに両品種のプロトプラストをウイルス接種直後から AMD 処理 (10 μg/ml) したが、両者とも対照に比べウイルスの増殖の促進はみられなかった。

考 察

タバコ品種 Ambalema に TMV の感染による病徴が現れない原因は明らかでないが、Ambalema の接種葉における TMV の増殖量は感受性品種 Xanthi のそれに比べ著しく低く、接種 12 日後でも 1/8 以下であった。また TMV 接種 30 日後の Ambalema の上位葉 (Xanthi ではモザイク症状の出現している葉位の葉) の TMV 濃度も Xanthi の 1/10 以下と低かった (陳ら未発表)。トマトでも TMV の弱毒系統は病徴をほとんど現さないが、この場合にも植物体内のウイルス濃度が強毒系統の 1/5~1/10 と低くなっている¹⁰⁾。このようにウイルスが全身的に感染してもその濃度がある値以下に低いと病徴が出現しないのかもしれない。

これまで、ウイルスに抵抗性を示す宿主を AMD で処理するとウイルスの増殖が促進される例が報告されているが^{1,2,6,12,16)}、本実験でも Ambalema の接種葉を接種後の早い時期に AMD で処理するとウイルスの増殖量が 2.5~3 倍に増加した。しかし、AMD の処理の時期が遅くなるとウイルス増殖の促進効果は減少し、接種 10 日以後ではほとんど認められなくなった。このことは、AMD が宿主の DNA 依存の RNA 合成を阻害するとされているので、Ambalema では感染の早い時期に植物がウイルスの感染に反応してその遺伝子の働きによって、ウイルスの増殖を抑制する生理的狀態を形成することを示していると考えられる。

接種葉から経時的に分離したプロトプラストのウイルスの感染率と増殖量および蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量は、Ambalema では Xanthi に比べ著しく低かった。これは、Ambalema 葉のウイルス濃度が Xanthi 葉のそれに比べ著しく低いのは、葉中のウイルス感染細胞の割合が少ないのと同時に個々の感染細胞におけるウイルス量も低いためであることを示している。植物体におけるウイルスの細胞間移行は細胞内でのウイルスの増殖と関連していると考えられ、Ambalema 葉でウイルス感染細胞の割合が少ないのは、細胞間のウイルスの移行が物理的に阻害されたのではなく、細胞内でのウイルスの増殖が抑制され、その結果細胞間の移行速度も低下したためと考えられる。このことは AMD 処理により、ウイルス濃度が増加した葉からのプロトプラストのウイルス感染率と蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量がともに増加していることから推察される。

TMV 接種葉から分離したプロトプラストを72時間培養すると、Ambalema ではウイルスの感染率がかなり増加した。これは分離直後のプロトプラストではウイルスの増殖量が少なく、蛍光抗体法では検出できなかったものが、培養後にはウイルスが増殖し検出できるようになるためと考えられた。また、プロトプラスト 10^6 個当りのウイルス量と蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りのウイルス量もそれぞれ分離直後のプロトプラストに比べ 4.6~6.0 倍と 3.4~5.0 倍に増加した。一方、Xanthi ではこれらの増加の割合は Ambalema に比べて低かった。これは、Ambalema の葉組織内ではウイルスの増殖が Xanthi に比べ強く抑制された状態にあり、これがプロトプラストになると弱められ、ウイルスの増殖が著しく促進されるためと考えられる。しかし、この場合における Ambalema のプロトプラストのウイルス濃度は Xanthi のそれと同程度にまでは増加しなかった。これは Ambalema の葉組織内で誘起されたウイルスの増殖抑制作用がプロトプラストになった場合にも完全には失われないためかもしれない。

Ambalema と Xanthi の健全葉から分離したプロトプラストに TMV を接種した場合、ウイルスの感染率は両品種でほとんど差がなく、ウイルスの増殖量も Ambalema でやや低い傾向にあったが、著しい差は認められなかった。今泉ら⁸⁾ はすでに同様の実験を行っており、Ambalema のプロトプラストではウイルスの感染率と増殖量が感受性品種の Bright Yellow のそれらより低かったと報告している。しかし、本実験では Ambalema の葉組織でみられたウイルス増殖抑制作用はプロトプラストではほとんど失われていると考えられた。これまでキュウリモザイクウイルスに抵抗性のキュウリ品種¹³⁾、TMV に抵抗性を示す *Tm-1* 遺伝子を持つトマト品種^{15,21)}、cowpea mosaic virus に免疫性のササゲ品種 Arlington^{4,9)} などでは植物体と同様プロトプラストでも抵抗性を示すことが知られているが、局部病斑を形成しウイルスが局在化する宿主や免疫性とされる宿主などでもプロトプラストではウイルスに対する抵抗性が認められなくなる例も報告されている^{3,4,14,20)}。このように植物体でみられたウイルス抵抗性がプロトプラストでは弱められたり、失われる場合には、その原因を探ることにより、植物体でのウイルス抵抗性の機構を明らかにできる可能性が

ある。

摘 要

タバコ品種 Ambalema のタバコモザイクウイルス (TMV) に対する耐病性の機構を明らかにする目的で、接種葉および葉肉プロトプラストにおける TMV の増殖とそれに及ぼすアクチノマイシン D の影響を感受性品種 Xanthi と比較して検討した。

Ambalema の接種葉におけるウイルスの増殖量は Xanthi のそれに比べ著しく低く、接種 12 日後でも 1/8 であった。TMV を接種した Ambalema 葉を接種 2 時間あるいは 1 日後にアクチノマイシン (AMD) で処理すると、TMV の増殖量が対照の 2.5~3.0 倍に増加したが、その後 AMD のウイルス増殖促進の効果は減少し、接種 10 日以後ではほとんど認められなくなった。TMV 接種葉から経時的に分離したプロトプラストのウイルス感染率と蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量は、Ambalema では Xanthi に比べ著しく低かった。一方、このプロトプラストを 72 時間培養すると、Ambalema ではウイルスの感染率がかなり増加するとともに、蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量が約 5 倍に増加した。Xanthi でも蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量の増加が認められたがそれは約 2 倍であり、Ambalema に比べ低かった。AMD 処理によりウイルス濃度の増加した Ambalema の接種葉から分離したプロトプラストでは、ウイルスの感染率と蛍光抗体染色陽性プロトプラスト当りの平均ウイルス量が対照に比べ増加していることが認められた。一方、Ambalema と Xanthi の健全葉から分離したプロトプラストに TMV を接種した場合には、ウイルスの感染率は両品種でほとんど差がなく、ウイルスの増殖量も Ambalema が Xanthi よりやや低い傾向にあったが、その差は少なかった。以上の結果から Ambalema の葉組織で TMV の増殖量が少ないのは、葉組織の細胞内でのウイルスの増殖が抑制されるため、個々の細胞でのウイルス濃度が低くなるとともに細胞間のウイルスの移行も遅れ、感染細胞の割合も少なくなるためと考えられた。しかし、プロトプラストでは、この葉組織細胞でのウイルスの増殖抑制作用はほとんど誘起されないと考えられた。

引用文献

1. Barbara, D.J. and Wood, K.R. (1974). *Physiol. Plant Pathol.* 4: 45-50.
2. Barnett, A. and Wood, K.R. (1978). *Ibid.* 12: 257-277.
3. Beier, H., Siler, D.J., Russell, M.L. and Bruening, G. (1977). *Phytopathology* 67: 917-921.
4. Beier, H., Bruening, G., Russell, M.L. and Tucker, C.L. (1979). *Virology* 95: 165-175.
5. Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). *J. gen. Virol.* 34: 475-483.
6. Faccioli, G. and Rubies-Autonel, C. (1976). *Phytopath. Z.* 87: 48-56.
7. Guilford, P.J. and Forster, R.L.S. (1986). *J. gen. Virol.* 67: 83-90.
8. 今泉誠子・高浪洋一・久保 進 (1979). *日植病報* 45: 129-130 (講要).
9. Kiefer, M.C., Bruening, G. and Russell, M.L. (1984). *Virology* 137: 71-81.
10. Kiho, Y. and Nishiguchi, M. (1984). *Microbiol. Immunol.* 28: 589-599.
11. 久保 進 (1971). *秦野たばこ試報* 70: 1-42.
12. Leobenstein, G., Sela, B. and van Praagh, T. (1969). *Virology* 37: 42-48.
13. Maule, A.J., Boulton, M.I. and Wood, K.R. (1980). *J. gen. Virol.* 51: 271-279.
14. Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1975). *Ibid.* 29: 81-91.
15. Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1977). *Ibid.* 34: 499-506.
16. Nachman, I., Loebenstein, G., van Praagh, T. and Zelcer, A. (1971). *Physiol. Plant Pathol.* 1: 67-71.
17. Nagata, T. and Takebe, I. (1970). *Planta* 99: 12-20.
18. Nolla, J.A.B. (1938). *J. Hered.* 29: 43-48.
19. Otsuki, Y. and Takebe, I. (1969). *Virology* 38: 497-499.
20. Otsuki, Y., Shimomura, T. and Takebe, I. (1972). *Ibid.* 50: 45-50.
21. Watanabe, Y., Kishibayashi, N., Motoyoshi, F. and Okada, Y. (1987). *Ibid.* 161: 527-532.
22. Watanabe, Y., Meshi, T. and Okada, Y. (1987). *FEBS Lett.* 219: 65-69.
23. Widholm, J.M. (1972). *Stain. Tech.* 47: 189-193.