総 説

植物の2本鎖 RNA ウイルス

池 上 正 人

PLANT VIRUSES WITH DOUBLE STRANDED RNA GENOMES

Masato IKEGAMI

Department of Biochemistry, Kinki University School of Medicine

[受付: 3月11日, 1976年]

はじめに

過去20年間に発見された2本鎖(ds) RNA ウイルスの数は16にものぼり, それらの寄主範囲は哺乳動物, 昆虫, 高等植物, 糸状菌と広範囲に及んでいる。しかしながら, 哺乳動物, 昆虫, 高等植物を寄主とするウイルスと糸状菌を寄主とするウイルスとは, 粒子の大きさ, 構造などに大きな差異がみられ, 分類学上同一の科に属するものとするには無理がある。

ICT (The International Committee on Taxonomy of Viruses) は下記の粒子構造をする ds-RNA ウイルスを Reoviridae と分類した¹⁾。(Reoviridae の名称はこの科のなかでもっとも詳細に粒子構造, 構成成分が研究されている reovirus に由来している。)

1. ウイルス核酸である ds-RNA は, 分子量 $0.3 \sim 3.0 \times 10^6$ からなる数本のセグメントで構成され, これらはすべて1粒子中に含まれる。

2. 粒子は正20面体構造で, 直径は 60~80 nm である。

Reoviridae は寄主範囲に基づいて次の4属に分類される。

1) Reoviruses, reovirus で代表される属で寄主は脊椎動物である。

2) Orbiviruses, bluetongue virus で代表され, 寄主は哺乳動物で昆虫が伝搬する。

3) Cytoplasmic polyhedrosis virus (細胞質多角体病ウイルス, CPV), 寄主は80種の昆虫である。

4) 植物の ds-RNA ウイルス

4) のグループには wound tumor virus (WTV), イネ萎縮病ウイルス (rice dwarf virus, RDV), maize rough dwarf virus (MRDV), Fiji disease virus (FDV) およびイネ黒すじ萎縮病ウイルス (rice black streaked dwarf virus, RBSDV) が属する。本稿ではこの5植物 ds-RNA ウイルスの粒子の構造とその構成成分を中心に述べてみたい。なお2本鎖 RNA ウイルスについては川瀬実著「ウイルスと昆虫」²⁾および Kaper 著「The Chemical Basis of Virus Structure, Dissociation and Reassembly」³⁾の総説がある。合わせて参照してほしい。

1. 病理学的研究

1. 地理的分布

植物の ds-RNA ウイルスの地理的分布は下記のように限定される⁴⁻⁸⁾。

WTV; アメリカ

RDV; 日本, 韓国

MRDV; イタリア, スイス, スペイン, フランス, ユーゴスラビア, チェコスロバキア, イスラエル

FDV; オーストラリア, ニューギニア, フィジー島, フィリピン, サモア, マダガスカル, ニューブリテン, ニューヘブライデス

RBSDV; 日本

2. 媒介昆虫

植物の ds-RNA ウイルスは植物とウンカ・ヨコバイ類の体内の両方で増殖する興味あるウイルスである。WTV と RDV はヨコバイによって媒介される^{4,5)}。いっぽう MRDV, FDV と RBSDV は Delphacidae に

* 近畿大学医学部生化学研究室

属するウンカによって媒介される^{6,8)}。とくに MRDV と RBSDV の媒介昆虫は同種のウンカ (*Laodelphax striatellus*, ヒメトビウンカ) である^{6,8)}。WTV が媒介昆虫体内で増殖することは下記の方法で証明された⁹⁾。WTV に感染したヨコバイ (*Agrallia constricta*) を磨砕し、 $10^{1.5}$ 倍希釈液を無毒虫に注射し、1 か月後生存虫を磨砕し、さらに $10^{1.5}$ 倍希釈して無毒虫に注射、これを連続7代通過させた。その結果、各継代の保虫率を換算すると7代後には最初の保毒虫の磨砕液は 10^{18} 倍に希釈されたが、なおその感染力は変化しなかった。いつぼう保毒虫磨砕液は 10^5 倍希釈で感染力を消失するので、前述の継代保毒虫磨砕液が 10^8 倍希釈でもなお感染力を有することは、このウイルスが虫体内で増殖したためである。RDV, RBSDV でも同様な方法で虫体内の増殖が証明された^{10,11)}。FDV および MRDV では保毒虫細胞の電顕観察の結果、viroplasma (ウイルスの assembly の場所) が細胞質にみられ、このことはウイルス虫体内増殖を示すものである^{12,13)}。WTV, RDV および MRDV は保毒虫の卵子を通じて次代の子虫に伝染する、いわゆる経卵伝染が報告された¹⁴⁻¹⁶⁾。FDV と RBSDV は経卵伝染しない^{7,17)}。経卵伝染はヨコバイの卵巣小管内の mycetome 内に共生する微生物のうち L (電子密度の低い) 共生微生物が表面に RDV 粒子を吸着し、mycetocyte がこれを含んで卵黄形成期の oocyte に侵入することによって成立する¹⁸⁾。このことから経卵伝染の有無は mycetocyte が卵巣内に共生するかどうかによると考えられる。WTV 粒子は保毒虫体内の脂肪体、マルピギー氏管、表皮、筋肉、mycetome、唾腺、神経系、血球の細胞、気管、腸のなかにみられ¹⁹⁻²²⁾、RDV は保毒虫の脂肪体、マルピギー氏管、腸の上皮細胞、唾腺、卵巣内の細胞中に見いだされる^{23,24)}。MRDV 粒子は脂肪体、唾腺、卵巣、mycetome、筋肉の細胞中にみられる²⁵⁻²⁹⁾。これらのことから、保毒虫はウイルスに全身感染していると思われるが、感染細胞の異常分裂は観察できない。ヒメトビウンカによって獲得された RBSDV は消食管で増殖し、ついで体液に移り、唾腺を経て植物に伝搬される¹¹⁾。

3. 寄主範囲・特徴

WTV の寄主範囲は広く、20科34種の双子葉植物に感染し³⁰⁾、寄主植物の根や茎に腫瘍をつくる⁴⁾。FDV および RBSDV はそれぞれサトウキビ および日本産イネに感染し、感染植物は萎縮し、罹病葉には腫瘍がみられる^{7,8)}。このような腫瘍は感染師部細胞の異常分裂につづく細胞肥大に原因している^{7,8)}。FDV と RBSDV は MRDV の寄主植物であるトウモロコシにも感染し、罹病植物の丈は短くなり、葉には腫瘍をつくる^{8,31)}。いっ

ぽう MRDV はサトウキビ (FDV の寄主植物) および日本産イネ (RBSDV の寄主植物) には感染しない^{82,33)}。FDV の日本産イネへの接種および RBSDV のサトウキビへの接種は行なわれていない。RDV に感染した日本産イネは丈が短くなり、感染葉には白斑がみられ、この白斑は縦につながって縞となる³⁾。日本産イネを用いた実験で RDV と RBSDV との間に干渉作用はない³⁾。

いままでは昆虫体内のウイルスと植物のなかのウイルスは同一であるとして述べてきたが、これは次の事実に基づいている。

1) 罹病植物から純化したウイルスは昆虫体内で増殖し、保毒虫を通して同種の健全植物に感染する^{10,11,34,35)}。

2) 罹病植物および保毒虫から純化したウイルスは血清学的にまったく同一のものである³⁶⁾。

3) 罹病植物の感染細胞と保毒虫の感染細胞の電顕観察の結果同じような形態の粒子が観察された^{12,37,38)}。

植物の ds-RNA ウイルスは寄主植物に汁液接種できない。なぜ虫を通してのみ接種可能かについては不明で、粒子が不安定なためだけでは説明できないようである。ウイルスは保毒虫が師部組織から吸汁するときに接種されるが、もし機械的にウイルスを師部組織に注入できれば、接種は可能かもしれない。

2. 粒子の構造および理化学的性質

1. 粒子の構造

植物の ds-RNA ウイルス感染細胞の電顕観察から、ウイルス粒子 (直径 70~80nm) は電子密度の高い core (直径約 40nm) とそれを包む capsid (ウイルスたん白質殻) から構成される。WTV, RDV, MRDV および FDV では、純化標品のネガティブ染色による電顕観察からたん白質サブユニットの立体的な並び方が明らかになった。Bils・Hall³⁹⁾によると、WTV 粒子は正20面体構造で、capsid は92個の capsomere (形態学的単位) からなるとしたが、その後保坂⁴⁰⁾は種々の球型ウイルスの構造の CV 比 (capsomere 間の距離とウイルス capsid の直径の比) を計算し、WTV 粒子の capsomere の数は162であるとした。WTV の構成たん白質 (後述) と粒子の形態学的な観察結果から、この capsid の外側には protein layer が存在し⁴¹⁾、キモトリブシンで処理するとこの protein layer がはぎとられ、outer shell の capsomere の構造が明白に観察できる⁴¹⁾。後述するように MRDV と FDV の粒子では protein layer はみられない。WTV 粒子の直径は 60~80nm³⁹⁾で、core の直径は 35~40nm である⁴²⁾。WTV 粒子の inner shell の幅は約 4.5nm である⁴³⁾。木村・四方によると RDV 粒子は正20面体構造で、capsid のなかに 32 個の

図1 RDV 粒子の構造(木村郁夫博士の好意による)

5回対称 (a), 3回対称 (b), 2回対称 (c) を示すモデル (上) とそれに似た RDV 粒子の電顕像を示す(下). (d) は重畳(superposition)を示さない.

図2 MRDV 粒子の電顕像(上)とその構造モデル(下). 酢酸ウラニウム染色. $\times 400,000$ (Dr. Milne の好意による)

- (A) 完全粒子. capsid の外側には A spike が見られる.
 (B) capsid の一部が崩壊した粒子.
 (C) B spike をもった core 粒子.

capsomere が存在する(図1).⁴⁴⁾ capsomere そのものは中空の管状構造で, 正20面体の頂点にある capsomere は中空で5つの構造単位からなる(図1)⁴⁴⁾. そのほかの位置のものは6つの構造単位からなる(図1)⁴⁴⁾. 換言すれば, 32個の capsomere からなる RDV 粒子は20個のヘキサマーと12個のペンタマーからなる180個の構造単位からできている. capsomere を構成している構造単位の大きさは直径6 nm, 長さ 9.5nm である⁴⁴⁾. RDV 粒子の

capsomere の数は162であるとの報告もある⁴⁰⁾. RDV 粒子の直径は約 70nm で, core の直径は 40~50nm である²³⁾. 純化 MRDV 粒子標品の酢酸ウラニウムによるネガティブ染色像から, この粒子は正20面体構造で, 外殻は92個の capsomere からなる³⁴⁾. しかし外殻の外側に MRDV 粒子特有の12個の A spike と呼ばれる突起があり(図2-A), その長さは 11nm で中空の5角形の管状構造である³⁴⁾. MRDV 粒子を熱処理するかあるい

図3 PTA 染色した B spike をもった MRDV 粒子の電顕像. バックグラウンドに PTA 染色によってはぎとられた B spike がみられる. $\times 400,000$. (Dr. Milne の好意による)

は *n*-ブタノールで処理すると, A spike と一部の capsomere がはぎとられ, 長さ 8 nm の B spike と呼ばれる突起のついた core (図2-C), あるいは B spike もはぎとられた core になる³⁴⁾. B spike は内殻の正20面体頂点に存在し, その構造は A spike と似ている³⁴⁾. MRDV の完全粒子の直径は 63~70nm で, core の直径は 50~57nm である³⁴⁾.

FDV 粒子の capsid の構造の詳細は不明であるが, FDV 粒子の形態学的な電顕観察の結果から, capsid および core の表面には MRDV 粒子にみられるような A spike および B spike があり⁴⁵⁾, おおのこの spike は5つの構造単位からなる五角形の中空の管状構造である⁴⁵⁾. FDV 粒子の直径は 70nm で, core の直径は 40 nm である¹²⁾. RBSDV 粒子の直径は 75~80nm⁹⁾, core の直径は 50~55nm⁹⁾ で, 粒子の構造については報告がない.

これらのことから MRDV と FDV の粒子構造は類

似していると考えられる. さらにこれらの粒子の capsid は種々の方法によって容易に core からはぎとられるようである. すなわち精製 MRDV 標品を 4 °C で1日保存すると B spike のついた core, あるいは表面がスムーズな core になる³⁴⁾. MRDV 粒子および FDV 粒子をリンタングステン酸でネガティブ染色すると, A spike, B spike および capsid は完全な粒子からはぎとられて, core となる (図3)^{34, 45)}. いっぽうこのような現象は WTV, RDV 粒子についてはみられない. MRDV 粒子は有機溶媒に不安定で, クロロホルムを用いて純化した粒子はすべて core である^{36, 46)}. FDV および RBSDV では, MRDV と同様に, 有機溶媒として四塩化炭素, フルオロカーボン, クロロホルムのいずれを用いた場合も, さらに有機溶媒を使用せず分画遠心と蔗糖濃度勾配遠心分離法のみで部分純化した場合でも, core のみが得られる^{47, 48)}. これとは反対に, RDV 粒子では有機溶媒としてクロロホルム, 四塩化炭素あるいはフルオ

ロカーボンを用いて、直径約 70nm の粒子が純化される⁴⁹⁾。

このように、粒子構造（とくに spike の存在の有無）および粒子の安定性を考えると植物の ds-RNA ウイルスは次の2群に類別できるようである。1つは WTV と RDV のグループ、他方は MRDV と FDV のグループである。粒子の安定性、あるいは前述した媒介昆虫の種類、寄主範囲、病徴から考え合わせると、RBSDV と MRDV、FDV との近縁関係は著しく、おそらくこの3ウイルスは同じグループに分類できるようである。

植物の ds-RNA が core 内で裸の RNA として存在するのがあるいは核たん白質として存在するののかについてははっきりしない。精製 WTV 粒子を 0°C で2週間保存するか、他方トリプシンで処理すると幅 30Å の核たん白のひも状物質が流れてくる³⁹⁾。純化 RDV 粒子を透析または凍結融解処理を行なうか、4°C で長時間保存すると、粒子からもひも状物質が流出し、この物質は RNase 処理で消化されるので RNA であると考えられた⁴⁹⁾。MRDV では、クロロホルムで純化した core は RNA を含有するが、熱処理で得られた core は RNA を含有しない。しかし構成たん白質には差がなかった。これは RNA と関係する内部たん白質の不存在を示す⁵⁰⁾。

Spike の構造上の機能については不明である。しかし reovirus をキモトリプシン処理して得られた core で m-RNA を試験管内で合成させ、電顕観察すると、10本の m-RNA がそれぞれ10個の spike から出ているのが観察された⁵¹⁾。

2. 粒子の理化学的性質

植物の ds-RNA ウイルス粒子の理化学的性質の報告はほとんどなく、ウイルス間で相互比較するのは困難である。WTV 粒子の沈降定数は 514 ± 10 で⁵²⁾、RDV 粒子の沈降定数と近似する⁵⁾。この WTV の沈降定数を用いて、粒子の分子量は $68 \pm 2 \times 10^6$ と算出された⁵²⁾。さらに WTV-RNA の全分子量は 15.5×10^6 であるから、RNA 含量は $23 \pm 1\%$ となる⁵²⁾。RNA 含量は 22% との報告もある⁵³⁾。RDV の RNA 含量は 11.7% である⁵⁴⁾。MRDV 完全粒子の沈降定数は不明であるが、その core の沈降定数は 400 である⁵⁵⁾。精製 WTV 粒子は浮上密度 (density) の異なる4粒子からなる⁴²⁾。浮上密度 1.29~1.30 の粒子は中空で、浮上密度 1.39~1.41 の粒子は完全粒子である。core は2つの浮上密度の異なる粒子（一方は浮上密度 1.425、他方のそれは 1.445）からなるが、構造たん白質には差がない⁴²⁾。core が2つの浮上密度の異なる粒子からなる理由は知られていない。reovirus をキモトリプシン処理すると浮上密度の異なる

2種類の core が得られる⁵⁶⁾。core の RNA のセグメント数を調べると、浮上密度 1.43 の core の RNA は 10本であるが、浮上密度 1.415 の core の RNA 数は 9 であった⁵⁶⁾。このことから reovirus の2つの core の浮上密度の差はセグメント数のちがいに由来と考えられた。そのほかの植物の ds-RNA ウイルス粒子の浮上密度については報告がない。

3. ウイルス核酸

WTV-RNA、RDV-RNA、MRDV-RNA および FDV-RNA は純化ウイルス標品からフェノール・SDS 法⁵⁷⁻⁶⁰⁾、たん白質分解酵素・SDS 法⁵⁷⁾、SDS・尿素法⁵⁸⁾、過塩素酸ナトリウム法⁵⁹⁾など種々の方法で抽出され、次のような性質を有するので ds-RNA と断定された⁵⁷⁻⁶¹⁾。

1. ここであげたどのウイルス RNA も冷エタノールに投入すると、DNA のようなゲル沈殿として得られ、1本鎖 (ss) RNA の沈殿とは異なる。

2. $1 \times \text{SSC}$ (0.15M NaCl , $0.015\text{M sodium citrate}$) のなかに懸濁したこれらの RNA は RNase で加水分解されない。100°C、10分間熱処理し、氷-エタノールのなかで急冷すると、TMV ss-RNA と同様に RNase で加水分解される。

3. $0.001 \times \text{SSC}$ 中に懸濁し、その紫外線吸収の温度変化をみると、DNA のような挙動で、約 75°C 前後まで一定で、それから鋭く立ちあがる。TMV ss-RNA の紫外線吸収は 30°C 位から温度とともにだんだんとあがる。

4. Cs_2SO_4 平衡沈降遠心分離の結果、浮上密度は 1.60~1.61 で、TMV-RNA の浮上密度 1.66 とは明らかに異なる。

5. 遊離のアミノ基と反応するホルマリン (1.8%, 37°C) とは DNA の場合と同様に反応せず、100°C、10分間加熱すると TMV-RNA と同様に反応する。

6. 酸およびアルカリで分解するとグアニン (G)/シトシン (C)、アデニン (A)/ウラシル (U) の比が 1 となつて、DNA のような塩基の相補性を示す。

7. 抗 poly inosinic: poly cytidylic acid 血清 (抗 poly [I]: poly [C]血清) と反応する。

これらのことからここで述べているウイルス RNA は DNA のような2重らせんであつて、塩基 G と C、および A と U の組み合わせで水素結合によって対合している。

RDV ds-RNA は径約 24Å、らせんのピッチは 30.5 Å で、一方のらせんから他方のらせんの距離は軸に沿って 13.0Å である⁶²⁾。さらに RDV ds-RNA の微細構造は赤外線吸収によつても調べられた⁶²⁾。[P < O] グ

ループのO··O線はらせん軸と 69.4° , $\angle OPO$ の2等分線はらせん軸と $40 \pm 4^\circ$ の角度をなす。これは DNA の2重らせん構造中の $[P \ll O]$ -グループの配置 (O··O線が 55° , $\angle OPO$ 2等分線が 65°) とはおおに異なる。このことは DNA と RNA とが2重らせん構造の概要は似ているが、微細構造は異なることを示している。またX線回析の結果、RDV, CPV と reovirus RNA の2重らせん分子構造は実質的に互いに等しい^{62,63}。WTV-RNA と RDV-RNA の GC 含量はそれぞれ44%, 44.3%である^{59,64}。

ds-RNA の蔗糖密度勾配による分析、電子顕微鏡観察およびポリアクリルアミドによる分析からみて、各ウイルスのゲノム構成は各ウイルスによって特異的である^{58,65-75}。WTV-RNA は蔗糖密度勾配遠心の結果、それらの沈降定数は 15S, 14.5S, 14.0S, 13.4S, 12S, 11S, 10S である⁵⁹。WTV-RNA のセグメントの分子量はこれらの沈降定数と、RNA の分子量 $= 2.24S^{3.16}$ の式から、 $0.32 \sim 2.62 \times 10^6$ と計算される⁵⁸。MRDV-RNA は蔗糖密度勾配遠心から、WTV-RNA とは異なる2成分からなる⁷³。その後ポリアクリルアミドゲルを支持体とする電気泳動の技術の進歩に伴い、ウイルスゲノム構成も詳細に分析された。MRDV-RNA はこの方法で10本のセグメントに分離された⁷²。その分子量は研究者により若干異なるが、 $1.11 \sim 2.58 \times 10^6$ ⁷³あるいは $1.13 \sim 2.85 \times 10^6$ である⁷²。FDV-RNA では9ないし10本のセグメントに分離され^{57,72}、RNA の分子量は RNA マーカーおよび電気泳動の緩衝液により若干異なるが、 $1.08 \sim 2.60 \times 10^6$ である⁵⁷。RBSDV-RNA では10本のセグメントに分類され⁷³、その分子量は電気泳動の緩衝液として Loening の緩衝液⁷⁶を用いると $1.17 \sim 2.88 \times 10^6$ である⁷⁵。

FDV-RNA, MRDV-RNA, RBSDV-RNA を同時に電気泳動した結果、FDV-RNA と MRDV-RNA では5本のセグメントは同じ分子量であり⁷²、MRDV-RNA と RBSDV-RNA の間では、7本のセグメントが同分子量である⁷⁵。また FDV-RNA と RBSDV-RNA では、4本のセグメントの分子量が一致している^{72,75}。これらのことから、3ウイルス間の近縁関係は著しい。しかし FDV-RNA と MRDV-RNA 間で、融解温度に差異があり^{55,57}、これは RNA 中の GC 含量に差があることを示す。

WTV-RNA と RDV-RNA のゲノム構成は MRDV-RNA, FDV-RNA と RBSDV-RNA とは異なる。WTV-RNA はポリアクリルアミドの泳動結果から12本のセグメントに分けられた⁷¹。その分子量は電気泳動の緩衝液として Loening の緩衝液を用いると $0.35 \sim 2.90$

$\times 10^6$ である⁷⁴。RDV-RNA は12本のセグメントに分けられ^{68,74}、その分子量は $0.52 \sim 3.10 \times 10^6$ である⁷⁴。WTV-RNA と RDV-RNA を同時に電気泳動した結果2本のセグメントがまったく同じ分子量であつた⁷⁴。

以上述べたようなウイルス特有のセグメント数はウイルス系統間で変化する。Black らは24年間 WTV に感染したクローバーをさし木しつづけ、昆虫体内では増殖しない vector less 系統を得た⁷⁷。この系統は vector cell monolayer に感染せず、セグメント数は普通系が12本であるのに対して11本である⁷⁸。reovirus でもこれに似た defective virion が報告された⁵⁰。MRDV の1変異株では、1セグメントは2つのバンドからなる⁷²。

reovirus は粒子のなかに ds-RNA のほかにアデニンに富む ss-RNA を含み、この RNA はウイルス全 RNA の約15~30%にあたる⁷⁹⁻⁸¹が、その機能については不明である。このような ss-RNA が植物の ds-RNA ウイルス粒子中に含まれているという報告はない。

4. 粒子中に存在する RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性

RDV ds-RNA はそのままではたん白質合成の鋳型活性がなく、熱変性などによつて1本鎖になつてはじめて活性を示す⁸²。reovirus が細胞に侵入後たん白質合成に必要な m-RNA の形成は、ds-RNA が ss-RNA に開裂することによつてではなく、また寄主の DNA 依存 RNA ポリメラーゼにより ds-RNA が読みとられることによつてもなく、ウイルス粒子中に存在する RNA ポリメラーゼによつて合成される⁸³⁻⁸⁶。その後 WTV, RDV あるいは FDV 粒子を試験管内で基質などと混ぜると RNA 合成がおこり、reovirus と同じように粒子中に RNA ポリメラーゼをもっていることが知られた⁸⁴⁻⁸⁶。植物の ds-RNA ウイルス粒子中の酵素活性の至適 pH は8.0前後であり、至適温度は 30°C 前後である。また活性は反応液中の MgCl_2 , NH_4Cl の濃度に左右される。基質として4種類のヌクレオシドトリリン酸(NTP)が必要である。NTP のうち1種類を省くと反応は進まない。反応はアクチノマイシンDによつて阻害されない。植物の ds-RNA ウイルス粒子中の酵素と reovirus 粒子中の酵素とは至適温度に差がみとめられる。reovirus の場合は、 40°C では 30°C の3倍、 50°C では 40°C の2倍の活性がある⁹⁰。反応生成物は生成1時間後には粒子から離れ反応液中に存在する。精製ウイルス粒子それ自体が酵素活性を示し、reovirus とちがつてキモトリプシンあるいは熱処理によつて core にする必要はないようである。

reovirus 粒子や CPV 粒子を用いて試験管内で合成された RNA は ds-RNA のゲノムセグメントを忠実に、その長さ全域にわたってコピーした ss-RNA である^{91,92}。ss-RNAはゲノムの2本鎖の両側のコピーの混合物ではなく、一方の鎖のコピーである^{91,92}。三浦らは ds-RNA の一方の5'末端のグアニンの7位置と2番めのアデニンのリボースの2位置そして reovirus ds-RNA の一方の5'末端のグアニンの7位置と2番めのグアニンのリボースの2位置がメチル化されていることを発見し、また m-RNA の配列は5'末端に修飾がある鎖とまったく同一であることを明らかにした⁹³⁻⁹⁶。これは m-RNA が相手の鎖の鋳型となつて相手の鎖が合成されるとそのままウイルスになることを示唆している。

Reoviridae に属するウイルス粒子中の酵素は Mg^{2+} の至適濃度によつて、糸状菌につくウイルス、Rhabdoviruses と Myxoviruses の粒子中の酵素と区別できる⁹⁷⁻¹⁰⁰。

5. 構成たん白質

植物の ds-RNA ウイルスの構成たん白質についてはほとんど不明で、WTV と MRDV からのみコートたん白質が分離されその性質が分析された。これらのたん白質をウイルス粒子から分離する方法としては酢酸法、フェノール法、温塩法、尿素-塩化リチウムによる方法、ギ酸-酢酸による方法など種々用いられる。WTV 粒子のたん白質は7成分のポリペプチドからなり、それぞれの分子量は (I) 160,000; (II) 131,000; (III) 118,000; (IV) 96,000; (V) 58,000; (VI) 36,000; (VII) 35,000である⁴¹。また精製ウイルスは CsCl 平衡沈降遠心分離の結果、4種類の粒子に分けられ、それらの粒子のたん白質の性質は次のようである⁴¹。浮上密度 1.26~1.29の粒子 (中空の粒子) はポリペプチド(VI)と(VII)からなり、浮上密度1.43および1.45の粒子(core)はポリペプチド(I), (III), (V) から構成される。浮上密度1.39の粒子は7成分のポリペプチドから構成されるが、ポリペプチド(IV)の量が CsCl 平衡沈降遠心分離前の量よりも少なく、これは WTV が CsCl に不安定であることを示すものである。さらにキモトリプシン処理した粒子のたん白質のポリアクリルアミドゲルによる泳動から、粒子の outer layer はポリペプチド(II)と(VI)から構成される。

精製 MRDV 粒子を蔗糖密度勾配遠心によつて完全な粒子、B spike の付着した core および B spike もとれた core の3つに分け、それぞれのたん白質をポリアクリルアミドで分析した⁵⁰。MRDV の完全粒子は6種類のポリペプチドから構成され、それぞれの分子量

は (I) 139,000; (II) 126,000; (III) 123,000; (IV) 111,000; (V) 97,000; (VI) 64,000 である。capsid はポリペプチド (IV), (V), (VI) からなり、core はポリペプチド (I), (II) から構成された。ポリペプチド(III)は B spike を構成した。

WTV 粒子と MRDV 粒子のポリペプチドの分子量の測定値と ds-RNA を転写した m-RNA から算出したたん白質の分子量がよく一致するので、WTV と MRDV の m-RNA も reovirus m-RNA と同様にモノシストロンであると考えられた。

6. 血清学的研究

FDV, RDV および MRDV に対する抗血清中にコートたん白質に対する抗体のほかにウイルス ds-RNA に対する抗体が存在する¹⁰¹⁻¹⁰³。CPV に対する抗血清中にもウイルス ds-RNA に対する抗体が存在する¹⁰⁴。いまAウイルスを注射した兎の血清中に、Aと沈降反応をおこす抗A抗体が生じたとする。その抗A抗体がBとも反応するならば、AとBは同じかまたは類似のウイルスと判定される。このような方法はきわめて容易で安心感をともなうので、ウイルス間の近縁関係を調べる場合にしばしば用いられる。しかし抗 ds-RNA 抗体は比較的非特異なため¹⁰⁵、ds-RNA ウイルス相互間の血清関係を調べるうえで注意が必要である。抗 ds-RNA ウイルス血清中の抗 ds-RNA 抗体の力価は抗コートたん白質抗体の力価より低い¹⁰¹。ウイルス ds-RNA の血清学的な性質は poly [I]: poly [C] とよく似ているがまったく同一でない^{48,102,106,107}。このような抗ウイルス ds-RNA 抗体はウイルス注射後、兎体内でウイルスが崩壊して産生されたものと考えられる¹⁰¹。抗 ds-RNA ウイルス血清中に抗 ds-RNA 抗体が含まれていることに注意して、MRDV の core のたん白質と RBSDV の core のたん白質間で血清関係があることが示された^{102,108}。前述のごとく MRDV 粒子と RBSDV 粒子の外殻たん白質は種々の方法によつて容易にはぎとられるため、完全な粒子を兎に注射しても血清中には core に対する抗体のみが産生される¹⁰²。したがって MRDV と RBSDV の外殻たん白質に対する血清関係は研究されていない。WTV と RDV, FDV と RDV, FDV と MRDV, WTV と MRDV 間でコートたん白質同士での血清関係はない^{5,36,101}。WTV と reovirus 間で血清関係があると報告された¹⁰⁹が、その後否定された¹⁰⁹。最近 WTV-RNA, reovirus-RNA および CPV-RNA 間でまったく塩基配列に類似性がないことがわかつた¹¹¹。

WTV あるいは MRDV 感染組織中に、高速遠心 (40,000rpm, 60分) では沈殿せず、ウイルス抗血清と反応

する“soluble antigen”が存在する^{50,102,110,112}。これは最初たん白質と考えられた¹¹²が、その後 ds-RNA であると証明された^{50,102}。

おわりに

以上植物の ds-RNA ウイルスについて最近までの研究成果をウイルス粒子の構成成分および粒子構造を中心にまとめてみた。これらのデータを相互比較すると、植物の ds-RNA ウイルスは下記に述べる2群に類別できることはすでに述べた。

- 1) WTV, RDV
- 2) MRDV, FDV, RBSDV

最近 WTV-RNA, CPV-RNA, reovirus-RNA 間で塩基配列の比較がなされた¹¹¹。試験管内で異種の核酸間 hybrid をつくる方法で、DNA を用いてすでに微生物間の比較がおこなわれている。高等動物でもすでに用いられ、高等哺乳類間の分類とよく合うことが知られている。今後植物の ds-RNA ウイルス間の相互比較が RNA の塩基配列のレベルでなされるならば、ウイルスの分類に大きく貢献するであろう。

最後に、原稿に目を通し貴重な助言をいただいた近畿大学農学部教授平井篤造博士に心から御礼申しあげる。また本稿のために写真を快く提供していただいた Laboratorio di Fitovirologia Applicata del CNR, Italy の Dr. R. G. Milne、植物ウイルス研究所の木村郁夫博士に感謝したい。

文 献

- 1) Fenner, F., Pereira, H. G., Porterfield, J. S., Joklik, W. K. and Downie, A. W. (1974) : Intervirology, **3**, 193.
- 2) 川瀬茂実 (1976) : 化学の領域選書, 南江堂, 東京, 282.
- 3) Kaper, J. M. (1975) : North-Holland/American Elsevier, New York, 485.
- 4) Black, L. M. (1970) : C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, **34**.
- 5) Iida, T., Shinkai, A. and Kimura, I. (1972) : C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, **102**.
- 6) Lovisolo, O. (1971) : C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, **72**.
- 7) Hutchinson, P. B. and Francki, R. I. B. (1973) : C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, **119**.
- 8) Shikata, E. (1974) : C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, **135**.
- 9) Black, L. M. and Brakke, M. K. (1952) : Phytopathology, **42**, 269.
- 10) 木村郁夫 (1962) : 日本植物病理学会報, **27**, 197.
- 11) 北川良親, 四方英四郎 (1974) : 日本植物病理学会報, **40**, 329.
- 12) Francki, R. I. B. and Grivell, C. J. (1972) : Virology, **48**, 305.
- 13) Vidano, C. (1970) : Virology, **41**, 218.
- 14) Fukushi, T. (1933) : Proc. Imp. Acad. Japan., **9**, 457.
- 15) Black, L. M. (1953) : Phytopathology, **43**, 9.
- 16) Harpaz, I. and Klein, M. (1969) : Ent. exp. and appl., **12**, 99.
- 17) 新海 昭 (1962) : 農技研報, **C 14**, 77.
- 18) Nasu, S. (1965) : Jap. J. Appl. Ent. Zool., **9**, 225.
- 19) Shikata, E., and Maramorosch, K. (1969) : J. Virol., **1**, 1052.
- 20) Shikata, E., and Maramorosch, K. (1965) : Virology, **27**, 461.
- 21) Hirumi, H., Granados, R. R. and Maramorosch, K. (1967) : J. Virol., **1**, 430.
- 22) Granados, R. R., Ward, L. and Maramorosch, K. (1968) : Virology, **34**, 790.
- 23) Fukushi, T., Shikata, E. and Kimura, I. (1962) : Virology, **18**, 192.
- 24) Fukushi, T. and Shikata, E. (1963) : Virology, **21**, 503.
- 25) Vidano, C. and Bassi, M. (1966) : Atti. Acad. Sci. Torino, **100**, 73.
- 26) Vidano, C. (1966) : Atti. Acad. Sci. Torino, **100**, 731.
- 27) Vidano, C. (1967) : Atti. Acad. Sci. Torino, **101**, 717.
- 28) Vidano, C. (1967) : Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Torino, **4**, 33.
- 29) Vidano, C. (1968) : Atti. Acad. Sci. Torino, **102**, 641.
- 30) Black, L. M. (1945) : Amer. J. Bot., **32**, 408.
- 31) Hutchinson, P. B., Forreath, G. N. R. and Osborn, A. W. (1972) : Sugarcane Pathol. Newsletter, **9**, 12.
- 32) Harpaz, I. (1972) : “Maiz rough dwarf, A planthopper virus disease affecting maize, rice, small grains and grasses”. Israel Universities Press, Jerusalem.
- 33) 四方英四郎, 北川良親, Lovisolo, O., Luisoni, E., Conti, M. (1971) : 日本植物病理学会報, **37**, 195.
- 34) Milne, R. G., Conti, M. and Lisa, V. (1973) : Virology, **53**, 130.
- 35) Black, L. M. (1965) : “Physiology of virus-induced tumors in plants” Encyclopedia of Plant Physiology, Springer-Verlag, New York.
- 36) Wetter, C., Luisoni, E., Conti, M. and Lovisolo, O. (1969) : Phytopath. Z., **66**, 197.
- 37) Shikata, E., Orenski, S. W., Hirumi, H., Mitsuhashi, J. and Maramorosch, K. (1964) :

- Virology, **23**, 441.
- 38) Gerola, F. M., Bassi, M., Lovisolo, O. and Vidano, C. (1966) : *Phytopath. Z.*, **56**, 97.
- 39) Bils, R. F. and Hall, C. E. (1962) : *Virology*, **17**, 123.
- 40) Hosaka, Y. (1965) : *Biochim. Biophys. Acta.*, **104**, 261.
- 41) Reddy, D. V. R. and MacLeod, R. (1976) : *Virology* (in press).
- 42) Lewandowski, L. J. and Traynor, B. L. (1972) : *J. Virol.*, **10**, 1053.
- 43) Streissle, G. and Granados, R. R. (1968) : *Archiv für die gesamte virusforschung*, **25**, 369.
- 44) Kimura, I. and Shikata, E. (1968) : *Proc. Japan Acad.*, **44**, 538.
- 45) Ikegami, M. (1975) : Ph. D. thesis, University of Adelaide.
- 46) Lesemann, D. (1972) : *J. Gen. Virol.*, **16**, 273.
- 47) 北川良親, 四方英四郎 (1969) : 北海道大学農学部邦文紀要, **6**, 446.
- 48) Ikegami, M. and Francki, R. I. B. (1974) : *Virology*, **61**, 327.
- 49) Toyoda, S., Kimura, I. and Suzuki, N. (1965) : *Ann. Phytopath. Soc. Japan.*, **30**, 225.
- 50) Boccardo, G. and Milne, R. G. (1975) : *Virology*, **68**, 79.
- 51) Bartlett, N. M., Gillies, S. C., Bullivant, S. and Bellamy, A. R. (1974) : *J. Virol.*, **14**, 315.
- 52) Kalmakoff, J., Lewandowski, L. J. and Black, D. R. (1969) : *J. Virol.*, **4**, 851.
- 53) Reichmann, M. E. (1965) : *Virology*, **25**, 166.
- 54) Suzuki, N. and Kimura, I. (1969) : *The virus disease of the rice plant*, 207, Johns Hopkins Press, Baltimore.
- 55) Redolfi, P., Pennazio, S. and Paul, H. L. (1973) : *Acta virol.*, **17**, 243.
- 56) Nonoyama, M., Watanabe, Y. and Graham, A. F. (1970) : *J. Virol.*, **6**, 226.
- 57) Ikegami, M. and Francki, R. I. B. (1975) : *Virology*, **64**, 464.
- 58) Wood, H. A. and Streissle, G. (1970) : *Virology*, **40**, 329.
- 59) Miura, K., Kimura, I. and Suzuki, N. (1966) : *Virology*, **28**, 571.
- 60) Redolfi, P. and Pennazio, S. (1972) : *Acta virol.*, **16**, 369.
- 61) Francki, R. I. B. and Jackson, A. O. (1972) : *Virology*, **48**, 275.
- 62) Sato, T., Kyogoku, Y., Higuchi, S., Mitsui, Y., Iitaka, Y., Tsuboi, M. and Miura, K. (1966) : *J. Mol. Biol.*, **16**, 180.
- 63) Arnott, S., Wilkins, M. H. F., Fuller, W. and Langridge, R. (1967) : *J. Mol. Biol.*, **27**, 535.
- 64) Gomatos, P. J. and Tamm, I. (1963) : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **50**, 878.
- 65) Kleinschmidt, A. K., Dunnebacke, T. H., Spendlove, P. S., Schaffer, F. L. and Whitcome, R. F. (1964) : *J. Mol. Biol.*, **10**, 282.
- 66) Bellamy, A. R., Shapiro, L., August, J. T. and Joklik, W. K. (1967) : *J. Mol. Biol.*, **29**, 1.
- 67) Miura, K., Fujii, I., Sakai, T., Fuke, M. and Kawase, S. (1968) : *J. Virol.*, **2**, 1211.
- 68) Fujii-Kawata, I., Miura, K. and Fuke, M. (1970) : *J. Mol. Biol.*, **51**, 247.
- 69) Verwoerd, D. S., Louw, M. and Oellermann, R. A. (1970) : *J. Virol.*, **5**, 1.
- 70) Lewandowski, L. J. and Millward, S. (1971) : *J. Virol.*, **7**, 434.
- 71) Reddy, D. V. R. and Black, L. M. (1973) : *Virology*, **54**, 557.
- 72) Reddy, D. V. R., Boccardo, G., Outridge, R., Teakle, D. S. and Black, L. M. (1975) : *Virology*, **63**, 287.
- 73) Redolfi, P. and Boccardo, G. (1974) : *Virology*, **59**, 319.
- 74) Reddy, D. V. R., Kimura, I. and Black, L. M. (1974) : *Virology*, **60**, 293.
- 75) Reddy, D. V. R., Shikata, E., Boccardo, G. and Black, L. M. (1975) : *Virology*, **67**, 279.
- 76) Loening, U. E. (1969) : *Biochem. J.*, **113**, 131.
- 77) Black, L. M. (1969) : *Ann. Rev. Phytopath.*, **7**, 73.
- 78) Reddy, D. V. R. and Black, L. M. (1974) : *Virology*, **61**, 458.
- 79) Bellamy, A. R., Shapiro, L., August, J. T. and Joklik, W. K. (1967) : *J. Mol. Biol.*, **29**, 1.
- 80) Shatkin, A. J. and Sipe, J. D. (1968) : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **59**, 246.
- 81) Bellamy, A. R. and Hole, L. V. (1970) : *Virology*, **40**, 808.
- 82) Miura, K. and Muto, A. (1965) : *Biochim. Biophys. Acta.*, **108**, 707.
- 83) Sekiguchi, K., Koide, F. and Kawamura, H. (1968) : *Arch. Ges. Virusforsch.*, **24**, 123.
- 84) Shatkin, A. J. (1965) : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 1721.
- 85) Shatkin, A. J. and Sipe, J. D. (1968) : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **61**, 1462.
- 86) Borsa, J. and Graham, A. F. (1968) : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 895.
- 87) Black, D. R. and Knight, C. A. (1970) : *J. Virol.*, **6**, 194.
- 88) Kodama, T. and Suzuki, N. (1973) : *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **39**, 251.
- 89) Ikegami, M. and Francki, R. I. B. (1976) : *Virology*, **70**, 292.
- 90) Kapuler, A. M. (1970) : *Biochemistry*, **9**,

- 4453.
- 91) Skehel, J. J. and Joklik, W. K. (1969) : *Virology*, **39**, 822.
 - 92) Shimotohno, K. and Miura, K. (1973) : *Virology*, **53**, 283.
 - 93) Furuichi, Y. and Miura, K. (1975) : *Nature*, **253**, 374.
 - 94) Miura, K., Watanabe, K. and Sugiura, M. (1974) : *J. Mol. Biol.*, **86**, 31.
 - 95) Miura, K., Watanabe, K., Sugiura, M. and Shatkin, A. J. (1974) : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **71**, 3979.
 - 96) Shimotohno, T. and Miura, K. (1974) : *J. Mol. Biol.*, **86**, 21.
 - 97) Alaoui, R., Jacouemin, J. M. and Boccardo, G. (1974) : *Acta Virol.*, **18**, 193.
 - 98) Chater, K. F. and Morgan, D. H. (1974) : *J. Gen. Virol.*, **24**, 307.
 - 99) Baltimore, D., Huang, A. S. and Stampfer, M. (1970) : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **66**, 572.
 - 100) Francki, R. I. B. and Randles, J. W. (1972) : *Virology*, **47**, 270.
 - 101) Ikegami, M. and Francki, R. I. B. (1973) : *Virology*, **56**, 404.
 - 102) Luisoni, E., Milne, R. G. and Boccardo, G. (1975) : *Virology*, **68**, 86.
 - 103) Milne, R. G. and Lovisolo, O. (1974) : *New Scientist*, **64**, 252.
 - 104) Payne, C. C. and Kalkmakoff, J. (1974) : *Intervirology*, **4**, 365.
 - 105) Stollar, B. D. (1973) : *The Antigens* (M. Sela, ed.) Vol., **1**, 1, Academic press, New York and London.
 - 106) Ikegami, M. and Francki, R. I. B. (1975) : *International Virology III*, 207. #
 - 107) Ikegami, M. and Francki, R. I. B. (1977) : *Ann. Phytopath. Soc. Japan.*, (in press).
 - 108) Streissle, G. and Maramorosch, K. (1963) : *Science*, **140**, 996.
 - 109) Gamez, R., Black, L. M. and MacLeod, R. (1967) : *Virology*, **32**, 163.
 - 110) Whitcomb, R. F. and Black, L. M. (1961) : *Virology*, **15**, 507.
 - 111) Martinson, H. G. and Lewandowski, L. J. (1974) : *Intervirology*, **4**, 91.
 - 112) Reddy, D. V. R. and Black, L. M. (1966) : *Virology*, **30**, 551.