

イネ縞葉枯病ウイルス純化法の改良

木谷清美・木曾皓
(四国農業試験場)

緒 言

筆者らは先にイネ縞葉枯病ウイルスの純化法について報告したが(木谷・木曾, 1967), これによると, えられるウイルス量が比較的少なく, さらに純化ウイルスの不活化や崩壊が著るしいので, よりすぐれた純化法が望まれていた。

ところで近年, 分子篩い分け(molecular sieving)技術が分析や調製的手段として重要視され, セファデックス(sephadex)が紹介されて以来“gel-filtration”として知られる特殊な分子篩い分け法が, 生化学者, 高分子化学者の間で, もっとも有力な研究手段の一つとなって来た。そしてセファデックスを使用した研究報告も年を追って多くなって来ている(Bengtsson and Philipson, 1964; Fridborg et al., 1965; Abbott and Johnson, 1966; Kingsbury 1966)。そこで筆者らも, セファデックスの利用に着眼し, これをイネ縞葉枯病ウイルス純化法の改良に応用したところ, 良好な成果がえられたので純化法の改良としてその一部をとりまとめ報告する。

純化行程のなかで行なった蔗糖濃度勾配遠心分離は, 阪大微生物病研究会観音寺研究所の御厚意により超遠心分離機の使用便宜を許していただいで行なったものである。記して御礼申し上げる。

材 料 と 方 法

1 病 イ ネ

四国農試病害研究室保存 No. 12系統(木谷・木曾・山本, 1968)の保毒ヒメトビウンカ(2~3令虫)を用いて, ポリエチレンバット(5×20×35 cm)に播種した水稻(金南風)が3葉期になった時集団接種(25~30℃下, 5日間)し, ところご隔離温室で管理し発病葉を供試した。

2 ウィルス純化行程

病葉10gを秤量し, 脱イオン水で洗滌後細断し, 0.001M MgCl₂-0.05M Tris 緩衝液(pH7.6) 50mlを加えて磨砕(日本精機ホモゲナイザー)した。磨砕汁液はガーゼでろ過し, ろ液は遠心(6000rpm, 20分, 5℃)して上清を採取した。えられた淡黄褐色の上清にポリエチレン・グリコール - NaCl法(Hebbert, 1963)を改良して用いた。すなわち, 終末濃度が0.43%になるようにNaClを加え, さらに8%になるようにポリエチレングリコール・6000を加えて氷冷下に攪拌したのち, 2~3時間5℃下で放置した。えられた沈澱は遠心(24000rpm, 60分)で採取し, 沈澱したペレットは0.001M MgCl₂-0.05M Tris 緩衝液(pH7.6) 8mlで溶解させ, 再び遠心分離(6000rpm, 10分)して螢光色の上清を採取した。次の行程として上清に分子篩い分け法(守屋, 1963; 高橋, 1961)を応用した。すなわち, セファデックスG-200を0.001M MgCl₂-0.05M Tris 緩衝液(pH7.6)で緩衝膨潤させ, セファデックスカラム(内径2cm, カラム長90cm)を作成し, 溶出液(0.001M MgCl₂-0.05M Tris 緩衝液(pH7.6)で充分洗滌した。これに先の上清液3mlを加えたのち, 20分間に7mlの流速で溶出液を流した。溶出液はフラクションコレクターを使用して7mlずつ分画し, 350mlの溶出液を流下させた。えられた分画液は260mμの吸光度を核酸自動分析装置(三田村理研製)で測定し, さらにイネ縞葉枯病ウイルス抗体感作綿羊赤血球凝集反応法(安尾・柳田, 1963; 木谷・木曾, 1966)でウ

1) Improvement for the purification method of rice stripe virus from rice stripe virus infected rice plant. By Kiyomi Kitani and Akira Kiso. Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku, No. 3: 81-85 (1968).

ウイルスの存在の有無を試験した。次に、ウイルス分画部を採集し、Visking社のセロファンチューブに入れ、膜外表面をカーボワックスで被覆し、氷室下で濃縮した。約1~2mlに濃縮できたらその一部を採取して、20%~50%の蔗糖濃度勾配液を作成した遠心チューブの最上層液の表面に静かにのせ、スイングローターを用いて超遠心分離(40,000rpm, 120分)した。遠心分離後、遠沈チューブの底部に穴を開け、3滴ずつ採集し、これに0.001M MgCl₂-0.05M Tris 緩衝液(pH7.6) 0.5mlを加えて、ウイルス抗体感作緬羊赤血球凝集反応でウイルスの存在部を試験した。

3 電子顕微鏡観察

日立HU-7D型電子顕微鏡を用い、噴霧法でウイルス分画部すなわち第3図、Iピークをメッシュ上に噴霧し、クロム蒸着によるシャドウイング法で観察した。

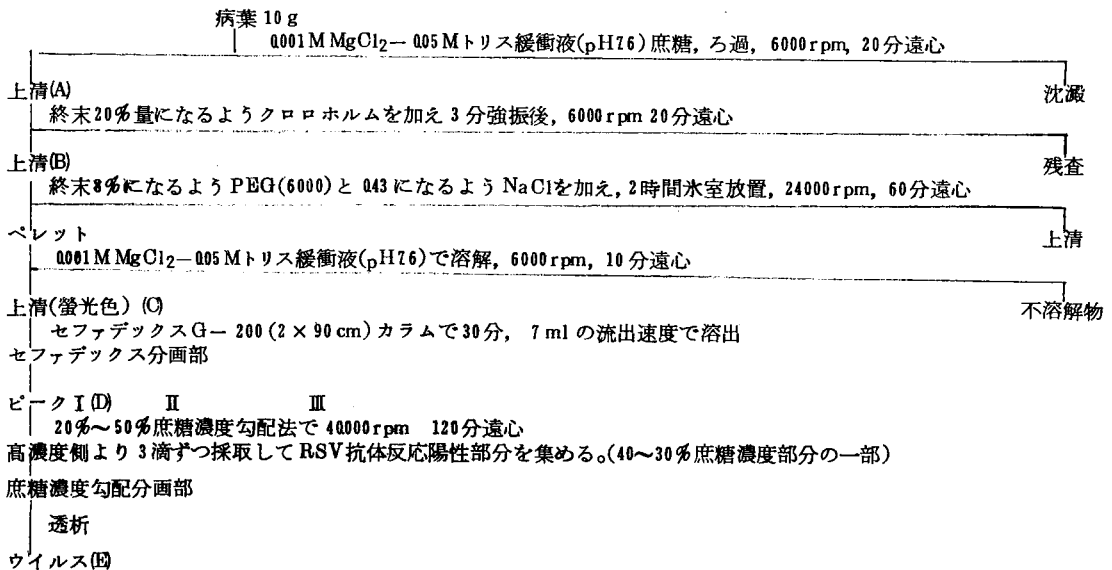
4 ウイルス活性の確認

セファデックスG-200カラム分画部(第3図、Iピーク)についてウイルス活性試験を行なった。すなわち、セロファンチューブで濃縮したウイルス液を凍結乾燥したイネ葉鞘に機械的吸収させ、これに無毒ヒメトビウンカ(木谷ら, 1968)の2令虫を放飼させた。ウイルス吸収葉鞘は毎日新しいものと交換して25℃下で5日間ウイルスを獲得させたのち、芽出し小麦(農林26号)上で個体別飼育を行なって保毒の有無を観察した。

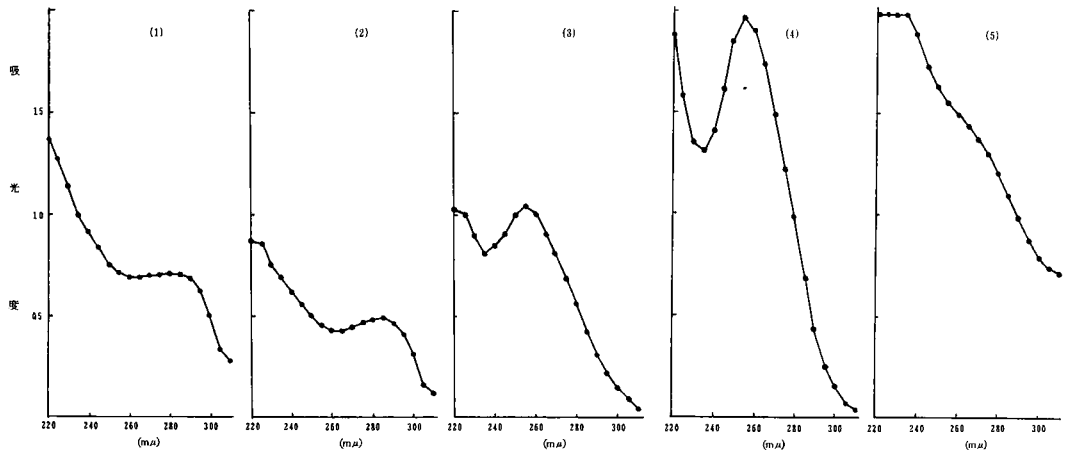
第1表 セファデックスカラムによる分画部(第3図 Iピーク)のウイルス活性

分 画	供試ヒメトビウンカ数			ウイルス活性 (%)	
	注 射 虫 数	15日以上生存虫	伝 搬 虫		
A分画 ¹⁾	I	50	43	18	41.8
	II	50	45	23	51.1
D分画 ¹⁾	I	50	39	16	41.0
	II	50	47	27	57.4

注 1) 第1図参照。

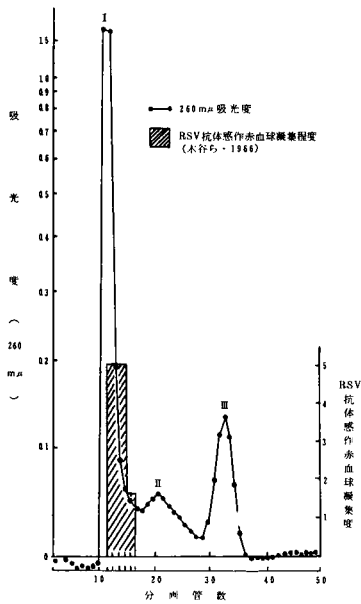


第1図 セファデックスG-200カラムを用いたイネ縞葉枯病ウイルス純化の改良法行程



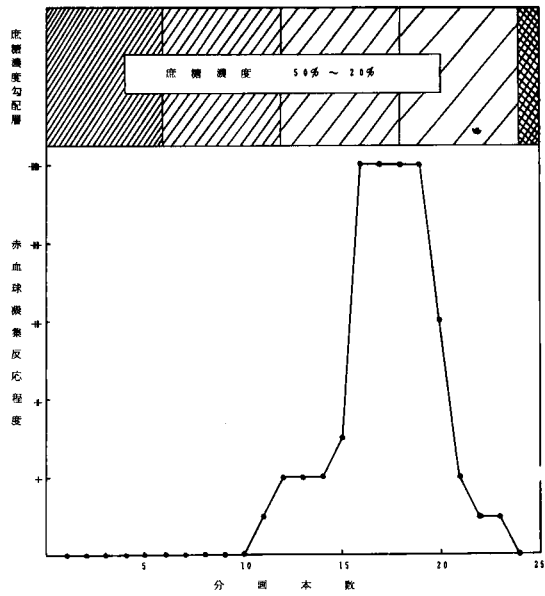
第2図 純化行程における分画部の紫外外部吸収特性

(1)A分画, (2)B分画, (3)C分画, (4)セファデックス分画Iピーク, (5)セファデックス分画IIIピーク
 ((1)~(5)は第1図参照).



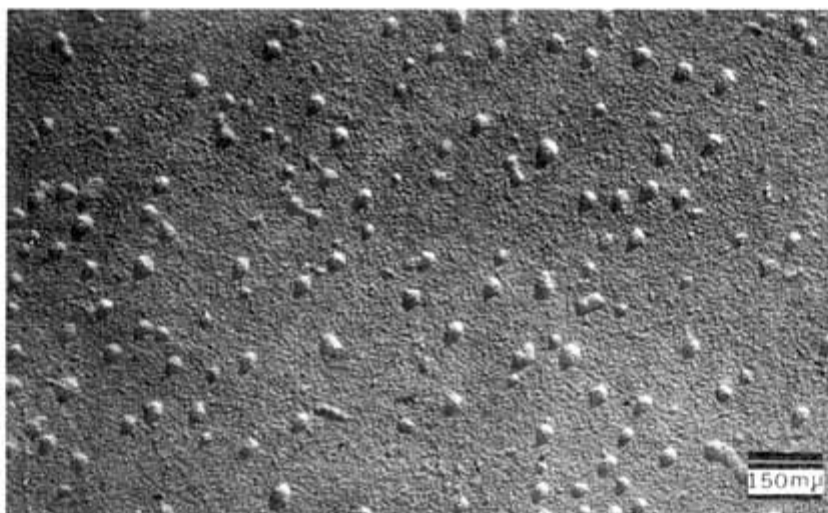
第3図 セファデックスG-200カラムによる分画

溶離液: 0.001 M MgCl₂ - 0.05 M トリス緩衝液 (pH7.6)
 7ml/30分溶出, 全量 350ml.



第4図 蔗糖濃度勾配遠心分離後の分画部分におけるウイルス抗体感作赤血球凝集反応

- 1 遠心した試料は1試験管に3滴宛添加.
- 2 凝集反応程度は(+)-(++++)で示す(木谷ら, 1966).



第5図 セファデックスG-200カラムによる分画部
(第3図Iピーク)の電子顕微鏡像

20~40 μ mの粒子が混在するが、平均粒子は30 μ m。

実験結果と論議

実験結果は第1表、第1~5図に示した。

第1図の純化行程により分画した分画部は、行程が進むに従って紫外吸収特性は核蛋白の様相を示した。特にセファデックスG-200カラムを通過させると $\max/\min = 154$ と核蛋白の特性を示すIピークが最初に溶出し、またこのピークはウイルス抗体感作綿羊赤血球凝集反応にも陽性を示し、さらに分画本数も極めて少本数にまとまるのでウイルス分画の目的を十分に果たすことができたと考える。

セファデックス分画部(D分画のIピーク)のウイルス活性もA分画(第1図)とほとんど大差が認められないので純化行程中のウイルスの不活化も少ないものと思われる。

D分画のIピークを試料とした電子顕微鏡像では、20~40 μ mの粒子がみられるが、平均粒子は30 μ mである。しかし、これら不揃いの粒子をさらに精製するために蔗糖濃度勾配遠心分離を行なった結果では、主体の粒子は、30%蔗糖濃度に存在するようである。今後大いさの平均した粒子を限って採取する簡便法には、Sephacrose 2BあるいはSephacrose 4Bを用いた分子篩が必要であろう。

摘 要

1. セファデックスG-200(2×90cm)カラムを用いて、イネ縞葉枯病ウイルスの純化法を改良した。
2. 改良法でえられたウイルス分画は、紫外吸収特性、ウイルス活性、電子顕微鏡的観察およびウイルス抗体感作綿羊赤血球凝集反応の結果から、イネ縞葉枯病ウイルス純化法の改良として適当なものであった。
3. ウイルス粒子の揃った大いさのものを採取するには、Sephacrose 2BあるいはSephacrose 4Bを用いた分画が必要のようである。

引用文献

- Abbott, D. G. and J. A. Johnson (1966) : J. Food Sci. 31 : 38~47.
- Bengtsson, S. and L. Philipson (1964) : Biochim. biophys. Acta, 79 : 399~406.
- Fridborg, K., S. Hjerten, and S. Hogland (1965) : Proc. nat. Acad. Sci. 54 : 513~521.
- Hebbert, T. T. (1963) : Phytopathology, 53 : 362.
- Kingsbury, D. W. (1966) : J. mol. Biol. 18 : 195~203.
- 木谷清美・木曾皓 (1966) : 四国植物防疫研究, 第1号 : 9~11.
- 木谷清美・木曾皓 (1967) : 昭和41年度稻縞葉枯病に関する研究成績(四国農試). pp. 9~18.
- 木谷清美・木曾皓・鄭鳳朝 (1966) : 同上 : 37~46.
- 木谷清美・木曾皓・山本孝孫 (1968) : 研究時報(昭和42年度試験成績, 四国農試・病害研究室). p. 8.
- 守屋寛 (1963) : 蛋白質・核酸・酵素, 7 : 248~252.
- 高橋健治 (1961) : 同上, 5 : 308.
- 安尾俊・柳田騏策 (1963) : 植物防疫, 17 : 215~218.

(1968年3月1日 受領)