

静岡県のサツマイモから分離されたサツマイモ斑紋 モザイクウイルスの諸性質

大貫 正俊¹⁾・酒井 淳一¹⁾・花田 薫¹⁾・加藤 公彦²⁾・宇杉 富雄³⁾

(¹⁾九州農業試験場・²⁾静岡県農業試験場・³⁾国際農林水産業研究センター沖縄支所)

Characterization of an isolate of sweet potato feathery mottle virus isolated from sweet potato in Shizuoka Prefecture. Masatoshi ONUKI¹⁾, Jun-ichi SAKAI¹⁾, Kaoru HANADA¹⁾, Kimihiko KATO²⁾ and Tomio USUGI³⁾ (¹⁾Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-11. ²⁾Shizuoka Agricultural Experiment Station, Iwata, Shizuoka 438. ³⁾Okinawa Branch of Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ishigaki, Okinawa 907)

静岡県下のサツマイモ圃場においてイモの萌芽時に萎縮症状を示す株が認められ、この株からポティウイルスと推定されるひも状ウイルスが検出された。この株の葉の磨碎液をアサガオ(スカーレットオハラ)に接種したところ、サツマイモ帶状粗皮病の病徵と極めてよく似た症状が現れた。さらに、血清反応から本分離株(静岡分離株)はサツマイモ斑紋モザイクウイルス(Sweet potato feathery mottle virus; SPFMV)であることが確認された。本分離株の諸性質について調査を行ったので結果の概要を報告する。

材料及び方法

供試ウイルス

サツマイモ斑紋モザイクウイルス普通系統⁴⁾ (SPFMV-O; Oと略称)、帶状粗皮病の病原ウイルスである強毒系統⁴⁾ (SPFMV-S; Sと略称)、徳島系統³⁾ (SPFMV-T; Tと略称) および静岡分離株 (SPFMV-Si; Siと略称) の各ウイルスに感染したアサガオ葉を供試した。なお、S, Siについては SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) によるウイルス外被タンパク質の検定のため、Cali and Moyer¹⁾ の方法に準じて純化ウイルスを調製した。

1. 宿主範囲

Siに感染したアサガオ葉を用いて、カーボランダム法による汁液接種を7科22種の草本植物について行った。病徵を発現しなかった植物についてはアサガオに戻し接種して感染の有無を確認した。

2. 粒子形態

Siに感染したアサガオ葉の磨碎液をDip法により電顕観察し、ひも状ウイルス粒子(200粒子)の長さを計

測後、ヒストグラムを作成した。

3. 粗汁液中の性質

アサガオ粗汁液におけるSiの不活化温度(thermal inactivation point; TIP)、希釈限界(dilution end point; DEP)及び20°Cにおける保存期限(longevity in vitro; LIV)を調査した。

4. SPFMV 3系統との血清学的類縁関係

SiとSPFMV 3系統との血清学的類縁関係を明らかにするためO, S, Tに対する抗血清を用いて、Siとの反応をデコレーション法による免疫電子顕微鏡観察、DIBA(Dot-immunobinding assay)及びウエスタンプロット法により検討した。

結 果

1. 宿主範囲

7科22種の植物にSiを汁液接種したところ、ヒルガオ科の*Ipomoea*属植物に明瞭な葉脈透過(VC)、葉脈に沿った退緑(VCh)、斑紋(Mo)及び退緑斑点(CS)が認められたほか、*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*の接種葉に退緑斑点が認められた(Table 1)。この結果から、Siの宿主範囲はO, Sと同様に狭く、ほぼヒルガオ科に限定されていると推察された。Siのアサガオでの病徵は初め葉脈が弱く灰白色化し、次いで明瞭な葉脈透過や葉脈に沿った退緑が現れ、その後、次第に斑紋や退緑斑点が現れた。このような病徵の推移はSのそれと一致しており、両ウイルスを病徵の上から区別することは困難であった。

2. 粒子形態

Siに感染したアサガオ葉の磨碎液をDip法により電顕観察した。Siの粒子はやや屈曲性に富むひも状であ

Table 1. Host range of Shizuoka isolate of sweet potato feathery mottle virus

Plant (cultivar)	Symptom ^{a)}
<i>Chenopodium amaranthicolor</i>	CS/- ^{b)} (-) ^{c)}
<i>C. quinoa</i>	CS/-(-)
<i>Spinacia oleracea</i> (Jiromaru)	-(-)
<i>Capsicum annuum</i> (New Face)	-(-)
<i>Datura stramonium</i>	-(-)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Mini Carol)	-(-)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-(-)
<i>Petunia hybrida</i> (Salmon Ensign)	-(-)
<i>Physalis floridana</i>	-(-)
<i>Brassica campestris</i> (Shikimaki Kokabu)	-(-)
<i>Sesamum indicum</i> (Kurogoma)	-(-)
<i>Vicia faba</i>	-(-)
<i>Vigna angularis</i> (Dainagon)	-(-)
<i>Vigna sesquipedalis</i> (Kurodane Sanjaku)	-(-)
<i>Cucurbita maxima</i> (Ebisu)	-(-)
<i>Ipomoea hederacea</i>	VC, CS, Mo, VCh
<i>I. indica</i>	VC, CS, Mo, VCh
<i>I. nil</i> (Scarlet O'Hara)	VC, CS, Mo, VCh
<i>I. purpurea</i>	VC, Mo, VCh
<i>I. selosa</i>	VC, CS, Mo, VCh
<i>I. tricolor</i> (Heavenly Blue)	VC, VCh
<i>I. triloba</i>	VC, CS, VCh

a) VC: vein clearing, CS: chlorotic spot, Mo: mottling, VCh: veinal chlorosis, -: no infection.

b) Inoculated leaf/upper leaf.

c) Back inoculation to *Ipomoea nil*.

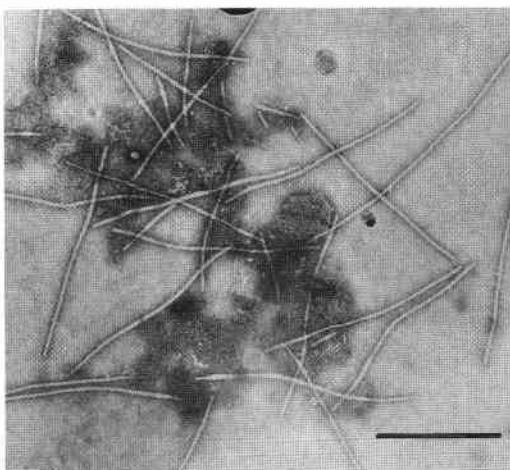


Fig. 1. Electron micrograph of virions of Shizuoka isolate.
bar: 500 nm.

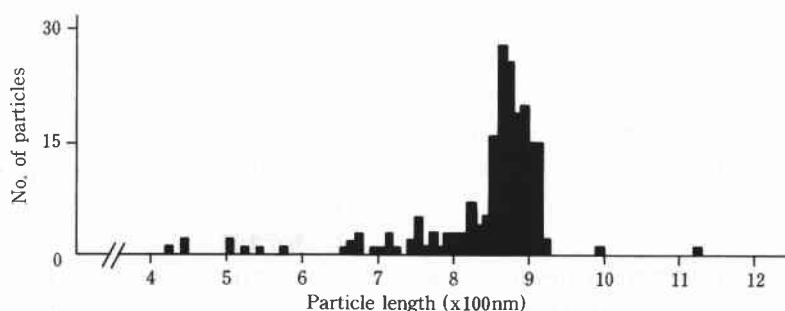


Fig. 2. Particle length distribution of Shizuoka isolate.

り (Fig. 1), その長さは 850~900 nm で、幅は 13 nm 前後であった。粒子長の最頻値は 870~880 nm の範囲にあり (Fig. 2), 既に報告のある O, S, T の粒子長がともに 850~880 nm であることから³⁻⁵⁾, Si と SPF MV3 系統は形態的には極めてよく似ていることが明らかになった。

3. 粗汁液中の性質

アサガオ粗汁液中の Si の不活化温度は 50~60°C の間, 希釀限界は 10^{-4} ~ 10^{-5} の間にあった。20°C における保存期限は 1 日以内であった (Table 2)。比較のため, 既に報告のある O, S, T の粗汁液中の安定性³⁻⁵⁾について示したが, Si の粗汁液中の性質は S と最も近かった。

Table 2. Stability of Shizuoka isolate and three other strains of sweet potato feathery mottle virus in sap of infected *Ipomoea nil* leaves

	Shizuoka isolate	-O ^{a)}	-S ^{b)}	-T ^{c)}
TIP	50~60°C	60~70	50~60	50~60
DEP	10^{-4} ~ 10^{-5}	10^{-3} ~ 10^{-4}	10^{-4} ~ 10^{-5}	10^{-3} ~ 10^{-4}
LIV(20°C)	1d. > ^{d)}	1d. >	1d. >	1d. >

a) According to the data of Usugi et al. (1991).

b) According to the data of Usugi et al. (1990).

c) According to the data of Usugi et al. (1993).

d) Within one day.

4. 純化ウイルス

Si の粒子は S と同様な方法によって、感染アサガオ葉から純化することができた。純化ウイルスを SDS-PAGE (ゲル濃度 10%) で泳動したところ、Si の外被タンパク質と推定されるタンパクの泳動度は S のそれよりも小さく、その分子量は約 40~41 K ダルトンと推定された (Fig. 3)。

5. SPF MV3 系統との血清学的類縁関係

a) 免疫電子顕微鏡観察

Si に対する O, S, T 各抗血清の反応を免疫電顕法により調べた。各抗血清は 50, 100, 200, 400 倍希釀して用いた。Si は O 及び S 抗血清とは 400 倍希釀まで反応し、とくに 200 倍希釀抗血清とは明瞭に反応した

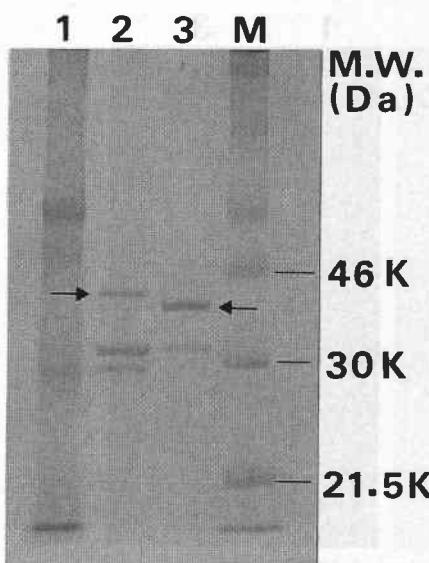


Fig. 3. Detection of coat proteins of Shizuoka isolate and SPFMV-S by SDS-PAGE.

Lane 1: healthy control, lane 2: purified sample of Shizuoka isolate, lane 3: purified sample of -S,
M: molecular weight marker, Arrows: protein bands presumed to be coat proteins of Shizuoka isolate and -S, respectively.

(Fig. 4A, B)。一方、T抗血清との反応は100倍希釈した抗血清で認められず (Fig. 4C), さらに50倍希釈した抗血清でも認められなかった。実験に用いたT抗血清が劣化していたため反応が陰性であったとも考えられたので、ホモロガスな関係のTウイルス粒子に対する反応を調べたところ、100倍希釈したT抗血清と明瞭な反応が認められた (Fig. 4D)。以上の結果から Si は免疫電顕法では T 抗血清との反応が認められないと判断された。

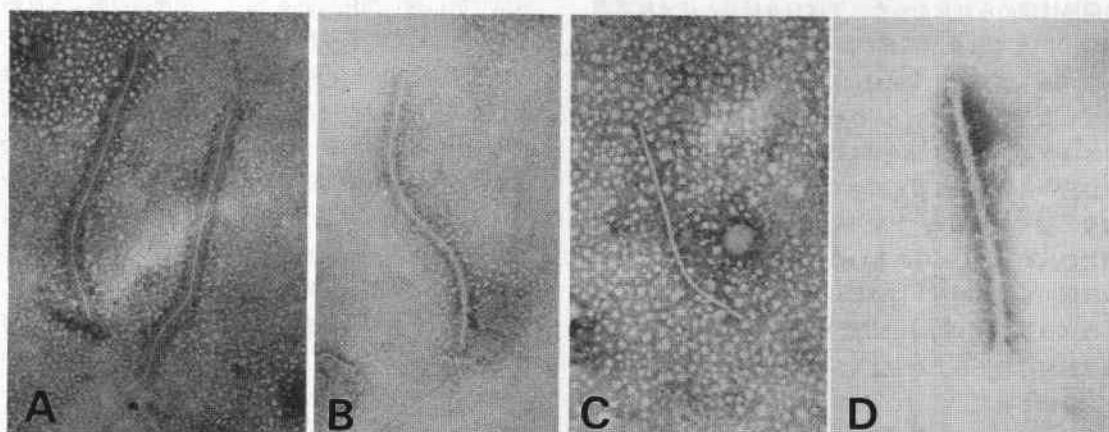


Fig. 4. Electron micrographs of Shizuoka isolate reacted with antisera of SPFMV-O, -S and -T.
A: Shizuoka isolate/-S antiserum (1: 200). C: Shizuoka isolate/-T antiserum (1: 100).
B: Shizuoka isolate/-O antiserum (1: 200). D: SPFMV-T/-T antiserum (1: 100).

b) DIBA

免疫電顕法により Si と SPFMV3 系統との血清学的な関係はほぼ明らかになったが、さらに DIBA により検討を行った。Si は1,000倍希釈したO及びS抗血清を用いた場合、感染アサガオ葉の100倍希釈汁液と明瞭に反応し (Fig. 5A, B), 1,000倍希釈汁液とも弱い反応が認められた。一方、250倍希釈したT抗血清との反応は陰性であった (Fig. 5C)。T抗血清の反応性を確認するため、T感染アサガオ葉を供試したところ、T感染葉

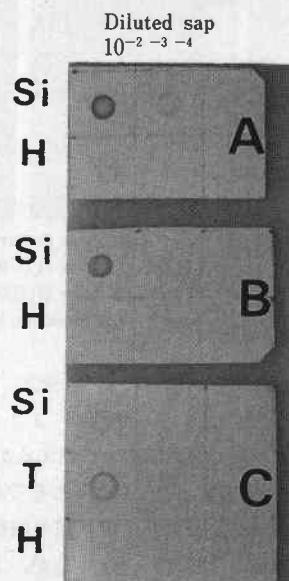


Fig. 5. Dot-immunobinding assay of Shizuoka isolate reacted with antisera of SPFMV-O, -S and -T.
A: -S antiserum (1: 1,000).
B: -O antiserum (1: 1,000).
C: -T antiserum (1: 250). Si: Shizuoka isolate, T: SPFMV-T, H: healthy sap.

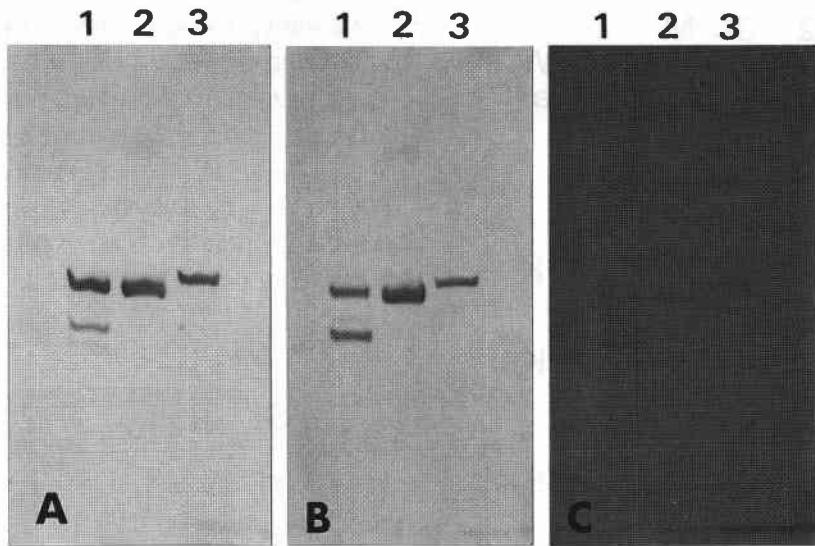


Fig. 6. Western blots of the virus preparations using antisera of SPF MV-O, -S and -T.
 A: -S antiserum (1: 2,000). B: -O antiserum (1: 1,000).
 C: -T antiserum (1: 250). Lane 1: purified sample of -S, lane 2: purified sample of -O, lane 3: purified sample of Shizuoka isolate.

100倍汁液で明瞭な反応が現れた (Fig. 5C)。Fig. 5C に示した T 抗血清を用いたニトロセルロースフィルター上の反応では Si と反応しているように見えるが、この Si の着色は緑色で、植物成分に由来するものであった。従って DIBA の結果は免疫電顕法の結果と同様であり、Si は O や S 抗血清とは明瞭に反応したが、T 抗血清との反応は認められなかった。

c) ウエスタンプロット法

免疫電顕法及び DIBA の結果では、Si は O 及び S との血清学的類縁関係が明瞭に認められたのに対し、T との関係は認められなかった。T は O 及び S とは免疫電顕法や DIBA では血清関係が認められないが、ウエスタンプロット法では、T は O, S と反応することが報告されている^{2,3)}。そこで、Si と SPF MV3 系統との関係をウエスタンプロット法を用いて調べたところ、Si は O 及び S の各抗血清に対してホモロガスな関係の反応と同程度に強く発色した (Fig. 6A, B)。また、Si と T 抗血清との反応は Si と O あるいは S 抗血清との反応に比べれば弱いものの明らかに認められた (Fig. 6C)。

ウエスタンプロット法により、Si の外被タンパク質の泳動度は O や S より小さく、T よりわずかに大きいことが確認された。

考

察

SPFMV の系統としては O⁴, S⁴, T³, F² の存在が知

られている。O と S は互いに血清学的な類縁性が強く、T 及び F は O や S とは遠い関係にある^{2,3)}。そして T, F どうしも互いに遠い関係にあることが明らかになっている²⁾。Si は病徵、宿主範囲及び粗汁液中の性質から、O や S に近く、とくに S との類似点が多かった。血清学的にも Si は O, S に近縁で T とは遠い関係にあることが判明した。Si は T 抗血清とはウエスタンプロット法により反応したが、ウエスタンプロットは SDS-PAGE に際して、SDS でタンパク質を解離させるため、ウイルス外被タンパク質のコア部分の抗原決定基が露出し、血清学的に遠い関係にある Si と T 抗血清の間でも反応が現れたものと考えられる。

Si は外被タンパク質と推定されるタンパクの泳動度が O や S よりも若干小さく、その分子量は約 40~41K ダルトンと推定される。O 及び S の外被タンパク質は約 38K ダルトンの位置に泳動されるので、SDS-PAGE やウエスタンプロット法で Si を O, S 両系統と区別することができる。Si と O 及び S との最も大きな違いはこの外被タンパク質の泳動度の差であり、この点を利用して、Si と O, S 間の干渉作用について検討することも可能であろう。

本実験で用いた T は汁液接種での宿主範囲がヒルガオ科ばかりでなく、*Nicotiana* 属や黒ゴマに及んでおり³⁾、SPFMV の系統の中でも特異なものであると考えられる。T については外被タンパク質をコードする領域の塩

基配列の解析も進みつつある（酒井ら、未発表）。

なお、Si のサツマイモへの影響、とくに塊根における病徵発現等については今後検討していく予定である。

引　用　文　獻

- 1) CALI, B. B. and MOYER, J. W. (1981) *Phytopathology*. 71 : 302-305. 2) 大貫正俊・宇杉富雄・中野正明・酒井淳一・花田 薫 (1993) 日植病報 59 : 332. 3) 宇杉富雄・眞岡哲夫 (1993) 日植病報 59 : 331-332. 4) 宇杉富雄・中野正明・大貫正俊・林 隆治 (1990) 日植病報 56 : 423. 5) USUGI, T., NAKANO, M., SHINKAI, A. and HAYASHI, T. (1991) Ann. Phytopath. Soc. Japan 57 : 512-521.

(1994年4月27日 受領)