

アルミニウム感受性を異にするオオムギ2品種における オオムギ斑葉モザイクウイルスの増殖

花田 薫¹⁾・大貫 正俊¹⁾・酒井 淳一¹⁾・前田 孚憲^{2)*}・正岡 淑邦^{1)**}・斉藤 彰¹⁾
(¹⁾九州農業試験場・²⁾岡山大学生物資源研究所)

Multiplication of barley stripe mosaic virus in two barley varieties with different sensitivity to aluminum. Kaoru Hanada¹⁾, Masatoshi Onuki¹⁾, Jun-ichi Sakai¹⁾, Takanori Maeda^{2)*}, Yosikuni Masaoka^{1)**} and Akira Saito¹⁾ (¹⁾Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan. ²⁾Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan)

Key words: aluminum, barley, barley stripe mosaic virus, coat protein gene, RT-PCR

はじめに

オオムギ斑葉モザイクウイルス (BSMV) は世界のオオムギ・コムギの栽培地域で発生して被害を与えている。わが国ではかつて北海道で発生したが¹⁾、現在では発生していない。わが国の BSMV の生物学的諸性質は、井上ら (井上, 1957; 井上・井上, 1962) によってすでに明らかにされているが、ウイルス抗血清を用いた診断法や RT-PCR およびその塩基配列レベルでの解析などはなされていない。

BSMV 感染オオムギの葉には、斑点や黄化・退緑の条斑が現れるのが一般的であり、葉が細くなることもある。一方、オオムギでの Al 過剰障害としては、根の伸長阻害と葉が細くなるのが大きな特徴である。オオムギには品種によってアルミニウム (Al) 感受性の高いものと低いものが知られている。

そこで本研究では、まず BSMV-J の外被タンパク質 (CP) 遺伝子の塩基配列を明らかにするとともに、BSMV の抗血清診断や RT-PCR について検討した。さらに、Al 感受性の異なるオオムギ2品種を用いて、Al 感受性が BSMV 感受性と関連するかどうかを検討した。

材料および方法

わが国の BSMV としては高橋ら (1957) が報告したハルピン分離株 (BSMV-J) を用いた。BSMV-J をオオムギ (キリン直立) に機械的に接種し、感染葉から分画遠心によりウイルスを純化精製した。純化試料に Sodium dodecyl sulfate (SDS) を加えて煮沸し、10% および 12% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動によって (Laemmli, 1970)、本ウイルスの外被タンパク質の分子量を推定した。分子量マーカーには、パパイア輪点ウイルス・キュウリ緑斑モザイクウイルスおよび Amersham 社のレインボーマーカーを用いた。純化 BSMV 粒子からウイルス RNA を抽出し、BSMV のタイプ分離株の塩基配列 (Petty et al., 1989) をもとにして作製したプライマーを用いて、RT-PCR により外被タンパク質 (CP) 遺伝子を増幅した。RT-PCR には Perkin Elmer 社の RT-PCR Core Kit を用い、逆転写反応を 42℃ 30 分行って 99℃ 5 分処理した後、95℃ 2 分で 1 回処理し、95℃ 40 秒、50℃ 1 分、72℃ 1 分を 40 回繰り返した。えられた増幅産物を常法によって pBluescript にクローニングした。2 クローンの塩基配列をダイデオキシ法により決定した。Al 感受性の異なる 2 品種 (Matsumoto, 1991) としては Kearney (感受性) と Dayton (抵抗性) を用いた。播種 10 日前後の両品種苗に、BSMV 感染ハルピン葉磨砕液を機械的に接種し、20~30℃ の温室で育成した。接種 2 ヶ月後まで両品種の病徴を比較観察するとともに、ウイルスの検出を行い、ウイルス濃度を比較した。本ウイルスの検出や定量には、オオムギ葉からフェノール-SDS 法で抽出した核酸成分

*現在 日本大学生物資源科学部

*Present address: Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252-0813, Japan

**現在 広島大学生物生産学部

**Present address: Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

を鋳型としたCP遺伝子のRT-PCR増幅、およびウサギで作製したBSMV-J抗血清によるDot immunobinding assay (DIBA)法(日比, 1984)やウエスタン解析を用いた。

また、AI感受性を異にするオオムギ2品種での、BSMVの増殖とAIとの関連を検討するために、AIイオンの活性に重要な影響を持つpH条件をコントロールできるpHコントローラーを用いた水耕栽培条件下で、オオムギ2品種を育成した。湿ったる紙の上で発根させたオオムギ幼苗を、AIイオンが活性を示さないpH6とAIイオンが活性化されるpH4の条件下で昼25℃、夜19℃で水耕しながら、7または10日後にBSMVを接種し、その後のオオムギ2品種の反応を検討した。

結果および考察

BSMV-Jを接種したキリン直立オオムギおよび御堀オオムギは、BSMVに特徴的な全身的に明瞭なモザイクを生じた。前者の感染葉からウイルスを純化精製し、電子顕微鏡で観察したところ、長さ約130nmの棒状粒子

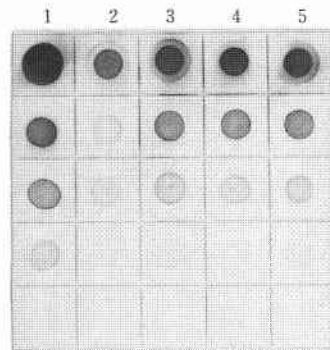
が多数認められた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、このウイルスのCPの分子量は約22Kと推定され、外国の既報の値(Atabekov and Novikov, 1971)とほぼ同一であった。またRT-PCRにより増幅したBSMV-JのCP遺伝子の塩基配列を決定したところ、停止コドンを含めて597塩基からなっていた。推定されるCP遺伝子のアミノ酸残基数は198(第1図)で、既報のタイプ分離株と同数であり(Petty et al., 1989)、配列もN末端から133番目の1アミノ酸が異なるのみ(Thr → Ala)で、きわめてよく類似していることが判明した。

BSMV-Jを機械的に接種して20~30℃で育成したKearneyとDaytonは、全身的に葉に黄色斑点や条斑などのモザイク症状を示し、葉が一部細くなるといったBSMV特有の病徴を示した。接種2ヶ月後まで病徴の程度も両品種で差が認められなかった。接種30日後に、全身感染葉においてウイルスが増殖しているか否かをRT-PCRおよびウエスタンによって検討した結果、どちらの品種でもウイルスはよく増殖していることが判明した。さらに、ウイルス濃度をDIBA法によって比較した結果、両品種においてウイルス濃度に大きな差は認められなかった(第2図)。

5'	ATG	CCG	9	AAC	GTT	TCT	18	TTG	ACT	GCT	27	AAG	GGT	GGA	36	GGA	CAC	TAC	45	AAC	GAG	GAT	54	CAA
	H	P	N	V	S	L	T	A	K	G	G	G	G	H	Y	N	E	D	Q					
	TGG	GAT	63	ACG	CAA	GTT	72	GTG	GAA	GCC	81	GGA	GTA	TTT	90	GAC	GAT	TGG	99	GTC	CAC	108	GTA	
	W	D	T	Q	V	V	E	A	G	V	F	D	D	N	W	V	H	V						
	GAA	GCC	117	TGG	AAT	AAA	126	TTT	CTA	GAC	135	AAT	TTA	CGT	144	GGT	ATC	AAC	153	AGC	GTT	162	GCT	
	E	A	W	N	K	F	L	D	N	L	R	G	I	N	F	S	V	A						
	TCC	TCT	171	CGG	TGG	CAA	180	GTC	GCT	GAA	189	TAC	TTA	GCT	198	CGG	TTA	GAT	207	GAT	CTA	216	CCT	
	S	S	R	S	Q	V	A	E	Y	L	A	A	L	D	R	D	L	P						
	GCT	GAT	225	GTA	GAC	AGA	234	CGG	TTT	GCA	243	GGT	GCT	AGA	252	GGA	CAA	ATG	261	TTA	CCC	270	AAT	
	A	D	V	D	R	R	F	A	G	A	R	G	Q	I	G	L	P	N						
	TAT	CTT	279	CCT	GCG	CCA	288	AAA	TTC	TTT	297	CGT	CTC	GAT	306	AAG	GCA	ACT	315	GCT	GAA	324	CTG	
	Y	L	P	A	P	K	F	F	R	L	D	K	R	T	I	A	E	L						
	ACT	AGA	333	CTC	TCT	CGT	342	CTT	ACG	GAT	351	CAG	CCG	CAC	360	AAC	AAT	CGT	369	GAT	ATA	378	GAG	
	T	R	L	S	R	L	T	D	Q	P	H	N	N	R	D	I	E	L						
	AAC	CGA	387	GCC	AAA	AGA	396	GCC	GCA	ACT	405	CAAC	TCT	CCC	414	CCG	GCG	GAG	423	GCA	CCG	432	TCC	
	N	R	A	K	R	A	A	T	N	P	S	P	S	P	A	A	Q	A	P	S				
	GAG	AAT	441	CTT	ACT	CTT	450	CGT	GAT	GTT	459	CAA	CCG	TTA	468	AAG	GAT	AGT	477	TTG	CAT	486	TAT	
	E	N	L	T	L	R	D	V	Q	P	L	K	D	S	A	L	H	Y						
	CAA	TAC	495	GTG	TTG	ATT	504	GAC	CTA	CAG	513	AGT	GCG	AGA	522	CTC	CCA	GTG	531	TAT	ACC	540	AGG	
	Q	Y	V	L	I	D	L	Q	S	A	R	L	P	V	Y	T	R	K						
	ACT	TTC	549	GAA	CGT	GAA	558	CTC	GCT	TTG	567	GAA	TGG	ATC	576	ATT	CCA	GAT	585	GCC	GAG	594	GCG	
	T	F	E	R	E	L	A	L	E	W	I	I	P	D	A	E	E	A						

TGA 3'

第1図 BSMV-JのCP遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列
上段:塩基配列 下段:アミノ酸配列

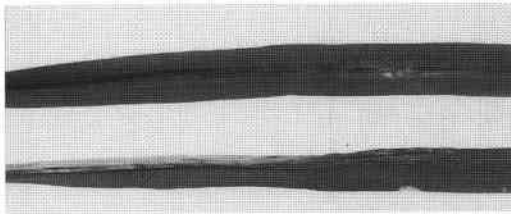


1: 純化BSMV-J(原液:100μg/μl)
2, 3: Kearneyの異なる株
4, 5: Daytonの異なる株

第2図 AI感受性を異にするオオムギ2品種におけるBSMVの増殖のDIBA法による比較

上から順に原液, 10, 10², 10³, 10⁴倍希釈液を3μlずつスポットした

pH6の条件下での水耕栽培では、BSMV-J接種によって両品種において、AIなしでも主脈にのみえそ性の病徴が現れた(第3図)。pH6における水耕栽培で、通常のモザイク症状とは明らかに異なるえそ性のストリーク症状があらわれたことは、本ウイルスによるオオムギ



第3図 AI感受性を異にするオオムギ2品種の水耕栽培 (pH6) で認められたBSMV接種により出現した特徴的なえそストリーク症状
上: Kearney 下: Dayton

の病徴が、環境条件によって質的に大きく変化しうることを意味していると考えられた。AIはこの条件下では不活性であり、AI存在の有無によって病徴に明瞭な差は認められなかった。

pH4で育成した場合には、BSMVの接種やAIの有無と関わりなく両品種で全身的な激しいえそ症状が現れた。これは、このような水耕条件下ではオオムギの正常な育成が困難なことを意味していると思われる。しかし、いずれの場合もRT-PCRによってウイルスが増殖していることは確認できた。

以上の結果から、本研究ではAI感受性がBSMVの感受性と関連があるかどうかを明らかにすることはできなかったが、pH6で水耕栽培することによって、通常は見られない質的に異なる病徴がオオムギに現れることが判明した。このような現象は、ほとんど知られていないと思われる。この事実は、植物のおかれた環境条件によって病徴の質的変化が起きうることを示しており、今後、どのような機構でこのような質的な変化が現れるのかを解明できれば、病徴の発現機構の解明にもつながる可能性があるのではないかと考えられる。

摘 要

わが国で分離されたオオムギ斑葉モザイクウイルスの1分離株 (BSMV-J) の外被タンパク質 (CP) の分子量は電気泳動によって約22Kと推定された。RT-PCRにより増幅したCP遺伝子の塩基配列を決定してBSMVのタイプ分離株と比較したところ、きわめて高い相同性を

示した。アルミニウム (AI) に感受性を示すオオムギ品種 Kearney と抵抗性品種 Dayton に、BSMV-J を接種して通常の土壌条件下で育成した結果、両品種ともに同様な病徴を示し、ウイルス濃度にも大きな差はみとめられなかった。水耕栽培によって育成時の pH を一定にして検討した結果、AI が不活性な pH 6 ではウイルス接種によって特徴的な条斑えそが両品種に現れた。AI が活性を示す pH 4 ではウイルス接種の有無に関係なく、両品種とも全身的なえそを生じた。いずれの条件下でも RT-PCR によってウイルスの増殖は確認された。AI に対する感受性を異にする両品種での BSMV に対する反応には、明らかな差はないと考えられた。

引用文献

- Atabekov, J. G. and V. N. Novikov (1971) Barley stripe mosaic virus. C. M. I/A. A. B. Descriptions of Plant Viruses No. 68.
- 井上忠男 (1957) オオムギの新しいバイラス病 (麦斑葉モザイク) について. 植物防疫 19., 135-137.
- 井上忠男・井上成信 (1962) オオムギ斑葉モザイク病に関する研究. 農学研究 49, 1-7.
- 日比忠明 (1984) 植物防疫 38, 380-384.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685.
- Matsumoto, H. (1991) Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminium in plant cells. In Plant-soil interactions at low pH (R. J. Wright et al ed.). Kluwer Publishers, pp825-838.
- Petty, I. T., B. G. Hunter, N. Wei, and A. O. Jackson (1989) Infectious barley stripe mosaic virus RNA transcribed in vitro from full-length genomic cDNA clones. Virology 171, 342-349.
- 高橋隆平・赤木温郎・井上忠男 (1957) ビール大麦の半不稔性 (提灯穂) と麦斑葉モザイク病. 農学研究 44, 147-158.

(2000年4月30日 受領)