

旧タバコモザイクウイルス保存株の血清学的な検証¹

河野敏郎・高橋幸吉・高橋義行
(日本植物防疫協会研究所)

Serological Certification of the Collections Preserved as *Tobacco mosaic virus* Belonging to the Genus *Tobamovirus*

Toshiro KAWANO², Kokichi TAKAHASHI and Yoshiyuki TAKAHASHI

摘 要

独立行政法人農業生物資源研究所微生物ジーンバンク (MAFF) および社団法人日本植物防疫協会研究所 (JPPA) に長期保存中のタバコモザイクウイルス (TMV) の65株を7種の抗体を用いたDAS-ELISA検定により血清学的に類別・整理した結果, MAFF保存の40株は4株の所属を訂正し, TMV: 14株, トマトモザイクウイルス (ToMV): 24株, トウガラシマイルドモットルウイルス (PMMoV): 2株に類別した。JPPA保存の25株はTMV: 17株, ToMV: 1株, PMMoV: 1株に類別された。このうちTMV-普通系 (OM) の抗体に強く反応した27株は5種類の抗体 (各TMV-OM, ToMV, TMV-ワサビ系に対するポリクローナル抗体, ToMVに対する2種のモノクローナル抗体) に対する反応から血清学的に4群に分けられる可能性が示唆された。

病原ウイルスの名称は2000年の第7次国際ウイルス分類委員会 (ICTV) 報告で示された分類に準拠するように求められている。本邦でも大木 (2005) によって, 旧タバコモザイクウイルス (TMV) の各系統 (普通系, トマト系, トウガラシ系, アブラナ科系, ワサビ系等) がTMV, トマトモザイクウイルス (ToMV), トウガラシマイルドモットルウイルス (PMMoV) およびアブラナモザイクウイルス (YoMV) 等に再分類されることが示された。独立行政法人農業生物資源研究所微生物ジーンバンク (MAFF) には本邦で始めて分離・同定されたウイルス株や植物ウイルス研究の対象となった貴重な株などが長期間保存されている。これらのウイルス株は定期的に増殖され, 要望に応じて実費配布されている。また, 社団法人日本植物防疫協会研究所 (JPPA) には抗血清作製のための免疫源となるウイルス株やウイルス診断事業により, 多種の植物から分離・同定されたウイルス株が保存されている。そこで, MAFFおよびJPPAで長期保存

されている旧TMVの *Tobamovirus* 属内の所属を再検証するために, 血清学的方法による類別および整理を行ったので, その結果を報告する。

本検証はJPPAに対するMAFF委託事業「植物ウイルスの分類・同定, 平成3年~15年」の一環として, 平成14年~15年に行った。実施に当たり, 種々にご配慮頂いた生物資源研究所ジーンバンク微生物資源研究チーム長の佐藤豊三博士に厚く御礼申しあげる。

材料および方法

1. 供試ウイルス株

MAFFおよびJPPAに長期保存中の旧TMV系統, すなわち普通系(-OM), トマト系(-L), トウガラシ系(-P), ワサビ系(-W), アブラナ科系(-C), その他の計65株を供試した (第1表)。各株はそれぞれの感染葉をガラスアンプル中で真空凍結乾燥したものあるいは生葉のまま -80 で保存されていたものを用いた。

2. 供試抗体とELISA法

TMV-OM, TMV-L, TMV-PおよびTMV-Wに対する4

1 本報の概要は平成16年度日本植物病理学会大会 (2004年3月30日, 福岡市) において発表した。

2 Address: Research Institute of Japan Plant Protection Association 535, Kessoku-cho, Ushiku-shi, Ibaraki 300-1212, Japan
2005年4月21日受領

第1表 保存株一覧

株番号等	ウイルス名	系統名	株名	原宿主	採集地	採集年
MAFF104032	PMMoV		野榮	ピーマン, シシトウ	千葉	1979
MAFF104033	TMV	W	栃木1	ワサビ	栃木	1962
MAFF104034	TMV	T		トマト	千葉	1966
MAFF104036	TMV	U	千葉1	ピーマン, シシトウ	千葉	1981
MAFF260001	ToMV		L	トマト	北海道	1961
MAFF260002	ToMV		L ₁₁	トマト	北海道	1962
MAFF260003	TMV		C(大島)	ヤチイヌガラシ	北海道	1984
MAFF260004	ToMV		L ₁₁ A	トマト	北海道	1968
MAFF260005	ToMV		L ₁₁ A237	トマト	茨城	a)
MAFF260006	ToMV		Ls1	トマト	千葉	1974
MAFF260007	ToMV		CH2	トマト	千葉	1973
MAFF260008	ToMV		CH3	トマト	千葉	1973
MAFF260009	ToMV		L ₁₁ Y	トマト		
MAFF260010	ToMV		L ₁₁ Y237	トマト		
MAFF260011	ToMV		L ₁₁ Y236	トマト		
MAFF260012	ToMV		L ₁₁ Y254	トマト		
MAFF260013	ToMV		L ₁₁ Y390	トマト		
MAFF260014	TMV		OM8	トマト		
MAFF260015	TMV		OM12			
MAFF260017	ToMV		C32	トマト		1976
MAFF260022	ToMV		Ltb-1	トマト		1982
MAFF260023	ToMV		Lta-1	トマト		1982
MAFF260025	TMV		OMY(大島)	タバコ		1972
MAFF260031	TMV		O			
MAFF260051	ToMV		LFD-st	トマト	千葉	1971
MAFF260052	TMV		N	トマト		
MAFF260053	TMV		S			
MAFF260054	TMV		TMV-Y	タバコ		
MAFF260056	TMV	OM	Ni9	タバコ	千葉	1972
MAFF260058	TMV	C	NA23	タバコ	千葉	
MAFF260061	TMV	Y		タバコ	千葉	
MAFF260062	ToMV		LY	タバコ	千葉	
MAFF260064	TMV	OM		タバコ		
MAFF307019	ToMV	N	N(トト系)	トマト	長野	1964
MAFF307032	TMV	O	7032	トマト	長野	1964
MAFF715016	ToMV		strain-0	トマト	愛知	1977
MAFF715017	ToMV		strain-1	トマト	奈良	1977
MAFF715051	ToMV		Gi-1	トマト	岐阜	1992
MAFF715052	ToMV		Gi-11	トマト	岐阜	1992
MAFF715065	PMMoV		Kochi	トウガラシ	高知	1994
JP89V1	TMV		Gi	ジオウ		
JP90V1	TMV		GG	ニンニク		
JP90V2	TMV		GL3	ユリ		
JP90V3	TMV		GL6	ユリ		
JP90V4	TMV		GR1	ラッキョウ		
JP90V5	TMV		GR2	ラッキョウ		
JP90V6	TMV		GR6	ラッキョウ		
JP91V1	TMV		W 29	ワサビ	埼玉	1990
JP91V2	TMV		W 31	ワサビ	埼玉	1990
JP91V3	TMV		W 32	ワサビ	埼玉	1990
JP91V4	TMV		W 6	ワサビ	埼玉	1990
JP91V5	TMV		WMB1	ワサビ		1991
JP99V2	TMV		Pet-Ya	ベチュニア	山梨	1999
JP00V8	TMV		Nil-LM	ニールンベルギア	神奈川	2000
JP02V11	TMV		Pet-Si1	ベチュニア	滋賀	2001
JP02V12	TMV		Pet-Si2	ベチュニア	滋賀	2001
JP02V6	TMV		Pet-YS2	ベチュニア	埼玉	2002
JP02V7	TMV		Pet-SaOP	ベチュニア	埼玉	2002
JP02V8	TMV		Pet-SaOR	ベチュニア	埼玉	2002
JP03V3	TMV		Saf-Si	サフィニア	滋賀	2003
TMV-OM	TMV	OM ^{b)}				
TMV-L	TMV	L ^{b)}				
TMV-P	TMV	P ^{b)}				
TMV-W	TMV	W ^{b)}				
TMV-O	TMV	O ^{b)}				

a) : 不明

b) ポジティブコントロールとした純化抗原 (10 µg/ml)

種のポリクローナル抗体 (以下それぞれをOM-PAb, L-PAb, P-PAbおよびW-PAbと略す), TMV-L11Aに対する2種 (TL2F2-MAb, TL6F11-MAb) およびTMV-Wに対する1種 (TW6G1-MAb) のモノクローナル抗体 (Takahashi et al., 1989, 1990) の7種抗体 (いずれもJPPA製) を供試した。特にTL2F2-MAbはToMVだけに反応する抗体であり, TL6F11-MAbはToMVだけでなくTMV-OMにも同等の反応性を持つ抗体である。

また, TW6G1-MAbはTMV-Wにのみ反応して, TMV-Cに反応しないことから, 両ウイルスを識別できる抗体である。

ELISA法はClark and Adams (1977) に準じたDAS-ELISAによって行った。各検定試料の調整は葉重量の10~100倍になるように, 0.05%のTween20を含む0.02Mリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS-T, pH7.4) 中で磨砕し, 3,000rpmで5分間遠心した上清を用いた。

第2表 保存株の7種抗体に対する反応の検証結果

株番号等	検証結果 ^{a)}	抗体反応 ^{b)}
260014, 260015, 260025, 260031, 260053, 260054, 260056, 260061, 260064, 307032, JP89V1, JP90V1, JP90V2, JP90V3, JP90V4, JP90V5, JP90V6, JP99V2, JP00V8, JP02V11, JP02V12, JP02V6, JP02V7, JP02V8, JP03V3, TMV-OM, TMV-O	TMV	L-PAb: - ~ + + + , 2F2-MAb: - , 6F11-MAb: - ~ + + + , P-PAb: - , OM-PAb: + ~ + + + , W-PAb: - ~ + + + , 6G1-MAb: -
104034, 260001, 260002, 260004, 260005, 260006, 260007, 260008, 260009, 260010, 260011, 260012, 260013, 260017, 260022, 260023, 260051, 260052, 260062, 307019, 715016, 715017, 715051, 715052, TMV-L	ToMV	L-PAb: + + ~ + + + , 2F2-MAb: + + ~ + + + , 6F11-MAb: - ~ + + + , P-PAb: - , OM-PAb: - , W-PAb: - , 6G1-MAb: -
104032, 715065, TMV-P	PMMoV	L-PAb: - , 2F2-MAb: - , 6F11-MAb: - , OM-PAb: - , P-PAb: + ~ + + , W-PAb: - , 6G1-MAb: -
104033, JP91V1, JP91V2, JP91V3, JP91V4, JP91V5, TMV-W	TMV-W	L-PAb: - , 2F2-MAb: - , 6F11-MAb: - , P-PAb: - , OM-PAb: - , W-PAb: + + + , 6G1-MAb: + ~ + +
260003, 260058	TMV-C	L-PAb: - , 2F2-MAb: - , 6F11-MAb: - , P-PAb: - , OM-PAb: - , 6G1-MAb: - , W-PAb: + + +
104036	TMV-U	L-PAb: + , 2F2-MAb: - , 6F11-MAb: - , P-PAb: - , OM-PAb: - , W-PAb: - , 6G1-MAb: -

a) TMV : タバコモザイクウイルス, ToMV : トマトモザイクウイルス, PMMoV : トウガラシマイルドモットルウイルス, TMV-W : タバコモザイクウイルス - ワサビ系, TMV-C : タバコモザイクウイルス - アブラナ科系, TMV-U : タバコモザイクウイルス - U系統

b) - : $A_{410} < 0.2$, + : $0.2 \leq A_{410} < 0.5$, ++ : $0.5 \leq A_{410} < 1.0$, +++ : $A_{410} \geq 1.0$ (A_{410} (基質添加60分後の吸光値))

結 果

1. ウイルス保存株の7種抗体に対する反応

DAS-ELISA法による各ウイルス保存株の7種抗体に対する反応とそれらの検証結果を第2表に示した。

MAFF保存のMAFF104034, MAFF260052, MAFF715051, MAFF715052の4株はL-PAbおよびTL2F2-MAbに強く反応し, OM-PAbに反応しなかった。したがって, TMVとなっていた所属をいずれもToMVに訂正した。ToMVの25株はL-PAb, TMV-Wの7株はW-PAb, PMMoVの3株はP-PAbにそれぞれ強く反応し, 保存株の命名と一致した。

2. TMV-OM抗体に強く反応した株の血清学的類別

OM-PAbに強く反応した27株の5種抗体に対する反応結果を第3表に示した。グループの6株は

TL6F11-MAb, グループの5株はL-PAb, グループの12株はTL6F11-MAbおよびL-PAb, グループの4株はTL6F11-MAb, L-PAbおよびW-PAbでも明らかな反応を示した。通常はL-PAbでTMV-OMを検定すると若干の交差反応を示すことがTakahashi et al. (1989)の結果からも伺えるが, グループのようにL-PAbとほぼ同等の反応性を示すものやグループのようにW-PAbにまで明瞭に反応する株が認められた。これらのことから, TMV-OMに強く反応した27株は, 各5種抗体の反応から血清学的に4群に分けられる可能性が示唆された(第1図)。また, グループを代表したTMV-OM, TMV-O, JP90V1およびJP00V8を簡易寒天ゲル拡散法により, 抗TMV-OM血清に反応させた結果, いずれの株に対しても明瞭な沈降帯を生じたが, 各株

第3表 TMV-OM抗体に強く反応した株の血清学的類別

グループ	株番号等	系統名 (株名)	抗体				
			TMV·L ₁₁ A MAb(2F-2)	TMV·L ₁₁ A MAb(6F-11)	TMV·L PAb	TMV·OM PAb	TMV·W PAb
TMV·OM	OM	OM	- ^{a)}	+	-	+++	-
	260014	(OM8)	-	+	-	++	-
	260015	(OM12)	-	+	-	++	-
	260025	(OMY)	-	+	-	++	-
	260056	(Ni9)	-	+	-	+++	-
	260064	OM	-	+	-	+++	-
TMV·O	O	O	-	-	++	++	-
	307032	(普通系, 小室)	-	-	+	++	-
	JP01V6	(Pet·Si1)	-	-	++	++	-
	JP01V7	(Pet·Si2)	-	-	++	++	-
	JP03V3	(Saf·Si)	-	-	+++	++	-
	260031	(O)	-	+	+	++	-
	260054	(TMV·Y)	-	+	+	++	-
	260053	(S)	-	+	+	++	-
	260061	Y	-	+	+	++	-
	JP89V1	(Gi)	-	++	+	++	-
	JP90V1	(GG)	-	+	+	++	-
	JP90V2	(GL3)	-	+	+	++	-
	JP90V3	(GL6)	-	+	+	+	-
	JP90V4	(GR1)	-	+	+	+	-
JP90V5	(GR2)	-	+	+	+	-	
JP90V6	(GR4)	-	+	+	++	-	
JP99V2	(Pet·Ya)	-	+	+	+++	-	
TMV·W	JP00V8	(Nil·LM)	-	+	++	++	+
	JP02V2	(Pet·YS2)	-	+	+	++	+
	JP02V7	(Pet·SaOP)	-	+	++	++	++
	JP02V8	(Pet·SaPR)	-	+	++	+++	++

a) - : $A_{410} < 0.2$, + : $0.2 \leq A_{410} < 0.5$, ++ : $0.5 \leq A_{410} < 1.0$, +++ : $A_{410} \geq 1.0$ (A_{410} (基質添加60分後の吸光値))

間でスパーは形成されなかった(データ未記載)。このように、TMVの27株においてもわずかながら血清学的差異をもっていることが、確認された。一方、ToMVの25株は同一郡内でほぼ同等の反応を示し、血清学的に差異は認められなかった。

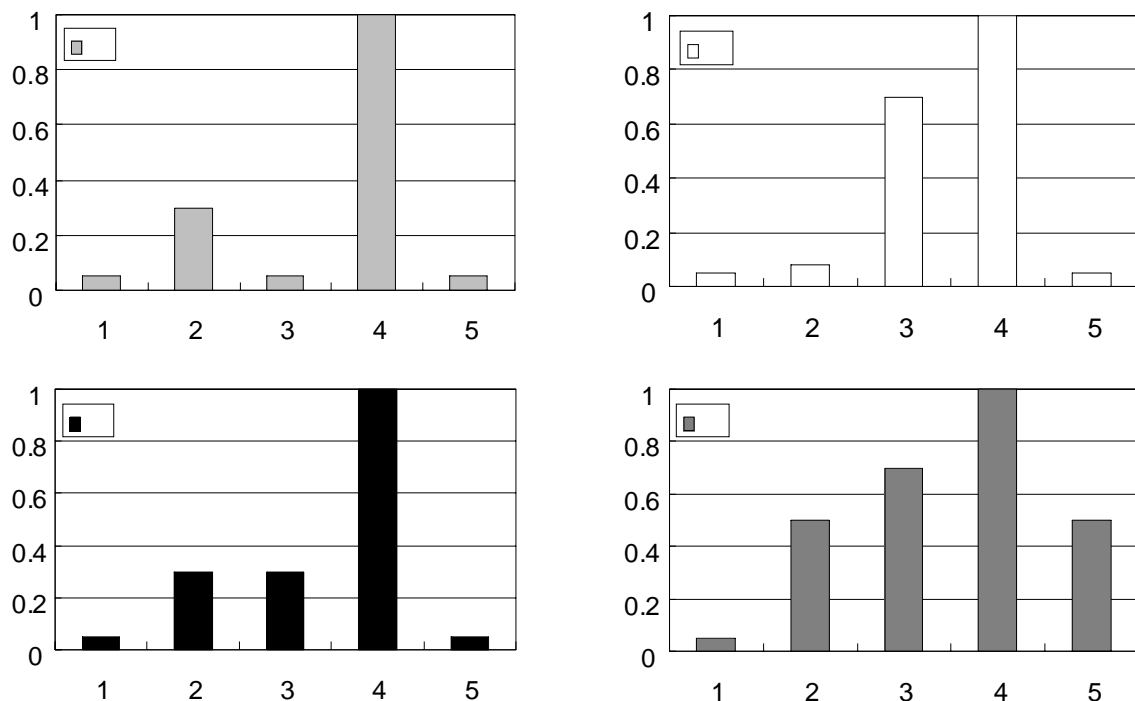
考 察

トルコギキョウに発生したTMV-Cはアブラナモザイクウイルス(YoMV)であることを山下・福井(2002)が修正の報告をした。大木(2005)はこれまで国内で報告されたTMV-CおよびTMV-WはYoMVの可能性が高いことから、アブラナ科植物に発生するTobamovirusについて改めて調査する必要があるとしている。したがって、MAFFで保存されているTMV-C(MAFF260003, MAFF260058), TMV-W(MAFF104033)およびJPPA保存の6株はYoMVに変更される可能性がある。

TMV-U株(MAFF104036)はピーマン等から分離されたが、長井ら(1987)による寒天ゲル内二重拡散法による血清反応の結果、抗PMMoV血清で沈降帯は形成されず、抗TMV-OM血清、抗ToMV血清では沈降帯を形成した。一方、作製された抗TMV-U血清では

TMV-OM, ToMV, PMMoVに対して明瞭な沈降帯を形成したことから、タバコモザイクウイルスの新系統として報告された。しかしながら、近年、竹内ら(1998)は高知県で発生したタバコマイルドグリーンモザイクウイルス(TMGMV)がTMV-Uと同類であることを示唆した。また、Hamada et al.(2003)はTMV-OM, ToMVおよびPMMoVの抗体を用いた間接ELISAで、TMGMV-J株がいずれの抗体に対しても弱い反応性を示すことを記述している。本試験でのTMV-U株(MAFF104036)に対する各抗体の反応はL-PAbでのみ反応し、他の6種抗体には反応しなかった。したがって、長井ら(1987)およびHamada et al.(2003)の記載内容と若干異なることから、MAFF104036の所属を明らかにすることはできなかった。これには、遺伝子診断等での再検証も必要と考えられる。

本検証の結果から、血清学的手法により、Tobamovirus属内の所属を明らかにしたことで、MAFFおよびJPPAで長期保存されている旧TMV保存株の65株について、類別および整理を行うことができた。MAFFでは遺伝資源管理規定や配布要領等の諸規定が2001年から再整備され、現在、約230株



第1図 TMV普通系の5種抗体での相対的な反応群

1 : TMV-L₁₁A(2F·2)MAb, 2 : TMV-L₁₁A(6F·11)MAb, 3 : TMV-L PAb, 4 : TMV-OM PAb, 5 : TMV-W PAb

(http://www.gene.affrc.go.jp/micro/index_j.html) の植物ウイルスが配布対象となり、多種にわたる調査・研究に役立っている。また、JPPAでは供試した7種抗体を実費配布していることから、各抗体の各ウイルスに対する反応性を参考にされたい。

引用文献

- Clark, M. F. and A. N. Adams (1977) *J. Gen. Virol.* 34 : 475 - 483.
- Hamada, H. et al. (2003) *J. Gen. Plant Pathol.* 69 : 199 - 204.
- 河野敏郎ら (2004) 日植病報 70 : 279 (講要).
- 長井雄治ら (1987) 日植病報 53 : 540 - 543 .
- 大木 理 (2005) 植物防疫 59 : 25 - 28.
- Takahashi, Y. et al. (1989) *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 55 : 179 - 186.
- Takahashi, Y. et al. (1990) *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 56 : 621 - 627.
- 竹内繁治ら (1998) 日植病報 64 : 424 (講要).
- 山下一夫・福井要子 (2002) 日植病報 68 : 235 (講要).