

氏 名 (本籍)	あめ 雨	みや 宮	よし 良	みき 幹 (兵庫県)
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	博	第 1 5 2	号
学位授与年月日	昭和 5 0 年 3 月 2 5 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻			
学位論文題目	キュウリモザイクウイルスに対する キュウリ品種の感受性の差異			

(主 査)

論文審査委員	教授	三 沢 正 生	教 授	堀	裕
			助教授	山 中	達

論文内容要旨

キュウリモザイクウイルス(Cucumber mosaic virus, CMV)はウリ科をはじめ多くの植物に寄生性のある多犯性のウイルスで、アブラムシによっても容易に伝搬されるので防除が極めて困難である。キュウリ品種の中には、CMVに対して種々の感受性を有するものがあり、抵抗性品種では病徴が極めて軽微である。したがって抵抗性の機構を解明することはウイルス病防除の目的上意義深いものと思われる。以上のような抵抗性の機構に関しては種々の論議があるが、まだ実験例も少なく十分には解明されていない。本研究は、CMVに対し感受性を異にするキュウリの諸品種を用い、感染葉における病徴およびウイルス濃度の比較検討を基礎として、CMVに対するキュウリ品種の抵抗性の機構を解明することを目的として行なった。

1. CMV感染キュウリ品種の病徴の比較

CMV接種子葉においては、各品種とも退緑斑点(病斑)が生じ、その数と面積の大小により感受性の程度が判別できた。すなわち、感受性品種では数・面積とも大、抵抗性品種ではともに小、中程度抵抗性品種では病斑数大で病斑面積小であった。また感受性品種の病斑は感染段階の進行にしたがい拡大するが、抵抗性品種では拡大しない。以上のことは接種した本葉においても同様であった。

また子葉接種後の2次感染した本葉でも、品種間における病徴程度の差異は子葉と同様な傾向であった。感受性品種では激しいモザイク症状となり、株の生育および葉の生長が抑制された。抵抗性品種では、病徴が軽微で生育も殆んど抑制されなかった。

接種子葉の病斑部は、それ以外の部分に比べ、はるかにウイルス濃度が高い。また病斑数は接種ウイルスの濃度に応じて増減するので、病斑部はウイルスの侵入感染部位であると推定された。そして低濃度のウイルス液を子葉に接種した場合、感受性品種では抵抗性品種に比べ、本葉の発病株数が多く、病徴発現時期も早い。このことは、感受性品種ではウイルスの感染部位数および増殖量の多いことを示している。

2. 子葉および本葉におけるCMVの増殖

CMV接種子葉におけるウイルス濃度は、各品種ともその推移にcyclic patternが認められた(第1図)。品種間のウイルス濃度には明瞭な差異があり、感受性品種は抵抗性品種に比べて常に高濃度であった。この差異は温度条件を変えても変化することはなかった。一方、本葉の接種葉においても子葉と同様な増殖曲線が得られた。

子葉接種後の本葉においては、各品種とも子葉に比べてウイルス濃度が高かった。感受性品種では各葉位とも高濃度であるが、中程度抵抗性および抵抗性の各品種では、葉位の上昇にしたがい

ウイルス濃度が低下した。

各品種の子葉および本葉におけるウイルス濃度は、病徴の発現程度と一致した。また、品種間のウイルス濃度の差異は病斑数の多少よりも病斑面積の大小による影響の方が大であった。

3. キュウリ子葉中に含まれるウイルス感染阻害物質と抵抗性との関係

キュウリ子葉汁液には、本来ウイルス感染阻害作用が認められるが、感受性および抵抗性品種の子葉汁液の間には感染阻害効果に差異がなかった。また両品種感染葉のウイルス濃度をフェノール抽出液中のウイルスRNAとして調べた場合にも明らかな差異が認められた。以上のことから、両品種間のウイルス濃度の差異は、本来葉汁液中に含まれるウイルス感染阻害物質の量的差異によっては説明し難いように思われる。

4. CMV接種子葉におけるウイルスの初期増殖

子葉の病斑面積当りのウイルス濃度は感受性および抵抗性の品種間に差異はない(第1表)。したがって細胞当りのウイルス増殖量は、両品種とも同程度であると推定された。さらに、子葉に高濃度のウイルスを接種して初期増殖を追跡した場合、接種後36時間までは両品種とも同様な増殖過程を経た(第2図)。以後感受性品種ではさらに濃度が高まるのに対し、抵抗性品種では濃度が徐々に低下した。このことは、細胞当りのウイルスの初期増殖速度は両品種間に差異のないことを示している。

5. 子葉のCMV接種部の隣接組織におけるウイルスの増殖

子葉のCMV接種部の隣接組織においては、感受性品種では時日の経過と共にウイルス濃度が高まるが、抵抗性品種では全くウイルス活性が認められなかった(第2表)。これは前者では病斑が拡大し、後者では拡大しないということと一致している。また抵抗性品種では、その部分において2次接種ウイルスの増殖が抑制された。増殖抑制率は1次接種後の日数の経過に伴い上昇した。したがって両品種間のウイルス濃度の差異は、組織内におけるウイルスの増殖範囲を反映したものとと言える。また抵抗性品種で病斑面積が小さいのは、病斑周辺組織でのウイルスの増殖が抑制されることに原因があるように思われる。

6. CMVの増殖に及ぼす熱処理および各種代謝阻害剤の影響

本実験は各種処理によりキュウリの抵抗性を変動させることを目的として行なった。抵抗性品種におけるウイルスの増殖量は、接種後の温湯処理(50℃, 30秒), actinomycin Dおよび α -amanitin の処理によって高まるが、感受性品種ではこれらの処理に対して殆んど影響が認められなかった。

抵抗性品種におけるactinomycin Dのウイルス増殖に及ぼす影響は、接種12時間後に処理した場合に大であった。Actinomycin D処理区では、ウイルスの増殖曲線が感受性品種に類似し、接種36時間以後ウイルス濃度が減少することはなかった(第3図)。また接種部の隣接組織ではウイルス活性が認められるようになった(第2表)。以上のことから、actinomycin D, α -amanitin 処理によるウイルス濃度の増加は、宿主の抵抗機能が阻害されたことが原因であると推定された。

7. CMVの感染に伴う2, 3の現象

感染によるcalloseの集積およびperoxidase, RNase活性の変動について調べた。抵抗性品種の病斑周辺にはcalloseの集積は認められず、また病斑部には壞疽を伴わない。したがって、病斑面積の限定要因としてcalloseの集積などの物理的要因によるウイルスの移行阻止という現象は考え難い。

ウイルス感染後、peroxidase およびRNase活性が健全葉に比べて増加するが、その程度は抵抗性品種よりも感受性品種の方が大であった。したがってこれら酵素活性の変動と抵抗性との間には関連性はないものと考えられる。

8. CMV接種子葉抽出液のウイルス増殖に及ぼす影響

CMV接種子葉抽出液をキュウリ子葉に吸収させ、ウイルスを接種して増殖量を調べた場合、感受性品種からの抽出液では殆んどウイルスの増殖に影響を及ぼさなかった。これに対して抵抗性品種からの抽出液では約50%増殖が抑制された(第3表)。しかしこの抽出液をウイルスと直接混合して接種しても感染阻害作用は認められなかった。

抵抗性品種の接種子葉抽出液のウイルス増殖抑制効果は、接種3時間以上前に葉に処理した場合に認められた。また抽出液を4倍以上希釈した場合には効果が認められない。さらに、子葉接種後定期的に抽出液を得、ウイルス増殖抑制率を調べたところ、接種後3日目から効果が認められ、5日目で抑制率が最高になった。以後抑制率は減少した。抽出液のウイルス増殖抑制率の高まりは、接種部の隣接組織における2次接種ウイルスの増殖抑制率の高まりとよく一致していた。以上のこ

とから、抵抗性品種の接種子葉においては感染後ウイルス増殖抑制因子が生成され、生体内ではそれが高濃度で作用しているものと思われる。

9. ウイルス増殖抑制因子の性質

抵抗性品種の接種子葉抽出液に含まれるウイルス増殖抑制因子の性質について検討した。その結果、加熱処理（100℃，1分）およびフェノール処理によって失活し、硫酸80%飽和で塩析される（第4表）。さらにSephadex G-150でゲル濾過した場合、アルブミンとチトクロームCの間の分画に抑制効果が認められた。また接種子葉をactinomycin Dで処理した場合、その抽出液にはウイルス増殖抑制作用が認められなかった。これらのことから、本因子は蛋白様の物質であると推定された。しかしこれが単一のもかどうかについては不明である。本因子はキュウリ葉に本来存在する感染阻害物質とは異なったものと思われる。

結 論

CMVに対し抵抗性のキュウリ品種では、病徴が軽微で、同時にウイルス濃度も低い。一方接種子葉抽出液に認められるウイルス増殖抑制作用は、病斑面積の小さい品種において認められた。このことから、抵抗性品種においてウイルス濃度が低いのは、感染後ウイルス増殖抑制因子の生成により、ウイルスの増殖範囲の限定されることが原因の一つであると推定される。

第1表 CMV接種子葉における病斑の面積当りのウイルス濃度の比較

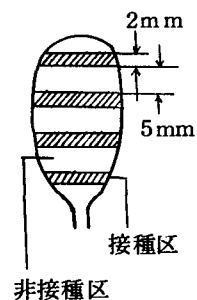
実験番号	病斑数 a (1葉当り)		病斑直径 b (mm)		病斑の面積当りのウイルス濃度	
	R	S	R	S	R	S
	1	82	167	0.46	1.17	485
2	51	110	0.43	1.02	759	600
3	-	-	0.43	1.07	560	721

a. 20葉の平均値 R: 抵抗性品種

b. 病斑30個の平均値 S: 感受性品種

第2表 キュウリ子葉のCMV非接種部分におけるウイルスの増殖

接種後 の日数	感受性品種		抵抗性品種		AMD処理抵抗性品種	
	接種区	非接種区	接種区	非接種区	接種区	非接種区
3	2470*	137	319	0	440	0
4	1916	141	120	0	207	41
5	1520	1124	53	0	76	39
6	1519	1438	42	0	152	56
7	1825	2334	48	0	163	339



*ササゲ葉10cm²当りの局部病斑数

第3表 CMV接種子葉抽出液のウイルス増殖に及ぼす影響

実験 番号	リン酸 緩衝液	感受性品種		増殖 抑制率 (%)	抵抗性品種		増殖 抑制率 (%)
		H	D		H	D	
1	205*	183	150	18	196	88	55
2	312	344	307	11	326	111	66
3	236	243	229	6	222	120	46

H: 健全葉抽出液 D: 接種葉抽出液

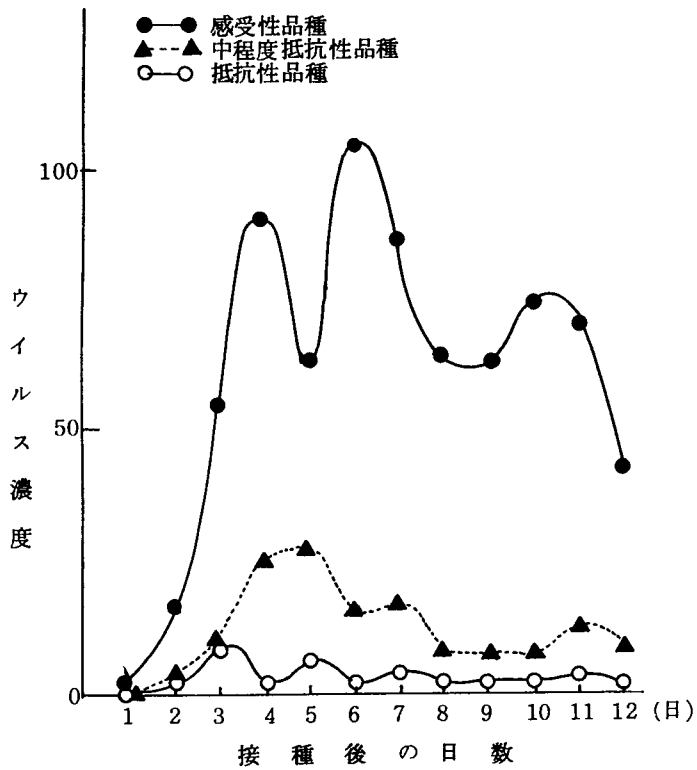
*ササゲ葉10cm²当りの局部病斑数

増殖抑制率 = (1 - D/H) × 100

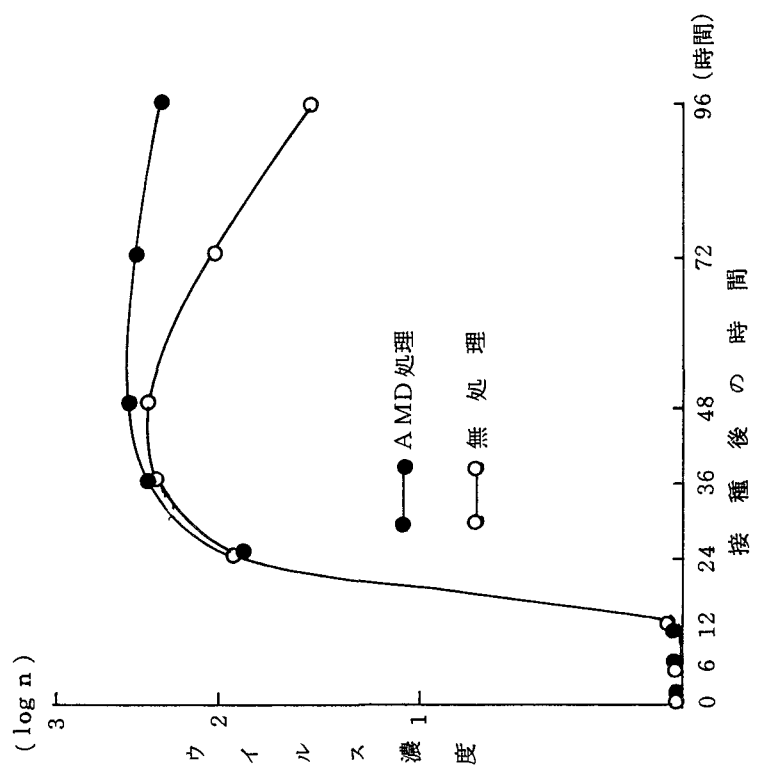
第4表 ウイルス増殖抑制因子の性質

処 理	ウイルス濃度※		増殖抑制率 (%)
	H	D	
硫安80%飽和, 沈渣	323	191	46
加熱処理, 100℃, 1分	304	289	5
フェノール処理	365	339	7

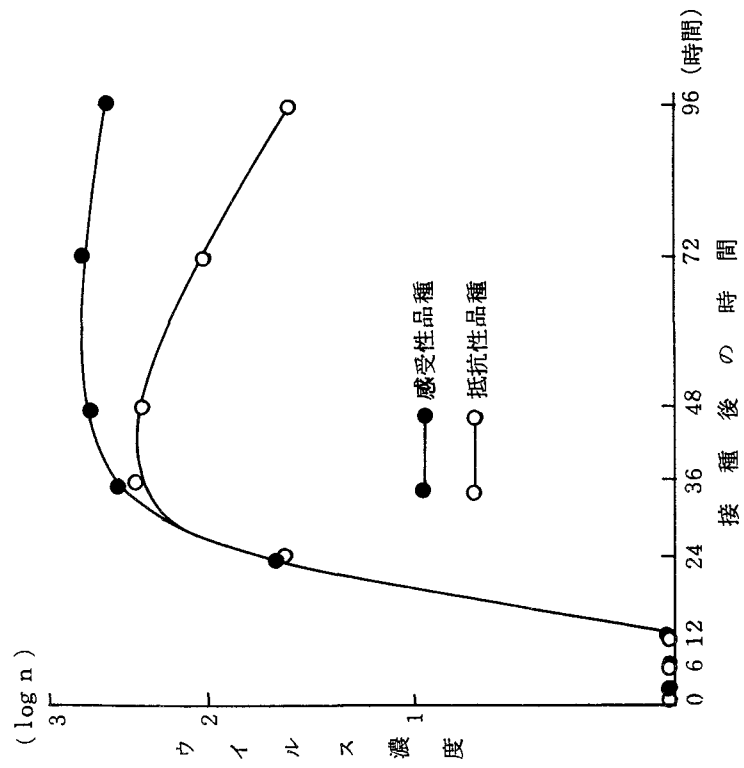
※ ササゲ葉10cm²当りの局部病斑数



第1図 キュウリ子葉におけるCMVの増殖



第3図 Actinomycin Dのウイルス増殖に及ぼす影響
注：nはササゲ葉10cm²当りの局部病斑数



第2図 キュウリ子葉におけるCMVの増殖
注：nはササゲ葉10cm²当りの局部病斑数

審査結果の要旨

キュウリモザイクウイルス (CMV) は、世界各地に広く分布し、寄生範囲が広いため農作物に多大の被害を与えている。本ウイルスの発生を防止する手段としては、媒介虫の駆除を中心とする姑息的なものであり、もとより十分な防除が期待されない。そこで著者は、品種間に見られる本病発生之差を通じてウイルス病に対する宿主抵抗性機作を解明することに努力した。これ迄ウイルス病に対する植物の抵抗性機作に就いては、過敏反応による細胞死・インターフェロン説以外に知られたものは少ない。

著者は、キュウリ品種間には CMV 感受性に差があり、それは極めて明瞭であることを示した。しかもその相違は環境により変化することがない。抵抗性品種の子葉では、葉当りのウイルス増殖量は少く、また減少時期も早い。さらに局部病斑数が少なく且つその大きさも小さい。これは各細胞でのウイルス増殖量の差に由来するとは考えられないことを示した。その原因は、感染細胞から周辺細胞へのウイルスの移行が物理的に阻止されるのではなく周辺細胞ではウイルスが移行しても増殖が抑止されるためであることを証明した。周辺細胞に予めアクチノマイシン-D、または α -アミニチンを吸収させると移行したウイルスが増殖することが出来、周辺細胞のウイルス抵抗力が発現し得ない。このことは、ウイルスに感染した細胞からの何等かの刺激により隣接細胞では核 DNA を經由する新しい物質の合成が始まることを推定させた。そのため抵抗力を得た細胞群から、関係する物質の抽出を行った所、蛋白質様物質 (分子量約 40000) であり葉に吸収させると抵抗力を発現することを証明した。

すなわち上記の抵抗性キュウリ品種の抵抗力はウイルスと宿主細胞との相互関係により誘導される一種の獲得抵抗性であると推定された。

本論文は、ウイルスに対する植物の抵抗機作の解明に新しい知見を加えるものであり、研究の進展によりウイルス病の防除の進歩に貢献するものと考えられる。よって本論文は農学博士の学位を与えるに価値あるものと認められる。