



Title	タバコ・モザイク・ウイルス核酸のオゾン，塩素および紫外線による不活性化
Author(s)	由崎，俊道；池畑，昭
Citation	北海道教育大学紀要．第二部．B，生物学，地学，農学編，31(1)：13-18
Issue Date	1980-09
URL	http://s-ir.sap.hokkyodai.ac.jp/dspace/handle/123456789/6381
Rights	

タバコ・モザイク・ウイルス核酸のオゾン, 塩素, および 紫外線による不活性化

由崎俊道・池畑 昭*
北海道教育大学札幌分校生物学教室
*工業技術院北海道工業開発試験所

Inactivation of Nucleic Acid of Tobacco Mosaic Virus by Chlorine, Ozone, and Ultraviolet Light

Toshimichi YOSHIZAKI and Akira IKEHATA*
Biological Laboratory, Sapporo College, Hokkaido University of Education,
Sapporo 064

Abstract

An experimental study was made to determine the protective effect of TMV-protein against the inactivation of TMV-RNA by ozone, chlorine, and ultraviolet light. TMV-RNA was quantitatively mixed with TMV-protein in 0.005M phosphate buffer solution (pH 7.0), and in a 0.1M pyrophosphate solution (pH 7.2). The former solution did not induce the reconstitution into TMV particles from TMV-RNA and its protein, while the latter solution induced the reconstitution. Each of these samples was subjected to the treatment of ozone, chlorine, and ultraviolet light. After the treatment, the samples in 0.005M phosphate buffer solution were reconstituted by an addition of 0.2M pyrophosphate solution (pH 7.2). In order to compare the infectivities of the reconstituted TMV, all samples were diluted and inoculated to *Nicotiana glutinosa* L. As a result, the protective effect of the protein on the inactivation of TMV-RNA by ozone was found to be of almost the same degree, regardless of whether the TMV-RNA and its protein were reconstituted or not into the TMV particles. In contrast, TMV-protein did not interfere with the inactivation of TMV-RNA by chlorine and ultraviolet light when they were not reconstituted into TMV particles in 0.005M phosphate buffer solution (pH 7.0). The protective ability of protein against the inactivation of TMV-RNA by chlorine and ultraviolet light increased clearly with the production of reconstituted TMV. TMV-protein did not show a distinct protection against the inactivation of TMV-RNA by chlorine and ultraviolet light when the reconstitution was not carried out.

緒 言

オゾンのタバコ・モザイク・ウイルス (TMV) を不活性化する作用は、塩素よりも強力であることは、すでに報告したが (由崎・池畑・野村, 1976), オゾンの不活性化力は TMV の系統を変えても同じであった。これに対し、塩素の TMV 不活性化作用は、TMV の系統によって明らかに差を示し、また TMV より分離した核酸 (TMV-RNA) に対する不活性化作用は、オゾンおよび塩素ともに系統による差が認められなかったことから、TMV の系統の塩素に対する耐性の差は、TMV 粒子を構成している蛋白に依存するものと推測した (由崎・池畑, 1977)。TMV-RNA と TMV 蛋白とを 0.1 M ピロリン酸溶液中で混合すると、TMV-RNA に蛋白小単位が集合し、再び粒子が構成される (Fraenkel-Conrat, 1955)。本研究では、再構成されない低濃度のリン酸溶液 (0.005 M, pH 7.0) および再構成される溶液 (0.1 M ピロリン酸溶液, pH 7.2) に TMV-RNA と TMV 蛋白とを定量的に混合し、それぞれの混合液にオゾン、塩素、および紫外線照射の処理を行ない、TMV-RNA の不活性化の程度を調べ、TMV 蛋白が粒子に再構成されなかった場合と再構成された場合との TMV-RNA の不活性化に対する TMV 蛋白の保護効果を比較検討した。

材料および方法

TMV は普通系統を用い、タバコ (*Nicotiana tabacum* L. var. White Burley) に接種し増殖させた。その感染葉の搾汁液から超遠心分画法 (Steere, 1959) によって TMV を純化した。TMV-RNA は、ベントナイト・フェノール法 (Fraenkel-Conrat, Singer, and Tsugita, 1961) によって調整し、TMV 蛋白は酢酸法 (Fraenkel-Conrat, 1957) によって調整した。TMV および TMV-RNA の濃度は 265 nm の紫外部吸光度によって、TMV 蛋白は 280 nm の紫外部吸光度によって定めた (Takahashi, 1951)。オゾンはカラム型オゾン発生器を用いて作り、0°C の純水に飽和溶解させた。溶存オゾン濃度は、使用の都度チオ硫酸滴定法によって測定した。塩素の実験においては、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 溶液を用いた。塩素濃度はオゾンと同様にチオ硫酸滴定法によって使用の都度測定した。一定量の TMV 試料を共栓付きの試験管に入れ、それに一定濃度のオゾンあるいは塩素溶液を加え、十分振盪し、30 分間反応させた。反応中は試験管を水中に保ち、0.2% の沃化カリ液を加えて反応を停止させた。紫外線照射には殺菌灯 (マツダ製、波長: 253.7 nm, intensity: 2,160 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) を用い、シャーレに試料を入れ、管球の中心から 10 cm あるいは 50 cm の距離からシャーレを振盪させながら一定時間照射を行った。TMV は感染性を示す 5% の RNA と感染性を有していない 95% の蛋白さら構成されているが、TMV の組成通り TMV-RNA : TMV 蛋白 = 5 : 9.5 の割合で、0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) あるいは 0.1 M ピロリン酸溶液 (pH 7.2) の中にそれぞれ混合させた。混合液にオゾン、塩素、あるいは紫外線処理を行なった後、0.005 M リン酸緩衝液中に混合した試料は、再構成を行なうために、0.2 M のピロリン酸溶液 (pH 7.2) を用いて 0.1 M のピロリン酸溶液中に保った。すべての試料を再構成された TMV (計算値) の濃度が 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) を用いて希釈し、*N. glutinosa* の葉に接種を行ない、2 ~ 3 日後に生ずる壞疽病斑数から TMV の感染力を定めた。

実験結果

1) オゾン, 塩素, 紫外線による TMV および TMV-RNA の不活性化

一定濃度の TMV に濃度を変えてオゾン水を加え, 30 分間の反応後, *N. glutinosa* に接種を行なった. 壊疽病斑が全く生じなくなるオゾン濃度から, 一定量の TMV を完全に不活性化させるに要するオゾン量を求めた. 同様に, 一定量の TMV を完全に不活性化させるに要する塩素量を求めた. 同じ実験を TMV-RNA について行なった. 第 1 表には, それらの結果と TMV および TMV-RNA を完全に不活性化させるに要する紫外線量を示した. 第 1 表に示すように, オゾンの TMV および TMV-RNA を不活性化する効果は, 塩素よりも強く, また, TMV-RNA は TMV よりもオゾン, 塩素, および紫外線によって容易に不活性化され, 特に紫外線においては, その差がいちじるしかった.

第 1 表 オゾン, 塩素, 紫外線処理による TMV RNA の不活性化量

処 理	TMV	TMV-RNA
オ ゾ ン	11.9~23.1 *	22.3 *
塩 素	4.2~ 5.0 *	10.0 *
紫 外 線	10cm, 10分 **	50cm, 10分 **

* オゾンあるいは塩素の 1 μg によって不活性化された TMV および TMV-RNA の平均量を示した。
 ** 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TMV あるいは TMV-RNA が, ほぼ完全に不活性化されるに要した紫外線照射量を殺菌灯から試料までの距離と照射時間とで示した。

2) オゾンによる TMV-RNA の不活性化

TMV-RNA と TMV 蛋白とが, それぞれ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように, 0.005 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0), および 0.1 M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2) の 2 種の溶液中に混合した. この結果, 0.1 M ピロ磷酸溶液中に混合した場合は, TMV-RNA と蛋白から粒子が構成されるため試料は白濁し, 他の溶液では再構成は起らず, 透明な状態のままであった. それぞれの 2 ml の試料に対し, 一定濃度 (1~5 ppm) になるように 2 ml のオゾン水を加えた. 30 分間反応させた後, 沃化カリを加え反応を止め, 0.005 M の磷酸緩衝液中の試料は, 0.2 M ピロ磷酸溶液を加え再構成させ, 希釈後 *N. glutinosa* に接種を行なった. 第 2 表には *N. glutinosa* の葉一枚当りの平均壊疽病斑数を示した. 第 2 表に示すように, 2 種類の溶液において, 蛋白を加えられた TMV-RNA の不活性化は, オ

第 2 表 TMV 蛋白*を混合した TMV-RNA* のオゾンによる不活性化

溶 媒 \ オゾン濃度	再構成させた後の感染力 (壊疽病斑数**)					
	0	1	2	3	4	5 ppm
0.005M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)	37.5	25.3	23.9	23.3	22.9	15.6
0.1M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2)	34.1	40.5	39.8	36.8	25.5	25.1

* 最終濃度が TMV-RNA は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TMV 蛋白は 950 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように混合した。
 ** 0.005 M 磷酸緩衝液中の試料は, 0.2 M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2) を加えて再構成させた. すべての再構成 TMV は 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈し, 8~16枚の *N. glutinosa* の葉に接種し, 葉一枚当りに生じた病斑の平均数を示した。

ゾンの最高濃度 5 ppm においても完全に不活性化されることはなかった。0.1 Mピロリン酸溶液中での TMV-RNA と蛋白とが完全に再構成されたとすれば、その最終濃度は 1,000 μg/ml となり、5 ppm の濃度では完全な不活性化が起らないことは、第 1 表のオゾンによる不活性化 TMV 量（オゾン量 1 に対し不活性化 TMV 量 11.9~23.1）からも推測できる。TMV-RNA 単独の場合では、5 ppm 濃度のオゾンによって不活性化される TMV-RNA 量は、オゾン量の 22 倍すなわち $5 \times 22 = 110 \mu\text{g}$ であり、この実験の TMV-RNA 単独の濃度では、5 ppm のオゾンによって完全に不活性化されることは明らかである（第 1 表）。第 2 表に示すように、TMV 蛋白を混合することによって、TMV-RNA のオゾンによる不活性化は保護される。しかし、TMV 蛋白が TMV-RNA と再構成されても、されなくても、その保護効果には、大きな差が認められなかった。この結果は、次に示す塩素および紫外線の TMV-RNA 不活性化効果と明らかに異なっていた。

3) 塩素による TMV-RNA の不活性化

オゾンの実験の場合と同様に、TMV-RNA (100 μg/ml) と TMV 蛋白 (1900 μg/ml) とを 0.005 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) および 0.1 Mピロリン酸溶液 (pH 7.2) の 2 種類の溶液に混合し、それぞれ 2 ml の試料に一定濃度の塩素水を 2 ml 加えた。水中で 30 分間反応させた後、沃化カリ液を加えて反応を止め、0.005 M 磷酸緩衝液中に混合した試料は、0.2 Mピロリン酸溶液 (pH 7.2) を等量加えて再構成させ、希釈後、*N. glutinosa* に接種を行なった。その結果を第 3 表に示した。塩素の場合は、オゾンと異なり、TMV-RNA の不活性化は、混合した TMV-RNA と TMV 蛋白とが再構成された場合と再構成されなかった場合とでは、大きな差を示した。すなわち、TMV-RNA と蛋白とが再構成されない溶媒 0.005 M 磷酸緩衝液中の TMV-RNA は、5.0 あるいは 7.5 ppm の塩素濃度によって完全に不活性化された。TMV-RNA に対するこの塩素量との比率は、TMV-RNA : 塩素 = 50 : 5 (あるいは 7.5) で、すなわち 10~6.7 : 1 であり、試料中の TMV-RNA と蛋白との総和に対するの塩素量の比は 500 : 5 (あるいは 7.5) で、すなわち 100~66.6 : 1 であった。TMV 蛋白が再構成されない場合では、塩素による TMV-RNA 不活性化効果を、ほとんど減退させなかった。0.1 Mピロリン酸液中で再構成され TMV 粒子となることによって塩素に対する耐性が増加した。

第 3 表 TMV 蛋白*を混合した TMV-RNA*の塩素による不活性化

溶 媒	塩素濃度	再構成させた後の感染力 (壊疽病斑数 **)					
		0	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0ppm
0.005 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)		80.2	54.7	7.5	0.4	0.2	0.0
0.1 M ピロリン酸溶液 (pH 7.2)		54.1	44.4	57.3	63.5	35.6	15.1

* 最終濃度が TMV-RNA は 50 μg/ml, TMV 蛋白は 950 μg/ml になるように混合した。

** 0.005 M 磷酸緩衝液中の試料は、0.2 M ピロリン酸溶液 (pH 7.2) を加えて再構成させた。すべての再構成 TMV は 0.05 μg/ml になるように希釈し 8~16 枚の *N. glutinosa* の葉に接種し、葉一枚当りに生じた病斑の平均数を示した。

4) TMV 蛋白を混合した TMV-RNA の紫外線による不活性化

上記の実験と同様に、TMV-RNA (50 μg/ml) と TMV 蛋白 (950 μg/ml) とを 0.005 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) および 0.1 M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2) の 2 種類の溶液中に混合し、これらの試料に殺菌灯の管球から 50 cm の距離を保って紫外線照射を行なった。一定時間毎に試料をとり、0.005 M 磷酸緩衝液を用いた試料には、等量の 0.2 M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2) を加え再構成を行なった。一定濃度に希釈した後、*N. glutinosa* に接種を行なった。*N. glutinosa* の葉一枚当りの平均病斑数を第 4 表に示した。紫外線照射においても、TMV-RNA と蛋白とが再構成されない溶液中での TMV-RNA の完全な不活性化は、7.5~10 分間で起こり、この結果は、第 1 表に示した TMV-RNA 単独の不活性化の場合とはほぼ同じ照射量であった。0.1 M ピロ磷酸によって TMV 蛋白と再構成された場合は、紫外線に対する耐性は、いちじるしく増加することが認められた。

第 4 表 TMV 蛋白*を混合した TMV-RNA*の紫外線照射**による不活性化

溶 媒 \ 紫外線照射時間	再構成させた後の感染力 (壊疽病斑数****)					
	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5 分
0.005M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)	25.1	4.7	0.2	0.2	0	0
0.1M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2)	30.1	29.0	16.7	18.8	7.8	5.7

- * 最終濃度が TMV-RNA は 50 μg/ml, TMV 蛋白は 950 μg/ml になるように混合した。
- ** 殺菌灯から 50cm の距離を保って照射した。
- *** 0.005M 磷酸緩衝液中の試料は、0.2M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2) を加えて再構成させた。すべての再構成 TMV は 0.05 μg/ml になるように希釈し 8~16 枚の *N. glutinosa* の葉に接種し、葉一枚当りに生じた病斑の平均数を示した。

論 議

TMV に対するオゾンの不活性化効果は、塩素よりも、はるかに強力であり (由崎・池畑・野村, 1976), この不活性化力の差はオゾンおよび塩素の示す酸化力の差によるものと考えられる。さらに、オゾンは TMV の系統に対する不活性化作用に差を示さなかったが、塩素は TMV の普通系統よりも他の系統をより少ない塩素量で不活性化させた (由崎・池畑, 1977)。紫外線による不活性化効果は TMV の系統によって異なることが知られている (Siegel and Wildman, 1954; Oshima, Ohara, and Umekawa, 1971)。しかし、TMV-RNA では系統によって紫外線に対する耐性に差がなく (Siegel, Ginoza, and Wildman, 1957), また塩素による TMV-RNA の不活性化においても系統によって耐性が異なることはなかった (由崎・池畑, 1977)。Streeter and Gordon (1968) は紫外線に対する耐性の異なる TMV の U₁ 系統と U₂ 系統の RNA と蛋白とを組み換えて再構成させ、紫外線に対する耐性を調べ、耐性の差は外被蛋白に依存していることを認めた。さらに、Oshima, Ohashi, and Umekawa (1971) は TMV の他の系統を用い、同様な報告をしている。本研究においては、再構成され粒子を形成することによって、TMV 蛋白は紫外線あるいは塩素の不活性化作用に対して強い保護効果を示した。

しかし、オゾンに対する TMV 蛋白の保護効果は TMV-RNA と再構成されなかった場合と再構成された場合とで、それ程大きな差がなく、この結果はオゾンの強い酸化力によるものと考えられる。一方、塩素および紫外線的作用においては、再構成されなかった TMV 蛋白には、ほとんど妨害されることなく TMV-RNA は不活性化されるが、TMV-RNA が蛋白と結合し粒子となると耐性が、いちじるしく増加する。この原因が、塩素あるいは紫外線が外被蛋白を通過し難いのが原因なのか、あるいは TMV-RNA と蛋白との結合に対する作用が弱いためのものは不明である。

要 約

TMV-RNA のオゾン、塩素、および紫外線による不活性化に対する TMV 蛋白の保護効果について研究を行なった。TMV-RNA と TMV 蛋白とを 0.005 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) あるいは 0.1 M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2) に定量的に混合した。前者の溶液では TMV-RNA と蛋白とから TMV 粒子に再構成されないが、後者の溶液では再構成され、粒子が形成される。これらの試料にオゾン、塩素および紫外線照射の処理を行なった。処理後、0.005 M 磷酸緩衝液を用いた試料は 0.2 M ピロ磷酸溶液 (pH 7.2) を加えて再構成させた。すべての試料は希釈後、感染性を比較するために *Nicotiana glutinosa* L. に接種を行なった。その結果、オゾンによる TMV-RNA の不活性化に対する TMV 蛋白の保護効果は、それらが再構成されても、されなくとも、ほぼ同じ程度であった。これに対し、塩素あるいは紫外線に対する保護効果は再構成されることによって、いちじるしく増加した。0.005 M 磷酸緩衝液を用いて再構成させなかった場合は、TMV 蛋白の塩素あるいは紫外線に対する保護作用は、ほとんど認められなかった。

引用文献

- Fraenkel-Conrat, H. 1957. Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. *Virology* **4** : 1-4.
- Fraenkel-Conrat, H. and Williams, R. C., 1955. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Biochem.* **441** : 690-697.
- Fraenkel-Conrat, H., Singer, S., and Tsugita, A., 1961. Purification of viral RNA by means of bentonite. *Virology* **14** : 54-58.
- Oshima, N., Ohashi, Y., and Umemura, M., 1971. Studies on some strains of tobacco mosaic virus, pathogenic to crucifer plants. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **37** : 319-325.
- Siegel, A. and Wildman, S. G., 1954. Some natural relationships among strains of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **44** : 277-282.
- Siegel, A., Ginoza, W., and Wildman, S. G., 1957. The early events of infection with tobacco mosaic virus nucleic acid. *Virology* **3** : 554-559.
- Steere, R. L., 1959. The purification of plant viruses. *Advances in Virus Res.* **6** : 1-73.
- Streeter, D. G. and Gordon, M. P., 1968. Studies of role of the coat protein in the U. V. photo-inactivation of U(1) and U(2) strains of TMV. *Photochem. Photobiol.* **8** : 81-92.
- Takahashi, W. N., 1951. Ultraviolet adsorption as a measure of tobacco mosaic virus nucleoprotein. *Phytopathology* **41** : 142-145.
- 由崎俊道・池畑昭・野村邦重, 1976. タバコ・モザイク・ウイルスに対するオゾンおよび塩素の影響. 北海道教育大学紀要 **26** : 5-11.
- 由崎俊道・池畑昭, 1977. タバコ・モザイク・ウイルスのオゾンおよび塩素による不活性化. 北海道教育大学紀要 **28** : 3-6.