

キミガヨラン葉中の抗ウイルス蛋白質の細胞内局在について*

伊藤良仁**・関 育也・平松 昭

1978年に奥山ら¹⁾は、169種(40目84科149属)の植物について、tobacco mosaic virus(以下TMVと略す)、cucumber mosaic virus(CMV)およびpotato virus X(PVX)についてウイルス感染阻害物質を検索し、ユリ科の常緑半低木であるキミガヨラン(*Yucca recurvifolia* Salisb.)に強い植物ウイルス感染阻害活性を見出し、その汁液が蛋白質性であることを報告²⁾した。

前報³⁾で大沢らは、キミガヨラン葉中より抽出、精製された植物ウイルス感染阻害物質について報告した。この感染阻害物質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で均一であり、分子量23,000、等電点9.4、糖を含まない塩基性単純蛋白質であった。この蛋白質をYucca Leaf Protein(YLP)と命名した。平松ら⁴⁾はその諸性質を検討し、YLPはアカザ及びTMVを用いた半葉法では0.6 µg/mlで局部病斑形成を50%減少させ、塗抹処理から72時間経過後にTMVを感染させても十分な阻害効果が認められたが、TMV感染後2~3時間後にYLPを処理した場合、効果は認められなかった。つまり、予防的効果はあるが治療的効果はないことを示唆した。また、RNA加水分解活性及びTMV凝集活性はなく、4℃で24時間の混合インキュベーションでTMV粒子に対する直接的な不活性化作用は、認められなかった。また、TMV-RNAに対する感染阻害活性を有していることからTMVの脱コート蛋白質の過程を阻害しないことが示唆したので、抗ウイルス蛋白質である。また、伊藤^{4,5)}はうさぎ網状赤血球ライセートとTMV-RNAをm-RNAとして用いた無細胞系でアミノ酸の取込み量を測定した結果、9.2ng/mlで蛋白質合成を50%阻害した。さらに、関⁷⁾らはマウス肝臓リボソームにYLPを作用させたところ、アデニンが遊離したことを報告し、YLPがRNA N-グリコシダーゼであることを示唆した。この蛋白質は単量体⁸⁾であるからリボソーム不活性化蛋白質(Ribosome-inactivating proteins, 以下RIPs略す)のType Iに属する。しかし、YLP

のTMV感染阻害機構について明確な結論が得られていない。

YLPとよく類似したRIPsの性質について、Barbieri⁹⁾らが総説にまとめているが、その生体内での生理作用はよくわかっていない。Stirpe⁹⁾らは、RIPsが蛋白質合成の調節、もしくは、継ぎ木などによる異種生物の侵入を防ぐ作用をしているのではないかと報告している。Ready¹⁰⁾らは、RIPsの一つであるヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)から抽出された、Pokeweed Antiviral Protein(一般にPAPと略されている)の細胞内局在をフェリチン抗体法で実験し、細胞壁マトリックス上に存在するため、ウイルスの侵入に伴い、PAPが細胞中に入り、蛋白質合成を阻害し、ウイルスの増殖を抑制するのではないかと報告した。また、YLPのキミガヨラン葉中での生理的な作用はまったく分っていない。

今回、著者らはYLP抗血清を作製し、Ouchterlony法による2元放射状免疫拡散法にて、キミガヨラン葉中より抽出された、精製中にもう一つの抗ウイルス蛋白質(YLP IIと略す)、シイタケ(*Lentinus edodes*)子実体より単離精製した抗ウイルス蛋白質¹¹⁾(Furiting body protein, 以下FBPと略す)、および、ヒマ(*Ricinus communis*)の種子から得られた蛋白質毒⁹⁾Ricin(RIPs Type II)の蛋白質合成阻害活性をもつサブユニットRicin A-chainとYLPの免疫学的な比較を行った。また、YLP抗血清を用いた酵素抗体法でキミガヨラン葉中の細胞内局在を確認し、生体内での作用を考察したので、以下報告する。

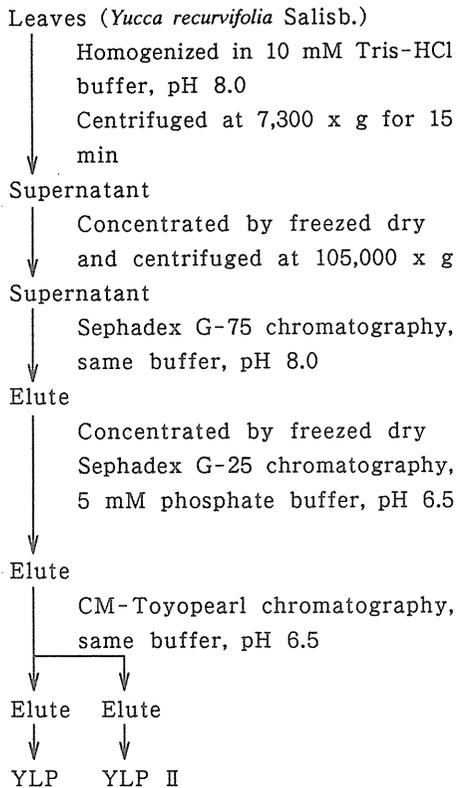
材料および方法

1. YLPおよびYLP IIの精製

茨城大学農学部構内に自生しているキミガヨラン葉を採取した。YLPおよびYLP IIの精製は、前報³⁾によるYLPの精製法に準じて行った(Scheme 1)。また、Fig. 1に示したCM-クロマトグラフィーで、第1ピーク(YLP)および第2ピーク(YLP II)をそれぞれ分画し、セファデックスG-25クロマトグラフィーで脱塩し、以下の実験に使用した。

* 本報は日本農芸化学会昭和63年度大会(名古屋)で発表⁴⁾した。

** 現在、(株)桃屋リサーチセンター



Scheme 1 Purification of YLP and YLP II from Leaves of *Yucca recurvifolia* Salisb.

2. FBP および Ricin A-chain

市販のシタケ子実体を前報¹¹⁾に従って精製した。Ricin A-chainはSigma社より購入した。

3. YLP 抗血清の作製

購入してから10日間飼育をした雄のうさぎ(日本白色種:体重2.5kg)2羽を準備し,6mg/mlのYLP溶液1mlとFreund's complete adjuvant 1mlのシリンジを用いて混和しwater in oilの状態にした後,爪の裏,背中,腹部の皮内など約30箇所に分けて皮下に投与した。

投与から1ヵ月毎に試験採血し,抗体価を重層沈降線法¹²⁾によって測定し,抗体価が×100未満の場合,試験物質の初回投与の半量を目安として,同様に追加投与をした。

約2ヵ月後に抗体価×256が得られたので,頸動脈にカテーテルを差込み,全採血を行った。血液は室温で1時間静置後,4℃で一晩静置する。その後,4℃で,10,000rpm,15分の冷却遠心して血清を得た。

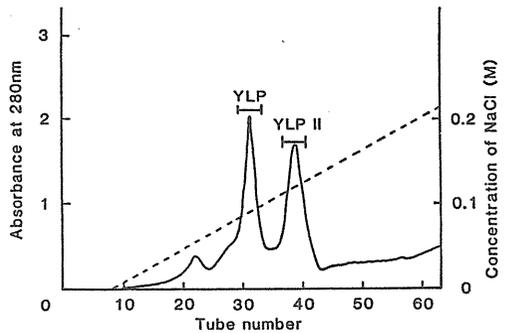


Fig. 1. Chromatography of YLP and YLP II on a column of CM-Toyopearl 650M

A YLP solution was applied to a column (1.8 × 30cm) of CM-Toyopearl 650M, which had been equilibrated with 5 mM phosphate buffer at pH 6.5. After the column had been washed with the same buffer, YLP and YLP II were eluted with a linearly increasing concentration of NaCl from 0 to 0.3 M in starting buffer. The flow rate was 30 ml per hr and fractions of 4.5 ml were collected. — indicates absorbance at 280nm
- - - indicates NaCl concentration

2羽から合計132mlの抗血清を得た。

4. Ouchterlony法による2元放射状免疫拡散法

2元放射状免疫拡散法は, Ouchterlony¹²⁾法に従って行った。内径8.5cmのシャーレに1%寒天, 0.765% NaCl, 0.1% NaNO₃を含む10mMリン酸バッファpH 7.3を20mlよく煮沸して入れ, 室温で固化させた。ゲルに直径4mmの穴を6mm間隔にあげ, 中央に抗体 20 μl, 周囲に試料をそれぞれ20 μl添加する。37℃で1夜放置し, 沈降線の形成をみる。試料は, YLPは1mg/ml, YLP IIは1mg/ml, FBPは, 1mg/mlを, およびRicin A-Chainは0.7mg/mlの溶液をそれぞれ使用した。

5. パラフィン切片作製

パラフィン切片の作製は, 常法に従って¹³⁾行った。

固定は, キミガヨラン葉を5mm幅に切り, 10%パラホルムアルデヒドを含む100mMリン酸バッファpH7.4に浸して室温にて7日間静置した後, 流水にて洗浄(4~5時間)した。

パラフィン包埋は, 固定された組織片は自動包埋装置を用いて脱脂, 脱水(20時間)した。(60%エタノール, 70%エタノール, 80%エタノール, 90%エタノール, 100%エタノール, トルエン, パラフィン)得られたサンプルをパラフィン(メルク社57~60℃ melt)包埋した。

薄切は, パラフィン包埋された組織片を台木につけ, ミクロトームにて薄切した。切片は60℃の湯で「湯のぼし」をしてからhistostik(接着剤)処理済

スライドガラスに貼布した後、37℃で一夜乾燥させた。

脱パラフィンは、得られたスライドガラスをさらに58℃で30分間乾燥させた後、キシレン、100%エタノール、90%エタノール、PBSにて順次洗浄した。

組織片の染色は、染色キット (Avidin-Biotin Immunoperoxidase (AB) Kits) は、Bio Genex Laboratories USAより購入し、免疫組織化学用染色システム「ヒストジェン」マニュアルに従って、以下のように行った。

1) ブロッキング I

まず、組織内在性のPeroxidaseの活性をおさえ、バックグラウンドを低くするために、第1液 (H₂O₂) を添加し、モイストチャンバー内にて室温で10分間静置後、150mM NaClを含む10mMリン酸バッファー pH7.2 (以下PBSと略す) にて洗浄した。

2) ブロッキング II

次に、組織片に対する抗血清の非特異的な吸着をおさえるため第2液 (正常山羊血清) を添加、モイストチャンバー内にて室温で20分間静置後、PBSにて洗浄した。

3) 第1抗体処理

次に、PBSにて1,000倍希釈したYLP抗血清、またはブランクとしてPBSを添加、モイストチャンバー内にて室温で20分間静置後PBSにて洗浄した。

4) 第2抗体処理

次に、ビオチン結合性-免疫グロブリン抗家兎山羊血清を添加し、モイストチャンバー内にて室温で20分間静置後、PBSにて洗浄した。

5) 標識抗体処理

ペルオキシターゼ標識アビジンを添加、モイストチャンバー内にて室温で20分間静置後、PBSにて洗浄した。

6) 基質添加

500 µg/ml Diaminobenzidin および0.03% H₂O₂を含む10mM Tris-HCl pH7.4に3分間浸し、モイストチャンバー内にて室温で20分間静置後、PBSにて洗浄した。

7) 対比染色

対比染色は、1%エオジンにて行った。

8) 観察

観察は光学顕微鏡にて行った。

結 果

1. YLPの免疫反応

Ouchterlony法による2元放射状免疫拡散法を用

いて、YLP抗血清に対しYLP, YLP II, FBP, Ricin A-chainの免疫反応を調べた。その結果をFig. 2に示したようにYLPとYLP IIに沈降線がみられた。YLP IIの沈降線は二本あらわれたが、低分子側 (抗血清側) は、分解物または2種類の蛋白質を含むものと思われる。

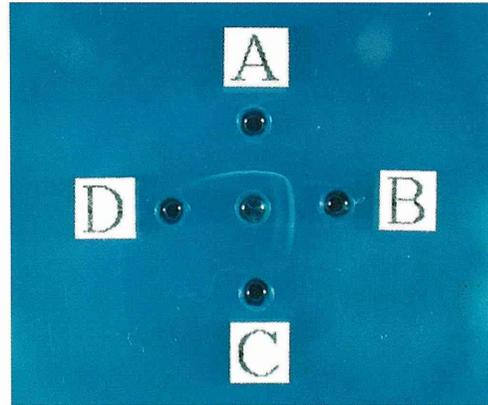


Fig. 2. Ouchterlony double diffusion analysis

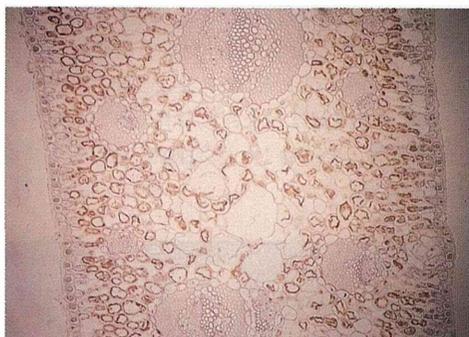
The center well contained 20 µg of the antibody specific for YLP. The samples in the other wells were as follows, A: 20 µg of purified YLP, B: 20 µg of purified YLP II, C: 20 µg of purified FBP and D: 14 µg of Ricin A-chain, respectively.

2. YLPのキミガヨラン葉中細胞内局在

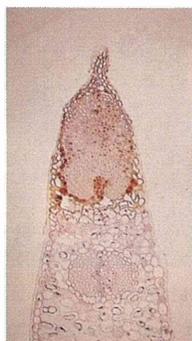
今回、YLP抗体を用いた酵素抗体法でキミガヨラン葉中の細胞内局在を求め、その結果をFig. 3に示した。サンプルには、健全葉と褐変をおこした葉の2種を用いたが、全く違いは認められなかった。組織レベルでは表皮細胞、導管、師管にはなく、比較的柵状細胞に多くみられ、葉の端の部分に強く局在した。細胞レベルでは、細胞壁マトリックス等ではなく、細胞質中に平均的に分布 (Fig. 3b参照) していることが明らかとなった。なお、コントロール染色としてエオジン染色した写真をFig. 4に示した。

考 察

今回、YLPの抗血清を用いて、YLP, YLP II, FBP, Ricin A-chainの4種の蛋白質との免疫反応を調べた結果、YLPとYLP IIに反応があった。このことから、蛋白質構造に免疫学的な相似部分があると考えられる。FBP, Ricin A-chainについては、共に蛋白質合成阻害活性を有するにもかかわらず、まったく反応しなかったことはYLPと構造的に差異のあ



(a)



(b)

Fig. 3. Localization of yucca leaf protein in thin sections of *Yucca recurvifolia* leaf

Sections of leaf were stained with rabbit anti-yucca leaf protein, followed by avidin-biotin immunoperoxidase kits.



Fig. 4. Control micrograph for Fig. 3

Sections of leaf were stained with eosin.

ることを示した。今後のYLPおよびYLP IIの構造解析に期待したい。

キミガヨラン葉中でのYLPの生理的役割については、YLPは、アカザやタバコを用いた半葉法にて強力にTMVの病斑形成を阻害するが、本来の目的がキミガヨラン以外の植物のウイルス感染阻害ではない

ことは確かである。YLPはキミガヨラン葉中に一年を通じて常に存在し、褐変した葉と健全葉を比較して、YLPの局在ときわだった量に違いが認められなかったことから、YLPは外的要因によって誘導されるフィトアレキシンのようなものではないと思われる。また、YLPの植物ウイルス感染阻害作用はその蛋白質合成阻害活性に依存するものであるから、もし、キミガヨラン自体のウイルスに対する防御が本来の目的ならば、細胞膜外に存在し、ウイルスの侵入に伴い細胞内に入り込み、蛋白質合成を阻害する過程が必要である。しかし、本実験では、細胞質中に平均的に分布していた。

Ready¹⁰らは、PAPの細胞内局在をフェリチン抗体法で実験し、細胞壁マトリックス上に存在するため、ウイルスの侵入に伴い、PAPが細胞中に入り、蛋白質合成を阻害し、ウイルスの増殖を抑制するのではないかと、つまり、ウイルスに対し防御的に働くのではないかと報告した。

これらのことより、YLPは生体内では前駆体で存在し、抽出の過程で変性し、蛋白質合成阻害活性をもつのか、生体内ですでに活性があるのか不明であるが、キミガヨラン自体のウイルスに対する防御を目的としたものではないと考える。

YLPはキミガヨラン葉中で葉の端に強く局在していること、動物細胞に毒性⁶⁾があること、60℃までの温度、pH1~11で安定であること⁵⁾、nativeな状態でProtease (TrypsinおよびChymotrypsin)に対して安定な⁵⁾ことから、キミガヨランを摂取した昆虫などに影響を与えることも推測され、YLPのキミガヨラン葉中での役割は、昆虫などの食害に対する防御的なものであると思われる。また、YLPがキミガヨラン葉中で、前駆体として存在し、蛋白質合成を調節している可能性も考えられる。

謝 辞

本報告の作成にあたりご助言、ご指導を賜りました農林水産省家畜衛生試験場病理第1研究室長 門田耕一博士に感謝します。

文 献

- 1) 奥山哲・竹見洋一・坂ひろみ：植物ウイルスの感染阻害物質に関する研究 第7報 各種植物汁液のウイルス感染に及ぼす影響、茨大農学術報告、26、35-48 (1978)
- 2) 奥山哲・竹見洋一・坂ひろみ：植物ウイルスの感染阻害物質に関する研究 第8報 キミガヨランに

- 含まれるウイルス感染阻害因子の性状, 茨大農学術報告, 26, 49 - 55 (1978)
- 3) Osawa, N. and A. Hiramatsu : Purification and chemical properties of an inhibitor of plant-virus infection from leaves of *Yucca recurvifolia* Salisb., *Agric. Biol. Chem.*, 51, 891 - 896 (1987)
- 4) 伊藤良仁・平松昭・植物ウイルス感染阻害蛋白質 YLP の蛋白合成阻害活性について, 日本農芸化学会誌, 62, 413 (1988)
- 5) Hiramatsu, A., N. Kobayashi and N. Osawa : Properties of two inhibitors of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes* and from leavers of *Yucca recurvifolia* Salisb., *Agric. Biol. Chem.*, 51, 897 - 904 (1987)
- 6) 伊藤良仁：キミガヨラン抗植物ウイルス物質の性質と作用機構, (茨城大農学部修士論文) (1988)
- 7) 関育也・平松昭：植物ウイルス感染阻害蛋白質 YLP の作用機構に関する研究, 日本農芸化学会誌, 65, 572 (1991)
- 8) Barbieri, L. and F. Stirpe : Ribosome-inactivating proteins from plants : Properties and possible uses, *Cancer Surv.*, 1, 489-520 (1982)
- 9) Stirpe, F. and L. Barbieri : Ribosome-inactivating protein up to date, *FEBS Lett.*, 195, 1-8 (1986)
- 10) Ready, P. M., D. B. Dennis and J. D. Robertus : Extracellular localization of pokeweed antiviral protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5053-5056 (1986)
- 11) Kobayashi, N., A. Hiramatsu and T. Akatsuka : Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 883-890 (1987)
- 12) 西岡久壽彌・嶋田孝吉・真崎知生：約にたつ免疫実験法, 講談社サイエンティフィック編集, 講談社, p62-63 (1987)
- 13) 渡辺慶一・中根一穂：改訂版 酵素抗体法, 学際企画, p25-26 (1986)
- 14) 渡辺慶一・中根一穂：同上, p83-88

Extracellular localization of antiviral protein from leaves of *Yucca recurvifolia* Satisb.

YOSHIHITO ITO, IKUYA SEKI and AKIRA HIRAMATSU

Two antiviral protein from leaves of *Yucca recurvifolia* were purified to homogeneous state by the method of column chromatography on CM-Toyopearl 650M. These antiviral proteins were named "yucca leaf proteins" (YLP and YLP II).

In Ouchterlony double diffusion analysis, antibody specific for YLP formed a single precipitin line with purified YLP, and double line with purified YLP II, but not formed line with antiviral protein from fruiting bodies of *Lentinus edodes* and ricin A-chain.

We have used microscopy to show that the antibody specific for the YLP is bound with its protein into the cell in thin sections of *Yucca recurvifolia* leaf.