

RT-PCR 法を利用したサツマイモウイルス病の高感度簡易診断

農林水産省九州農業試験場 ^{おおぬき}大貫 ^{まさとし}正俊・^{はなだ}花田 ^{かおる}薫

はじめに

わが国のサツマイモに発生するウイルス病のうち、主なものには帯状粗皮病、斑紋モザイク病及び葉巻病である。また、サツマイモでの病徴発現は明らかではないものの2種のひも状ウイルスが存在することが報告されており、それぞれサツマイモ潜在ウイルス (sweet potato latent virus, SPLV)、サツマイモシンプトムレスウイルス (sweet potato symptomless virus, SPSV) と呼ばれている (USUGI et al., 1991)。

本稿では、サツマイモに発生するこれらのウイルスのうち、サツマイモ斑紋モザイクウイルス (sweet potato feathery mottle virus, SPFMV) の RT-PCR 法を利用した高感度診断事例について紹介する。

SPFMV はポティウイルスグループに属するひも状ウイルスで、わが国のサツマイモ栽培地において広く発生している。SPFMV にはいくつかの系統が存在するが、特に、サツマイモ帯状粗皮病の病原であるサツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統 (SPFMV severe strain, SPFMV-S) 及び強毒系統と血清学的に極めて近縁な普通系統 (SPFMV ordinary strain, SPFMV-O) が重要である (宇杉ら, 1990)。サツマイモからの SPFMV の検出は、これまで *Ipomoea setosa* 等の検定植物への接種やウイルス抗血清を用いた血清学的手法が採られてきた。しかし、接種検定は結果を得るまでに1週間程度の日数を必要とすること、そして、血清学的検出に関してはサツマイモ植物汁液に含まれるフェノール化合物やラテックスが血清反応を阻害することが問題である (ABAD and MOYER, 1992)。なお、サツマイモ植物体中のウイルス濃度や分布は不均一であることが知られており、これが検出の再現性に影響すると考えられている (GREEN et al., 1988)。

最近、RNA ウイルスの検出に RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) の利用が図られている。RT-PCR 法は逆転写酵素 (RT) を使って目的のウイルス RNA の相補鎖 DNA (cDNA) を作り、2種のプライマー (相同及び相補プライマー) を用いて、

PCR 反応で、cDNA を数十万倍にまで増幅させる方法である。このため、植物体内でのウイルス濃度や分布が不均一な SPFMV の検出には RT-PCR 法の利用が有効であると考えられる。

西口らは、RT-PCR 法によりアサガオ感染葉から SPFMV-O 及び S 系統を検出している (NISHIGUCHI et al., 1995)。しかし、サツマイモ感染葉からのウイルスの直接的検出に関しては混在する植物成分が RT-PCR の反応過程を阻害したため成功しなかった。そこで、我々はサツマイモ感染葉から簡便に SPFMV のウイルス RNA を抽出する方法を検討し、これを RT-PCR 法に応用することで感染サツマイモ葉からの高感度のウイルス検出法を確立した (大貫ら, 1995)。以下、その方法について具体的に紹介する。なお、本研究に用いた SPFMV の合成プライマーを分譲していただいた、茨城県生工研の津田新哉氏ならびに圃場サツマイモ苗を分譲していただいた千葉県原種農場の大越一雄氏に厚くお礼申し上げる。

I サツマイモ感染葉からのウイルス RNA の簡易抽出

SPFMV-O 及び S をウイルスフリー化したサツマイモ '高系 14 号' に接木接種した。約 1 か月後、下位葉を採取し、生葉のままかあるいは凍結葉としてウイルス RNA を含む全 RNA の簡易抽出に供試した。抽出法の概略は図-1 に示したとおりであるが、この抽出法で注意すべき点は、図-1④で得られる沈殿中にサツマイモの成分を混入させないことである。この段階で沈殿が植物成分により若干でも褐変している場合は RT-PCR 法の結果は再現性がよくなかった。これを防ぐには図-1③の 35 STE 緩衝液による CF 11 セルロースの洗浄操作を 1～2 回繰り返すことが必要であった。この操作を繰り返すことで RNA を吸着した CF 11 セルロースの沈殿物から褐変を除くことができ、図-1④の最終的な沈殿も褐変のないものが得られた。RT-PCR を実施する場合、抽出試料の CF 11 セルロース処理が好結果をもたらすことは他のウイルスやウイロイドの検出の例でも報告されている (楠ら, 1993; 佐野, 1990)。

- ① 感染葉 (0.2 g) を 0.6 ml の TNE 緩衝液とともに乳鉢中で磨碎する。フェノールクロロホルム (1:1) を 0.6 ml 加えて乳鉢中でよく混合する。磨碎汁液を 1.5 ml の微量遠心チューブに移す。



- ② 15,000 rpm, 5 分間遠心後、水層を採り、エタノール沈殿する。沈殿を STE 緩衝液 130 μ l に再懸濁し、エタノールを 70 μ l 加える。あらかじめ 35 STE 緩衝液で湿らせておいた CF 11 セルロース (10 mg) と混合し、ボルテックスで 1 分間かくはんする。



- ③ 15,000 rpm, 2 分間遠心し、沈殿を 35 STE 緩衝液に再懸濁し、15,000 rpm, 2 分間遠心する (洗浄)。この洗浄操作を 1 ~ 2 回繰り返す。得られた沈殿を STE 緩衝液 0.4 ml に再懸濁し、15,000 rpm, 1 分間遠心後、上清を採りエタノール沈殿する。



- ④ 沈殿を減圧乾燥し、滅菌蒸留水 20 μ l に再懸濁し、このうち 2 μ l を RT-PCR に供試。

* TNE 緩衝液: 20 mM Tris-HCl (pH 8.5),
0.1 M NaCl, 1 mM EDTA

* STE 緩衝液: 50 mM Tris-HCl (pH 7.0),
0.1 M NaCl, 1 mM EDTA

* 35 STE 緩衝液: 35% エタノールを含む STE 緩衝液

図-1 SPFMV に感染したサツマイモ葉からの RNA の調製法

II RT-PCR

RT-PCR に用いたプライマーは 5' 側ウイルス RNA 相 同 プ ラ イ マー の 配 列 が 5'-CACTTCAGTGACGTTGCTGA-3', 3' 側相補プライマーの配列が 5'-GGCTCGATCACGAACCAAAA-3' である。これらは SPFMV-O, S の外被タンパク質をコードする領域と 3' 末端非翻訳領域 (Mori et al., 1994, 1995) の塩基配列に由来し、約 540 bp の DNA 断片の増幅が想定された。RT-PCR には RNA PCR キット (宝酒造, R 012) を用い、添付のプロトコールに従って塩濃度及びプライマーの濃度を決定した。RT-PCR の温度設定はヒートブロック式のプログラム温度制御装置 (アステック, PC-700) を用い、ウイルス RNA の cDNA への逆転写は 42°C, 15 分, 次いで 99°C, 5 分間処理で逆転写酵素を失活させた。cDNA の増幅は DNA 変性に 95°C で 40 秒, プライマーの会合に 53°C, 1 分 30 秒, DNA 鎖の伸長に 72°C で 2 分間反応させ、これを 40 サイクル行った。100 μ l の RT-PCR 反応液のうち, 5 μ l を 1% アガロースゲルで電気泳動後, ゲルを臭化エチジウムで染色し, 紫外光下で観察して目的の約 540 bp の DNA 断片の有無を調べた。

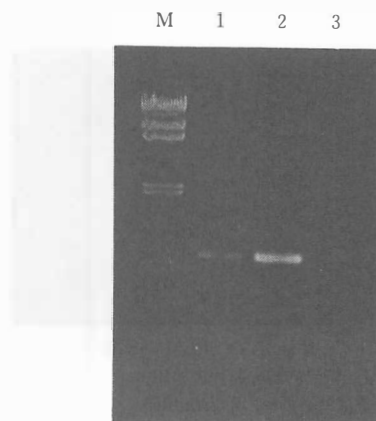


図-2 RT-PCR による感染サツマイモ葉からの SPFMV 各系統の検出

M: 分子量マーカー, λ /HindIII

1: SPFMV-O 感染葉の抽出

RNA を RT-PCR に供試した

2: SPFMV-S 感染葉の抽出

RNA を RT-PCR に供試した

3: 健全サツマイモ葉からの抽出

RNA を RT-PCR に供試した

III ウイルス検出

1 RT-PCR 法による感染サツマイモ葉からの SPFMV の検出

感染サツマイモ葉から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR を行った。対照として茎頂培養によりウイルスフリー化した健全サツマイモ葉から抽出した RNA を同様に処理した。RT-PCR の結果, SPFMV-O 及び S に感染したサツマイモ葉の RNA 試料からはプライマー配列から予想される約 540 bp の明瞭な増幅断片が得られた。一方, 健全サツマイモ葉から抽出した RNA 試料ではこのような特異的断片は検出されなかった (図-2)。

2 RT-PCR 法による SPFMV の検出限界

(1) 純化ウイルスからの精製 RNA の RT-PCR

SPFMV-S に感染したアサガオ葉から宇杉ら (Usugi et al., 1994) の方法によりウイルスを純化し, proteinase K-SDS 処理, フェノール抽出及びエタノール沈殿を行い, ウイルス RNA を精製した。精製 RNA を滅菌蒸留水で 10 倍ずつ段階希釈し, RT-PCR 反応液中に 1 ng (10^{-6} mg) から 1 ag (10^{-15} mg) のウイルス RNA を加えて特異的断片が増幅されるか調べた。その結果, 1 fg (10^{-12} mg) までのウイルス RNA を加えた RT-PCR 反応液から特異的断片の増幅が認められた (図-3)。

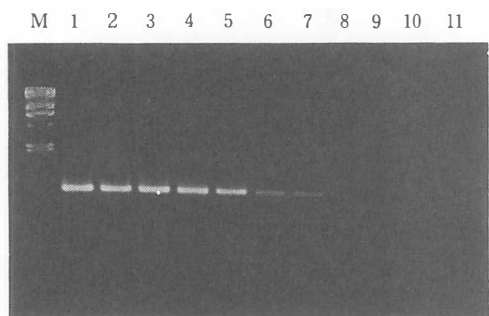


図-3 RT-PCR 反応液中の SPFMV-S のウイルス RNA 量と特異的増幅断片の検出

M: 分子量マーカー, λ /HindIII

- 1: 1 ng のウイルス RNA を加えて RT-PCR を行った
 2: 100 pg 3: 10 pg
 4: 1 pg 5: 100 fg 6: 10 fg
 7: 1 fg 8: 100 ag 9: 10 ag
 10: 1 ag 11: 対照 (滅菌蒸留水)

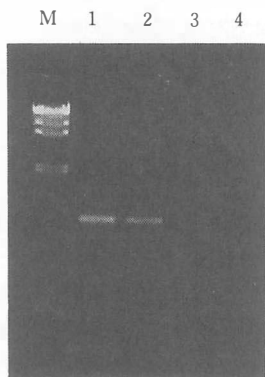


図-4 SPFMV-S に感染したサツマイモ葉の希釈汁液からの RT-PCR による増幅断片の検出

M: 分子量マーカー, λ /HindIII

- 1: 10 倍希釈した感染葉汁液の RT-PCR
 2: 100 倍希釈 3: 1,000 倍希釈
 4: 10,000 倍希釈

(2) 感染サツマイモ葉からのウイルスの検出限界

SPFMV-S に感染したサツマイモ葉を葉の重量に対し, 10 倍量の TNE 緩衝液 (図-1 参照) で乳鉢中で磨砕し, さらに TNE 緩衝液で 10 倍段階希釈した。各希釈段階の汁液 0.6 ml より図-1 に示した方法により全 RNA を抽出した。最終的に得られた沈殿を 10 μ l の滅菌蒸留水に再懸濁し, このうち 2 μ l を RT-PCR に供試した。実験の結果, 1,000 倍希釈した汁液試料からウイルス RNA に由来する約 540 bp の特異的な断片が検出された (図-4)。このように, サツマイモの感染葉汁液を用いた場合は, 1,000 倍希釈汁液からの検出が限界であっ

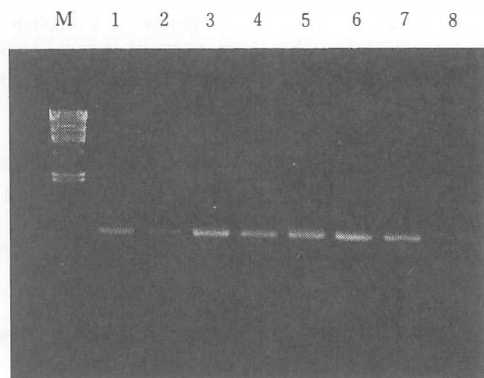


図-5 千葉県下のサツマイモ育苗圃で採取したウイルス感染株の RT-PCR による検定

M: 分子量マーカー, λ /HindIII

- 1: 千葉県下総町① 2: 千葉県下総町②
 3: 千葉県下総町③ 2: 千葉県栗原町①
 5: 千葉県成田市① 6: 千葉県成田市②
 7: 千葉県成田市③ 8: 健全サツマイモ
 ①～③は感染株の個体番号

た。これはサツマイモ感染葉からのウイルス RNA の調製過程における試料の洗浄操作等が RNA の回収率に影響しているためと推察された。今後, RNA 抽出, 洗浄等の条件をさらに検討することでより高感度のウイルス検出が可能になるとと思われる。

3 RT-PCR 法による圃場サツマイモからのウイルス検出

千葉県下の 3 か所の育苗圃 (下総町, 栗原町, 成田市: 品種はいずれもベニアズマ) で栽培したサツマイモ苗の葉に斑紋や小輪紋, 葉脈透化および葉脈に沿った退緑症状が認められたため, 図-1 に示した方法で RNA 抽出を行い, RT-PCR に供試した。感染苗は 1 か所から 3 株ずつ選び, 各株について葉からの RNA 抽出及び RT-PCR 操作を 2 回行った。その結果, 栗原町の 2 株を除いた他の感染株すべてから約 540 bp の特異的断片が増幅され, それらは SPFMV に感染していると判断された (図-5)。増幅断片が検出されたサツマイモ苗の葉は葉脈透化や葉脈に沿った退緑あるいは斑紋が顕著で, これらは典型的な SPFMV の病徴であった。これに対し, 栗原町の 2 株の試料では RT-PCR 法による検出を 2 回試みたが, いずれも特異的な断片は検出されなかった。これら 2 株のサツマイモの葉の病徴は軽く, 小輪紋や弱い葉脈の退緑が認められただけであった。したがって, これら 2 株は SPFMV 以外のウイルスかあるいは SPFMV ではあっても, O や S とは異なる系統に感染していると考えられた。

IV 他の検出法との比較

サツマイモ感染葉からの SPFMV の検出法として、血清学的手法である免疫電頭法、DIBA 法 (dot-immunobinding assay) 及びウエスタンブロット法の利用を検討した。これらの方法はいずれもサツマイモ感染葉からのウイルス検出には有効であったが、ウイルス濃度が低いために汁液の希釈は数倍から数十倍の範囲が適当であった。GIBB and PADOVAN (1993) は DIBA 法と類似の検出法である MIBA 法 (membrane immunobinding assay) について検討しているが、MIBA 法の場合も 50 倍希釈した汁液からの検出が限界であった。このように血清学的手法を用いた場合、感染葉汁液からのウイルス検出感度は比較的低いものと推定された。

サツマイモに発生するウイルスの高感度検出法として ABAD and MOYER (1992) は RNA プローブを用いた検出法 (RNA プローブ法と略記する) について報告している。この方法による SPFMV の精製 RNA の検出限界は 0.128 pg (10^{-9} mg) であった。そして、感染サツマイモ葉では 2,500 倍希釈した汁液からウイルス RNA を検出している。ABAD and MOYER の実験条件と筆者らの RT-PCR 法のそれとは異なるが、精製 RNA の検出感度は RT-PCR 法のほうが高いと考えられた。一方、感染葉からの検出に関しては、RT-PCR 法は 1,000 倍希釈した汁液からの検出が限界であり、RT-PCR 法がより高感度であるとはいえなかった。精製したウイルス RNA の検出感度の高さに比べて感染葉汁液での感度は予想外に低かったが、これは先に指摘したとおり、サツマイモ感染葉からのウイルス RNA の調製法等に起因するものと思われる。なお、実際のウイルス検定に当たり、我々が実施したウイルス RNA の調製とそれに続く RT-PCR による検出法は、RNA プローブ法に比べればより簡便であるという利点がある。以上、RT-PCR 法を従来法及び RNA プローブ法と比較したが、RT-PCR 法は高い検出感度、操作の簡便性の両面を備えた優れた方法であると判断された。

おわりに

サツマイモの汁液は粘りゅうで褐変しやすく、サツマイモの汁液から RT-PCR のための RNA を通常のフェノール法で調製することは困難であった。そこで、我々は RNA が特異的に吸着される CF 11 セルロースを用い、サツマイモ葉からでも RT-PCR に供試することができる全 RNA の簡易な抽出法を検討した。この方法は極めて簡便であるが、SPFMV-O 及び SPFMV-S 感染

サツマイモ葉の抽出試料から、いずれも約 540 bp の明瞭な増幅 DNA 断片を得ることができた。また、千葉県下の圃場のウイルス感染株からも SPFMV を検出することができた。

RT-PCR 法による SPFMV の高感度検出が可能となり、今後は様々な利用場面が考え出されていくと思われる。現時点では、ウイルスフリー化のための茎頂培養苗の高感度ウイルス検定への利用が考えられる。本研究で用いたプライマーにより SPFMV-O 及び S 両系統を一度に検出することができる。また、SPFMV-O 及び S の系統特異的検出が必要なときは、プライマーの配列を工夫することで対応できる (長田ら, 1995)。

わが国のサツマイモには SPFMV 以外のひも状ウイルスとして SPLV 及び SPSV の 2 種のウイルスの発生が確認されており、SPLV はポティウイルスグループに属することが明らかになっている。ポティウイルスに共通的な塩基配列に基づくプライマー (COLINET et al., 1994) を用いることで、SPLV のウイルス RNA から特異的な DNA 断片が増幅されており (未発表データ)、これにより現在までに SPFMV 及び SPLV の 2 種ウイルスの RT-PCR による検出が可能になっている。一方、SPSV はウイルスの分類学的な所属が明らかになっていないため、生物検定や抗血清による検出にとどまっている。しかし、SPSV についてもウイルスゲノムの cDNA のクローニングの検討を当研究室で開始しており、SPSV の RT-PCR による検出もいずれ可能になると思われる。そして、将来的にはわが国のサツマイモに発生するすべてのひも状ウイルスの遺伝子診断が実現するものと期待される。

引用文献

- 1) ABAD, J. A. and J. W. MOYER (1992): *Phytopathol.* 82: 300~305.
- 2) COLINET, D. et al. (1994): *ibid.* 84: 65~69.
- 3) GIBB, K. S. and A. C. PADOVAN (1993): *International Journal of Pest Management* 39: 223~228.
- 4) GREEN, S. K. et al. (1988): *Tropical Pest Management* 34: 298~302.
- 5) 楠 幹生ら (1993): *関西病虫研報* 35: 7~12.
- 6) MORI, M. et al. (1994): *Biotech. Biosci. Biochem.* 58: 965~967.
- 7) ——— (1995): *Arch. Virol.* 140: 1473~1482.
- 8) 長田龍太郎ら (1995): *九州農業研究* 57: 97.
- 9) NISHIGUCHI, M. et al. (1995): *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 119~122.
- 10) 大貫正俊ら (1995): *九州農業研究* 57: 96.
- 11) 佐野輝男 (1990): *植物防疫* 44: 557~561.
- 12) 宇杉富雄ら (1990): *日植病報* 56: 423.
- 13) USUGI, T. et al. (1991): *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 57: 512~521.
- 14) ——— (1994): *ibid.* 60: 545~554.