

植物ウイルス感染組織からの簡易核酸抽出法

宇都宮大学農学部 ^{いしかわ すえひろ}石川 (末廣) ^{のりこ いしつか}典子・石塚 ^{みほ いのうえ}美帆・井上 ^{としろう なつあき}登志郎・夏秋 ^{ともひで}知英

はじめに

植物ウイルスによる病害を正確に診断するには様々な方法があり、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察や検定植物を用いる生物検定などのほかに、検出対象とするウイルスに対する特異的な抗体を用いた酵素結合抗体法 (ELISA) や DIBA 法、より簡便な RIPA 法などの血清学的手法が広く用いられている。電子顕微鏡による検出や生物検定では、時間や手間がかかる。ELISA 法をはじめとする血清学的手法では同時に多くのサンプルを安価に診断できる一方で、特異的な抗体が利用できない場合はウイルスは検出できないという問題もある。

もちろん最近では PCR 法や RT-PCR 法を用いた遺伝子診断技術も広く普及しており、これらが植物ウイルスの DNA あるいは RNA ゲノムを検出するうえで最も強力で高感度な技法であることに論を待たない。さらに抗体を利用するイムノキャプチャー (免疫吸着) を応用すれば、より感度を高めることができる。この PCR 法を利用するうえで重要な点は、①標的とするウイルス核酸の塩基配列に対して特異的なプライマーを用意すること、②サンプルの核酸を抽出すること、の2点であろう。現在では DNA データベースに多種の植物ウイルスの塩基配列が登録されているので、プライマーの設計も比較的容易になり、抗体の利用できないウイルスやウイロイドの検出にも広範囲に適用できる。

しかし、多数のサンプルを扱う場合には核酸抽出がネックとなり、キットを用いたとしてもかなりの労力、時間、費用を必要とする。また核酸抽出キットを用いない場合には、フェノールやクロロホルムといった有機溶媒を使用する場合があります、安全や廃液の問題が生じる。また特に RNA ウイルスを検出したい場合、RNA が DNA よりも不安定であるため、安定的に RNA を感染植物体から抽出する方法の確立が重要である。

これまでも PCR 法と RT-PCR 法に多くの応用や工夫がなされてきているが、高感度の検出レベルを保ちつつ多量のサンプルを診断するためには、簡便で安価な核

酸抽出方法が必要である。本稿では、特に植物 RNA ウイルスを検出するための簡易核酸抽出法について、筆者らが利用している Simple-Direct-Tube (SDT) 法、および Whatman 社製の FTA[®]カードを用いた植物ウイルス感染組織からの簡易核酸抽出法を紹介したい。

I Simple-Direct-Tube (SDT) 法

Simple-Direct-Tube (SDT) 法は、ポリプロピレンのチューブの内壁にウイルス粒子が非特異的に吸着することを利用し、吸着したウイルス粒子からウイルス RNA を抽出する方法である (図-1)。ウイルス粒子の非特異的吸着は、間接 ELISA 法や電子顕微鏡の DN 法と同じと考えるとわかりやすい。

これまでに、フェノール-クロロホルム抽出や抗体を用いずに木本植物のウイルスを検出する方法として、direct-binding (DB)-RT-PCR (ROWHANI et al., 1995) や tube capture (TC)-RT-PCR (JAMES, 1999) が報告されているが、これらの方法を単純化し、RNA 抽出にかかる時間を短縮するよう改良を加えたものが SDT 法である (SUEHIRO et al., 2005)。SDT 法ではわずか 15 分以内で RNA 抽出が可能であり、インキュベーションしている間は逆転写反応のための試薬の調製にも使えることから、多検体の処理も可能となってくる。以下に実際の手順を示した。

【SDT 法の手順】

- ①試料 (0.1 g) を 100 ~ 500 μ l の PBST で磨砕する。
- ②粗汁液を PCR チューブに 50 μ l 分注し、水上あるいは室温で 5 ~ 10 分程度静置する。
- ③粗汁液をピペットで吸い出し、PBST を 50 μ l 加えてピペッティングで軽くすすぐ。2 回程度繰り返す。完全に溶液を捨てる。
- ④ DEPC (ピロ炭酸ジエチル) Water を 30 μ l 入れて、

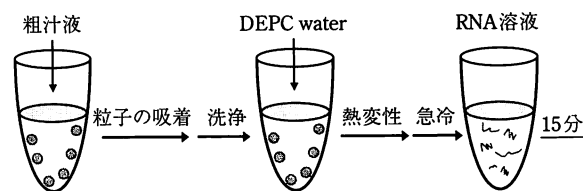


図-1 Simple-Direct-Tube (SDT) 法の原理

Simplified Methods for Obtaining Plant Viral Nucleic Acid. By Noriko ISHIKAWA-SUEHIRO, Miho ISHITSUKA, Toshiro INOUE and Tomohide NATSUAKI

(キーワード: ウイルス, 核酸, 検出, FTA[®]カード, RT-PCR)

95℃, 1分ほど加熱する。

⑤直ちに氷上で1, 2分静置して急冷する。

⑥逆転写反応の核酸溶液とする。

ここにいくつかの注意事項を記す。まず, ①で試料を磨砕する緩衝液のPBSTは, ELISA法のものをオートクレーブして用いる。これはELISA法との併用を考慮してのことである。すなわちPBSTを用いると, 同一の磨砕液をELISA法とRT-PCR法の両方に用いることができ, 極めて有用である。要は, 磨砕する緩衝液として炭酸ナトリウム緩衝液でもクエン酸緩衝液でも, RT-PCRで検出しようとするウイルスが安定ならば, どんな緩衝液でも利用可能である。次に, ②では, トスポウウイルスのような不安定なものを除き, 室温処理で十分である。④で用いるDEPC Waterは, ピロ炭酸ジエチル(DEPC)を0.1%になるように蒸留水に加え, 室温で1時間放置してからオートクレーブして調整する。④で加熱処理しているが, これはタバコモザイクウイルスをはじめとするトバモウイルスでは必須である。しかし他のウイルスでは, DEPC Waterによりすぐにウイルス粒子の崩壊が起きるようで, 熱処理は必須ではない。このことから, トバモウイルスの粒子がかなり安定であることがわかる。

これまでに本研究室でSDT法を利用した実験では, トバモウイルス, ポティウイルスをはじめとした各種ひも状ウイルス, キュウリモザイクウイルスをはじめとするククモウイルスなどで利用可能である(SUEHIRO et al., 2005)。さらに最近流行しているトスポウウイルスでも利用できる。また, ジェミニウイルス感染葉からDNA検出でも利用可能であった。

しかし, イチゴのRNAウイルスでは検出できなかった。おそらく, イチゴには多糖類やポリフェノールが多く含まれることによると思われる。なお, より詳細な実験条件の検討は原著(SUEHIRO et al., 2005)を参照されたい。

II FTA[®]カードを用いた植物ウイルスRNAの検出

Whatman社製のFTA[®]カードは元来, 微生物や血液, 植物等から核酸の採取や輸送, 保存および精製を簡単に行えるように設計されたもので, 最近はその技術を応用して, 植物組織から細菌やファイトプラズマのDNAをFTA[®]カードで検出した例をはじめとして, 各種ウイルス病の検出も報告されはじめている(大貫ら, 2004; ROY and NASSUTH, 2005; MULLIS et al., 2006; OSMAN and ROWHANI, 2006; NISCHWITZ et al., 2007; OWOR et al., 2007)。また, 検出した病原体のFTA[®]カード上での保

存期間についても調べられており, 病原体のDNAは4℃で4か月保存(大貫ら, 2004), 室温で9か月保存(OWOR et al., 2007)が可能であった。一方RNAウイルスにおいては, 動物ウイルスのNewcastle disease virus (NDV)が15日保存可能(PEROZO et al., 2006)であったことや, Pepino mosaic virus (PepMV)とRupestris stem pitting associated virus (RSPaV)では, RT-PCRで700塩基程度の断片であれば6か月後でも検出可能で, さらに短い300塩基程度の断片ならば8か月後でも検出可能であった(ROY and NASSUTH, 2005)。

そこで本稿では, 感染葉からRNAウイルスおよびウイルスをFTA[®]カードで検出する方法を紹介する。なお, 抽出方法はNDUNGURU et al. (2005)をもとにした下記の手順である。

【FTA[®]カードによるウイルスRNAの抽出手順】

①検査する植物の組織あるいは媒介昆虫をFTA[®]カードに強くプレスする(図-2)。

②1時間以上風乾したのち, シリカゲルを入れたチャック付きポリ袋に入れ, 室温で保存する。

③直径4mmのコルクボーラーで1箇所を切り抜き, 1.5mlのサンプルチューブに入れる。

④抽出用緩衝液を100 μ l加え, 氷上で30分間静置する。途中で2~3回チューブをかくはんする。なお, 抽出用緩衝液の組成は, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA, 400 U/ml RNase Inhibitor, 200 μ g/ml グリコーゲン, 2mM DTTである。

⑤処理後の抽出用緩衝液を別の1.5mlサンプルチューブに移し, 1/10量(10 μ l)3M酢酸ナトリウム(pH 5.2), 等量(110 μ l)の2-プロパノール(氷冷)を加え, よくかくはんし, -80℃で30分静置する。

⑥15,000 rpmで10分間遠心して溶液を捨て, 500 μ lの70%エタノール(氷冷)を加えて15,000 rpmで2分間遠心する。

⑦沈殿を乾燥させ, 30 μ lのDEPC Waterに溶き, 逆



図-2 植物(左)あるいは媒介昆虫(右, ネギアザミウマ成虫)をFTA[®]カードに強くプレスする

転写反応の核酸溶液とする。

以下に、この FTA[®]カードで RNA を検出する際に本研究室で検討してきたいくつかの事項を記す。まず、①で植物組織をプレスする場合、FTA[®]カードの裏面に植物の汁液が染み出る位まで押しつけることが重要なポイントである。また、サンプルの固定は、ウイルスに感染した植物組織を直接 FTA[®]カードにプレスする方法以外に、ウイルスに感染した植物組織を 5 倍量の PBS で磨砕して FTA[®]カードに滴下する方法も試みたが、汁液の滴下よりも植物組織を直接プレスしたほうが安定してウイルス RNA を検出できた。

本研究室ではこれまでに、いくつかの RNA ウイルスおよびウイロイドについて FTA[®]カードによる検出を検討した。まず、トンプスウイルス属のトマトブッシュスタントウイルス (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV)、クモウイルス属のキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、トスポウイルス属のアイリスイエロースポットウイルス (*Iris yellow spot virus*, IYSV)、ポテックスウイルス属のシンビジウムモザイクウイルス (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) の検出では、FTA[®]カードへ感染葉をプレスして 30 日後でもウイルス RNA の検出が可能であった (図-3, 4)。ウイルス粒子の安定している TBSV だけでなく、粒子の不安定な IYSV でも固定 30 日後で検出可能であることから、通常の RNA ウイルスでもプレス後 1 か月間は十分に検出可能であると考えられた。なお、コチョウランからの CymMV の検出が最も感度が悪く、プレス 30 日後でかろうじて検出できる程度であった。

ところで、本法もイチゴからのウイルス検出に適していなかった。すなわち、イチゴに感染したポテックスウイルス属のイチゴマイルドイエローエッジウイルス (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV) およびサドワウイルス属のストロベリーモットルウイルス (*Strawberry mottle virus*, SMoV) はいずれもプレスの翌日は検出可能であったが 5 日後には早くも検出できなくなり、FTA[®]カードによる保存には適していないと考えられた。この原因として、同じポテックスウイルス CymMV では検出できていることから、宿主であるイチゴに存在するポリフェノール、多糖類によって反応が阻害されること (THOMPSON et al., 2003; CHANG et al., 2007)、植物内に存在するウイルスの量が少ないこと、あるいは、イチゴの葉を FTA[®]カードにプレスしてもカードに汁液が浸透しにくいことなどが考えられた。このことから FTA[®]カードに適しない植物種があるので、汁液の粘性が高い植物の場合には予備試験が必要と思われる。

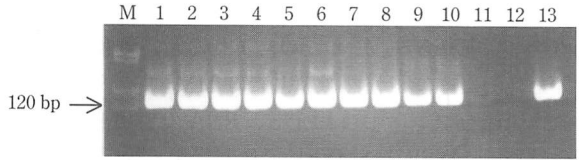


図-3 FTA[®]カードを用いた TBSV の検出

M: DNA マーカー, 1: 感染葉プレス 1 日後, 2: PBS 汁液スポット 1 日後, 3: 感染葉プレス 5 日後, 4: PBS 汁液スポット 5 日後, 5: 感染葉プレス 10 日後, 6: PBS 汁液スポット 10 日後, 7: 感染葉プレス 20 日後, 8: PBS 汁液スポット 20 日後, 9: 感染葉プレス 30 日後, 10: PBS 汁液スポット 30 日後, 11: 健全葉プレス, 12: 健全葉 PBS 汁液スポット, 13: TBSV コントロール。

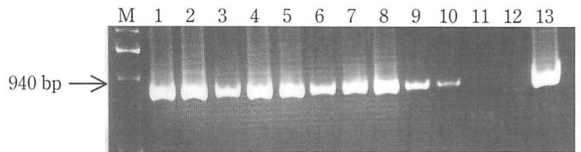


図-4 FTA[®]カードを用いた IYSV の検出

M: DNA マーカー, 1: 感染葉プレス 1 日後, 2: PBS 汁液スポット 1 日後, 3: 感染葉プレス 5 日後, 4: PBS 汁液スポット 5 日後, 5: 感染葉プレス 10 日後, 6: PBS 汁液スポット 10 日後, 7: 感染葉プレス 20 日後, 8: PBS 汁液スポット 20 日後, 9: 感染葉プレス 30 日後, 10: PBS 汁液スポット 30 日後, 11: 健全葉プレス, 12: 健全葉 PBS 汁液スポット, 13: IYSV コントロール。

イチゴを除いては、植物組織を固定した FTA[®]カードからウイルス RNA を安定して検出することができたことから、IYSV を媒介するネギアザミウマを FTA[®]カードに固定し、植物組織からの検出と同様の方法で調査した。その結果、媒介試験で陽性を示したネギアザミウマの 2 齢幼虫および成虫では 1 頭からでも IYSV-RNA を検出することが可能であった。アザミウマからの植物ウイルス RNA の検出にはトリゾールを用いた方法の報告があるが (MASON et al., 2003)、FTA[®]カードに固定することで、植物・媒介虫の区別を問わず同じ方法で RNA 抽出が容易にできることが判明した。

さらに、キクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) でも同様に直接プレスした FTA[®]カードからウイロイド RNA の検出を試みたところ、固定後 1 週間は容易に検出可能で、その後ほぼ 3 週間は検出できた。

感染葉を直接プレスした FTA[®]カードから比較的長期に、また安定して RNA ウイルスを検出できたが、

FTA[®]カードは特殊な化学処理がなされたろ紙であるためやや高価である。このため、より安価に同様の実験結果を得るために、乾熱滅菌した3MMペーパーに直接植物組織をプレスして固定し、RNAの検出を試みた。その結果、IYSVとSMYEVでは固定1日後での検出すら不可能だったものの、2種のトンプスウイルスやCymMV、CMVの計4種では固定5日後でも検出することができ、短期間ならば滅菌したろ紙でもFTA[®]カードの代わりができることが判明した。

おわりに

迅速・簡易・安価・安全な核酸抽出法は、PCR法を中心とした遺伝子診断法をより広く圃場レベルでの研究に用いるために、極めて重要なポイントである。このような視点から見ると、前章までに述べたSDT法とFTA[®]カードによるRNA抽出の方法は、極めて簡易なため、本稿にあるように実験手順は極めて短い記述である。

両法の利点と欠点をまとめると、利点として、カードへの固定やRNA抽出などの一連の作業は大変簡単で迅速である。さらに今回用いたFTA[®]カードは大きさも約8cm×13cmと小さなもので、室温で比較的長期に保存が可能なことから、野外調査などに携行して感染植物をカードにプレスすれば運搬に非常に便利である。一方、カードに固定しにくい植物種や検出が困難な植物種があることや、ろ紙としては高価であること、などの欠点がある。IYSVを媒介するネギアザミウマを固定した

FTA[®]カードからIYSVを検出できたこと、プレスしたカードを1か月以上は室温保存できたことなどから、圃場レベルにおけるウイルス感染植物の診断にとっても有効な手段となると思われた。また、乾熱処理した3MMペーパーも短期間ならば代用できることが明らかとなった。また最近はつまようじで感染葉をつつく方法も報告されており(竹内, 2006)、今後もこのような迅速・簡易・安価・安全な核酸抽出法の改良が続くであろう。

最後に、本研究の一部は農林水産研究高度化事業「ウイルス病に打ち勝つトルコギキョウ健全栽培システムの構築」の一環として行った。また、栃木県農業試験場の病理昆虫研究室にはキクわい化ウイロイド感染株を分譲いただいた。ここに感謝の意を表する。

引用文献

- 1) CHANG, L. et al. (2007): J. Phytopathology 155: 431 ~ 436.
- 2) JAMES, D. (1999): J. Virol. Methods 83: 1 ~ 19.
- 3) MASON, G. et al. (2003): ibid. 109: 69 ~ 73.
- 4) MULLIS, S. W. et al. (2006): Plant Dis. 90: 377.
- 5) NDUNGURU, J. et al. (2005): Virol. J. 2: 45.
- 6) NISCHWITZ, C. et al. (2007): J. Phytopathol. 155: 531 ~ 535.
- 7) 大貫正俊ら (2004): 九州農業研究 66: 90.
- 8) OSMAN, F. and A. ROWHANI (2006): J. Virol. Methods 133: 130 ~ 136.
- 9) OWOR, B. E. et al. (2007): ibid. 140: 100 ~ 105.
- 10) PEROZO, F. et al. (2006): Avian Pathol. 35: 93 ~ 98.
- 11) ROWHANI, A. et al. (1995): Phytopathology 85: 347 ~ 352.
- 12) ROY, Y. and A. NASSUTH (2005): Pl. Mol. Biol. Rep. 23: 383 ~ 395.
- 13) SUEHIRO, N. et al. (2005): J. Virol. Methods 125: 67 ~ 73.
- 14) 竹内良彦ら (2006): 愛知農総誌研報 38: 57 ~ 63.
- 15) THOMPSON, J. R. et al. (2003): J. Virol. Methods 111: 85 ~ 93.

登録が失効した農薬 (20.5.1 ~ 5.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

「殺虫剤」

●ダイアジノン粉剤

12344：一農ダイアジノン粉剤3（第一農薬）08/05/04

●ジクロメジン・フサライド水和剤

18378：ラブサイドモンガードDF（三共アグロ）08/05/27

「殺菌剤」

●トルクロホスメチル水和剤

15762：キンググランサー水和剤（キング化学）08/05/09