

マルチプレックス PCR による複数種の植物ウイルス種の同時検出法

九州沖縄農業研究センター ^{おく} 奥 ^だ 田 ^{みつる} 充

はじめに

現在、植物ウイルスを検出する手法として、血清学的手法と分子生物学的手法が広く使われている。ELISAを中心とした血清学的手法は低コストであるが、それぞれのウイルスに特異的な抗血清が必要であり、ウイルス種によっては抗血清の入手が困難あるいは不可能な場合がある。これに対し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、loop mediated isothermal amplification (LAMP) および isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids (ICAN) などの分子生物学的手法は、塩基配列情報から標的配列に特異的なプライマーを合成することでいかなるウイルス種にも対応することが可能である。

PCRは増幅対象とする DNA 配列の両末端に相同な塩基配列をもつ1組の20塩基程度のオリゴヌクレオチド (プライマー) と DNA 合成酵素を用いて、プライマー対に挟まれた領域を数百万倍以上に増幅する手法であり、特異性と感度の高さから植物ウイルスの検出と同定に広く利用されている。

古くからプライマー対を混合することで複数の標的ウイルスを一つの反応チューブ内で増幅するマルチプレックス PCR が考案されており、これにより複数ウイルス種の同時検出が可能である。マルチプレックス PCR は、複数ウイルスを同時検出する場合だけでなく、病徴から区別することが難しいウイルスの種や系統を判別する場合において、本来別々のチューブで行う PCR を一つのチューブで行う場合にも利用される。マルチプレックス PCR により、検定にかかるコストと時間を大幅に削減することが期待される。本稿では、マルチプレックス PCR によるウイルス検出の実施例、技術上の問題点と応用技術、並びにプライマー設計について解説したい。

なお、多くの植物ウイルスは RNA を遺伝情報としてもつため、RNA から cDNA を合成する反応 (逆転写反応) を PCR に先だてて行う RT-PCR により検出する。

近年は、逆転写反応と PCR を同じ反応液で行う One step RT-PCR が普及している。以下、RNA ウイルスについては DNA を RNA、PCR を RT-PCR と読み替えていただきたい。

I マルチプレックス PCR の特徴

PCRの原理は様々な記事で取り上げられているため、本稿では割愛する。PCRにより増幅されたDNAはアガロースゲルによる電気泳動を行うことで、おおよその分子量を推定することができる。PCRを用いた植物ウイルスの感染診断では、想定される分子量のDNA増幅が確認されれば、ウイルスに感染している(陽性)と判断する。DNAの増幅が見られても、想定分子量と大幅に異なる場合は、非特異的増幅であり、感染していない(陰性)と判断する。

マルチプレックス PCRでは、反応液に2組以上のプライマー対を加え、反応を行う。鑄型として用いるDNAの調整や試薬および反応条件は基本的に通常のPCRと変わらない。それぞれのプライマー対に対応する領域が増幅されるため、プライマー対の数に対応した増幅DNA断片が得られる。一般に、プライマー対ごとに増幅する領域の長さを変えることで、どのウイルス由来の配列が増幅されたかを区別する。

II マルチプレックス PCR の実施例

DNA ウイルスを対象としたマルチプレックス PCR として、トマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) の2系統を判別する手法が開発されている (LEFEUVRE et al., 2007)。RNA ウイルスでは、ZYMV、PRSV および WMV の3種 potyvirus を検出する手法 (下元・竹内, 2006) や、5種のトスポウイルスを検出する手法 (UGA and TSUDA, 2005) などが開発されている。また、6種のカンキツウイロイドを検出する手法も開発されている (Iro et al., 2002)。

筆者らは、キュウリとメロンに感染する8種ウイルスを対象としたマルチプレックスプライマー (表-1) を開発した (奥田ら, 2007)。これにより、一つの反応で8種のウイルスに対応でき、増幅DNAのサイズからウイルス種を推定できる (図-1)。ただし、実験的に混合した2種が検出できることは確認したが、8種ウイルス

Application and Further Perspective on Simultaneous Detection of Plant Viruses using Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR).
By Mitsuru OKUDA

(キーワード: multiplex PCR, 植物ウイルス, 同時検出法)

表-1 8種ウイルスを検出するマルチプレックスプライマー

ウイルス名	プライマー	長さ	増幅サイズ	Tm	Sequence (5' to 3')
スイカモザイクウイルス (WMV)	mu-WM4F	18	283	58.0	AGGGAATCTGGAATGGTT
	mu-WM4R	21		58.3	GGAGTTAAAGAAGCTGTCGAAC
ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV)	mu-ZY4F	22	410	59.4	GGATAAAATTGATGAGAGCATT
	mu-ZY4R	19		58.2	TGTCAAGTAAGCCGCTATC
キュウリモザイクウイルス (CMV)	mu-CM4F	19	539	57.6	GCGGATGCTAACCTTAGAG
	mu-CM4R	19		59.8	TGCTCGATGTCAACATGAA
キュウリ緑斑モザイクウイルス (KGMMV)	mu-KG4F	20	674	57.4	TTTGATTCCCTGTTGATTTGT
	mu-KG4R	18		59.5	AGGAAGCGAACAATACC
パパイア輪紋ウイルス (PRSV)	mu-PR4F	22	768	59.2	GAATGTCCTGAAGTGAATACA
	mu-PR4R	18		59.6	TGGTGAATGGCAATACA
メロン黄化壞疽ウイルス (MYSV)	mu-MY4F	21	888	59.9	CATTCTGTTGTTTATGGAAC
	mu-MY4R	23		58.6	TCCTAAGTAAACACCATGTCTAC
スイカ緑斑モザイクウイルス (CGMMV)	mu-CG4F	19	1,013	57.1	CGATAAGTTGCTCCCTAAC
	mu-CG4R	21		58.7	CGTAGGATTGCTAGGATCTAC
ビートシュードイエローウイルス (BPYV)	mu-Cu4F	22	1,144	58.0	AATAACGATTCCTATCTCGTC
	mu-Cu4R	18		59.5	CCGGAGGCTGATATCACT

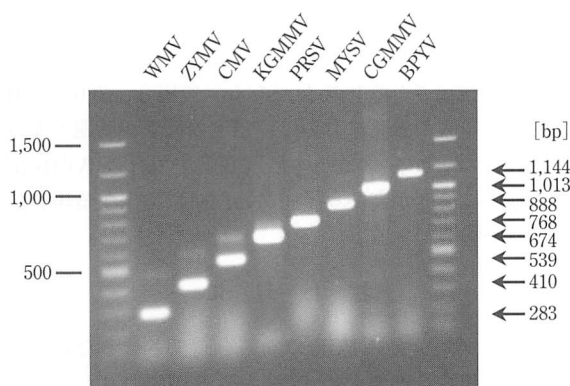


図-1 マルチプレックス PCR によるキュウリとメロンに感染する 8 種ウイルスの検出

を同時に検出できることは確認していない。また、2種のウイルスを混合した反応において、一方のみが検出される場合があった。検出されたウイルスの RNA を希釈して反応すると両方を検出することができたことから(図-2)、相対濃度の低いウイルスの増幅が抑えられ、検出できなかったと考えている。

III マルチプレックス PCR の設計と問題点

マルチプレックス PCR のためのプライマーを設計する場合、非特異的結合による DNA 増幅を防ぐことが重要となるため、Tm 値は 55 ~ 60℃ となるように設計したほうがよい。AutoDimer¹ というソフトウェアを用い

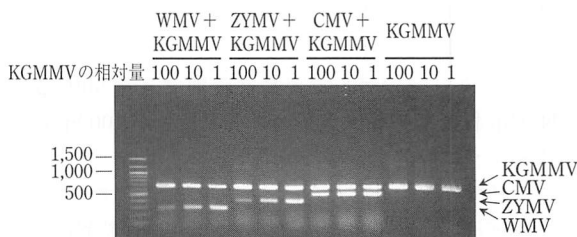


図-2 2種ウイルスの同時検出におけるウイルス量の違いが増幅効率に与える影響

KGMMV の相対量が多くなると WMV と ZYMV の増幅効率 (バンドの濃さ) が下がっている。

表-2 マルチプレックス PCR の条件設定

ステップ	温度・時間 ^{a)}	サイクル数
1	94℃・2分	1
2	94℃・30秒 x℃・30秒 72℃・y分	35 ~ 40
3	72℃・10分	1

^{a)} x: プライマーの中で最も低い Tm 値 + 0 ~ 5℃, y: 最も長い増幅領域 (bp)/1,000.

ると、プライマー同士の非特異結合 (プライマーダイマー) の危険性を確認することができる。なお、反応を安定させるため、各プライマーの Tm 値はできるだけ一定にしたほうがよい。

マルチプレックス PCR では、2 本以上の DNA フラグメントが増幅されるが、増幅 DNA の分子量が近すぎる

¹ <http://yellow.nist.gov:8444/dnaAnalysis/downloads.do>

表-3 MuPlex パラメータの説明

名称	働き	推奨設定値
Length	プライマーの長さを指定する	通常は初期値のままでよい
%GC	全体に対する G と C の比率を指定する	通常は初期値のままでよい
Tm	Tm 値を指定する	通常は初期値のままでよい
Product	増幅 DNA のサイズを指定する	同時検出する数により加減する必要がある。初めは, Min を 500 (bp), Max を 1,500 (bp) とするとよい。
Product Diff	増幅 DNA の差を指定する	同時検出する数により加減する必要がある。各増幅 DNA の差 [(Product Max) - (Product Min)/検出個数] に 10 ~ 20% 程度の幅をもたせるとよい。
その他	プライマーの安定性を決める	通常は初期値のままでよい

と電気泳動による識別が困難になる一方、離れすぎた場合も増幅効率に違いが生じる。コストと増幅効率を考慮するとアガロースゲルで容易に識別できる 500 bp ~ 1,500 bp 程度で、各フラグメントの長さが 100 bp 以上異なるように設計することが望ましい。

プライマーを設計したら、すべてのプライマーを混合した反応液を用いて、それぞれのウイルスが特異的に検出されることを確認する。同時に、健全 DNA を鋳型として反応させ、非特異増幅が起こらないことを確認する。PCR の条件は使用する試薬により多少異なるが、表-2 に示した条件から始めて、非特異反応が出た場合は条件を変更する。すべてのウイルスの特異的増幅が確認できたら、2 種以上のウイルス DNA を混合し、マルチプレックス PCR を行う。混合感染したサンプルを用いるのが理想だが、実験的には単独感染した植物サンプルから抽出した DNA を混合してもよい。

マルチプレックス PCR に適したプライマーの設計は難しいため、塩基配列をもとにマルチプレックス PCR に適した配列を探索する Web ベースのソフトウェアである MuPlex² が利用できる (RACHLIN et al., 2005)。プライマーを設計するためのパラメータについて表-3 を参考にさせていただきたい (より詳しくはサイト内の Help を参照)。

マルチプレックス PCR では、酵素と基質の競合が生じるため、単独領域の PCR と比較して増幅効率 (感度) が下がることがある。特に、鋳型中の相対量が最終的な

増幅量に影響することが知られており、濃度の高いウイルスと低いウイルスが混合感染した場合、濃度の低いウイルスが検出されない場合がある (奥田ら, 2007)。通常、ウイルスの診断において、感度の低下が問題となることは少ないが、ウイルス濃度が低いウイルスの検出や、極端に濃度が高いウイルスと同時に検出する場合には注意が必要である。

おわりに

マルチプレックス PCR の効率を向上させるためにバッファー組成を改良した PCR キットが販売されている (Multiplex PCR Assay Kit, タカラバイオ株式会社)。マルチプレックス PCR を応用した技術として、マイクロアレイによるジャガイモに感染する 12 種ウイルスの同時検出法が開発されている (眞岡, 2007)。

毎年、新種のウイルスが報告されており、発生病害の診断は困難になりつつある。高価な機械を必要とすることから PCR は特殊な技術と考えられてきたが、キットの改良や試薬・機械の低価格化により身近な技術となりつつある。マルチプレックス PCR を利用することにより導入に弾みがつくものと考えられる。

引用文献

- 1) Ito, T. et al. (2002): *Phytopathology* 92: 542 ~ 547.
- 2) LEFEUVRE, P. et al. (2007): *J. Virol. Methods* 144: 165 ~ 168.
- 3) 眞岡哲夫 (2007): *農業技術* 62: 297 ~ 302.
- 4) 奥田 充ら (2007): *九州病虫研報* 53: 9 ~ 13.
- 5) RACHLIN, J. et al. (2005): *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server Issue): W544 ~ 547.
- 6) 下元祥史・竹内繁治 (2006): *日植病報* 72: 146 ~ 149.
- 7) UGA, H. and S. TSUDA (2005): *Phytopathology* 95: 166 ~ 171.

² <http://genomics14.bu.edu:8080/MuPlex/MuPlex.html>