

レタスビッグベイン病の媒介菌オルピディウム菌の 休眠胞子を認識するポリクローナル抗体の作製

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター ^の ^み ^{やま} ^{こう} ^し
野見山 孝 司

はじめに

レタスビッグベイン病は土壤伝染性のウイルス病害であり、罹病株は葉脈周辺の緑色部が白く退色して葉脈が太くなったように見えるため（口絵①），商品価値が減少する。日本では1970年代初頭に和歌山県で初めて本病の発生が確認され，90年代以降は冬春レタスの主産地である瀬戸内地域において被害が拡大し，現在にいたるまで防除困難な重要病害となっている（岩本・相野，2010）。

病原ウイルスは土壤に生息するツボカビの一種 *Olpidium virulentus*（以下，オルピディウム菌）によってのみ媒介される。オルピディウム菌には休眠胞子（口絵②a），遊走子のう（口絵②b），遊走子（口絵②c）の三つの形態がある。ビッグベイン病の汚染土壤にレタスを植え付けると，土壤中の休眠胞子が発芽して放出された遊走子が最初の伝染源として根に感染する。感染した遊走子は根内で遊走子のうや休眠胞子へと成長し，これらからさらに大量の遊走子が放出され，レタスの栽培期間中にどんどん増殖を繰り返し，土壤中のオルピディウム菌の密度が高まっていく。レタスビッグベイン病関連ウイルス（レタスビッグベインミラフィオリウイルス（MiLBVV）およびレタスビッグベイン随伴ウイルス（LBVaV））はオルピディウム菌の体内に存在しており，休眠胞子は病原ウイルスを保持したまま土壤中で10年以上生存できることから，圃場内でひとたび発生すると根絶することは難しい。

オルピディウム菌自体にはほとんど病原性はないものの多犯性であり，MiLBVVやLBVaVのほかにも，チューリップ微斑モザイクウイルス，チューリップ条斑ウイルス，タバコネクロシスウイルス等の複数種の病原ウイルスを媒介することができる（小金澤，2005）。このようにオルピディウム菌はウイルス媒介菌として古くから知られているにもかかわらず，絶対寄生菌で人工培養できないために防除を行ううえで研究の進展が遅いという

問題点がある。

ビッグベイン病の汚染土壤を滅菌土壤で段階的に希釈してレタスを栽培すると，発病株率が徐々に減少していくことから，汚染土壤中のオルピディウム菌の休眠胞子密度が発病程度と関係していると考えられる（野見山ら，2013）。しかしながら，土壤中の休眠胞子密度を計測する手法はまだ開発されていない。これまでにアブラナ科野菜に深刻な土壤病害を引き起こす根こぶ病菌（*Plasmodiophora brassicae*）において，休眠胞子に対する抗体を作製し，血清学的手法により土壤中の休眠胞子の検出，さらには休眠胞子密度の把握ができた事例が数例報告されている（有江ら，1988；折原，1996）。しかしながら，オルピディウム菌では休眠胞子に対する抗体が作製された報告はない。その原因の一つとして抗原となる休眠胞子を大量に回収できる精製方法が確立されていないことがあげられる。

今回，オルピディウム菌の休眠胞子の精製方法を開発し，精製休眠胞子を抗原としてポリクローナル抗体を作製することができたので，精製方法の概要や抗体の反応特性について紹介する。

I オルピディウム菌休眠胞子の精製方法

オルピディウム菌は培地を用いて人工的に培養することができない絶対寄生菌であるため，レタス根に感染させることにより抗原として用いる休眠胞子を増殖した。レタスを土壤で栽培すると，根に付着した微小な土壤粒子が精製の最終過程まで残り，休眠胞子と分離することができなかった。そこで，土壤の代わりに洗浄した海砂を用いて栽培することにより，根を水で洗い流すだけでほとんどの砂を落とすことができ，実験材料として用いることが可能となった（小金澤ら，2003）。

レタス根内に感染した休眠胞子を分離するために，生根40gに対して1%セルラーゼオノヅカRS（ヤクルト）および0.05%ペクトリアーゼY-23（協和化成）の混合酵素溶液（50mM酢酸緩衝液（pH4.5））400ml中で処理を行った。当初は根をハサミで細かく裁断して酵素反応させていたが，消化が不十分で反応終了後のろ過残渣に多くの休眠胞子が残っていることが確認されたので，すり鉢を用いて根を細かく磨碎して酵素処理に供するこ

Preparation of Polyclonal Antibody against *Olpidium virulentus*
Resing Spores. By Koji NOMIYAMA

（キーワード：レタスビッグベイン病，オルピディウム菌，休眠胞子，抗体）

とにした。磨砕したことで植物根が消化されやすくなり、従前より多くの休眠孢子が分離された。ガーゼおよびふるいでろ過して未消化物を除いた酵素処理液には休眠孢子以外にも植物組織が存在しており、遠心分離によって沈殿を回収すると大量の植物組織が混入して、以降の精製過程に支障をきたした。そこで、遠心分離を行う前に酵素処理液を酢酸緩衝液で10倍量(4 l)に希釈し、4時間静置して休眠孢子はビーカーの底部に沈降させ、植物組織は溶液中に浮遊させた後、真空ポンプを用いて上清を吸引除去する操作を2回行うことにより、酵素処理液中の休眠孢子的存在割合を高めることができた。

不純物を除去して休眠孢子的を精製するために、二段階の不連続密度勾配遠心分離を行った。最初の担体にはパーコール(GEヘルスケア)を用いた。酵素処理液を0.25 Mのショ糖を含む酢酸緩衝液に置換した後、20 mlの懸濁液を60% (v/v, 酢酸緩衝液で希釈) および100%パーコールの密度勾配溶液(各5 ml, それぞれ0.25 Mのショ糖を含む)に重層した。28,000 × gで30分間遠心した後、60%と100%パーコールの境界部分および100%パーコール層を回収した。この遠心分離により微小鉱物は除去できたが、回収画分には休眠孢子と一緒に植物組織がまだ混在している状態だった。続いて、細胞毒性のない非イオン性のオムニパーク(第一三共)を担体に用いて超遠心分離を行った。画分回収したパーコール溶液を50 mMリン酸緩衝液(pH7.0)で置換し、20 mlの懸濁液をリン酸緩衝液で1.10, 1.20および1.30 g/mlに調製したオムニパークの密度勾配溶液(各5 ml)に重層した。113,000 × gで9時間遠心した後には休眠孢子と植物組織が別々の画分に分離され、1.10と1.20 g/mlの境界面にクリーム色の休眠孢子塊が浮遊した(図-1 a)。この浮遊塊を回収して顕微鏡観察すると不純物をほとんど含まない休眠孢子を確認できた(図-1 b)。回収率は生根1 gから約25万個だった。精製した休眠孢子的をウサギ1羽に免疫接種した。休眠孢子的の精製からウサギへの免疫接種までの手順を図-2に示す。

II 抗休眠孢子抗体の反応特性

採取した血清よりキットを用いてポリクローナル抗体(IgG)を精製し、抗体の反応特性を調べた。

1 直接免疫染色法

作製した抗休眠孢子抗体がオルピディウム菌に対して種特異的に反応するのか調べるために、オルピディウム菌(*Olpidium virulentus*)のほか、それと近縁のオルピディウム属の菌2種を対照として用いて試験した。一つは古くからオルピディウム菌と同一種であると見なさ

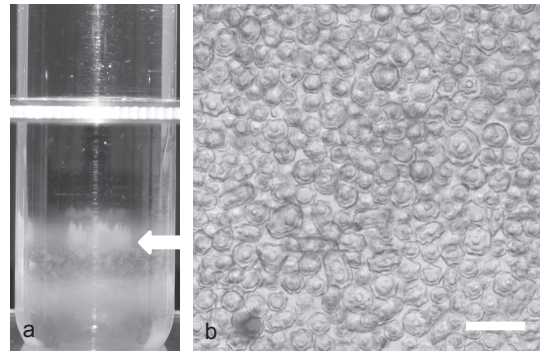


図-1 精製されたオルピディウム菌休眠孢子

(NOMIYAMA et al. (2013) より転載)

- a オムニパークを用いた不連続密度勾配超遠心分離終了後の休眠孢子画分(矢印).
b 精製休眠孢子的の顕微鏡写真. バーの長さ: 50 μm.

1. レタス生根(40 g)の酵素処理(1%セルラーゼオノヅカRS, 0.05%ペクトリアーゼY-23, 50 mM酢酸緩衝液(pH 4.5) 400 ml)
↓ 30℃, 12時間振盪
2. ろ過: 二重ガーゼ100 μm, ふるい45 μm ふるい
↓ 4時間静置, 2回
3. パーコール不連続密度勾配遠心分離
↓ 28,000 × g, 30分間
4. オムニパーク不連続密度勾配超遠心分離
↓ 113,000 × g, 9時間
5. 休眠孢子画分回収(収量: 2.5×10^5 個/g生根)
↓
6. ウサギに免疫接種(約50日間で6回接種, 2.5×10^6 個を5回, 最後に 5.0×10^6 個を1回)

図-2 オルピディウム菌休眠孢子的の精製からウサギへの免疫接種までの手順

れていた *O. brassicae* であり、もう一方はウリ科植物に感染してメロンえそ斑点病などのウイルス病を媒介する *O. bornovanus* (中央農研・津田博士のご厚意により譲受)である(小金澤ら, 2004; 小金澤, 2005)。これら3種の休眠孢子的を用いて、直接免疫染色法により抗体の種特異性を調べた(TAKEUCHI et al., 1999を改変)。休眠孢子的をPBSTで1 μg/mlに希釈した抗休眠孢子抗体溶液中で37℃, 2時間培養した後、PBSTで1,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識二次抗体(シグマ)で37℃, 2時間さらに反応させた。これらの抗体処理した休眠孢子的をNBT/BCIP溶液に浸漬すると、オルピデ

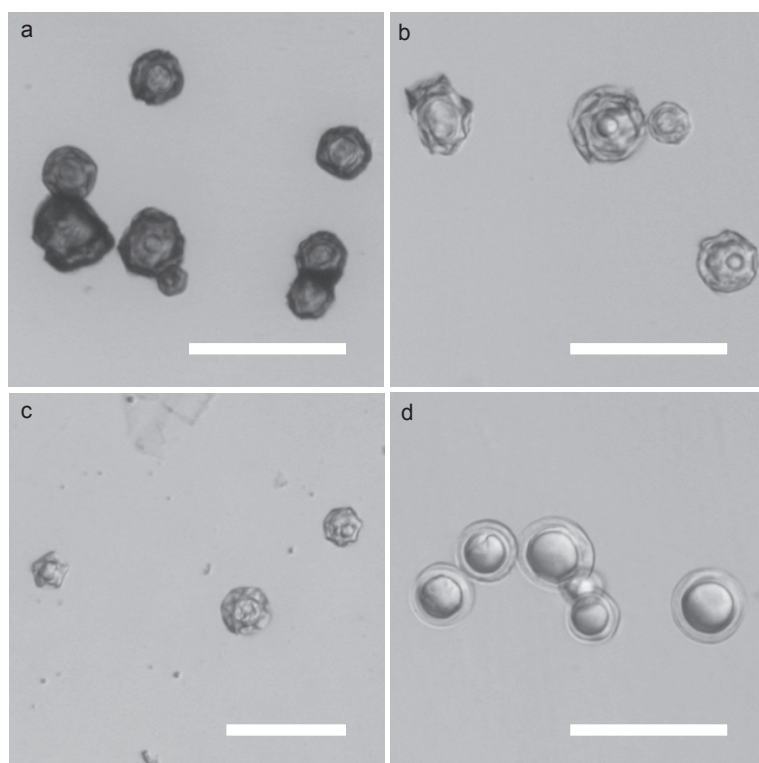


図-3 オルピディウム属菌休眠孢子の直接免疫染色像

(NOMIYAMA et al. (2013) より転載)

- a オルピディウム菌 (*Olpidium virulentum*, 抗体処理あり).
 b オルピディウム菌 (抗体処理なし). c *O. brassicae* (抗体処理あり).
 d *O. bornovanus* (抗体処理あり). バーの長さ: 50 μm .

イウム菌の休眠孢子には抗原抗体反応に由来する紫色の色素が形成されていることが確認できた (図-3 a)。それに対して、抗体休眠孢子抗体を処理しなかったオルピディウム菌休眠孢子では染色は見られなかった (図-3 b)。同様に、2種の近縁菌の休眠孢子においても染色されておらず (図-3 cおよび d)、作製した抗体休眠孢子抗体がオルピディウム菌と種特異的に反応することが示された。また、ウェスタンブロッティング法を行うと、この抗体はオルピディウム菌休眠孢子に由来する 30.5 kDa および 29.0 kDa のタンパク質を認識した (NOMIYAMA et al., 2013)。

2 DAS-ELISA 法

抗体休眠孢子抗体を用いた休眠孢子的検出系の確立を目指して、DAS-ELISA 法の開発を行った。抗体休眠孢子抗体を 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液で 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、エライザプレートにコーティングした。精製休眠孢子を PBST 中でジルコニアビーズを用いて破碎してサンプル調整を行い、37°C、2 時間反応させた。次に、抗体休眠

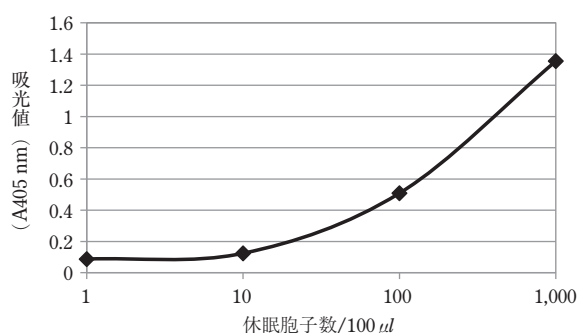


図-4 DAS-ELISA 法によるオルピディウム菌休眠孢子的検出

(休眠孢子 0 個/100 μl の場合の吸光値: 0.004)

子抗体をアルカリフォスファターゼで標識したコンジュゲートの PBST500 倍希釈液中で、37°C、2 時間反応させた。p-ニトロフェニルリン酸溶液を基質として加えて室温、1 時間反応後に吸光値を測定すると、100 μl 当たり休眠孢子 1 個から検出が可能であった (図-4)。休眠

胞子は直径が $30\mu\text{m}$ 程度あるため、ビーズ破碎せずにサンプルとして用いた場合には大きすぎて抗体で捕捉することができずに、基質溶液の発色は見られなかった(データ省略)。また、精製休眠胞子を破碎せずにエライザプレートに直接コーティングし、抗休眠胞子抗体およびアルカリフォスファターゼ標識二次抗体の順で処理した間接エライザ法の場合にも、ウェルの洗浄中に休眠胞子がプレートからはがれてしまうために検出限界は $100\mu\text{l}$ 当たり 200 個しかなく、高感度で検出することは困難だった(NOMIYAMA et al., 2013)。

お わ り に

オルピディウム菌は病原ウイルスの媒介者として植物防疫上、重要な菌であるにもかかわらず、人工培養できないことが研究を進めていくうえでの大きな障害となっている。今回開発した精製方法により回収した休眠胞子は生理活性を有しており、レタスへ接種すると感染できることを確認した。さらに、この精製方法は近縁の *Olpidium brassicae* および *O. bornovanus* の休眠胞子に感染根から回収する場合にも適用が可能であったことから、オルピディウム属菌の生理・生態学的解明に大きく

寄与できるものであると期待される。

また、今回作製した抗休眠胞子抗体を用いた DAS-ELISA 法により罹病根中の休眠胞子数を計測することが可能となった。この技術を活用して休眠胞子数が既知の罹病根粉末を接種源として用いることにより、土壌中の休眠胞子密度と発病程度の間接関係を表すことができた(野見山ら, 2013)。しかしながら、休眠胞子を検出するために汚染土壌をサンプルとして ELISA 法に供すると、非特異反応が生じるために現時点では実用段階には達していない。今後はサンプル調整や反応溶液の組成について最適な条件を検討することにより、レタスビグベイン病の発病程度を予測できる簡易迅速かつ精度の高い血清学的な土壌診断技術の開発へとつなげてゆきたい。

引 用 文 献

- 1) 有江 力ら (1988): 日植病報 **54**: 242 ~ 245.
- 2) 岩本 豊・相野公孝 (2010): 植物防疫 **64**: 229 ~ 234.
- 3) 小金澤碩城ら (2003): 四国植物防疫研究 **38**: 23 ~ 28.
- 4) ————ら (2004): 日植病報 **70**: 307 ~ 313.
- 5) ———— (2005): 植物防疫 **59**: 251 ~ 255.
- 6) NOMIYAMA, K. et al. (2013): J. Gen. Plant Pathol. **79**: 64 ~ 68.
- 7) 野見山孝司ら (2013): 日植病報 **79**: 48 ~ 49 (講要).
- 8) 折原詳子 (1996): 植物防疫 **50**: 507 ~ 510.
- 9) TAKEUCHI, S. et al. (1999): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **65**: 189 ~ 191.

登録が失効した農薬 (25.5.1 ~ 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」

- クロルピリホス水和剤
11583：クミアイダースバン水和剤 25（クミアイ化学工業）13/5/4
- メソミル粉粒剤
13246：ランネート微粒剤 F 三共（三井化学アグロ）13/5/14
- MEP 乳剤
13250：ヤシマ産業スミチオン乳剤 50（住化グリーン）13/5/14
- メタアルデヒド粒剤
21291：ナメジゴクプロ（レインボー薬品）13/5/25

「殺虫殺菌剤」

- MEP・カスガマイシン・ジクロシメット粉剤
21287：ホクコーブルーザスミチオン粉剤 DL（北興化学工業）

13/5/25

- BPMC・MEP・カスガマイシン・ジクロシメット粉剤
21288：ホクコーブルーザスミバッサ粉剤 DL（北興化学工業）13/5/25

「殺菌剤」

- チオファネートメチル水和剤
11576：ヤシマトップジン M 水和剤（協友アグリ）13/5/1
- 臭化メチルくん蒸剤
21396：不可欠用途専用ニチヒューム（日宝化学）13/5/7

「農薬肥料」

- ブタミホス・DCBN 複合肥料
21962：シバキーププラス（住化グリーン）13/5/10