

イミュノキャプチャーPCR (IC-PCR) による 植物ウイルスの高感度検出

—ヤマノイモモザイクウイルスの検出を例として—

山口大学農学部生物生産科学講座 かめ 亀 や 谷 みつ 満 ろう 朗

はじめに

植物ウイルスの検出は生物検定や酵素結合抗体法 (ELISA), 免疫電子顕微鏡法による血清学的手法等が広く用いられているが, 近年それらに加えて分子生物学的手法であるPCR法も用いられている。PCR (polymerase chain reaction) はDNAの増幅法である。多くの植物ウイルスの核酸はRNAであり, このRNAから相補鎖DNA (cDNA) を作り, これを増幅して検出するため逆転写PCR (RT-PCR) といわれる。RT-PCRについては本誌 (大貫・花田, 1996) を参照されたい。

RT-PCRはELISAなどに較べて一般に検出感度は高いといわれるが, ウイルスや植物により異なり, また病植物体から全RNAを抽出し, それから目的とするRNAのcDNAを作る手間がかかり, やや煩雑である。そこで, 全RNAを抽出する代わりにELISAの第1段階を利用し, チューブにウイルス抗体をつけ, そこにウイルス汁液を入れ, ウイルス粒子を捕捉し, そのRNAからcDNAを作り, PCRを行う方法が開発され, 利用されている。これがイミュノキャプチャーPCR (IC-PCR) である。この方法ではウイルス抗体を必要とするが, 全RNAを抽出する手間が省かれ, さらに夾雑物が少ないため特異性が高まるといわれる。

WETZEL et al. (1992) による *Plum pox potyvirus* の検出例で見ると, IC-PCRの検出感度はRT-PCRの250倍, ³²Pを用いたハイブリダイゼーション法の620倍, ELISAの5,000倍と非常に高いことが伺える。

本稿ではヤマノイモモザイクウイルス (JYMV) の検出例をもとにIC-PCRとPCR産物を利用したRFLP (制限酵素断片長多型) による強毒株と弱毒株の判別について紹介したい。

I ヤマノイモモザイクウイルス (JYMV) の IC-PCRによる検出

山口県で栽培されているイチヨウイモではJYMVが広く発生し, それによる被害が大きい。ウイルスフリー株の育成や弱毒ウイルスを利用した被害回避の研究が進められている。その中でウイルスフリーの確認や弱毒ウイルスの感染率, 弱毒ウイルスの強毒ウイルスに対する干渉効果の検定などのためJYMVの抗血清を作製し, ELISA法による検定が行われてきた。しかし, ELISAの検出感度は病葉の4,000~10,000倍希釈程度であり, 十分とはいえず, 検出感度のより高いといわれていたRT-PCRを行ったがその検出感度はELISAより低かった。また, これらの方法では強毒株と弱毒株の判別は不可能であった。

そこで検出感度がより高いとされているIC-PCRを試みたところ, 極めて高い感度 (病葉汁液の10⁻⁸倍) で検出できることが分かった。さらにこのPCR産物について4種類の制限酵素を用いたRFLPを行ったところ, 1種類の制限酵素 (*Tsp* 509 I) によるバンドパターンから強毒株と弱毒株を判別できることが明らかとなった。また, 凍結葉を用いた場合, ELISAでは検出できなかったが, IC-PCRでは生葉とほぼ同等に検出することができた。

IC-PCRはROWHANI et al. (1995) の方法に準じて行った。

RT-PCR用プライマー: JYMVの外被タンパク質のコア領域241bpを増幅可能なプライマーC2 (5'-GTGGCATGTACGCTCTTTCTTG-3') およびプライマーS2 (5'-CTAGATGACAGTTTCGACAAA-3') (藤・中前, 1999) を使用した。

RNAの抽出: 0.5 ml チューブにcarbonate buffer (1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃/l, pH 9.6) で希釈した40 μg/mlのウイルス抗体 (IgG) を50 μl 入れ, 37°Cに2時間置き, PBS-T (0.02 M PB, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN₃, 0.05% Tween 20, pH 7.4) で3回洗浄した。植物組織100 mgを2 mlの抽出用緩衝液 (0.2 M citrate buffer, 0.01 M Na-DIECA, 0.005

Highly Sensitive Detection of Plant Viruses by IC-PCR.
By Mitsuro KAMEYA

(キーワード: イミュノキャプチャーPCR, 制限酵素断片長多型, 系統判別)