

PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法による カンキツエキソコーティスウィロイドの検定

農林水産省横浜植物防疫所 ^{さい} 齊 ^{とう} 藤 ^{のり} 範 ^{ひこ} 彦

北海道大学農学部植物ウイルス病学・菌学講座 ^{はた} 畑谷 ^{たつじ} 達児・^{しかた} 四方 ^{えいしろう} 英四郎

はじめに

農林水産省植物防疫所では、海外から輸入される果樹類、いも類、花き球根類については隔離検疫により、また、国内で栽培されている優良な果樹母樹については果樹母樹ウイルス病検査により、ウイルスやウィロイドの検定を行っている。

近年、海外からの遺伝資源導入や国内における果樹生産の増加、多様化に伴い、植物防疫所におけるこれらの検定は増加の一途をたどっている。このため、短時間に大量の試料を精密に検定できる技術が必要となった。

ウイルスの検定では、汁液接種等の生物検定、電子顕微鏡による検定等従来の方法に加え、ELISA法が多くのウイルスで実用化されたため迅速、精密な検定が可能となった。しかし、ウィロイドは外被タンパク質を持たない裸のRNAのため、ELISA法等の血清学的検定を使えない、電子顕微鏡による検定が事実上不可能、などの制約があった。このため、ウィロイドの検定は生物検定や被検植物から抽出した核酸の電気泳動により行われてきた。しかし、これらの方法は検定期間が長い、ウィロイドの種類を特定できない、等の短所があった。

近年、分子生物学等の発達により、多くのウィロイドの塩基配列が決定された。また、数時間の内に目的とする遺伝子を大量に増幅するPCR (polymerase chain reaction) 法や、非放射性プローブを用いたハイブリダイゼーションによる検出法が考案された。

これらPCR法やハイブリダイゼーション法を用いた遺伝子診断法により、ウィロイドの検定を精密かつ短時間に実施することが可能となった。

PCR法やハイブリダイゼーション法については、本誌第44巻第12号(1990)で兼松ら及び佐野が詳しく解説しているので参照されたい。

PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法は、INOUE and HONDO (1990) によって医学分野で開発された新しいハイブリダイゼーションの技術である。ハイ

ブリダイゼーションは現在、ドットプロットハイブリダイゼーション等のように、核酸をニトロセルロースやナイロン膜に固定して行われているが、本法はELISA検定で用いられているポリスチレン製のマイクロプレートにPCR法によって増幅したDNAを直接固定して行うものである。PCR産物のアガロースゲル電気泳動では非特異的増幅によるバンドの混在や増幅バンドが不明瞭のためその判定が難しい試料でも、マイクロプレートハイブリダイゼーションを行い吸光度を測定することにより容易に判定できる。

HATAYA et al. (1993) は本法を植物ウイルス(ジャガイモYウイルス)の検出に応用し良好な結果を得、その検出感度はELISA法の10,000倍であったと報告している。また、筆者らはホップ潜在ウィロイド(HLVd)、ホップわい化ウィロイド(HSVd)、キクわい化ウィロイド(CSVd)、ジャガイモやせいも病ウィロイド(PSTVd)についても本法を応用し良好な結果を得ている(畑谷ら, 1992; 李ら, 1992)。

本稿では、カンキツエキソコーティスウィロイド(CEVd)を対象としたPCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法の実際について解説する。

I PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法によるカンキツエキソコーティスウィロイド(CEVd)の検出

CEVdは、我が国でカンキツ類の台木として多く用いられているカラタチ等に樹皮の亀裂や剝皮を生じさせるウィロイドである。本ウィロイドは接ぎ木伝染し、また、罹病樹を切断した刃物等によっても容易に伝染する(GARNSEY and BARKLEY, 1988)。

現在、植物防疫所における本ウィロイドの検定は、木本指標植物であるエトログシトロン-アリゾナ861-SIを用いた接ぎ木検定(ROISTACHER et al., 1977)、草本指標植物であるラトガストマトを用いた汁液接種検定(長尾・脇本, 1981)及び抽出核酸のリターンゲル電気泳動法(SCHUMACHER et al., 1986)によって行っているが、本ウィロイドのさらに迅速かつ精密な検定のため、遺伝子診断法の導入について検討を行った。この研究は、農林水産

業特別試験研究補助金により、有機合成薬品工業株式会社、北海道大学、横浜植物防疫所で行われたものである。

本法の概要は、①カンキツ試料からの全核酸の抽出、②逆転写反応による cDNA の合成及び PCR 法による増幅、③マイクロプレートハイブリダイゼーション法による検出、の三つの過程から成る。

1 カンキツからの核酸試料の抽出

本法は被検試料から抽出した核酸を PCR 法によって増幅するため、核酸抽出用の試料は極微量でよい。また、試料は生のものでよいが、シリカゲルで乾燥保存した試料からも十分検出可能である。

下記に抽出方法の例を示した。

- ① 試料 (0.1~0.2 g) を 1.5 ml/ エッペンドルフチューブに入れ 30 μ l の 2-メルカプトエタノールを加えた後、かくはんベッセル (図-1) で磨砕する。0.5ml の磨砕緩衝液 (0.13 M Tris-HCl (pH 8.9), 0.017 M EDTA (pH 7.0), 1 M LiCl, 0.83 % SDS, 5% PVP) を加えさらにを磨砕する。さらに

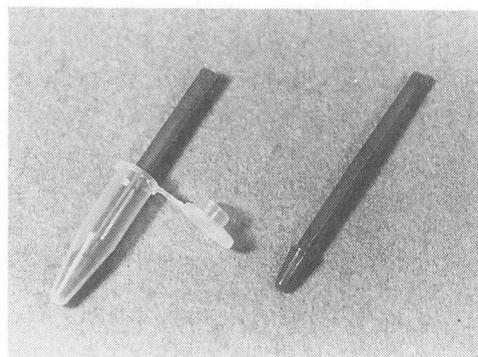


図-1 かくはんベッセル

エッペンドルフチューブ内で微量な試料を磨砕する。

0.5 ml の磨砕緩衝液を加え振とうする。

- ② 12,000 rpm で 1 分間遠心する。上清に 0.5 ml の水飽和フェノール:クロロホルム (1:1) を加え 5 分間振とうする。
- ③ 12,000 rpm で 3 分間遠心する。上清に 1/10 倍容の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2), 6/10 倍容のイソプロパノールを加え転倒混和する。-30°C で 30 分間静置する。
- ④ 15,000 rpm で 5 分間遠心する。沈殿を 0.45 ml の蒸留水に溶解する。0.45 ml の水飽和フェノール:クロロホルム (1:1) を加え 5 分間振とうする。
- ⑤ 12,000 rpm で 3 分間遠心する。上清に 1/10 倍容の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2), 2.5 倍容のエタノールを加え、転倒混和する。-80 度で 30 分間静置する。
- ⑥ 15,000 rpm で 5 分間遠心する。沈殿を 5 分間減圧乾燥させた後、0.2 ml の蒸留水に溶解する。0.05 ml の 10 M LiCl を加え水中で 1 晩静置する。
- ⑦ 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心する。上清に 2.5 倍容のエタノールを加え -80 度で 1 時間静置する。
- ⑧ 15,000 rpm で 10 分間遠心する。沈殿を 5 分間減圧乾燥させた後、0.2 ml の蒸留水に溶解する。1/10 倍容の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2), 2.5 倍容のエタノールを加え、-80 度で 30 分間静置する。
- ⑨ 15,000 rpm で 1 分間遠心する。沈殿を 5 分間減圧乾燥させた後、0.4 ml の蒸留水に溶解し全核酸抽出試料とする。

2 RT-PCR 法による増幅及びプローブの作成

ウイロイドは RNA のため、まず逆転写反応により cDNA を合成した後、これを鋳型とし PCR 法によって増幅する (RT-PCR 法)。

筆者らは逆転写反応用のプライマーとして PCR 用のマイナスプライマーを用いているが、市販のランダムプライマーを用いてもよい。プライマーの塩基配列及び

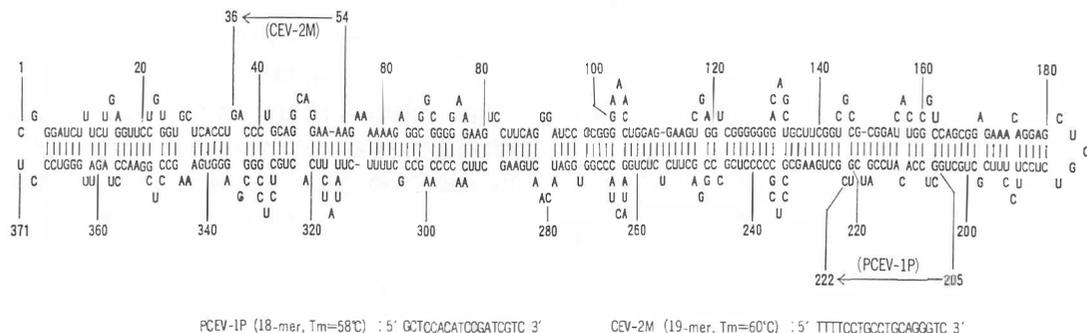


図-2 PCR 増幅用プライマーの位置

CEVd に対する結合部位は図-2 に示したとおりで、CEVd の全塩基数 371 の内約 60% に当たる 221 塩基を増幅するものである。

なお、PCR 法はたいへん鋭敏な方法のため、極微量の汚染でも増幅され疑陽性となってしまう。このため、使用する器具類や緩衝液等はオートクレーブや乾熱滅菌し、試薬類は小分けして保存するようにする。

① 逆転写反応

(1 検体当たり)

プライマー (CEV-2 M, 25 pmol/μl) ……………	1 μl
5 倍逆転写酵素用緩衝液 (GIBCO BRL 社, 酵素に添付) ……………	4 μl
蒸留水 ……………	6.5 μl
各 5 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) 混合液 ……	2 μl
0.1M DTT (GIBCO BRL 社, 酵素に添付) ……	2 μl
M-MLV 逆転写酵素 (GIBCO BRL 社, 200 U/μl) ……………	0. μl
	16 μl

混合 (0.5 ml チューブ)

抽出全核酸試料 4 μl を加える

↓ 37°C, 60 分

10 倍 Tth DNA ポリメラーゼ用緩衝液 (東洋紡, 酵素に添付) ……………	3 μl
0.17 M KCl ……………	5 μl
各 5 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) 混合液	1.5 μl
蒸留水 ……………	27.5 μl
Tth DNA ホリメラーゼ (東洋紡, 1 U/μl に希釈)	1 μl
プライマー (CEV-2 M, PCEV-1P 各 25 pmol/μl)	2 μl

40 μl

混合

ミネラルオイル (シグマ) を 1 滴重層する

逆転写反応産物 10 μl を加える

↓ ショートスピンの

逆転写反応産物 (cDNA)

② PCR 法による増幅

(1 検体当たり)

PCR 25 サイクル

1 サイクル	94°C, 5 分→53°C, 1 分→72°C, 2 分
2~25 サイクル	94°C, 30 秒→53°C, 1 分→72°C, 2 分
ラストサイクル	72°C, 8 分→20°C

プライマーとのアニーリングは (Tm-5)°C の条件で行った。

PCR 増幅終了後、0.5 ml の水飽和フェノール：クロロホルム (1:1) を加え 5 分間振とうする。12,000 rpm

で 3 分間遠心した後、1/4 倍容の 10 M 酢酸アンモニウム、2.5 倍容のエタノールを加える。-80°C で 30 分間静置した後、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心する。沈殿を 5 分間減圧乾燥し、50 μl の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解し PCR 産物とする。

③ プロープの作成

ハイブリダイゼーションに用いるプロープの標識は、従来、アイソトープ (RI, 主に ³²P) が用いられてきた。しかし、RI は検出感度は高いが、限られた実験室内でしか用いることができない、廃棄物の処理、実験者に対する放射線の影響等の問題があり、一般的な診断法としては適当ではない。

このため、最近様々な非 RI 核酸標識法が開発され、その感度も RI 標識に匹敵するものがある。

本法では dUTP にジゴキシゲニン (DIG) を結合させた DIG-11-dUTP を標識に使い、PCR 法でプロープの合成を行った。PCR 法の鑄型は逆転写反応によって作成した CEVd の cDNA を用いた。プライマーは上記の PCR 増幅と同じものを用いた。

(1 検体当たり)

10 倍 Tth DNA ポリメラーゼ用緩衝液 ……………	5 μl
蒸留水 ……………	34.25 μl
各 1 mM (dGTP, dATP, dCTP) } ……	混合液 5 μl
0.65 mM dTTP	
DIG-11-dUTP (ベリンガー社, 1 mM) ……	1.75 μl
プライマー (CEV-2 M, PCEV-1P 各 25 pmol/μl) ……………	2 μl
Tth DNA ポリメラーゼ (1 U/μl) ……………	1 μl

49 μl

混合

ミネラルオイル (シグマ) を 1 滴重層する

逆転写反応産物 10 μl を加える

↓ ショートスピンの

PCR 30 サイクル

1 サイクル	94°C, 5 分→53°C, 1 分→72°C, 2 分
2~30 サイクル	94°C, 30 秒→53°C, 1 分→72°C, 2 分
ラストサイクル	72°C, 8 分→20°C

DIG はステロイドであるため有機溶媒に可溶である。したがってフェノール抽出やクロロホルム処理を行うことができない。このため以下の操作により合成したプロープを精製する。

上層のミネラルオイルをできるだけ除く。限外ろ過フィルター付きスパンカラム (ミリポア, Ultrafree C3-TTK 等) に分注し 6,500 rpm で 8 分間遠心する。上部フィルターに TE 緩衝液を加え 400 μl にメスアップ

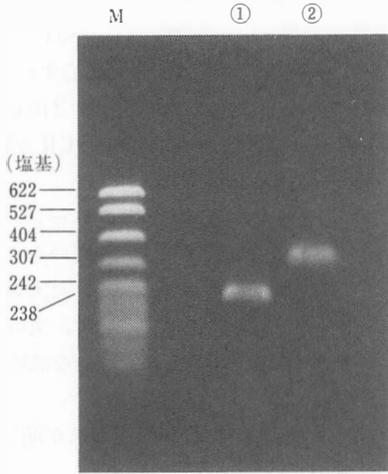


図-3 CEVd DIG-プローブの2%アガロース電気泳動
①は無標識のCEVd PCR産物. ②はDIGを取り込ませたCEVd PCR産物 (DIG-プローブ). DIGを取り込んだ分だけ泳動速度が遅くなっているのがわかる. Mは分子量マーカー.

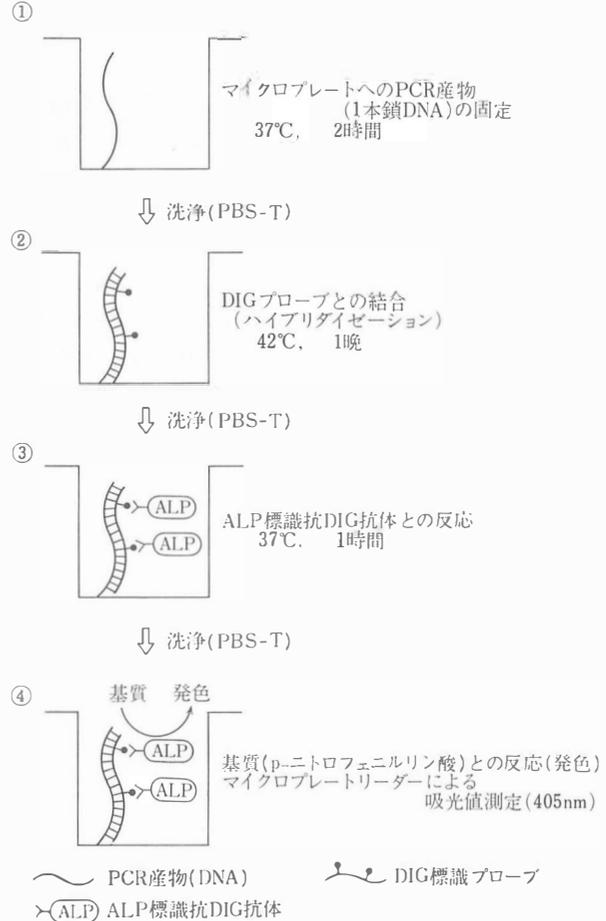


図-4 マイクロプレートハイブリダイゼーション法の概要

後、6,500 rpm で8分間遠心する。この操作を3~4回繰り返す。最後に、TE緩衝液を50 μ l 加えプローブ液とする。これを2%アガロースゲル電気泳動によりチェックを行う。通常のPCR産物に比べ、DIGを取り込ませたものはその分だけ泳動速度が遅くなる(図-3)。プローブは-20°Cで最低1年間は安定である。

3 マイクロプレートハイブリダイゼーションによる検出

マイクロプレートハイブリダイゼーションの概要は図-4に示したとおりで、従来行われているELISA法とたいへんよく似ている。ELISA法はタンパク質、マイクロプレートハイブリダイゼーションは核酸を基本としているが、抗原抗体反応に用いる酵素や基質は同じものである。

なお、現在、多くのマイクロプレートが市販されているが、いくつかのプレートについてDNAの吸着について比較したところ、Nunc社製Immunoplate II-MaxisorpがDNAを最もよく吸着したため、本法ではこのプレートを用いている。

① PCR産物のマイクロプレートへの固定化: PCR産物15 μ lにDNA固定化液(10倍SSC, 10mM EDTA (pH 7.0)) 285 μ l (20倍希釈)を加え、100°C, 5分間熱変性した後、水中急冷する。このうち100 μ lをマイクロプレートに分注する。プレートをシールした後、37°Cの恒温槽に沈め、2時間インキュベートする(恒温器中でも可)。

② 洗浄: PBS-Tween (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HP₄, 1.47 mM KH₂P₄, 2.7 mM KCl, pH 7.4, 0.05% Tween-20)を各穴300 μ lずつ分注し、3分間静置する。この操作を3回繰り返す。以下同じ。

③ ハイブリダイゼーション: 熱変性プローブを加えたハイブリダイゼーション液(5倍SSC (pH 7.0), 10 mM EDTA (pH 7.0), 50%ホルムアミド, 0.1% Tween-20, 50 μ g/ml サケ精子DNA, DIG標識プローブ(100°Cで5分間熱変性後、水中急冷し500倍希釈で用いる))を各穴100 μ lずつ分注する。プレートをシールした後、42°Cの恒温槽に沈め1晩インキュベートする(恒温器中でも可)。

④ 洗浄

⑤ 抗原抗体反応: アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体(BMY社:ポリクローナル抗体, 750 U/ml)をPBS-Tweenで5,000倍に希釈したものを各穴100

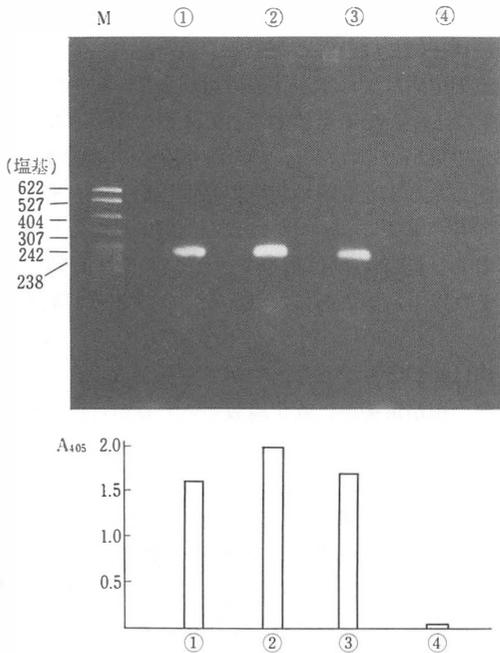


図-5 PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーションによるCEVdの検出

①～③はCEVd罹病カンキツ試料, ④は健全カンキツ試料, Mは分子量マーカー, 写真はPCR産物の2%アガロースゲル電気泳動。グラフは基質投入2時間後における波長405 nmの吸光度。

μ lずつ分注する。37°Cの恒温器中で1時間静置する。

⑥ 洗浄

⑦ 発色反応: 1 mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸2ナトリウム(10% ジェタノールアミン緩衝液(pH9.8)に溶解)を各穴200 μ lずつ分注する。

⑧ 室温に静置し, マイクロプレートリーダーにより波長405 nmの吸光度を測定する(図-5)。

おわりに

PCR法は最近開発された技術であるが, 急速に普及し, 現在では, 遺伝子研究になくってはならない技術となっている。

PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法は, 上記のとおりELISA法とたいへんよく似ている。しかし, ELISA法は試料として粗汁液を直接用いることができるが, PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法は核酸を抽出, 精製しなくてはいけない。このため大量の検体を処理する場合, 多くの労力を要する。抽出方法は簡素化できると思われるが, ある程度精製しないとPCR法において増幅されない場合がある。このため, 今後抽出方法の簡素化についてさらに検討する必要がある。

引用文献

- GARNSEY, S. N. and P. BARKLEY (1988): *Exocortis in Compendium of Citrus Diseases*, Ed. by WHITESIDE, J. O. et al., APS Press, Minnesota, pp. 40-41.
- 畑谷達見ら (1992): 日植病報 58: 624 (講要)。
- HATAYAMA, T. et al. (1993): *J. Virol. Methods* (印刷中)
- INOUE, S. and R. HONDO (1990): *J. Clin. Microbiol.* 28: 1469~1472.
- 兼松誠司ら (1990): 植物防疫 44: 549~556.
- 長尾記明・脇本 哲 (1981): 日植病報 47: 416 (講要)。
- 李世訪ら (1992): 日植病報 58: 624~625 (講要)。
- ROISTACHER, C. N. et al. (1977): *Plant Dis. Repr.* 61: 135~139.
- 佐野輝男 (1990): 植物防疫 44: 557~561.
- SCHUMACHER, J. et al. (1986): *J. Phytopathology* 115: 332-343.

人事消息

(3月1日付)

西山岩男氏(東北農試水田利用部長)は東北農試次長に
大野芳和氏(国際研究センター海外情報部長)は国際研究センター総合研究官に
中川原捷洋氏(生物研遺伝資源第一部長)は生物研遺伝資源調整官に
美濃部有三氏(生物研企画調整部ゲノム研究チーム長)は生物研遺伝資源第一部長に
千葉和彦(果樹試盛岡支場栽培研究室長)は果樹試栽培部長に
浅野次郎氏(野菜・茶試企画連絡室企画科長)は野菜・茶試盛岡支場長に
成河智明氏(野菜・茶試茶栽培部長)は野菜・茶試茶業研究官に
八戸三千男氏(技会事務局研究開発官)は野菜・茶試茶栽培部長に
赤間芳洋氏(九州農試企画連絡室企画科長)は東北農試

水田利用部長

大賀圭治氏(国際研究センター海外情報部国際研究情報官)は国際研究センター海外情報部長に
北村實彬氏(生物研企画調整部研究技術情報官)は技会事務局研究開発官に
棟方 研氏(東北農試次長)は退職
松本省平氏(農研センター総合研究官)は退職
鈴木孝仁氏(生物研遺伝資源調整官)は退職
長谷嘉臣氏(果樹試栽培部長)は退職
高田勝也氏(野菜・茶試盛岡支場長)は退職
築瀬好充氏(野菜・茶試茶業研究官)は退職
佐々木卓治氏(生物研企画調整部主研(ゲノム研究チーム)は同ゲノム研究チーム長に

○出版部より

前号の次号予告でご案内いたしました「植物防疫研究課題の概要」につきましては, 都合により次号に掲載させていただきます。