

植物ウイルスの遺伝子診断

独立行政法人農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター ^{はな} ^だ ^{かおる}
花 田 薫

はじめに

植物ウイルスは世界中で950種以上が知られており、我が国でも300種以上が発生している。植物ウイルスは、その遺伝子の種類からDNAウイルスとRNAウイルスに大別される。ほとんどがRNAウイルスで90%以上をしめていることは、植物ウイルスの大きな特徴である。従来、植物ウイルスは形態・宿主域・特定の植物での病徴・媒介者などの性質に基づいて大きく分類され、血清学的な性質で同定されて命名されてきた。最近になって、植物ウイルスの遺伝子解析は急速に進み、これまで純化精製が困難なために性状が未確定で研究が進まなかったウイルスの多くについても、その遺伝子構造が明らかにされ多くの新知見が報告されてきている。それに伴って、ウイルスやウイロイドで決定された塩基配列を利用した遺伝子診断技術が急速に進んできており、個々の病原について遺伝子診断法が確立されてきた。ここではPCRを利用した遺伝子診断の利用法とその現状について紹介する。

I 遺伝子診断の特徴

遺伝子レベルでの解析が早くから進んでいる植物ウイルスでは、耐熱性のDNAポリメラーゼを使用したPCRの発明後、早くから遺伝子診断の利用が検討されてきた。DNAウイルスではPCRのみで遺伝子を増幅できるが、RNAウイルスでは、PCRの前に逆転写(RT)反応を行ってRNAからDNAを合成する反応が必要なので、RT-PCRと呼ばれている。

ウイルスやウイロイドの遺伝子診断は、検出感度が高いのが大きな特徴であり、その操作も比較的簡易迅速な手法である。しかし、そこに至るまでの種々の条件設定が極めて重要である。条件設定が不十分であると、非特異反応のために感染していない株を感染していると判定したり、逆に感染しているのに検出できなかったりする場合もある。再現性の高い遺伝子診断を行うには、他の手法を用いてあらかじめ比較検討を行っておき、確実な条件を設定しておく必要がある。

PCRを用いた遺伝子診断は、確実に行えば大きな利点をもつ優れた診断法である。特に抗血清診断法と比較した場合の遺伝子診断の利点としては次のことが挙げられる。①プライマーさえあれば、原理的にはどんなウイルスでも検出可能である。各ウイルスに対する抗血清を一つずつ作製するのは大変な仕事であり、まずウイルスの純化精製から始める必要がある。純化が困難ならそこで中断してしまう。PCRでは、プライマーセットをもっていれば診断をすぐに行えるわけで、各種のウイルスに対するプライマーをもっておくことは、各種ウイルスの抗血清を保有しているのと同じくらいの価値がある。②共通する配列部分をプライマーとして用いることで、異なった種のウイルスでも同時に検出できる。③逆に特定のウイルスや分離株にのみ特異的な配列部分をプライマーとすれば、特定のものだけを検出できる。④RT-PCRやPCRによって増幅されたDNA断片を制限酵素で処理する(RFLPと呼ぶ)ことで、検出されたウイルスの類似性を知ることができる。⑤必要なら増幅断片の塩基配列を決定して、既知のものと比較できる。⑥血清学的手法では検出できないウイロイドなどの検出ができる。⑦ほかの手法では検出できない低濃度のウイルスを検出できる。

II 遺伝子診断の具体的手法

植物ウイルスの遺伝子診断のためには、いくつかの基本的な技術が必要となる。それらは、鋳型とするための核酸の抽出法、プライマー、PCRまたはRT-PCRの反応、そして検出法である。一般的な原理や実験法については、他の参考書を参照されたい(島本・佐々木、1997など)。ここでは、特に植物ウイルスについて具体的に説明する。

1 鋳型の抽出

(1) DNAウイルス

ジェミニウイルスではDELLAPORTA et al. (1983)の方法が基本的なものである。サツマイモからのサツマイモ葉巻ウイルス(SPLCV)、トマトやトルコキキョウからのトマト黄化葉巻ウイルス(TYLCV)、トマトからのタバコ巻葉ウイルス(TbLCV)、ヒヨドリバナからのジェミニウイルスなどでは、本法でよい結果が得られている。ナノウイルスであるレンゲ萎縮ウイルスでは酢酸

ナトリウムを用いる方法が報告されている。栄養繁殖性作物でのパドナウイルスでは、磨砕液に SDS や PVP などを添加するとよい。

(2) RNA ウイルスとウイロイド

1) 植物からの RNA 抽出

タバコなど多くの草本植物では、磨砕にはアルカリ性の緩衝液に還元剤と SDS を添加したものをを用い、フェノールなどのタンパク質変性剤で処理して遠心分離後、エタノールなどで核酸を沈殿させ遠心で集め洗浄して乾燥後、滅菌水にとかしたものを RT-PCR に用いる。SDS やフェノールの除去のためクロロフォルムなどの利用は有効である。

一般に栄養繁殖性植物は酸化酵素や多糖類などを多く含むために、RT-PCR に利用可能な RNA を抽出することは困難なことが多い。

サツマイモから RT-PCR に使える RNA の抽出は植物ウイルス dsRNA の抽出などで用いる CF-11 セルローズ粉末を利用することで比較的簡易にできる (大貫・花田, 1996)。また、DNA 抽出のために考案された方法 (DELLAMORTA et al., 1983) を簡易にした方法が最近佐藤ら (2000) によって報告されているが、ジャガイモ塊茎やサツマイモからも RNA を短時間で簡便に抽出できる。

我が国のキクにはキクわい化ウイロイドが、カンキツにはエクソコーティスなど 8 種ウイロイドが発生しており、その診断には RT-PCR が簡便で迅速である。これらの植物からの RNA の抽出には、ショ糖や PVP の加用が有効であり、CF-11 や市販のキットの利用も有効である。

2) RFLP と弱毒株特異的 RT-PCR

増幅 DNA 断片を適当な制限酵素で切断して、大きさの異なる DNA 断片ができてくる場合には、RFLP によって系統や特殊な株を特定できる。サツマイモ斑紋モザイクウイルスの 4 系統に共通なプライマーを用いた RT-PCR によってサツマイモから DNA 断片を増幅後、制限酵素で処理をし電気泳動すると、系統によって断片の大きさが異なることを利用して系統を特定することができるなど多くの具体例がある。また、わずかな数の塩基配列のみ異なる弱毒株と強毒株を区別するような場合には、その異なる部分を利用して作製したプライマーを用いた RT-PCR によって両株を識別できる。

3) 媒介生物からの検出への利用

アブラムシが伝搬するジャガイモ葉巻ウイルスやトリステザウイルスのアブラムシからの高感度検出、線虫伝染性の *Grapevine fanleaf virus* の線虫からの検出、コ

ナジラミ伝染性のジェミニウイルスのコナジラミからの検出などが RT-PCR や PCR によって可能なことが報告されており、従来のエライザ法より高感度であることが確認されている。イスラエルの TYLCV が特定のコナジラミ系統によって経卵伝染されるという報告も PCR を用いた詳細な検討の結果得られたものである。また、非永続伝搬性のウイルスでも媒介虫から RT-PCR で検出可能なことが報告されている。

(3) プライマー

プライマーには、あるウイルスの特定の系統にのみ特異的なもの、種特異的なもの、複数のウイルス種に共通なもの、ウイルス属の全体に共通なもの、科のほとんどのウイルスを検出可能なものがある。最近になって検討が進んできた利用性が高いと思われる属や科など幅広い検出に有用なものについて紹介する。

1) ジェミニウイルス

SPLCV のウイルス DNA は、当時は一般的に有効とされていた *Bean golden mosaic virus* 由来の共通プライマーでは増幅できず、ほとんど使われていなかったが BRIDGON and MARKHAM (1994) が考案した BM プライマーで増幅されることが判明した (OSUKI and HANADA, 1998, 図-1)。その後、この BM プライマーは、我が国で発生しているほとんどのジェミニウイルスの検出に利用できることがわかった。純化精製が困難なものが多いジェミニウイルスであるが、BM プライマーによる PCR 増幅産物をダイレクトシーケンスするか、その RFLP によって、対象としているのがどのジェミニウ

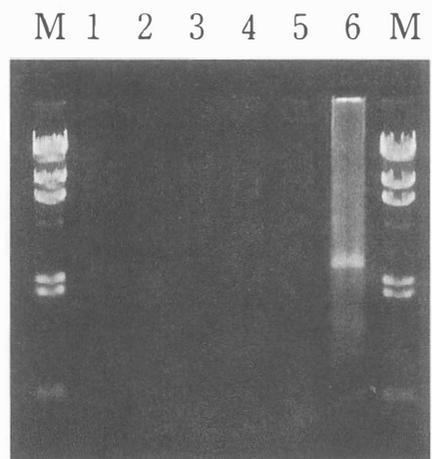


図-1 共通プライマー (BM プライマー) を用いた PCR によるジェミニウイルス (SPLCV) の検出例 (OSUKI and HANADA, 1998 より)
M: λ /HindIII, 1~5: BGIMV 由来プライマーの共通プライマー 5 組, 6: BM プライマー。

ウイルスであるかを簡単に判別できる。この手法によって、我が国の SPLCV が全く新しいジェミニウイルスであることが判明した。

2) ポティウイルス

ポティウイルス科には植物ウイルスでは最多の数の種が知られており、その検出および同定にポティウイルス共通プライマーを利用した RT-PCR を用いることは極めて有用である。GIBBS and MACKENZIE (1996) が報告している共通プライマー (図-2) は極めて有用であり、多くのポティウイルス科に属するウイルスを増幅できる。Potyvirus 属のウイルスばかりでなく、Bymovirus 属、Ipomovirus 属、Macluravirus 属のウイルスも増幅できることが報告されている。我々が行った結果でも、このプライマーによって、ダイズモザイク・カボチャモザイク・ズッキーニ黄斑モザイク・パパイア輪点・インゲン黄斑モザイク・サトウキビモザイクなどのウイルスや Maize dwarf mosaic virus を容易に増幅できた。図-2 のプライマー 1 の最後の V はなくてもよい (花田, 未発表)。またプライマー 2 の制限酵素部位までは必須ではないが、プライマー 1 ではこの付加は必須である。これらの増幅産物の塩基配列の一部を、ダイレクトシークエンスによって決定して既知のものと比較すれば、どのポティウイルスかを容易に知ることができる。ウイルス種の決定のために、数十種にも及ぶポティウイルスの抗血清のシリーズを準備しておき、その一つ一つの反応を検討する必要はもはやなくなった。

3) トスポウイルス

トスポウイルスは世界中で 13 種が知られており、個々のウイルスの塩基配列の一部は報告され、それぞれのウイルスの RT-PCR 検出は既に可能である。2001 年になって、多くのトスポウイルスに共通のプライマーが台湾 (CHU et al., 2001) と日本 (OKUDA and HANADA, 2001) で報告された。前者のは L-RNA がコードしている保存性の高い RNA ポリメラーゼ遺伝子の中でも特にウイルス間で共通して保存されている塩基配列部分を

利用するものである。後者ののは既知のトスポウイルスすべてで保存されている RNA 3' 末端の 8 塩基由来の配列と、N タンパク質遺伝子アミノ酸配列の中で保存性の高い部分からの degenerate primer を用いるものである (図-3)。これらのプライマーでは 5 種のトスポウイルスが検出可能であることが既に確認されている。これらのプライマーはその保存性の高さから、検出できることが未確認の他のトスポウイルスも検出可能と期待されている。トスポウイルスの種を決定するためには N タンパク質の配列が重要なので、種の同定には日本のプライマーの方が有効である。

(4) PCR と RT-PCR の改良

濾紙上に試料を置き、押しつぶして汁液を付着させたものをチューブに入れて PCR を行うという Print-PCR (P-PCR) という方法は簡便であるために、RNA ウイルスでも DNA ウイルスでも利用されている (大貫・花田, 2000)。また、ウイルス抗血清をコーティングしておいた PCR チューブにウイルスを吸着させておいてから、PCR や RT-PCR を行う Immunocapture-PCR (IC-PCR) の利用も広く検討されており、特異性や感度の向上に役立っている (WETZEL et al., 1992)。

2 検出

(1) 染色

最も一般的な増幅産物の検出法は、PCR および RT-PCR の産物の一部をとり電気泳動によって分離した後、エチジウムブロマイドで染色して紫外線を照射するという手順で行われており、手数と時間のかかる手法にたよっている。現在、プレキャストゲルに試料を入れるだけ

Potyvirus プライマー 1 (3' 側)

5'-ACGGATCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Potyvirus プライマー 2 (5' 側)

5'-ACGGATCCGGBAAYAAYAGYGGDCARCC-3'

図-2 ポティウイルスの共通プライマー (GIBBS and MACKENZIE, 1997 より)

混合塩基: V=ACG, B=CGT, Y=CT, D=AGT, R=AG. 下線部は BamHI の制限酵素切断部位のために付加したもの。逆転写のときはプライマー 1 のみを使う。

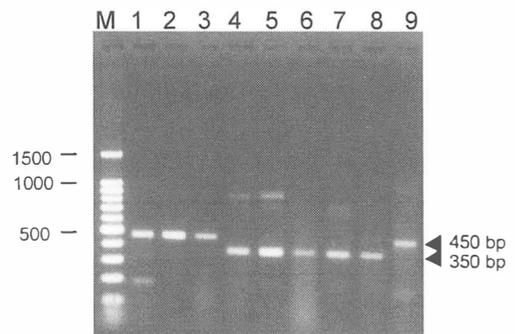


図-3 共通プライマーを用いた RT-PCR によるトスポウイルスの検出 (OKUDA and HANADA, 2001 より) 1~3: TSWV, 4~5: WSMoV, 6~7: MYSV, 8: IYSV, 9: INSV. 5' 側プライマー: 5'-TCIR-DICKIYKRAAIGTCMSRTC-3', 3' 側プライマー (3' T): 5'-GGGGGGGAGAGCAAT-3', 混合塩基: C=A, T, I=ACGT (イノシンで代用), K=GT, M=AC, S=CG,ほかのものは図 2 参照。

で、後は機械がやるという機器も開発されてきているので、今後は効率化が図れることが期待される。

(2) ハイブリダイゼーション

PCR産物の一部をマイクロプレートに吸着させ、プローブと反応させて、その結果を見るという方法も考案されており、上の染色法より検出感度が高い場合もあることが報告されている。多数の検体の結果の解析にはこの方法が簡易であるが、少数検体では手間がかかる。

(3) 蛍光などによる超高感度検出と定量

既にいくつかの機械が発売されているが、特に定量性の高いものは高価である。これによると、PCRの初めの時期から増幅産物を検出でき、診断にかかる時間も短縮できるばかりでなく、どの株・部位などにウイルスがより多いのかも容易に判定できるので、その有用性は高く、植物ウイルスでの利用はこれから進むと思われる。

おわりに

ジェミニウイルスおよびトスポウイルスは、近年になって、世界中で流行して大きな被害をもたらしている。これらのウイルスは純化精製が困難であるために抗血清診断には限界があったが、遺伝子診断のおかげで、その診断は確実にできるようになってきた。また、ほかのウイルスやウイロイドに関しても重複感染した植物から、1組の共通プライマーや多数の個別プライマーを混合して用いた一度のPCR反応で多数のウイルスやウイロイドを検出することが既に可能となっている。複数のウイルスの感染の有無の検定のために複数のプライマーセットを用いるときは、増幅されてくるDNAの大きさが異なるようにプライマーを設計しておけば、電気泳動によってどのウイルスが感染していたかも判定できる。また、複製酵素遺伝子などの配列を利用した科を超える(Super-Family)ウイルスの同時検出用のプライマーの検討も行われるであろうから、将来はわずかな数のプラ

イマーのみを用いることで、植物ウイルスに感染しているか否かを検定できるようになることが期待される。ここでは紹介しなかったが、特に果樹のウイルス様病害の中でウイルス粒子の形態や特性が明らかでないウイルスの場合でも、PCRの利用によってその診断や特性解明が急速に進んできている。また遺伝子診断の高感度性のゆえに、これまでの抗血清を用いた手法では困難であった媒介生物内でのウイルスの動態の解明、伝染環の解明などの疫学的調査などにも、遺伝子診断の技術は大いに役立つであろう。上で紹介したように検出の自動化や機械化も一部で進んでいる。このような情勢の中で、ウイルスやウイロイドのPCRを用いた遺伝子診断技術の利用はますます広がっていくものと思われる。また、long-PCRの利用によって、ポティウイルスのような大きいゲノムをもつウイルスの感染性クローンの作出も容易に行えるようになってきており、遺伝子の塩基配列と遺伝子の機能や病徴との関連解析の効率化が進んできている。今後はPCRの、特に検出段階での迅速化・簡易化、簡便な定量法の開発、酵素類の格段の低価格化が、遺伝子診断のさらなる利用のための重要な課題である。

引用文献

- 1) BRIDDON, R. W. and P. G. MARKHAM (1994): *Mol. Biotechnol.* **1**: 202~205.
- 2) CHU, F. et al. (2001): *Phytopathology* **91**: 361~368.
- 3) DELLAPORTA, S. L. et al. (1983): *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19~21.
- 4) GIBBS, A. and A. MACKENZIE (1997): *J. Virol. Methods* **63**: 6~16.
- 5) OKUDA, M. and K. HANADA (2001): *ibid.* **96**: 149~156.
- 6) 大貫正俊・花田 薫 (1996): *植物防疫* **50**: 102~105.
- 7) ONUKI, M. and K. HANADA (1998): *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **64**: 116~120.
- 8) 大貫正俊・花田 薫 (2000): *九病虫研報* **46**: 54~57.
- 9) 佐藤仁敏ら (1999): *北日本病虫研報* **50**: 65~70.
- 10) ————ら (2000): *同上* **51**: 87~92.
- 11) 島本 功・佐々木卓治 (1997): *新版植物のPCR実験プロトコール*, 秀潤社, 東京, pp. 1~232.
- 12) WETZEL, T. et al. (1992): *J. Virol. Methods* **39**: 27~37.

中央だより

○農業安全使用基準の一部改正について

農林水産省は、食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準(「残留農薬基準」)」に4農薬が追加された

ことから、新たにこれら農薬について「農薬残留に関する安全使用基準」を設定し、平成13年10月1日付で改正した。

アゾキシストロピン剤、TPN剤(殺菌剤)、フルアジホップ剤、フルアジホップP剤(除草剤)