

# 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 <sup>かめ</sup> 亀 <sup>や</sup> 谷 <sup>みつ</sup> 満 <sup>ろう</sup> 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, <sup>32</sup>P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ョウイモではJYMVが広く発生し, それによる被害が大きいため, 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'-CTAGATGACAGTTCGACAAA-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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.93 g  $\text{NaHCO}_3$ /l, pH 9.6) で希釈した40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のウイルス抗体 (IgG) を50  $\mu\text{l}$  入れ, 37°Cに2時間置き, PBS-T (0.02 M PB, 0.15 M NaCl, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , 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)

M 2 Na-EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.4% L-ascorbic acid, 2% polyvinylpyrrolidone, pH 5.8) とともに乳鉢と乳棒で磨砕し, 同じ緩衝液で希釈し, それぞれ 50  $\mu$ l を上記の抗体をつけたチューブに入れた。4°C で1夜静置した後, PBS-T で3回洗浄し, 50  $\mu$ l の滅菌水を入れ, 80°C で5分間処理し, ただちに氷上に2分間置いた。

cDNA の合成: RTG You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech 社) の入ったチューブに抽出 RNA 液 32  $\mu$ l と 20  $\mu$ M プライマー C 2 1  $\mu$ l を加え, 室温に1分間置いた後, 37°C で60分間処理した。

PCR: cDNA 液に 20  $\mu$ M プライマー S 2 1  $\mu$ l, 65  $\mu$ l 滅菌水, 2.5 ユニット AmpliTaq DNA polymerase (PE Applied Biosystems 社) を入れた後, ミネラルオイル1滴を加え, Thermalcycler (ASTECH PC-700) を用いて, 92°C 3分1回, 92°C 1分・57°C 1分・72°C 1分 35回, 72°C 5分1回の条件で PCR を行った。

電気泳動: PCR 産物に GLB (ゲルローディング緩衝液: 0.25% bromophenol blue, 50% glycerol) 3  $\mu$ l を加え, その 10  $\mu$ l を 1.5% アガロースゲルを用いて, 50 V でゲルの 2/3 程度まで泳動した。その後, ゲルを 0.1% エチジウムブロマイド溶液で15分間染色し, 水で洗浄し, 241 bp のバンドの検出を行った。

この方法によりイチョウイモから JYMV の強毒株 (山口株, 愛知株) および弱毒株などすべて検出可能であった。モザイク症状を示す強毒株に感染したイチョウイモの病葉を用いて, 検出感度を調べた。100 mg の病葉に 2 ml の抽出用緩衝液を加えて磨砕し, それを同じ緩衝液で  $10^{-2}$ ~ $10^{-10}$  倍液を調整し, IC-PCR を行った

ところ,  $10^{-8}$  倍まで検出できた (図-1)。同じくムカゴとイモについてはそれぞれ  $10^{-5}$  と  $10^{-6}$  倍まで検出できた。同じ病葉について ELISA と RT-PCR による検定を行ったところ, それぞれ検出限界は 12,800 倍と 10,240 倍希釈であった。この結果から, イチョウイモにおける JYMV については, IC-PCR の検出感度は ELISA より約 8,000 倍, RT-PCR より約 10,000 倍高いことが示された。

## II PCR-RFLP による JYMV の強毒株と弱毒株の判別

イチョウイモにおける弱毒ウイルスによる強毒株に対する干渉効果の判定は明瞭な病徴の発現の有無によっていたが, 病徴の発現には長期間を要する。また, ELISA や RT-PCR による強毒株と弱毒株の判別も不可能である。そこで, PCR 産物の RFLP による判別の可能性について検討した。

PCR 産物 (241 bp DNA) を QIAquickPCR 精製キット (QIAGEN 社) で精製した後, JYMV の愛知株のシーケンス (FUJI and NAKAMAE, 1999) をもとに利用可能と考えられた4種類の制限酵素 (*Fok* I, *Mbo* II, *Sau* 3 AI および *Tsp* 509 I) で消化し, 4% メタファーアガロースゲル電気泳動し, バンドパターンを調べた。その結果, *Tsp* 509 I を用いた場合に, 強毒株と弱毒株のバンドパターンに大きな差異が認められた (図-2)。他の3種制限酵素では差異が見られなかった。

PCR 産物における *Tsp* 509 I の認識部位が強毒株と弱毒株で異なることが示唆されたので, 両者の 241 bp

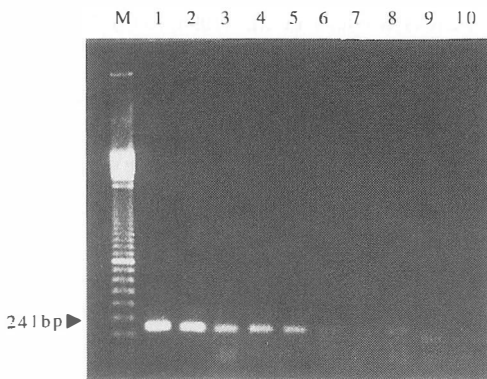


図-1 イチョウイモのモザイク病葉からの IC-PCR による JYMV の検出

M: マーカー, レーン1~10: 病葉の1~10倍希釈液。

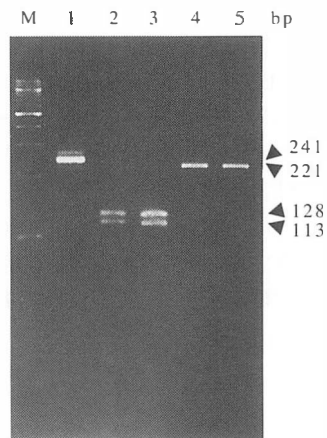


図-2 IC-PCR 産物の制限酵素 *Tsp* 509 I を用いた RFLP による JYMV の強毒株と弱毒株の判別

M: マーカー, レーン1: IC-PCR 産物 (241 bp), レーン2・3: 山口強毒株, レーン4・5: 弱毒株。

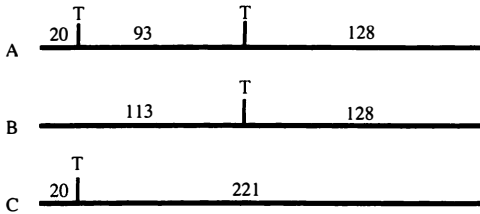


図-3 JYMV 分離株の IC-PCR 産物 (241 bp DNA) における制限酵素 *Tsp* 509 I の認識部位 (AATT) の位置

A: 愛知強毒株, B: 山口強毒株, C: 弱毒株.

DNA を pT7 Blue (R) ベクター (Novagen 社) にクローン化し、塩基配列を調べた。その結果、*Tsp* 509 I 認識部位 (AATT) の位置が両者で異なっており、既報の愛知株とも一部異なっていた (図-3)。この結果は、PCR-RFLP のバンドサイズとも一致していた。

PCR-RFLP はこのように強毒株と弱毒株の判別が可能であり、早期に干渉効果の判定ができるだけでなく、種イモにおける強毒ウイルスの有無を検定することにより一層安定した防除効果が期待できると考えられる。

## おわりに

以上述べたように、イチョウイモから IC-PCR により JYMV が高感度で検出され、さらにその PCR 産物

の RFLP により強毒株と弱毒株の判別も可能であった。このことは塩基配列の解析から、*Tsp* 509 I の切断認識部位の位置が強毒株と弱毒株で異なることによるものである。

近年、多くのウイルスについて塩基配列が解明されてきており、この塩基配列が系統間で部分的に異なっていれば、それぞれに特異的なプライマーを作製することにより、系統を特異的に検出することも可能である。また、今回の JYMV のように RFLP により系統を判別することもでき、今後いろいろな場面で利用されるであろう。

弱毒ウイルスと強毒ウイルスの差異は病徴発現の有無であるが、弱毒ウイルスの強毒ウイルスに対する干渉効果の判定も病徴を発現するかどうかによっている。しかし、永年作物などでは結果の判定までに長期間を要することが一般的であり、このような場合強毒ウイルスに特異的なプライマーを用いた RT-PCR によるか、PCR-RFLP により判別することができれば早期に判定でき、大いに役立つと考えられる。

## 引用文献

- 1) FUJI, S. and H. NAKAMAE (1999): Arch. Virol. 144: 231~240.
- 2) 藤 晋一・中前 均 (1999): 日植病報 65: 207~210.
- 3) 大貫正俊・花田 薫 (1996): 植物防疫 50: 102~105.
- 4) ROWHANI, A. et al. (1995): Phytopathology 85: 347~352.
- 5) WETZEL, T. et al. (1992): J. Virol. Meth. 39: 27~37.

## 書評

植物の寄生体たち  
——植物病理学の挑戦——  
岸 國平 著  
(株)八坂書房 刊  
254 頁, 本体 2,400 円

本書は自然科学を身近に感じさせてくれる優れて有益な啓蒙の書である。「ゆとり教育」の名の下に「総合学習」の時間が設けられる一方で、学力低下が懸念される昨今、二十一世紀の科学立国を担う我が国の青少年にぜひ薦めたい本である。

話題は植物と寄生体との係わりであるが、生物学全般についても興味をそるよう書かれており、自分も生物学を、生命とは何かを調べて (研究して) みたいという気を起こさせる本である。

植物病理学では一般的な専門用語である「寄生者」を、今や市民権を得た「寄生体」という横文字に置き換えたことがこの本の成功のカギである。寄生体と宿主 (宿主または寄主) との関係は①人間の食料との関係において歴史を変えるほどの力を持つ寄生体②植物 (作物) に病気を起こす病原菌としての寄生体

③宿主と共生し、生き残りをかけて生活しているパラサイトの3部構成とし、それぞれに7話, 6話, 9話を配している。どこから読んでもよいようにできている。

植物病理学の中でも理解の難しいサビ病菌の一生や病原性の変化などが例を挙げてわかりやすく解説されている。また寄生体が植物の根毛から進入する説明では、植物の根や篩管の構造が解説され、植物組織学の理解を深めてくれる。さらに、研究は自然界の疑問を解き明かしていく楽しさを味わわせてくれる一方、人間がこれまでに明らかにした部分はほんのわずかで、わからないことがまだ山ほどあることに気づかせてくれ、自分も挑戦してみようという勇気を奮い起こさせてくれる。また、寄生体が自らを守るために必死の努力をしている場面に接し、これ以上寄生体の生活を暴きたくなくとも述べている。即ち、植物病理学者としてのプロの目と素人の目の間を自在に動き回る著者の視線が斬新であり、自然と人間を見る目のやさしさが読む者の心をなごませてくれる。

研究の進め方、困難に直面したときの対処法についても著者の見解が示されており、研究者が読んで示唆に富む本である。一読をお薦めしたい。(山口 昭)