

我が国に発生する主要なブドウウイルスの 遺伝子診断法

農業技術研究機構果樹研究所
ブドウ・カキ研究部

なか うちね りょう じ
中 畝 良 二

はじめに

ブドウウイルス病は樹勢や光合成に影響し、収量の低下、糖度や色など品質低下の原因となる重要な病害である。近年、海外で多くの種類のブドウウイルスが報告されているが、我が国におけるブドウウイルス病の発生実態やウイルスと病徴および被害との関係には不明な点が多く残されており、ウイルス病対策も立ち後れているのが現状である。ウイルス病対策を効果的に進めるためには、ウイルス病の確実な診断が不可欠である。これまでの我が国におけるブドウウイルス病の診断は、主にウイルス抗血清を用いたエライザ法と指標植物を用いた生物検定法で行われてきた。しかし、エライザ法では良質のウイルス抗血清が必要であり、生物検定法では診断までに数年の観察を要するうえ判定が難しいなどの問題点がある。近年、植物RNAウイルスの検出にRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) が広く利用されている。RT-PCRは逆転写反応(RT)でRNAからcDNAを合成し、PCRで目的のウイルスに由来するcDNAを増幅・検出する方法であり、上記のような従来の方法と比べ迅速かつ高感度な診断が可能である。本稿では、RT-PCRを利用したブドウウイルス病の診断法とその問題点について紹介する。

I 対象ウイルスとプライマーの設計

世界的に保毒率(感染率)が高いウイルスやこれまでに国内で発生が認められているウイルスの中から、ブドウ葉巻随伴ウイルス(GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3)、ブドウAウイルス(GVA)、ブドウBウイルス(GVB)、Grapevine fleck virus (GFkV)、ブドウファンリーフウイルス(GFLV)、*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) およびブドウえそ果ウイルス(GINV)の9種類を診断の対象として選んだ(表-1)。各ウイルスに対するプライマーはデータベースに登録されている塩基配列をもとに塩基配列解析ソ

表-1 対象ウイルス

ウイルス	属	性状
GLRaV-1	<i>Ampelovirus</i>	ひも状, 一本鎖 RNA
GLRaV-2	<i>Closterovirus</i>	ひも状, 一本鎖 RNA
GLRaV-3	<i>Ampelovirus</i>	ひも状, 一本鎖 RNA
GVA	<i>Vitivirus</i>	ひも状, 一本鎖 RNA
GVB	<i>Vitivirus</i>	ひも状, 一本鎖 RNA
GFkV	<i>Maculavirus</i>	球状, 一本鎖 RNA
GFLV	<i>Nepovirus</i>	球状, 一本鎖 RNA
GRSPaV	<i>Foveavirus</i>	ひも状, 一本鎖 RNA
GINV	<i>Trichovirus</i>	ひも状, 一本鎖 RNA

フト GENETYX (Software Development Co., LTD) を使用して選定した。プライマーの選定に当たっては、9種類のウイルスを同一条件のRT-PCRで検出できるようにGC含量やTm値に配慮した。それぞれのウイルスに対して複数のプライマーを設計し、増幅効率や特異性の高いものを選抜した。後述するように、現在もプライマーの改良を続けているため、本稿ではプライマー配列の紹介は控えさせていただく。

II サンプル調製法

診断法の第一条件は、検出感度と精度の高さ(確実性)であるのはいうまでもないが、同時に、低コスト(経済性)で多くのサンプルを効率的に取り扱える方法(簡便性)であることも求められる。筆者らは、MINAFRA and HADIDI (1994)の方法を改良し、図-1に示す簡便なサンプル調製法を考案した。対象のブドウウイルスは師部組織に局在するものが多い。そこで、取り扱いの容易さや検出感度を考慮し、樹皮(師部組織)や葉柄を診断に供試している。師部組織は一年を通して診断に適しているが(LING et al., 2001)、葉柄(葉)を用いる場合には、生育初期のものより、ある程度成熟したものを使用の方がよいとされている(CHEVALIER et al., 1995; LING et al., 2001)。また、植物体内でウイルスが偏って存在している可能性を考慮し、一本の樹について異なる数か所からサンプルを採取することが望ましい。ブドウ試料の磨砕には乳鉢・乳棒等を使っても構わないが、多くのサンプルを取り扱う場合には多大な時間と労

Molecular Diagnosis of Grapevine Viruses Occurred in Japan. By Ryoji NAKAUNE

(キーワード:ブドウ, ウイルス, RT-PCR, 遺伝子診断)

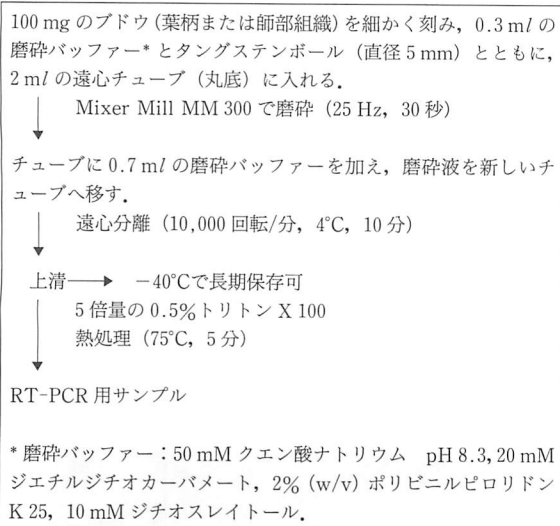


図-1 ブドウウイルス診断用サンプルの調製法

力を要してしまう。筆者らは、核酸抽出用細胞破砕機 Mixer Mill MM 300 (QIAGEN) をブドウ試料の磨砕に応用しており、これにより最大 48 サンプルを均一条件で短時間のうちに調製することができる。通常、RNA の抽出・精製には慎重な実験操作が必要とされるが、本法はブドウサンプルの磨砕液を界面活性剤存在下で熱処理し、溶液中のウイルス粒子からウイルス RNA を露出させ、その RNA を RT-PCR に使用するので、調製中のサンプルを低温に維持すること以外に慎重な操作は要求されない。また、サンプルを長期間保存できることも本法の利点の一つであり、熱処理前のサンプルを -40°C で保存し、数年間にわたりポジティブコントロールとして使用しているが全く問題ない。以上が、筆者らが考案したサンプル調製法の概略であるが、本法はブドウウイルスに限らず、多くの植物ウイルスの診断に応用可能であると思われる。

III RT-PCR

RT 反応には目的に応じて 3 種類のプライマー (特異的プライマー、ランダムプライマー、オリゴ dT プライマー) が使用される。筆者はそれぞれのプライマーを試験し、現在はランダムプライマー (6 mers) とオリゴ dT プライマー (16 mer) を混合して RT 反応に使用している (中畝ら, 2002 a)。対象とする 9 種のウイルスには、ゲノム RNA の末端構造 (ポリ A 配列の有無) が異なるものが混在しており、上記両プライマーの混合使用によって科や属の異なるウイルスの RNA から効率的に cDNA が合成されているものと考えられる。それ

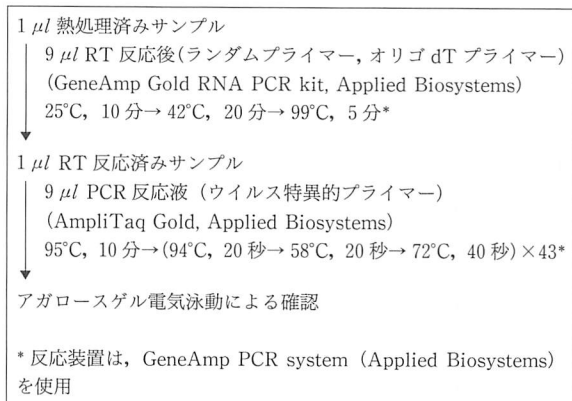


図-2 RT-PCR の基本的流れ

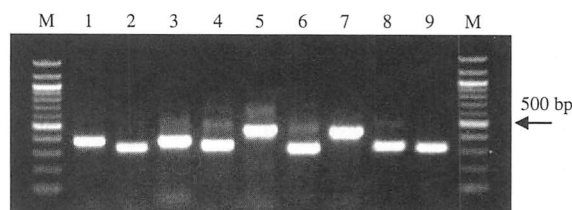


図-3 RT-PCR による 9 種ブドウウイルスの検出

RT-PCR 後の反応液の半量を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色した。レーン 1: GLRaV-1, 2: GLRaV-2, 3: GLRaV-3, 4: GVA, 5: GVB, 6: GFkV, 7: GFLV, 8: GRSPaV, 9: GINV, M: 100 bp ラダーマーカー。

ぞれのプライマーを単独で使用した場合や、ウイルス特異的プライマーを使用した場合と比べ、結果の再現性や検出感度において優れているようである。本法では複数のウイルスについての RT 反応を同時に行うことができるため、特異的プライマーを使用する方法に比べ、試薬等にかかるコストを大幅に低減できる。RT 反応後の PCR には、目的のウイルスに特異的なプライマーをそれぞれ個別に使用し、図-2 に示す同一反応条件で各ウイルスともよい結果が得られている (図-3)。ただし、本法に限らず、PCR は使用する試薬の種類や組成、反応装置の性能等に影響されるので、それぞれに最適な反応条件を検討する必要がある。さらに、各ウイルスに感染したブドウ試料から図-1 に示す方法で調製したブドウ磨砕液を 2 倍段階希釈 (200~25,600 倍) し、RT-PCR の検出限界を調査した。その結果、各ウイルスとも、数千倍以上に希釈したブドウ磨砕液から検出可能であり、後述するような変異系統株の問題が残されているものの、10~1,000 倍希釈程度のサンプルを用いることで安定した診断ができるものと考えられた。本法では約

半日で診断(サンプル調製から検出まで)でき、にエライザ法(2~3日)や生物検定法(数か月~数年)と比べ、極めて迅速な診断が可能になった。以上から、本稿で紹介したRT-PCRによるブドウウイルスの診断法は、高い検出感度、操作の簡便性および経済性を兼ね備えた優れた方法であると判断された。

本稿で紹介したRT-PCR診断で、筆者らは、これまでに100本を超えるブドウからウイルスを検出している。その中でもGRSPaVが国内のブドウに広く感染していることが明らかになった。これまでGVAやGVBが原因ウイルスと考えられていたコーキーバークやステムピッチング等のいわゆるルゴースウッド症状を示す樹から高頻度でGRSPaVが検出され、本症状と深く関わっている可能性が示唆されている(中畝・中野, 2002b)。本法を用いて、これまで国内では知られていなかったウイルスについても診断できるようになり、ウイルスと病徴や被害との関連が次第に明らかになるものと期待される。

IV 確実な診断のために

筆者らが対象にしている9種類のブドウウイルスそれぞれについて、RT-PCR増幅断片の塩基配列相同性を比較したところ、すべてのウイルスで変異が認められ(表-2)、特にGVAとGRSPaVでは著しい変異が確認され、一部のGVA分離株で診断結果に影響するほどの変異が認められた(図-4)(中畝ら, 2002a)。このことは、現在使用しているプライマーでは検出できない変異株が存在する可能性を示唆している。PCRによる遺伝子診断を行う上でプライマーの配列は最も重要な要素であり、複数のプライマーの組み合わせの中から検出感度や再現性に優れたものを使用しているが、それでも検出漏れの懸念があることは否めない。最近、GLRaV-1において、複数の分離株の塩基配列相同性が調べられ、変異の頻度が遺伝子の読み取り枠によって異なることが明らかになっている(LITTLE et al., 2001)。このような情報に基づいて、塩基配列がよく保存されている領域を検出するプライマーに改良していくことで、多くの変異株を網羅した高精度な診断が可能になると考えられる。そこで、ディジェネレートプライマー等を利用し、一つでも多くの分離株・変異株を調査することが重要となる。ディジェネレートプライマーを利用したPCRは、変異株の検出には有効であり、ブドウウイルスについても同属や近縁のウイルスを検出する方法として報告されている(ROUTH et al., 1998; SILDARELLI et al., 1999; SABANADZOVIC et al., 2000; WETZEL et al., 2002; DOVAS and KATIS,

表-2 RT-PCR断片の塩基配列相同性

ウイルス	相同性
GLRaV-1	85.6~91.6%
GLRaV-2	97.3~99.4%
GLRaV-3	91.3~99.1%
GVA	76.6~94.4%
GVB	82.9~87.0%
GFkV	91.3~97.3%
GFLV	88.5~92.4%
GRSPaV	79.8~99.7%
GINV	98.1~99.4%

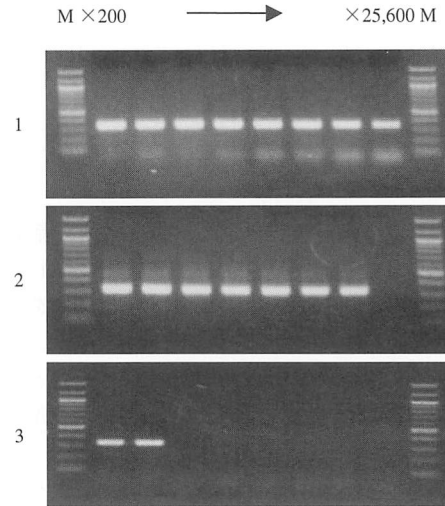


図-4 GVAの検出限界調査

GVA感染ブドウサンプルを2段階希釈し、RT-PCRの検出限界を調査した。ほとんどのサンプルで 10^4 希釈以上の検出感度が得られたが(写真1および2)、表-2における相同性76.6%の分離株では検出感度・再現性ともに低かった(写真3)。

2003)。

一方で、PCRの感度と特異性を上昇させる簡単な方法としてnested PCRが広く利用されており、ブドウウイルスの診断においても、その有効性が報告されている(HABILI and SYMONS, 2000; NOLASCO et al., 2000; LING et al., 2001)。nested PCRはPCR反応後の反応液を鋳型として再度PCRを行うもので、最初のPCRで目的の配列がわずかでも増幅されていれば非常に有効な手段となる。筆者らも、GRSPaVの診断や診断結果に不安のある場合に利用している。また、GLRaV-3やGVAなどウイルス抗血清が利用できるウイルスでは、抗体で補足したウイルスをRT-PCRで検出するimmunocapture RT-PCRが検出感度を上昇させる方法として利用されている。利用できる抗血清があれば、特別な装置も必

要とせず、強力な診断技術となることが示されている (MINAFRA and HADIDI, 1994; LING et al., 2001)。

以上に、PCRの問題点とともに、確実な診断に向けた診断方法について述べたが、これらの方法はPCRが基本技術であり、塩基配列解析に基づいて合理的なプライマーを設計することが重要であることに変わりない。今後、診断を通して検出されたウイルスの塩基配列を解析し、海外で報告されたデータ等も取り入れながら、診断法を改良していく必要がある。

おわりに

2003年9月にイタリアで開催される第14回ICVG (筆者参加予定)におけるブドウウイルス病の診断技術に関するセッションでは、複数のウイルスを同時に検出するmultiplex RT-PCRや植物体内のウイルスを定量的かつ高感度で検出できるTaqMan assayまでRT-PCRを基盤とする診断技術が多く紹介される予定であり、今後、RT-PCRによる診断の確実性及び簡便性の向上が期待される。上述した通りRT-PCRによるブドウ

ウイルス診断法には問題点が多く残されており、今後の診断においてもエライザ法や生物検定法を併用していくことが重要であろう。ブドウウイルス病対策の第一歩は事前のウイルス診断によって健全母樹・無毒苗を育成・使用することであり、そのためにも診断技術の向上を図ることが重要である。

参考文献

- 1) CHEVARIER, S., et al. (1995) : J. Phytopathol. 143: 369~373.
- 2) DOVAS, C. I. and N. I. KATIS (2003) : J. Virol. Methods 107: 99~106.
- 3) HABIL, N. and R. H. SYMONS (2000) : Extended abstracts 13th ICVG Meeting, pp. 124~126.
- 4) LING, K. et al. (2001) : Am. J. Enol. Vitic. 52: 21~27.
- 5) LITTLE, A. et al. (2001) : Virus Research 80: 109~116.
- 6) MINAFRA, A. and A. HADIDI (1994) : J. Virol. Methods 47: 175~188.
- 7) 中畝良二ら (2002 a) : 日本植物病理学会報 68: 97
- 8) 中畝良二・中野正明 (2002 b) : 同上 69: 66
- 9) NOLASCO, G. et al. (2000) : Extended abstracts 13th ICVG Meeting, pp. 127~128.
- 10) ROUTH, G. et al. (1998) : Phytopathology 88: 1238~1243.
- 11) SABANADZOVIC, S. et al. (2000) : Arch. Virol. 145: 553~565.
- 12) SALDARELLI, P. et al. (1999) : Eur. J. Plant Pathol. 104: 945~950.
- 13) WETZEL, T. et al. (2002) : J. Virol. Methods 101: 63~69.

書評

農業と食：安全と安心

—農業の安全性を科学として考える—

梅津憲治 著 A5版 187ページ

定価本体 2,500円＋税

(発行日：平成15年9月10日；2版10月15日)

(株)ソフトサイエンス社発行 ISBN4-88171-106-7

「農業や化学肥料が環境汚染の源であり、食生活の上でも国民の健康に悪影響を及ぼしている」という認識が一般になされている。事実なのか情緒的結論なのか、著者はこれを問うている。まず農業の定義、歴史、分類にふれている(第1章)。「農業」は農業取締法で定義されているが、一般には異なる理解があり、さらに、海外でれっきとした農業であっても日本では登録されなければ農業ではないので、「農業」が何を指すかは注意を要する。一般にはそもそもなぜ農業を使わねばならないかについて、人口、食料、自給問題を踏まえた認識が不足している(第1, 9章)。安全性確保・登録のプロセスの解説(第3章)からは、農業の毒性試験が極めて高い薬量で行われ、その場合の毒性が発現しない極めて低いレベルに残留基準値が定められていること、農業の農産物中の残留実態(第4章)は、検出される場合が1%程度、基準値を超えるのはそのまた何分の1に過ぎないことが理解されよう。ある農業の健康影響は、個々の農産物での残留値でなく、農産物からの総摂取量がADI(人体1日摂取許容量)を下まわるか否かであり、実状はADIの数%に過ぎない。一方これまで見逃されがちだった食物中の天然毒物について農業との相対比較を行っているが(第5, 6章)、これらの事実からいえることは、天然物、有機ないし無農薬栽培農産物は安全、農業ないし農

薬使用産物は危険とする神話の崩壊である(第7章)。それにもかかわらず無農薬、天然物に関する消費者、生産者の牢固として抜きがたい思い込みはどこから出てくるのであろうか。著者は科学的見地からの安全と消費者の心情的安心の橋渡しとしてのリスクコミュニケーションの役割を重視している(第2, 13章)。このところBSE、無登録農業使用、基準値を超えた輸入農産物などを契機として農業取締法が改正され(第12章)、また食品安全委員会が設置された(第3章)。これにより国民の健康を守る仕組みが極端なまでに強化されたが、一方安全パニックへの対応に追われ、健全な安全理解への取り組みはなおざりにされていないだろうか。それにしても登録農業については、膨大な安全性試験と厳重な登録システム、問題にならない農業残留という厳然たる事実により安全性が確保されていることを認知している一方、合成農業が農産物、環境を汚染しているという前提に立つような環境保全型農業という行政の旗ふりに著者は疑問をなげかけている(第10章)。さらにゴルフ場農業問題(第8章)、内分泌攪乱物質問題(第11章)などについてマスコミ・行政が農業悪玉論に便乗することなく、建設的な役割を果たしてくれることを期待している。最後の第14章は、著者が関与した講演会で受けたもろもろの質問に答える形で、やさしく解説している。著者は化学農業オンリーの農法を弁護しているのではない。必要に応じて化学農業を使用し、総体的に農業の使用を削減するという減農薬やエコ栽培にもあい通じる農法を念頭においている。企業人である一方、日本農業学会の副会長をつとめ、学術と実務の両面に通暁した著者による本書を、時宜をえた啓蒙書として強く推薦するものである。

(山本 出 東京農業大学名誉教授)