

ウリ類退緑黄化ウイルス抗血清の開発と診断方法

中央農業総合研究センター 久保田 健 嗣

はじめに

ウリ類退緑黄化ウイルス (Cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV) はメロン, キュウリ, スイカ等のウリ科作物に感染して, 葉の黄化および果実品質・収量の低下を引き起こす。CCYV の発生は 2004 年に熊本県のメロンで初めて確認されて以来, 国内で急速に分布域を拡大し, 2009 年までに九州全県および中国, 四国, 関東の計 14 県で確認されるまでに至っている (行徳, 2008) (図-1)。CCYV は *Closteroviridae* 科 *Crinivirus* 属 (以下クリニウイルス) の RNA ウイルスであり, タバココナジラミによって媒介される。特にタバココナジラミのバイオタイプ Q は薬剤耐性を獲得し, 難防除害虫として各地で問題となっていることから, 今後の本ウイルスの分布拡大が懸念されている。

CCYV の感染による病徴は, 葉に退緑または黄色の小斑点が多数発生し, それが徐々に拡大し融合して黄斑となり, 最終的に葉の全面が黄化する。黄化は感染株の下葉から上位葉に進展する。メロンとキュウリでは葉の黄化のみでモザイクやえそは起こらないが, スイカでは黄化に加えてえそが生じる。CCYV の病徴は, メロン黄化えそウイルス (MYSV) などの他のウイルスによる病徴と類似する点が多く, 肉眼のみで識別するのは困難である。また, 圃場で栽培中の作物を診断する場合, 他の病害も併発していることが多いため, CCYV の発生が疑われた場合の確定診断には RT-PCR や DAS-ELISA 等の診断法を用いることが望ましい。

CCYV の診断法としては, 行徳ら (2009) が報告したウイルス RNA 上の HSP70h 遺伝子領域を RT-PCR で増幅して検出する方法が広く普及している。しかし, DAS-ELISA などの血清学的な手法を用いた簡便な診断法は未開発であった。そこで筆者らは, CCYV に対する抗血清を作製し, DAS-ELISA 用の検定試薬を開発することにした。この試薬は今年 4 月から日本植物防疫協会より販売されている (<http://www.jpapa.or.jp/>)。

(kenkyusho/virus_html/ccyv.htm)。

本稿では DAS-ELISA 試薬開発までの経緯を紹介するとともに, この試薬を用いて CCYV の診断を行う際の留意点を述べたい。

I ウリ類退緑黄化ウイルス抗血清の開発

CCYV などのクリニウイルスに共通する特徴として 2 本のゲノム RNA を有し, ひも状粒子を形成すること, コナジラミ媒介性であることに加え, 植物体内では節部局在性を示し, 体内ウイルス濃度が極めて低いことが挙げられる。

植物ウイルスに対する抗血清を作製するためには, 感染植物からウイルス粒子を純化し, これをウサギなどに注射して得る方法が一般的である。しかし CCYV は植物体内のウイルス濃度が低いため, 抗原として十分な量の純化ウイルスを得ることが困難であることが予想された。そこで筆者らは, 他のクリニウイルスにおける抗血清の作製事例を参考とすることにした。クリニウイルスでは, 大腸菌による組換えタンパク質発現系を利用してウイルスタンパク質を作製し, これを免疫源として抗血清を得て, DAS-ELISA などに使用することに成功した例がある。例えば, 地中海沿岸諸国と北アメリカでウリ科野菜に大きな被害を与えている *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) は, CCYV と同じくタバココナジラミ媒介性のクリニウイルスである (WISLER et al., 1998)。CYSDV の外被タンパク質 (CP) に, グルタチオン-S トランスフェラーゼ (GST) またはヒスチジン (His) タグを付加した組換えタンパク質は, ウサギに注射することで特異性の高い抗血清を作製することが可能であった (LIVIERATOS et al., 1999; HOURANI and ABU-JAUDAH, 2003; COTILLON et al., 2005)。

筆者らもこれらにならない, CCYV の CP を大腸菌で発現させることを試みた。融合タンパク質の精製度を高めるため, CP の N 末端に GST を, C 末端に 6xHis タグを付加することにした。CCYV の CP 遺伝子 (OKUDA et al., 2010) を増幅するプライマーを設計し, 感染キュウリ葉の全 RNA を鋳型とした RT-PCR によって CP の全長 ORF を増幅した。その際 3' 側のプライマーには 6xHis タグをコードする配列を付加した。増幅産物を, GST 融合タンパク質発現用のベクターである pGEX-

Immunodiagnosis of Cucurbit chlorotic yellows virus Using Antiserum Against Its Recombinant Coat Protein. By Kenji KUBOTA

(キーワード: CCYV, DAS-ELISA, 退緑黄化病, キュウリ, スイカ, メロン)

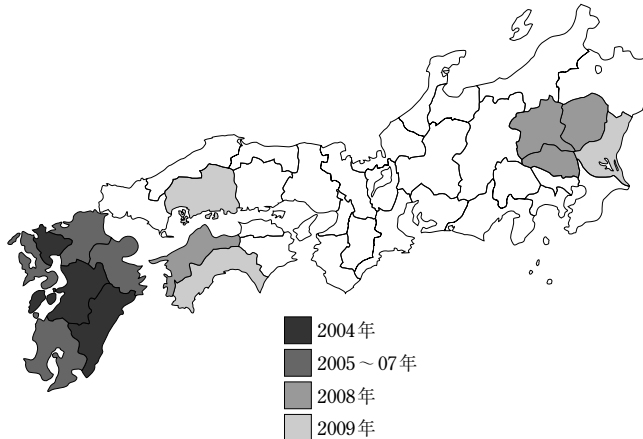


図-1 CCYVの発生分布状況

2010年9月までに14県で確認。各県の病虫害発生予察特殊報をもとに作成。

6P-1 (GEヘルスケア社)のGST遺伝子の下流に挿入して、発現ベクターを作製した。このプラスミドを大腸菌BL21株に導入し、IPTGで発現を誘導後、大腸菌を破碎し、可溶性タンパク質を得た。大腸菌で発現した組換えタンパク質は不溶性の封入体となり可溶化が困難となる場合もあるが、今回はそのような問題はなかった。可溶性タンパク質はグルタチオンカラム (GEヘルスケア社)を用いて精製し、さらにNi-NTAレジン (キアゲン社)で精製して、融合タンパク質を得た。融合タンパク質は通常はThrombinなどのプロテアーゼでGSTと目的タンパク質の間を切断し、GSTを除去してからウサギへの免疫に使用するが、今回はGST融合タンパク質のまま免疫に用いた。得られる抗血清にはGST (日本住血吸虫由来)に対する抗体も含まれることになるものの、後述するようにCCYVの検出診断に支障は来さなかった。

また、免疫するウサギ個体の中には、もともとメロンやキュウリ葉のなんらかのタンパク質に反応してしまう抗体をもつものがあると考えられ、このような個体の抗血清を用いてDAS-ELISAを行うと非特異反応が出やすくなるのが懸念された。そこで、ウサギ5個体から免疫前の血清を少量採取し、健全なメロンおよびキュウリ葉のサンプルに対してウェスタンブロットを行って、反応の最も低い2羽を選択して免疫に用いた。

得られた抗血清の反応性や特異性を確認するため、最初にウェスタンブロット解析を行った。CCYVに感染したメロンとキュウリ葉のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、メンブレンにブロットし

て、1次抗体に抗CCYV抗血清、2次抗体に抗ウサギIgG抗体を用いて検出したところ、CCYV CPに相当する約30 kDaの位置に明瞭なバンドが現れ、ほかに非特異的なバンドは認められなかった。また、メロンにおいて黄色小斑点の葉と、症状が進展して完全に黄化した葉とを比較したところ、CPの蓄積量は小斑点葉のほうが多かった。CCYVに近縁のビートシュードイエロースウイルス (BPYV)に感染したキュウリ葉ではバンドが生じず、抗血清はCCYVに特異的であった。

次に、作製した抗血清がCPをまとったウイルス粒子とも反応するかを確かめるために、免疫電子顕微鏡観察を行った。免疫電顕では、ウイルス粒子に反応性のある抗血清を処理すると、粒子の周りを抗体分子が覆うように結合して粒子像が太く見える。この現象は「デコレーション」と呼ばれている。電顕観察用グリッドのフォルムボール膜を免疫前血清または抗CCYV抗血清の1,000倍希釈液で処理して抗体を吸着させておき、そこにCCYV感染葉の磨砕液を処理してから電顕で観察した。一視野内に観察されるウイルス粒子の数は、抗CCYV抗血清では免疫前血清に比べて50倍以上多かった。また、グリッドに吸着されたウイルス粒子にさらにCCYV抗血清を処理すると、抗体分子が吸着して覆われた太いウイルス粒子像が得られた。このことから、本抗血清は遊離したCPだけでなく粒子中のCPとも反応性を有することが確認された。

クリニウイルスは植物体内では維管束の篩部に局在することが知られていることから、CCYVも篩部局在することが予想された。実際に、カミソリで切断したCCYV

感染メロン葉柄の断面をナイロンメンブレンにブロットし、ウェスタンブロットと同様に免疫染色を行ったところ、維管束部分だけでシグナルが得られたことから、CCYVも同様に節部局在性であることが支持された。

以上三つの結果から、本抗血清はCCYVのCPに特異的に反応することが明らかとなり、DAS-ELISA法による診断にも応用可能であると期待された。

II CCYV 抗血清を用いた DAS-ELISA による診断

本抗血清を農業現場での診断に使えるようにするため、DAS-ELISA 試薬の作製を試みた。抗血清から精製したIgG画分をコーティング抗体とし、さらにアルカリフォスファターゼ (AP) で標識してコンジュゲート抗体とした。この検出試薬を用いて、CCYVの診断に適したDAS-ELISAの条件を検討した。我々が基本的に用いたプロトコルの概略を図-2に示し、結果の1例を図-3に示す。

現地キュウリ圃場で採取したCCYV感染キュウリ葉のサンプルは、健全葉より数倍高い吸光値を示した。サンプルは葉の10倍量のPBST中で磨砕した遠心上清と、それをさらに希釈した100倍と1,000倍で行った。10倍では健全葉より明瞭に高い値となったが、100倍ではかなり低くなり、1,000倍希釈では差がほとんどなく検出困難となった。これはCCYVの植物体内濃度が低いためと考えられ、実際の検定には10倍程度の希釈が操作性からも適当と思われた。

サンプリングに適した葉としては、完全に黄化している葉よりも、まだ黄色斑点症状を示している葉のほう

が、メロン、キュウリともに高い値を示した (図-3)。同様の結果はCYSDVでも報告されており (COTTILON et al., 2005), 診断には斑点症状を呈する葉を用いたほうが高い感度で検出できると思われた。

CCYVは節部に局在するが、葉脈を多く含むようにカミソリで切り分けてサンプリングするとDAS-ELISAでの吸光度は低下する傾向が認められた。これは徒手で切り分けられるサイズの葉脈は節部以外のウイルスを含まない細胞のほうが多く、相対的なウイルス濃度は低いためと思われる。また、1枚の葉面の中でウイルスの分布が偏っている例もまれに見受けられたので、できれば1枚の葉からは数箇所切り取って用いることが望ましい。なお、サンプリングした葉は-80℃で凍結保存すれば3か月間は問題なく用いることができ、約2年半保存したメロン葉からも検出が可能であった (山崎修一氏, 私信)。

次に、感染葉を磨砕するバッファの検討を行った。クリニウイルスであるCYSDVのELISA検出に用いられた磨砕バッファ (HOURLANI and ABOU-JAWDAH, 2003) と、同じくクリニウイルスのTomato chlorosis virus (ToCV) と Tomato infectious chlorosis virus (TICV) に感染したトマト葉のDAS-ELISAに用いられたバッファ (JACQUEMOND et al., 2009) を参考として、(A) PBST (1x PBS, 0.05% Tween-20), (B) 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), (C) 0.5M tri-sodium citrateの3者を比較した。いずれも健全葉からの非特異的反応はなかったが、感染葉ではAが最も高い吸光度を示し、B

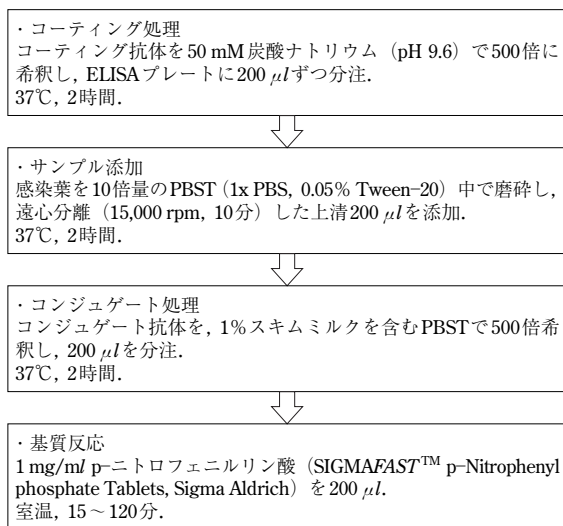


図-2 DAS-ELISA法の条件検討に用いたプロトコル

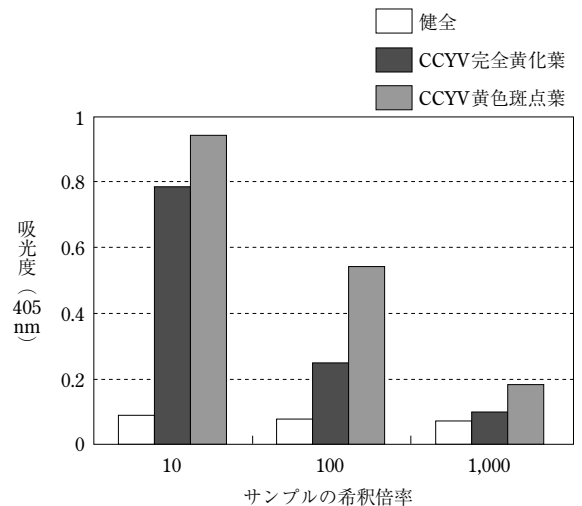


図-3 CCYV感染キュウリ葉のDAS-ELISA結果
基質反応を室温で1時間行った後、吸光度を測定した。2ウェルの平均値。

はその約7割, Cは約6割にとどまった。したがって、磨砕バッファーにはPBSTが最適と判断された。

I章で述べたBYPVは, CCYVに近縁の国内発生クリニウイルスである。オンシツコナジラミで媒介され、関東の一部のキュウリ圃場ではCCYVと混発しているが、両者の病徴は酷似しており、肉眼で区別することはできない。ウェスタンブロットの結果と同様に、本試薬でBYPV感染キュウリ葉に対してDAS-ELISAを行っても交差反応は全く認められなかったことから、BYPVとCCYVの識別用途にも利用可能と判断された。

検出試薬によるDAS-ELISAが実施可能であったので、さらに実用性の評価を行うことにした。現場からのもち込みサンプルを実際に検定することが想定される県農業試験研究機関の病害担当者に協力を仰ぎ、検出試薬を試用していただいたところ、おおむね、非特異反応が少なく実用性の高い試薬に仕上がっているとの評価をいただいた。ただしやや気になる点としては、病徴の不明瞭なサンプルでは検出できない場合があること、実施例が1例のみであるがスイカではメロン・キュウリと比較して吸光度がやや低いこと等があり、検定にあたっては磨砕する際に10倍希釈未満にするなどの工夫を必要とするかもしれない。

おわりに

DAS-ELISA法によるウイルス診断は、RT-PCR法よりも検出感度は劣る。例えば、RT-PCR法では無病徴葉からもCCYVが検出され得るが、本DAS-ELISA

試薬ではほぼ不可能であった。したがって両者をうまく使い分け、DAS-ELISAはその利点である低コスト性と簡便性が生かされる多検体の調査やルーチンの診断で活用いただきたい。CCYVは国内で急速に分布域が拡大しているため、未発生地でも侵入を常に警戒しておく必要がある。本試薬がCCYVの早期発見と防除につながれば幸いである。

なお、DAS-ELISA試薬の開発には日本植物防疫協会の河野敏郎氏に、実用性評価には佐賀県農業試験研究センターの古田明子氏、大分県農林水産研究センターの山崎修一氏、熊本県農業研究センターの森山美穂氏、宮崎県総合農業試験場の久野公子氏、鹿児島県農業開発総合センターの西八東氏(所属はいずれも当時)に多大なるご協力をいただいた。また、本研究は農林水産省の実用技術開発事業(18002)「果菜類の新規コナジラミ(バイオタイプQ)等防除技術の開発」(中核機関:独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所)に基づいて行われたものである。ここに記して感謝申し上げます。

引用文献

- 1) COTILLON, A. C. et al. (2005): EPPO Bulletin 35: 99 ~ 103.
- 2) 行徳 裕 (2008): 植物防疫 62: 424 ~ 426.
- 3) ————ら (2009): 日植病報 75: 109 ~ 111.
- 4) HOURANI, H. and Y. ABOU-JAWDAH (2003): J. Plant Pathol. 85: 197 ~ 204.
- 5) JACQUEMOND, M. et al. (2009): Plant Pathol. 58: 210 ~ 220.
- 6) LVIERATOS, I. S. et al. (1999): Phytopathology 89: 1050 ~ 1055.
- 7) OKUDA, M. et al. (2010): ibid. 100: 560 ~ 566.
- 8) WISLER, G. C. et al. (1998): Plant Dis. 82: 270 ~ 280.

(新しく登録された農薬 30 ページからの続き)

- カフェンストール・カルフェントラゾンエチル・フルセトスルフロン・ベンゾピシクロン粒剤 ※既製剤(新規参入)
22796: タンボエース1キログラム粒剤(小泉商事) 10/10/13
カフェンストール: 2.1%, カルフェントラゾンエチル: 0.90%, フルセトスルフロン: 0.22%, ベンゾピシクロン: 2.0%
- 移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ(北海道, 東北), ミズガヤツリ(北海道, 東北を除く), ウリカワ, クログワイ(北陸, 近畿・中国・四国), オモダカ(北陸, 近畿・中国・四国), ヒルムシロ, セリ, コウキヤガラ(関東・東山・東海, 九州), アオミドロ・藻類による表層はく離(九州)
- グリホサートイソプロピルアミン塩・プロマシル・メコプロップPカリウム塩液剤 ※既製剤(名称変更)
22803: アースカマイラス(アース製薬) 10/10/27

グリホサートイソプロピルアミン塩: 1.5%, プロマシル: 0.75%, メコプロップPカリウム塩: 0.30%
樹木等(公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地等): 一年生及び多年生雑草

「展着剤」

- 展着剤 ※既製剤(新規参入)
22794: クマイニーズ(クマイイ化学工業) 10/10/13
22795: アップライト(丸和バイオケミカル) 10/10/13
ポリナフチルメタンスルホン酸ジアルキルジメチルアンモニウム: 18.0%, ポリオキシエチレン脂肪酸エステル: 44.0%
- 殺菌剤・殺虫剤: 野菜類, りんご: 添加
殺菌剤: もも, 稲, 麦類, 茶: 添加
摘果剤(NAC剤): りんご: 添加