

国内発生5種トスポウイルスを同時検出・同定する マルチプレックス RT-PCR法の開発

群馬県農業技術センター ^{くわ}桑 ^{はら}原 ^{かつ}克 ^や也
秋田県北秋田地域振興局 ^{よこ}横 ^い井 ^{なほ}直 ^と人
農研機構・中央農業総合研究センター ^{おおき}大木 ^{たけひろ}健広・^{つだ}津田 ^{しんや}新哉

はじめに

トスポウイルスは、ウイルス粒子の形状や分子構成が酷似していることから、動物ウイルスで構成されるブニヤウイルス科にトスポウイルス属として分類されている。本ウイルスは外被膜を有する直径約 80 ~ 120 nm の球状ウイルスであり、その中に長さの異なる 3 分節のゲノム RNA を保有している (ULLAMAN et al., 2002)。トスポウイルスは、トマト黄化えそウイルス (TSWV) を代表種とし、熱帯および温暖地域を中心としたナス科、ウリ科、キク科、マメ科作物等、多くの作物や花き類に甚大な被害を及ぼす重要病原ウイルスで、現在 14 種が報告されている (NICHOL et al., 2005)。また、これらのトスポウイルスはいずれもアザミウマ類によって永続的に媒介されることが知られており、これまでに 12 種のアザミウマ類が媒介すると報告されている (INOUE and SAKURAI, 2007)。

国内でのトスポウイルスの発生は、TSWV (TSUDA et al., 1994) をはじめとして、スイカ灰白色斑紋ウイルス (WSMoV) (IWAKI et al., 1984)、メロン黄化えそウイルス (MYSV) (KATO et al., 1999; 加藤・花田, 2000)、インパチエンスえそ斑紋ウイルス (INSV) (後藤ら, 2001)、アイリス輪紋ウイルス (IYSV) (土井ら, 2003)、トウガラシ退緑ウイルス (CaCV) (奥田ら, 2005)、キク茎えそウイルス (CSNV) (MATSUURA et al., 2007) の 7 種が確認されている (表-1)。

トスポウイルスによる病徴は、ウイルス種にかかわらずいずれも感染植物の葉にえそ斑点やえそ輪紋が発生する。したがって、病徴観察だけではウイルス種の判断は困難である。アザミウマ類はその種によって有効薬剤が異なるため、トスポウイルスの種を同定し、各ウイルス

を媒介するアザミウマの種を明らかにすることが重要となる。つまり、ウイルス病の感染拡大防止のためには、トスポウイルス種の迅速な同定、さらにはその媒介虫の特定が必要不可欠となる。

そこで、主にナス科作物および花き類に感染する 5 種トスポウイルス (TSWV, INSV, IYSV, CaCV, CSNV) を同時に検出・同定できるマルチプレックス RT-PCR 法 (KUWABARA et al., 2010) を開発したので紹介したい。

I 本マルチプレックス RT-PCR 法の特徴

複数の植物ウイルスを同時に検定する遺伝子診断法として、マルチプレックス RT-PCR 法が知られている。同じ科や属に分類されるウイルスを検出するために複数のウイルスに対応するユニバーサルプライマーやディジェネレートプライマーを用いる方法がある (OKUDA and HANADA, 2001)。本法は、同科同属のウイルスを幅広く検出することから、ウイルス種の絞り込みや未知ウイルスの発見に有効な手法として利用される。また、ウイルス種によって増幅される DNA 断片の長さが異なるようにプライマーをデザインして検定する方法もある (下元・竹内, 2006; 奥田, 2008)。RT-PCR 法で増幅される DNA 断片の長さがウイルス種ごとに異なることから、その有無と長さを検定用コントロールの DNA 断片と比較して判断することにより、複数種のウイルスを同時検出・同定することが可能となる。

本稿で紹介するマルチプレックス RT-PCR 法は、上記の方法を組合せたもので、トスポウイルスに共通するディジェネレートプライマーと、ウイルス由来の遺伝子断片が異なった長さで増幅されるウイルス種特異的プライマーを組合せて、一度の反応で複数のウイルスを同定するものである。

本法は、UGA and TSUDA (2005) によって開発された方法が基盤となっている。GenBank などに塩基配列情報がある全トスポウイルスでは、その S RNA の 3' 末端の 8 塩基は完全に一致し、さらに上流 7 塩基は酷似している。この 15 塩基の配列に反応するディジェネレート

Development of Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for the Simultaneous Detection and Identification of Five Tospoviruses in Japan. By Katsuya KUWABARA, Naoto YOKOI, Takehiro OHKI and Shinya TSUDA

(キーワード: トスポウイルス, 同時検出・同定, RT-PCR)

表-1 日本で発生しているトスポウイルスの宿主植物と媒介アザミウマの種

ウイルス名 (和名)	略称	主な宿主作物	媒介するアザミウマ種
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (トマト黄化えそウイルス)	TSWV	トマト, ピーマン, ナス, タバコ, トウガラシ, キュウリ, ガーベラ, シクラメン, トルコギキョウ, シネリア, ニチニチソウ, パーベナ, アルストロメリア, インパチエンス, キク	ミカンキイロアザミウマ ヒラズハナアザミウマ チャノキイロアザミウマ ダイズウスイロアザミウマ ネギアザミウマ等
<i>Watermelon silver mottle virus</i> (スイカ灰白色斑紋ウイルス)	WSMoV	メロン, スイカ, ニガウリ, ツルナ, トウガン	ミナミキイロアザミウマ
<i>Melon yellow spot virus</i> (メロン黄化えそウイルス)	MYSV	メロン, キュウリ, スイカ, ニガウリ, シロウリ	ミナミキイロアザミウマ
<i>Impatiens necrotic spot virus</i> (インパチエンスえそ斑紋ウイルス)	INSV	パーベナ, トルコギキョウ, シクラメン, シネリア等	ミカンキイロアザミウマ ヒラズハナアザミウマ
<i>Iris yellow spot virus</i> (アイリス輪紋ウイルス)	IYSV	トルコギキョウ, アルストロメリア, タマネギ, ネギ, ニラ等	ネギアザミウマ
<i>Capsicum chlorosis virus</i> (トウガラシ退緑ウイルス)	CaCV	ピーマン	(<i>Ceratotheripoides claratris</i>)
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> (キク茎えそウイルス)	CSNV	キク, トマト, ピーマン	ミカンキイロアザミウマ

宇賀 (2007) を一部改変.

プライマー (Tos-R15) を RT-PCR 時の下流プライマーとして設計する。一方, PCR 後に得られる DNA の断片長がウイルス種間で異なるように, Tos-R15 の結合領域からの塩基距離が違う S RNA 上の領域にウイルス種特異的な上流プライマーを設計する。これにより, RT-PCR 反応後に得られる DNA 断片はウイルス種ごとに長さが異なるようになり, その断片の位置を確認することでウイルス種の検出・同定が可能となる。一般的に, 複数のウイルスを同時に検出・同定したい場合には, 検出対象とするウイルスのそれぞれに対応したプライマーペアを 1 本のチューブに投入しなければならず, ウイルスの種類が増えるほどチューブ内の総プライマー含量 (総モル濃度) が増え非特異反応や阻害反応が起こりやすくなる。本法では, 必要なプライマーの種類は同定したいウイルス種の数とディジェネレートプライマーだけであることから, 上記の問題は起こりにくくなる。

II 本マルチプレックス RT-PCR 法での種特異的プライマー作出・選定

本法は, 先述したとおり UGA and TsUDA (2005) の方法を一部改変している。ウリ科作物のみが宿主範囲であ

る WSMoV および MYSV を検出対象から除き, 代わりに, 国内のナス科および花き作物で新たに発生が確認された CaCV および CSNV の 2 種を加えた。まず, UGA and TsUDA (2005) の方法で検討した 3 組のプライマーセットから, WSMoV および MYSV の 2 種の特異的プライマーを除くと, 2 組のプライマーセットになる。そのセット 2 組について, 反応の特異性などを検討した。その結果, 1 組のプライマーセットは目的の DNA 断片が増幅され, かつ非特異バンドは出現しなかった (データ略)。次に, CSNV および CaCV の種特異的プライマーを合成し, ディジェネレートプライマーだけとの組合せで単独検出が可能か検討した。CSNV および CaCV の種特異的プライマーは, 対応するウイルスの塩基配列と相同性が高いこと, 他の種特異的プライマーの結合部位と十分に距離が離れていることを考慮してデザインした。塩基配列の相同性比較は「CLUSTAL W」, プライマー作成には「Primer3」をそれぞれ用いた。CSNV または CaCV の特異的プライマーとしてそれぞれ 3 種類を合成したところ, 全て目的の DNA 断片が検出されたが, それらの中で最も非特異的バンドが出現しなかった種特異的プライマーを最終的に選定した (データ略)。本稿

表-2 各検出プライマーの塩基配列

プライマー名 ^{a)}	対象ウイルス	塩基配列	Tm (°C)	増幅 DNA サイズ (bp)
IYSV-837	IYSV	5'-GTTTAGAAGACTCACCAATG-3'	52.2	837
TSWV-709	TSWV	5'-GTGTCATACTTCTTTGGGTC-3'	54.3	709
INSV-589	INSV	5'-CCCAAGACACAGGATTTCA-3'	53.9	589
CSNV-485	CSNV	5'-ACTCTTAGTTCTTCCAATAAGC-3'	53.0	485
CaCV-366	CaCV	5'-ATCAAGGCTTCTGTTCTCTT-3'	52.2	366
Tos-R15	—	5'-GGGAGAGCAATYGWGKYR-3'	55.8	—

^{a)} Tos-R15 は、5 種トスポウイルスに共通するディジェネレートプライマー、他の 5 種類は各種特異的プライマーである。

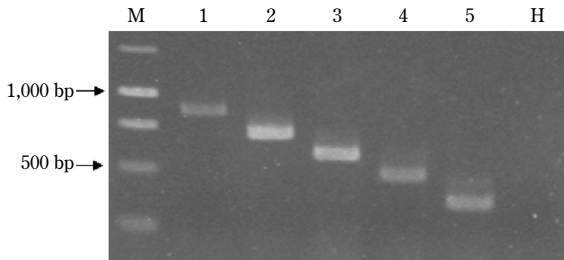


図-1 マルチプレックス RT-PCR による 5 種トスポウイルスの検出

レーン 1: IYSV, レーン 2: TSWV, レーン 3: INSV, レーン 4: CSNV, レーン 5: CaCV, M: DNA マーカー, H: 健全 *Nicotiana benthamiana*.

で紹介するマルチプレックス RT-PCR 法に用いるディジェネレートプライマーおよび種特異的プライマーを表-2 に示す。

III 本マルチプレックス RT-PCR 法での診断

はじめに、被検植物から total RNA を RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社製) を使用して抽出・精製する。プライマーカクテルとして、ディジェネレートプライマーである Tos-R15 の最終濃度は $2\mu\text{M}$ 、各種特異的プライマーは IYSV および CSNV 特異的プライマーが $0.6\mu\text{M}$ 、TSWV、INSV および CaCV 特異的プライマーが $0.2\mu\text{M}$ となるように調整する。その後、RT-PCR は One Step RNA PCR Kit (TaKaRa 社製) を使用し、取り扱い説明書に従って、RT-PCR 反応を行う。RT 反応を 50°C で 30 秒間行い、 94°C で 2 分間処理後、PCR は 94°C 30 秒、 54°C 30 秒、 72°C 1 分を 35 回繰り返し、 72°C 10 分間の最終伸長を行う。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動すると、IYSV、TSWV、INSV、CSNV、CaCV の単独感染植物からそれぞれ 848 bp、709 bp、589 bp、485 bp、366 bp の DNA 断片が増幅される (図-

1)。増幅された DNA 断片の塩基配列は、間違いなく標的とするトスポウイルス由来であった (データ省略)。このように増幅される DNA 断片のサイズをマーカーと比較して推定することで、それぞれのウイルス種を 1 回の PCR 反応で同定することができるようになる。

開発した本法が想定しうる混合感染を正確に検出できることを確認するため、上記 5 種ウイルスの単独感染植物から調整した RNA を任意に組合せた 26 通りのウイルス RNA 試料を対象に同時検出を試みた。その結果、当初の想定通り 1 反応で目的とするウイルス由来の DNA 断片が全て同時に検出された (図-2)。このように、5 種ウイルスを同時検出できることが実験的に確認されたので、次に複数のトスポウイルスを重複感染させた *Nicotiana benthamiana* を調整し検出を試みた。その結果、先と同様に接種したウイルス由来の DNA 断片がすべて検出された (図-3)。そこで、本法が実際の生産現場で利用できることを確認するため、現地圃場で栽培しているトルコギキョウ、ネギ、ニラ、キク、トマトの自然感染植物からトスポウイルスの検出を試みた。その結果、トスポウイルス感染が疑われた被検植物から単独の病原ウイルスが検出され、中には重複感染株も発見された (図-4, レーン 15)。

残念ながら、被検植物としてトルコギキョウ、ネギ、ニラを対象としたところ、IYSV の特異的 DNA 断片周辺に非特異的バンドが確認された (図-4, レーン 1~5)。このように、マルチプレックス RT-PCR では複数のプライマーが混合しているため、植物種によっては非特異や阻害反応が起こりやすくなることがある。本手法を実際の検査に用いる際には、サイズマーカーとの比較や被検植物の健全株での事前検討、あるいはあらかじめ用意した標的ウイルスの感染植物と一緒に検査する等、目的とする DNA 断片のサイズや植物種の違いにおける反応性の差異をあらかじめ確認することが必要である。

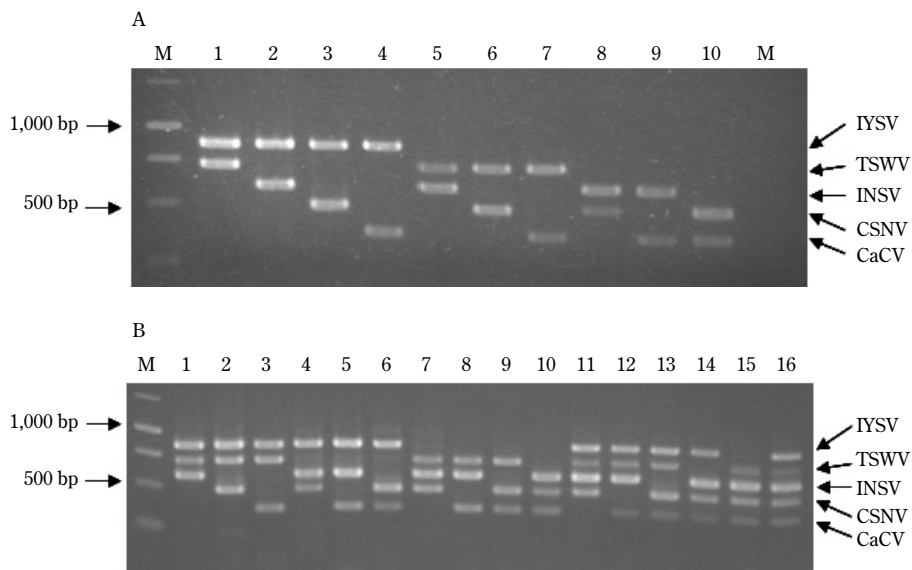


図-2 マルチプレックス RT-PCR による 5 種トスポウウイルスの任意組合せでの同時検出
 A: 2 種トスポウウイルスの任意の 10 組合せ, B: 3 種以上の任意の 16 組合せ
 M: DNA マーカー, H: 健全 *Nicotiana benthamiana*.

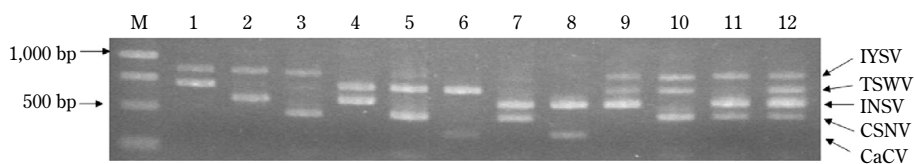


図-3 人為的重複感染 *Nicotiana benthamiana* からマルチプレックス RT-PCR による同時検出
 M: DNA マーカー, レーン 1 ~ 8: 2 種トスポウウイルスの同時検出, レーン 9 ~ 11: 3 種トスポウウイルスの同時検出, レーン 12: 4 種トスポウウイルスの同時検出.

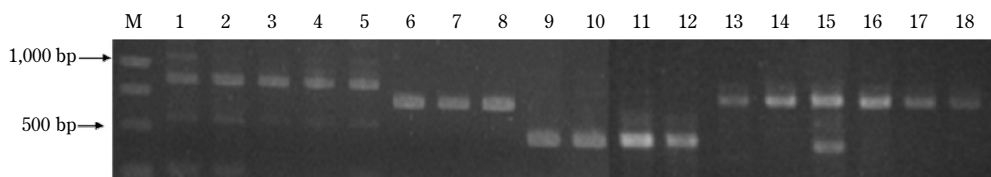


図-4 マルチプレックス RT-PCR による自然感染植物からの同時検出
 レーン 1, 2: トルコギキョウ (IYSV), レーン 3: ネギ (IYSV), レーン 4, 5: ニラ (IYSV), レーン 6 ~ 8, 13, 14, 16 ~ 18: キク (TSWV), レーン 9, 11, 12: キク (CSNV), レーン 15: キク (TSWV + CSNV), レーン 10: トマト (CSNV). () は検出対象ウイルスを示す.

おわりに

本稿で紹介したマルチプレックス RT-PCR 法を利用することで、主にナス科植物および花き類等で発生している 5 種トスポウウイルス種の同時検出・同定が可能とな

る。先述したが、トスポウウイルスの種を同定することは、病原体を明らかにするとともに、そのトスポウウイルスを媒介するアザミウマ種に対する有効な薬剤が選択できるという、防除戦略を考えるうえで重要な情報を提供することができる。

全国の栽培圃場では、今回検討したトスポウイルス以外にも多くの植物ウイルスによる被害が猛威をふるっている。植物ウイルス病の防除対策の第一歩として、マルチプレックス RT-PCR 法をはじめとするウイルス診断の迅速な実施が必要不可欠である。今後、様々なウイルス種においても、マルチプレックス RT-PCR 法による同時検出・同定する技術を開発して、植物ウイルスの防除対策の一助としたい。

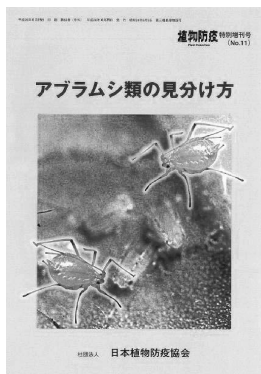
引用文献

- 1) 土井 誠ら (2003): 日植病報 69: 181 ~ 188.
- 2) 後藤知昭ら (2001): 同上 67: 173 (講要).
- 3) INOUE, T. and T. SAKURAI (2007): Appl. Entomol. Zool. 42: 71 ~ 81.
- 4) IWAKI, M. et al. (1984): Plant disease 68: 1006 ~ 1008.
- 5) KATO, K. et al. (1999): Ann. Phytopatho. Soc. Jpn 65: 624 ~ 627.
- 6) 加藤公彦・花田 薫 (2000): 日植病報 66: 252 ~ 254.
- 7) KUWABARA, K. et al. (2010): J. Gen. Plant Pathol. 76: 273 ~ 277.
- 8) MATSUURA, S. et al. (2007): Plant disease 91: 468.
- 9) NICHOL, S. T. et al. (2005): Virus Taxonomy, Elsevier Academic Press, San Diego, p. 695 ~ 716.
- 10) OKUDA, M. and K. HANADA (2001): J. Virol. Methods 96: 149 ~ 156.
- 11) 奥田 充ら (2005): 日植病報 71: 235 (講要).
- 12) ——— (2008): 植物防疫 62: 650 ~ 652.
- 13) 下元祥史・竹内繁治 (2006): 日植病報 72: 146 ~ 149.
- 14) TSUDA, et al. (1994): Ann. Phytopatho. Soc. Jpn 60: 216 ~ 220.
- 15) UGA, H. and S. TSUDA (2005): Phytopathology 95: 166 ~ 171.
- 16) 宇賀博之 (2007): 農業技術 62: 303 ~ 306.
- 17) ULLAMAN, D. et al. (2002): Advances in Botanical Research, Academic Press, London, 36, p. 113 ~ 140.

植物防疫特別増刊号 No.11 アブラムシ類の見分け方

社団法人 日本植物防疫協会 編 B5判 103ページ 口絵カラー
価格 2,520円 (本体2,400円+税) 送料100円

◆ 農作物を加害するアブラムシ類の見分け方を詳しく解説。薬剤感受性の検定法も掲載。



- § 1. 農作物のアブラムシの見分け方<総説> (宗林 正人)
- § 2. 水稻・畑作物のアブラムシ類 (鳥倉 英徳)
- § 3. 野菜のアブラムシ類 (高橋 滋)
- § 4. 果樹のアブラムシ類 (宗林 正人)
- § 5. 花きのアブラムシ類 (木村 裕)
- § 6. 緑化樹木のアブラムシ類 (宗林 正人)
- § 7. 主要アブラムシの有翅虫による見分け方 (杉本俊一郎)

付録

- 1. 果樹のアブラムシの見分け方 (宮崎 昌久)
- 2. 「果樹のアブラムシの見分け方」への補足 (宮崎 昌久)
- 3. 薬剤感受性検定法 (西東 力)

お問い合わせとご注文は

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒114-0015 東京都北区中里 2-28-10

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL 03-5980-2183 FAX 03-5980-6753

ホームページ <http://www.jpapa.or.jp/> メール: order@jpapa.or.jp