

# RT-nested PCR 法によるニンジン種子からの ニンジン黄化ウイルス核酸の検出

大阪府立大学生命環境科学研究科 <sup>もちづき</sup>望月 <sup>ともふみ</sup>知史・岡 <sup>おか</sup>久美子\*・岡村 <sup>くみこ</sup>有佳子・岡村 <sup>おかむら</sup>有佳子・大木 <sup>ゆかこ</sup>理 <sup>おおき</sup> <sup>さとし</sup>

## はじめに

植物ウイルス病の多くは媒介生物（主として昆虫類）により伝搬され、その感染を拡大させる。一方で、植物ウイルスの中には種子を経由して子孫植物に伝染するものがあり、約20%の植物ウイルスが種子伝染するとされている（JOHANSEN et al., 1994; AGARWAL and SINCLAIR, 1997）。我が国では種子伝染するウイルス病として50種の病気がリストアップされている（大畑ら, 1999）。種子伝染性ウイルスは多属多種にわたるが、その多くは *Nepovirus* 属, *Comovirus* 属, *Ilarvirus* 属, *Potyvirus* 属に含まれる。植物ウイルスの種子伝染には大きく二つの経路, すなわち, 種子中の胚を経由する種子伝染と胚以外の組織を経由する種子伝染がある（JOHANSEN et al., 1994; 大畑ら, 1999）。胚以外の組織を経由する様式では, 種皮に感染あるいは付着したウイルスが発芽後幼苗の莖葉や根に物理的傷害により感染すると考えられている。この経路により種子伝染するウイルスは, 粒子の物理的安定性が高いキュウリ緑斑モザイクウイルスやトウガラシマイルドモットルウイルス等の *Tobamovirus* 属ウイルスに限られる。また, メロンネズミ斑点ウイルスのように, 種子に付着したウイルス粒子が土壤中の媒介菌により幼植物根へ媒介されるといふ伝染経路もある。一方で, ほとんどの種子伝染性ウイルスは胚を経由する様式をとる。この場合, ウイルスはまず植物の胚のうあるいは花粉に感染し, そこから種子の胚にまで侵入する。多くの場合胚への侵入はウイルスが開花期までに全身感染していることが必要で, 開花後の感染ではウイルスは胚にまで侵入できないという報告が多い。胚で生存したウイルスは発芽後に生育した子孫植物に全身感染し, 発病させる。このほかに, 植物に無病徴感染して病気を引き起こさない種子伝染性潜伏ウイルスもある。種子伝染性潜伏ウイルスは高頻度で種子伝染するが, その他の様式

による伝染（汁液伝染や接ぎ木伝染, 媒介生物による伝搬等）が認められないユニークな特徴を持つ。一方で, 種子伝染しないウイルスでも未熟種子や登熟種子の種皮や胚への存在が認められる場合がある。これらウイルスは種子の成熟過程や貯蔵期間中に感染性が失活するために, 子孫植物に全身感染を成立させることができない。以上のように, 植物ウイルスの種子伝染性は, ①ウイルスの胚への侵入, および②種子の成熟・貯蔵・発芽生育期間におけるウイルス感染性の維持, の二つの要因によって決定される（JOHANSEN et al., 1994）。

ニンジン黄化ウイルス (*Carrot red leaf virus*, CtRLV) は *Luteovirus* 科 *Polerovirus* 属に属し (HUANG et al., 2005), 世界各地で発生が認められている植物ウイルスである (WATERHOUSE and MURANT, 1982)。CtRLV ゲノムは約5,800塩基の+鎖一本鎖RNAで, 少なくとも六つのタンパク質をコードしている (図-1A; HUANG et al., 2005)。CtRLVにより引き起こされるニンジン黄化病は, 生育初期では植物体が激しく矮化して叢生症状を呈し, 古い葉では赤みを帯びた黄色になる (図-1B)。我が国でのニンジン黄化病の発生は1956年に報告されている (小室・山下, 1956)。CtRLVはニンジンアブラムシとニンジンフタオアブラムシによって永続的に伝搬され, 汁液伝染や種子伝染はしないとされている (WATERHOUSE and MURANT, 1982)。

植物ウイルスの種子伝染性は, 農作物種子の輸出入で問題となる場合がある。CtRLVは種子伝染しないとされているにもかかわらず, 近年, 海外のニンジン種子輸入検疫においてCtRLV汚染の検査項目が含まれた。CtRLVがニンジン種子から検出されるとそのロットのニンジン種子すべての輸入が許可されないため, 検疫前にCtRLV汚染の有無をチェックする必要がある。LEE et al. (2004)は精製したニンジン種子RNAに罹病ニンジンから調製したCtRLV-RNAを混合した溶液を試験的に用い, RT-PCR法によりニンジン種子からCtRLV核酸を検出できる方法を確立したとの報告を行っている。しかしながら, 私たちが2010年ころから研究を開始するまで, ニンジン種子からCtRLVが検出されたという学術報告はなかった。実際にLEEらの方法では市販ニンジン種子からCtRLV核酸を検出することは難しく, した

Detection of Carrot Red Leaf Virus-RNA in Carrot Seeds by RT-Nested PCR. By Tomofumi MOCHIZUKI, Kumiko OKA, Yukako OKAMURA and Satoshi T. OHKI

(キーワード: ニンジン黄化ウイルス, ニンジン種子, RT-nested PCR, 種子汚染, 内在コントロール)

\* 大阪府立大学21世紀科学研究機構, 現: (独)農業生物資源研究所

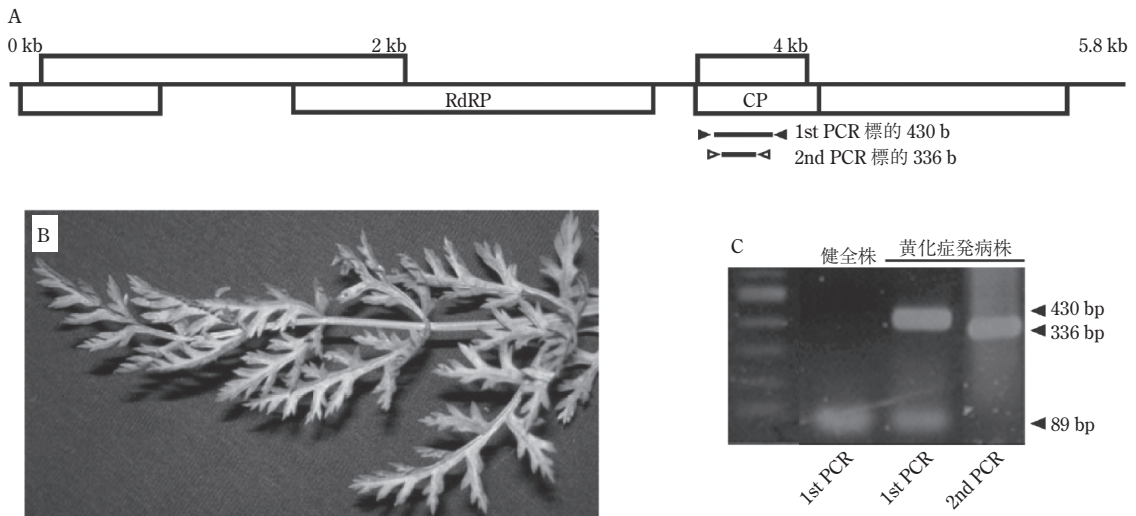


図-1 CtRLVのゲノム構造と病徴，およびRT-nested PCRによる検出

A: CtRLVのゲノム構造と nested PCRの標的遺伝子。RdRP: ウイルス複製酵素遺伝子。CP: 外被タンパク質遺伝子。B: CtRLV感染したニンジンが示すニンジン黄化病の黄化症状。C: CtRLVの外被タンパク質遺伝子領域に新たに作成した nested プライマーセットを用いたマルチプレックス RT-nested PCRの結果。サンプルには黄化症状を示したニンジン葉から抽出した RNA を用いた。1st PCR で約 430 塩基対の DNA バンド，2nd PCR で約 340 塩基対の DNA バンドが増幅される。健全ニンジン葉から抽出した RNA サンプルからは，内在コントロールのユビキチンバンド（約 90 塩基対）のみ増幅される。

がって，ニンジン種子の CtRLV 汚染を確かめるために，ニンジン種子中の CtRLV 核酸を高感度に検出する方法を確立することが必要と思われた。そこで私たちは，RT-nested PCR による CtRLV 検出法を開発した (OKA et al., 2012)。本稿では，ニンジン種子中の CtRLV 核酸検出法の開発の詳細を中心に，これまで調べた市販ニンジン種子の CtRLV 核酸検出率と CtRLV の種子汚染と種子伝染に関する考察を紹介する。本稿が植物ウイルスの種子汚染に対する理解に少しでも寄与できれば幸いである。

## I ニンジン種子における CtRLV 検出法の開発

### 1 内在コントロールのためのニンジン遺伝子の選定

RT-PCR 法によるウイルス検査法に重要なことの一つに，核酸抽出や RT-PCR 工程中の人為的なミスによる検出漏れ，フォールス・ネガティブ (false negative) をチェックできる系を用いることが挙げられる。多くの場合，チェックのためのポジティブコントロールには植物内在遺伝子を用いられている。そこで CtRLV 核酸とともに内在コントロール遺伝子を同時検出するマルチプレックス RT-PCR 法の開発を目指し，まずは，内在コントロールに適したニンジン遺伝子の選抜を行った。種子では各種植物遺伝子の発現が停止している可能性を考慮し，蒸留水に 1 時間浸漬して遺伝子発現を活性化させた

ニンジン種子 50 粒から RNA 抽出キット (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) により RNA を精製し，アクチン，チューブリン，ユビキチン，および Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマーを用いた RT-PCR を行った。その結果，ユビキチンのプライマーのみで増幅し，バンドが検出されたことから (OKA et al., 2012)，ユビキチンを内在コントロールに用いることにした。

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) は比較的高価なため (一検体あたりおよそ 900 円) 多検体を扱う検査には向いていない。そこで，酸性グアニジンチオシアネート/フェノール法による RNA 抽出を行った (一検体当たりおよそ 80 円)。TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) によりニンジン種子 50 粒から RNA を抽出し，50  $\mu$ l の RNase free 滅菌蒸留水 (DEPC-DW) に溶解した。RNA 抽出溶液 1  $\mu$ l を用いてユビキチンの検出を行ったが，DNA バンドの増幅は見られなかった。ニンジン種子には油脂を主とする夾雑物が多量に含まれているために抽出した RNA に残存している夾雑物が逆転写反応を阻害していると考えられたので，段階希釈した RNA 抽出溶液を用いてユビキチンの検出を行ったところ，10 倍および 100 倍希釈したサンプルにおいて明瞭な DNA バンドが検出された (OKA et al., 2012)。したがって，酸

性グアニジンチオシアネート/フェノール法によりニンジン種子 50 粒から抽出した RNA を 50  $\mu$ l の DEPC-DW に溶解した場合には, 50 倍程度に希釈した溶液を逆転写反応に供すると RT-PCR がうまくいくことがわかった。

## 2 RT-nested PCR による CtRLV の検出

Nested PCR は外側のプライマーと内側のプライマーを使って 2 段階の PCR を行う方法であり, 最初の PCR 産物を鋳型に二回目の PCR を行うことにより検出感度と特異性が高まる。既報のプライマー (LEE et al., 2004; VERCRUYSE et al., 2000) を用いた RT-PCR ではニンジン種子 RNA から CtRLV を検出できなかったため, RT-nested PCR 法を適用した。CtRLV 外被タンパク質 (CP) 遺伝子領域に新たな nested プライマーセットを設計し (図-1 A, C), CtRLV プライマーとユビキチンプライマー

(表-1) を混合したマルチプレックス RT-nested PCR を行った。検定には異なる産地で採種された 3 品種の市販ニンジン種子それぞれ 50 粒から抽出した RNA サンプルを数セット用いた。マルチプレックス RT-nested PCR の結果 (図-2), 1 品種では 1st PCR から約 430 塩基対の CtRLV バンドが検出され, 残りの 2 品種では 2nd PCR でのみ約 340 塩基対の CtRLV バンドが検出された。この検出された CtRLV バンド 4 サンプルの塩基配列を確認したところ, すべてにおいて CtRLV-UK1 系統と 98% 以上の相同性を示した。なお, ユビキチンバンドはすべて 1st PCR で検出された。この結果から, RT-nested PCR 法を用いるとニンジン種子から CtRLV 核酸を確実に検出できることが示された。

マルチプレックス RT-nested PCR による CtRLV 検出

表-1 マルチプレックス RT-PCR 法による CtRLV 検査に用いたプライマー塩基配列

プライマー	塩基配列 (5'3')	増幅産物のサイズ (bp)	標的遺伝子	文献
CtRLV-OPU-fw	GAGAGCAACAGGAATTAAC	430	CtRLV 外被タンパク質	Oka et al. (2012)
CtRLV-OPU-rv	TTTGTAGATTGTGCTCGAAAGTT	同上	同上	同上
CtRLV-OPU-nfw	CACACCTTCAAGGCGCCACG	336	同上	同上
CtRLV-OPU-nrv	ATCGAGCCACCGCGGTGA	同上	同上	同上
Ubi-1	GAATACCAGCAGTACCAAGA	89	ニンジンユビキチン遺伝子	ZAGON et al. (2010)
Ubi-2	CATTACATATCTTGATGAGCC	同上	同上	同上

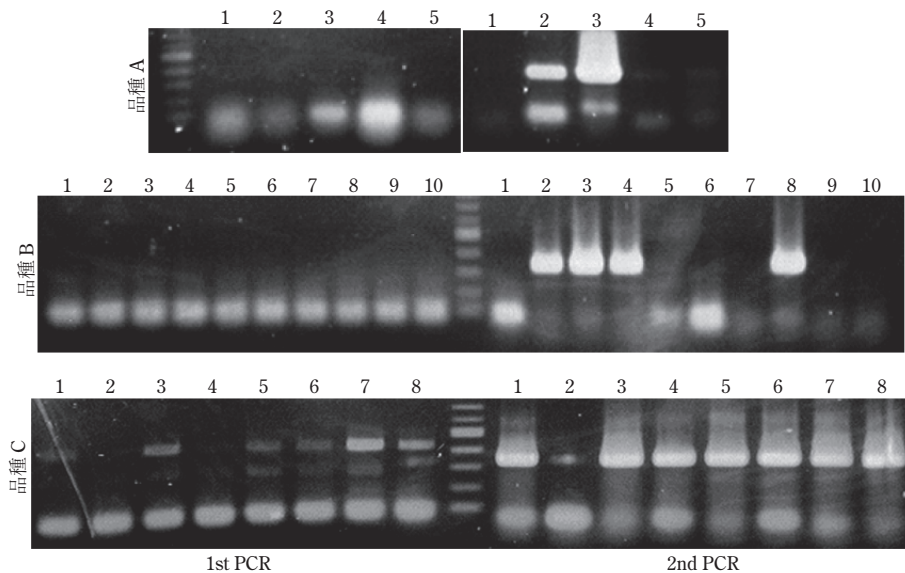


図-2 マルチプレックス RT-nested PCR 法による採取産地の異なる市販ニンジン 3 品種 (A~C) の種子からの CtRLV 核酸の検出  
ニンジン種子 50 粒から抽出した RNA を 1 サンプルとし, 1 品種につき 5~10 サンプルから CtRLV 核酸を検出した。左パネル (1st PCR) が RT-PCR 産物の電気泳動結果, 右パネル (2nd PCR) が nested PCR 産物の電気泳動結果を示している。

法を以下にまとめる。

### (1) ニンジン種子からの RNA 抽出

ニンジン種子 50 粒を蒸留水に 1 時間浸漬した後、水を取り除き -80℃ で冷凍する。冷凍種子を乳棒と乳鉢で磨砕し、RNA 抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% 2-メルカプトエタノール) を 750  $\mu$ l 加えてさらに磨砕する。磨砕液を 11,500  $\times$  g (12,000 rpm) で 5 分間遠心し、上清を 700  $\mu$ l 回収する。市販の酸性グアニジンチオシアネート/フェノール抽出試薬 500  $\mu$ l を加えてよく攪拌した後、付属のプロトコルにしたがって RNA を沈殿させる。沈殿物は DEPC-DW 50  $\mu$ l に溶解する。

### (2) マルチプレックス RT-nested PCR

PrimeScript One Step RNA PCR kit ver.2 (Takara) を用いて RT-PCR を行う。全 10  $\mu$ l の反応系 (5  $\mu$ l の 2  $\times$  1 step buffer, 0.4  $\mu$ l の PrimeScript 1 step enzyme mix, 1  $\mu$ l の 1  $\mu$ M Ubi-1/2 プライマー, 1  $\mu$ l の 10  $\mu$ M CtRLV-OPU-fw/rv プライマー, 1  $\mu$ l の 50 倍希釈 RNA 溶液, 1.6  $\mu$ l の DEPC-DW) で、50℃ 30 分間の逆転写反応と 94℃ 2 分間の RTase 不活化反応後、94℃ 30 秒間、48℃ 30 秒間、72℃ 30 秒間を 30 サイクル、最後に 72℃ で 7 分間の伸長反応を行う。続いて、得られた 1st PCR 反応液 1  $\mu$ l を用いて 2nd PCR を行う。全 10  $\mu$ l の反応系 (1  $\mu$ l の 10  $\times$  Ex Taq buffer, 1  $\mu$ l の dNTPs Mixture, 0.05  $\mu$ l の Ex Taq polymerase, 1  $\mu$ l の 10  $\mu$ M CtRLV-OPU-nfw/nrv プライマー, 1  $\mu$ l の 1st PCR 産物, 6.5  $\mu$ l の DEPC-DW) で、96℃ 5 分間後、96℃ 30 秒間、59℃ 30 秒間、72℃ 20 秒間を 35 サイクル、最後に 72℃ 5 分間の伸長反応を行う。1st および 2nd PCR 反応産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、1st PCR 産物で約 90 塩基対のエピキチンバンドが検出されることを確認し (エピキチンバンドが見られなかった場合は実験ミスなので再試験を行う)、2nd PCR 産物で約 340 塩基対の CtRLV バンドの有無を検定する。

## II 市販ニンジン種子の CtRLV 核酸検出率

次に、ニンジン種子 1 粒からの CtRLV 核酸検出を試み、市販ニンジン種子における CtRLV 検出率を調査した。上記酸性グアニジンチオシアネート/フェノール法によりニンジン種子 1 粒から RNA を抽出して 50  $\mu$ l の DEPC-DW に溶解し、その RNA 抽出原液 1  $\mu$ l を使いマルチプレックス RT-nested PCR 法により CtRLV 核酸の有無を検定した。市販ニンジン種子 4 品種を用いて検定を行ったところ、CtRLV 核酸の検出率はそれぞれ 28%、37%、47%、および 100% であった。さらに、本法の検

表-2 ニンジン種子 1 粒からの CtRLV 検出における RT-nested PCR 法の検出限界

サンプル	RNA 抽出液の希釈倍率					
	1	10 <sup>-1</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	+	+	+	-	-	n.t.
2	+	+	+	+	+	-
3	+	-	-	-	n.t.	n.t.

+ : CtRLV 核酸が検出される。- : CtRLV 核酸が検出されない。n.t. : 非検定。

出限界を調べるために、CtRLV 核酸が検出されたサンプルを段階希釈して RT-nested PCR を行った。3 サンプルを検定したところ、等倍希釈で CtRLV が検出されなくなるサンプルから 1,000 倍希釈しても CtRLV が検出できたサンプルまで、希釈限界は種子サンプルにより様々であった (表-2)。以上の結果から、本法によりニンジン種子 1 粒から CtRLV 核酸が検出可能であること、市販ニンジン種子には CtRLV 核酸汚染種子が高頻度に含まれていること、および、ニンジン種子 1 粒中の CtRLV 核酸濃度は様々であることが示された。

## おわりに

以上のように、RT-nested PCR 法を用いるとニンジン種子中の CtRLV 核酸を検出できることが示された。私たちが新たに作成した CP 遺伝子領域のプライマーに加え、ウイルス複製酵素遺伝子領域を増幅する既報のプライマーセット (VERCRUYSE et al., 2000 ; LEE et al., 2004) を用いた RT-nested PCR においてもニンジン種子から CtRLV 核酸を検出できた (データ省略)。これらのことから、市販ニンジン種子には少なくとも CtRLV のウイルス複製酵素遺伝子と CP 遺伝子の一部配列が存在していることが示された。しかしながら、これら市販ニンジン種子を使ったニンジン栽培現場において、ニンジン黄化病が発症し問題となっているという話は聞かない。また、過去の大規模なニンジン黄化病の種子伝染性試験—黄化病発病個体から得た 5 千粒近くの種子を用いた伝搬試験—において、ニンジン黄化病は種子伝染性ではないことが示されている (STUBBS, 1948 ; KRASS and SCHLEGEL, 1974 ; COSTA et al., 1975 ; HOWELL and MINK, 1979)。さらに、CtRLV が属するルテオウイルス科には種子伝染性のウイルスは報告されておらず、ルテオウイルス科ウイルスは種子伝染しないとされている (WATERHOUSE, 1988)。ルテオウイルス科に属する *Pea enation mosaic virus-1* では、CtRLV と同様に、RT-リアルタイム PCR 法によりゲノム核酸がエンドウ種子の種皮および胚から検出され

るが種子伝染は認められないと報告されている (TIMMERMAN-VAUGHAN et al., 2009)。ルテオウイルス科以外のウイルスでも同様の報告があり、例えば最近では、種子伝染性が認められていない *Indian citrus ringspot virus* のゲノム核酸がオレンジ種子から検出されている (PRABHA and BARANWAL, 2011)。前述したように、種子伝染性のウイルスでなくとも未熟・登熟種子にはウイルスの存在が認められる場合が多々あるが、種子中のウイルス感染性は失活している。このように、植物ウイルスの種子汚染と種子伝染性とは一致しないことが多く、JOHANSEN et al. (1994) はウイルス種子伝染に関する総説のなかで、種子全体を使ったウイルス汚染の検定はその後のウイルス種子伝染性の評価には適切ではないと述べている。したがって、RT-nested PCR によりニンジン種子から CtRLV 核酸の部分配列が検出された事実はニンジン黄化病が種子伝染することを直接に示すものではないといえる。今後、CtRLV の種子汚染に関して、ニンジン種子中に CtRLV の全長ゲノム RNA やウイルス粒子が存在するのか、種子中の CtRLV は感染性を保って

いるのかなどを慎重に検討する必要がある。

### 引用文献

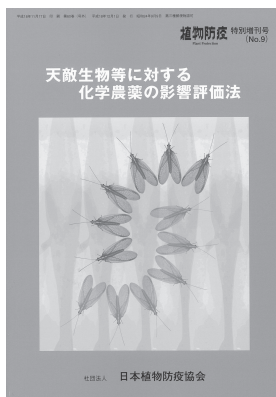
- 1) AGARWAL, V. K. and J. B. SINCLAIR (1997): Principles of Seed Pathology, 2nd ed., Lewis Publishers, New York, 539 pp.
- 2) COSTA, A. S. et al. (1975): Summa Phytopathol. 1: 5 ~ 18.
- 3) HOWELL, W. E. and G. I. MINK (1979): Plant Dis. Rep. 63: 989 ~ 993.
- 4) HUANG, L. F. et al. (2005): Arch Virol. 150: 1845 ~ 1855.
- 5) JOHANSEN, E. et al. (1994): Annu. Rev. Phytopathol. 32: 363 ~ 386.
- 6) 小室康雄・山下 功 (1956): 日植病報 20: 155 ~ 160.
- 7) KRASS, C. J. and D. E. SCHLEGEL (1974): Phytopathology 64: 151 ~ 152.
- 8) LEE, B. Y. et al. (2004): Plant Pathol. J. 20: 302 ~ 307.
- 9) 大畑貫一ら編 (1999): 種子伝染病の生態と防除—健全種子生産をめざして—, 日本植物防疫協会, 東京, 289 pp.
- 10) OKA, K. et al. (2012): J. Gen. Plant Pathol. 78: 2 ~ 7.
- 11) PRABHA, K. and V. K. BARANWAL (2011): Phytoparasitica 39: 491 ~ 496.
- 12) STUBBS, L. L. (1948): Aust. J. Sci. Res. B. 1: 303 ~ 332.
- 13) TIMMERMAN-VAUGHAN, et al. (2009): Phytopathology 99: 1281 ~ 1288.
- 14) VERCRUYSE, P. et al. (2000): J. Virol. Methods 88: 153 ~ 161.
- 15) WATERHOUSE, P. M. (1988): AAB Descriptions of Plant Viruses no. 339.
- 16) \_\_\_\_\_ and A. F. MURANT (1982): ibid. no. 249.
- 17) ZAGON, J. et al. (2010): Anal. Bioanal. Chem. 396: 483 ~ 493.

好評発売中

## 天敵生物等に対する化学農薬の影響評価法

植物防疫特別増刊号 No.9

日本植物防疫協会 編 B5判 158 ページ 口絵カラー  
価格 5,040 円(本体 4,800 円+税) 送料 80 円(メール便)



天敵昆虫, 天敵微生物, 訪花昆虫, 蚕などに対する化学農薬の影響を評価するための実験手法を, 国内の第一人者が詳しく解説しました。IPM 実践のため, 生物農薬や土着天敵そして訪花昆虫と, 化学農薬を上手に組み合わせるための裏付けとなるデータ取得に必携です。

### ■掲載生物種

タマゴバチ類, オンシツツヤコバチ, マメハモグリバエの寄生蜂, アブラバチ類, 土着のアブラバチ, クサカゲロウ類, テントウムシ, ヒメハナカメムシ類, クモ・メクラガメ等, イトトンボオオメカメムシ, ハネカクシ, チリカブリダニ, ケナガカブリダニ類, ククメリスカブリダニ, コハリダニ, 昆虫病原性線虫 (スタイナーネマ), 線虫寄生性細菌 (パスツリア), 糸状菌製剤ミツバチ, マルハナバチ, カイコ

お問い合わせとご注文は

一般社団法人 日本植物防疫協会 支援事業部 〒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.jpfa.or.jp/> メール: [order@jpfa.or.jp](mailto:order@jpfa.or.jp)