

九州農試で発生したイネ縞葉枯ウイルスの抗血清と RT-PCR による検出

花田 薫¹⁾・酒井 淳一¹⁾・鶴町 昌市^{1)*}・林 隆治^{2)**}

(¹⁾九州農業試験場・²⁾国際農林水産業研究センター)

Detection of rice stripe virus using viral antiserum and RT-PCR occurred at the Kyushu National Agricultural Experiment Station. Kaoru HANADA¹⁾, Jun-ichi

SAKAI¹⁾, Masaichi TSURUMACHI¹⁾ and Takaharu HAYASHI²⁾ (¹⁾Kyushu National Agricultural Experiment Station, Kumamoto 861-1192. ²⁾Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305)

Key words: Rice stripe virus, Serology, RT-PCR

緒 言

イネ縞葉枯ウイルス (RSV) は主にヒメトビウカによって永続的に媒介されるウイルスであり、わが国におけるイネの最も重要なウイルスである。RSV はテヌウイルス属のウイルスであり、そのゲノムは4種のRNA成分から構成されており、約35Kの大きさの外被タンパク質 (CP) によって包まれている¹⁾。また、RSV 感染イネ体内には非構造タンパク質である感染特異タンパク質 (NSP) が大量に蓄積される¹⁾。

RSV に起因するイネ縞葉枯病の九州地方における最近の発生の推移をみると、1960年から1965年にかけて北部九州で多発した後に小発生となり、1985年から1986年に西九州で多発した後、1987年以降は比較的小発生しかみられず大きな被害は出ていない^{1), 2)}。しかし、RSV はある程度の期間をおいて多発する傾向があり、今後警戒を要すると思われる。1996年に九州農業試験場 (以下、九州農試) の水田で RSV によると思われるイネ病害が散見された。RSV 抗血清による血清診断法及び RT-PCR を用いた遺伝子診断法によって、それらの異常株から RSV が検出されたのでその結果について報告する。

材料および方法

九州農試西合志地区の水田で7月中旬頃から、RSV 感染による病徴と類似の症状である葉脈に並行した黄緑色条斑を生じているイネ (品種関東 PL4) が散見された。まず、その2株についてウイルス抗血清を用いて RSV 感染の有無を検討した。これらの症状は、えそを伴うことはほとんどなく比較的軽いものであった。その後、出穂期になって曲がった穂にえそを起こしたもみが多数ついているものが数株認められた。これらのイネ5株の葉を用いて RSV の検定を行った。なお対照としては、同一圃場内の外観健全なイネを用いた。

本研究で供試した RSV 抗血清は、精製 RSV (RSV-O) を家兎に筋肉注射することによって作成したもので、その力価は沈降法で1,024倍まで反応するものであった。まずこの RSV 抗血清を用いた DIBA 法³⁾によって RSV の検定を行った。採取したイネの葉を6倍量の PBST (0.85% NaCl と 0.05% Tween 20 を加えた 10mM リン酸緩衝液 pH 7.2) を加えて磨砕した液の低速遠心後の上清を、直接ニトロセルロースメンブレンに3 μ l ずつスポットした。このメンブレンを1万倍に希釈した RSV 抗血清と反応させた後、Alkaline phosphatase でラベルした抗ウサギ IgG と反応させる間接法によって、RSV の感染の有無を検討した。また、同じ上清に含まれるタンパク質を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後に、Coomassie brilliant blue R-250 で染色してウイルス感染に特異的なタンパク質の有無を検討した⁴⁾。さらに、電気泳動した後にニトロセルロース膜に転写するウエスタンブロット法によ

*現在、東北農業試験場

*Present address: Tohoku National Agricultural Experiment Station, Oomagari, Akita 014-01.

**現在 国際農林水産業研究センター沖縄支所

**Present address: JIRCAS Okinawa Subtropical Station, Ishigaki Okinawa 907.

り RSV の外被タンパク質の検出を行った。

-70°Cに保存しておいたイネ葉50mgを8倍量の1% Sodium dodecyl sulfate と1% 2-Mercaptoethanolを加えたTNE緩衝液(20mM Tris (hydroxymethyl) amino methan-HCl, 0.1M NaCl, 5mM Ethylenediamine tetra-acetic acid, pH 8.5)で磨砕後、直ちに等量のフェノールクロロフォルムで抽出後、エタノール沈殿によって核酸成分を回収した。えられた沈殿を80%エタノールで洗浄して乾燥した後、20 μ lの蒸留水にとかしたものの1 μ lをRT-PCRに供試した。用いた合成プライマーは、既報のRSVのRNA 3またはRNA 4の塩基配列^{6,7)}から作成した。RNA 3用のプライマーの配列は、RSV-CPのコーディング領域が増幅されるように、5'側が5'-CTGACTTGTTTCAGTCTAGTC-3'で3'側が5'-CAGTACCTCTTGCTACAATG-3'であった。RNA 4用の配列は、NSPのコーディング領域が増幅されるように、5'側が5'-TTTAATCAGAATCGAAGATG-3'で3'側が5'-CATGTAGGTGAGATAACCAG-3'であった。RT-PCRには、パーキンエルマー社のRNA-PCRコキットを用い、その反応条件は逆転写が42°Cで20分の後、99°C5分で酵素を失活後、PCR反応は92°C40秒・53°C40秒・72°C1分を40回繰り返した。最後に60°Cで20分処理した後、100 μ lのうちの8 μ lをアガロースゲル電気泳動で検定した。

結 果

RSV抗血清を用いたDIBA法によって、黄緑色条斑症状を示していた2株のイネからRSVが検出された。また、若い穂にえそ粉を生じていたイネ5株中4株からRSVが検出された(Fig. 1)。さらに、これらの異常株のタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて検討した結果、特異的な2つのバンドが検出された。

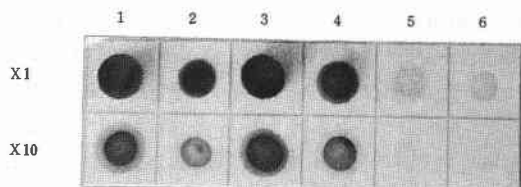


Fig. 1. Detection of RSV from rice plants showing RSV-like symptoms by DIBA using RSV-antiserum.
Upper boxes: leaf extracts without dilution.
Lower boxes: leaf extracts with x10 dilution.
1: a plant with chlorotic striped leaves obtained in August; 2~5: plants with malformed ears obtained in September; 6: a healthy-looking plant.

分子量の大きい方のバンドの泳動度はRSV-CPと、小さい方のバンドはRSV-NSPとほぼ同じ泳動度を示した(Fig. 2)。本RSVのCPは、林ら²⁾が報告しているRSV-O系統のCPとほぼ同じ分子量を有していたが、そのNSPの泳動度は少し異なっていた。また、このCPと思われる電気泳動のバンドは、ウエスタンブロット解析によってRSV抗血清とよく反応したことから、

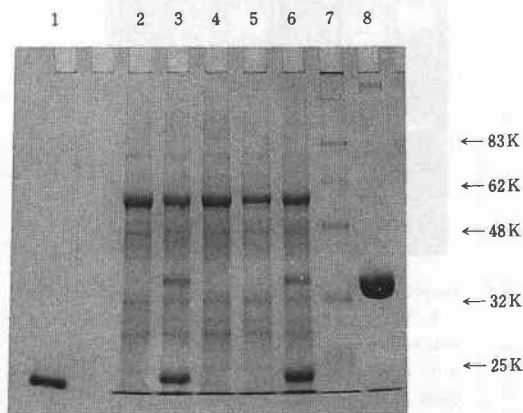


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins obtained from rice plants.
1: RSV-O-NSP; 2,4,5: a healthy-looking plant;
3,6: rice plants with symptoms;
7: marker proteins; 8: RSV-O-CP.

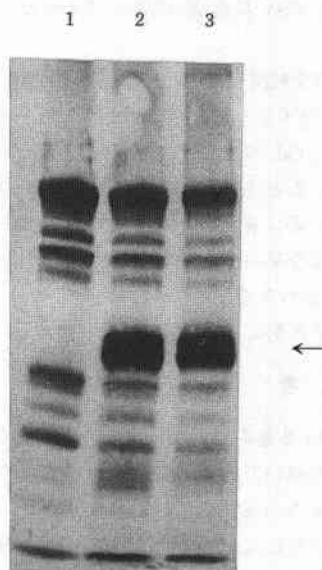


Fig. 3. Western blot analysis of proteins from rice plants.
1: a healthy-looking plant; 2,3: rice plants with symptoms
The arrow indicates the position of RSV-CP.

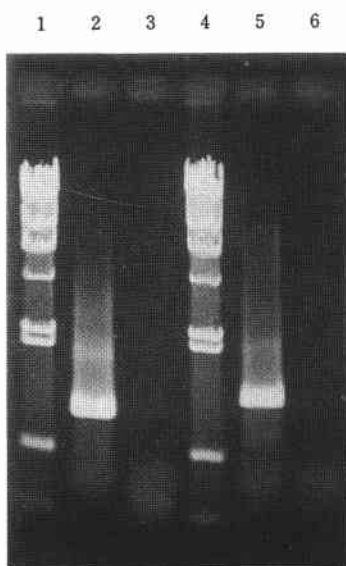


Fig. 4. Detection of RSV-RNA by RT-PCR from rice plants. 1,4: Marker DNA (λ /Hind III); 2,5: nucleic acid obtained from plants with symptoms; 3,6: nucleic acid obtained from a healthy-looking plant. RNA3 primers were used for 2,3; RNA4 primers were used for 5,6.

RSV の CP であることが確認された (Fig. 3)。ウエスタンでは健全イネ成分とも一部反応が認められているが、これは供試した RSV 抗血清の希釈が不十分だったためであった。

イネ葉からの全核酸を鋳型とした RT-PCR により、RNA 3 用のプライマーを用いたときはプライマーから想定される約 1.0kb の大きさの断片が、RNA 4 用のプライマーを用いたときは予想される約 1.2kb の断片がえられた (Fig. 4)。従って、イネ葉から常法によって抽出した全核酸をそのまま用いることで、RNA の特別な精製をおこなわなくとも、RT-PCR によって RSV が容易に検出できることがわかった。

考 察

RSV は感染イネ葉内でのウイルス濃度が高く、ウイルスの抗原性も高いために、RSV の診断にはウイルス抗血清を利用した方法が広く用いられている。ELISA 法によって、50万倍以上に希釈しても RSV の検出が可能な抗血清を作成可能であることが報告されている¹⁰⁾。また、ラテックスを用いた簡易診断法が開発されており、その簡便さから RSV の発生予察に広く利用されている。

RSV 感染イネ体内には、多量に蓄積される 2 種のタ

ンパク質の存在が知られており、一つは RSV-CP であり、もう一つは RSV-NSP である¹¹⁾。RSV の塩基配列から、両タンパク質は別のウイルス遺伝子によってコードされている全く異なるものであることがすでに判明している^{5,7)}。NSP の電気泳動での見かけ上の分子量の差から、RSV は L, M, O の 3 系統に分類できることが報告されており、これら 3 系統はイネでの病徴が明瞭に異なっていて $L < O < M$ の順に病徴が激しくなるといわれている^{2,4)}。本研究で用いた RSV はイネでの病徴が中程度か、やや軽いと思われたので、病徴からは O 系統に近いのではないかと考えられ、NSP の泳動度からも O に近いと思われた。これらの系統の識別には感染葉のタンパク質の電気泳動が簡便であるといわれているが^{2,4)}、異なる系統間で NSP 遺伝子の塩基配列に特徴的な差異はないことが報告されている⁵⁾ので、系統をウイルス抗血清や NSP 抗血清を用いる方法で識別することは困難であると考えられる。それではなぜ、NSP の泳動度と病徴型に関連があるのかは現時点では明かではない。

本研究では RSV の診断に RT-PCR の利用を検討して、イネからの RSV 診断には通常の RT-PCR が十分に利用できることを明らかにした。抗血清やタンパク質の泳動度では識別できないものでも、RT-PCR によって区別できる可能性があるので、RSV の系統識別にも RT-PCR が利用できると思われる。RT-PCR によって増幅された DNA 断片は、制限酵素処理によって切断される断片の有無やその大きさによって、相互に異なるものであるかどうかを推定することができる。また、増幅断片の塩基配列を解析して配列既知の RSV や性質の異なる株間で比較することによって、相違点や特徴を塩基配列レベルで知ることができる。今回、同一圃場から採取し検定した RSV の中には、RSV-RNA 3 用のプライマーで増幅した断片を制限酵素 *Hha* I で切断したときの断片の大きさが異なるものがあることが判明した (花田, 未発表)。従って、ウイルス外被タンパク質遺伝子の配列の一部が異なるものが同一圃場に発生していることが判明したわけである。今後、九州各地で RSV が多く発生するようになれば、RSV の RT-PCR による比較や塩基配列レベルでの検討を進めることによって、これまで解明されていなかった、RSV の系統分化と発生生態との関連を検討していくことが可能になるかも知れない。

摘 要

九州農試水田でイネ縞葉枯病に類似した症状を示して

いたイネから、ウイルス抗血清を用いた DIBA 法やウエスタンプロット法によって、RSV 感染を確認した。症状を呈していたイネ株から核酸を抽出し、RSV の RNA 3 または RNA 4 の配列から作成した合成プライマーを用いることによって、RSV の RT-PCR による診断が可能であることを示した。

引用文献

1) 深町三朗・井上栄明 (1989) 九病虫研会報 35, 3-4. 2) 林 隆治・宇杉富雄・中野正明・石川浩一 (1989) 九病虫研会報 35, 1-2. 3) 日比忠明 (1984) 植物防疫 38, 380.

4) 石川浩一・林 隆治・日比野啓行 (1992) 日植病報 58, 619 (講要). 5) 石川浩一・大村敏博 (1997) 平成9年度日本植物病理学会大会講演要旨集 p.5. 6) KAKUTANI, T., Y. HAYANO, T. HAYASHI and Y. MINOBE (1990) J. Gen. Virol. 71, 1427-1432. 7) KAKUTANI, T., Y. HAYANO, T. HAYASHI and Y. MINOBE (1991) J. Gen. Virol. 72, 465-468. 8) LAEMMLI, V. K. (1970) Nature 227, 680. 9) 新海昭 (1985) 植物防疫 39, 503-507. 10) TAKAHASHI, Y., T. OMURA, K. SHOHARA and T. TSUCHIZAKI (1991) Plant Dis. 75, 458-461. 11) TORIYAMA, S. (1983) CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 269.

(1997年4月30日 受領)