

大分県のサツマイモから検出された サツマイモ斑紋モザイクウイルス

花田 薫¹⁾・後藤 英世²⁾・大貫 正俊¹⁾

(¹⁾九州農業試験場・²⁾大分県農業技術センター)

Sweet potato feathery mottle virus detected in sweet potato in Oita Prefecture.
Kaoru HANADA, Hideyo GOTO and Masatoshi ONUKI (¹Kyushu National Agricultural
Experiment Station, Kumamoto 861-11. ²Oita Prefectural Agricultural Research Cen-
ter, Usa, Oita 872-01)

Key words: sweet potato feathery mottle virus, RT-PCR, RNA extraction

わが国のサツマイモに広く発生しているサツマイモ斑紋モザイクウイルス (SPFMV) は、その強毒系統 (SPFMV-S) が帯状粗皮病をひきおこすために、わが国のサツマイモのウイルスの中で最も重要な病原ウイルスとなっている^{1),2)}。また、SPFMV-S と血清学的に類似性が高く、そのゲノム RNA 3' 末端の塩基配列の相同性もきわめて高い SPFMV 普通系 (SPFMV-O) は、わが国のサツマイモで SPFMV-S が問題となる以前から発生していたウイルスである¹⁾。これまでに、帯状粗皮病または SPFMV-S は、九州地方の鹿児島県・宮崎県・長崎県、関東地方の千葉県・茨城県および四国地方などでその発生が確認されている。SPFMV の検出法としては、アサガオなどへの接種や接木接種またウイルス抗血清の利用および電子顕微鏡観察による方法が、広く用いられているが、最近になって九州農業試験場から RT-PCR を用いた遺伝子診断によるサツマイモ葉からの SPFMV の簡易診断法が報告された³⁾。今回、大分県の帯状粗皮病を呈していたサツマイモの皮から RT-PCR を用いた遺伝子診断により SPFMV を高感度で検出したこと、およびその塩基配列の一部を決定し既報の SPFMV と比較した結果、高い相同性があることを確認したので、その結果について報告する。

試 験 方 法

1995年10月に、大分県大野町で採取した帯状粗皮病を呈していたサツマイモ (品種土佐べに) 4 株から、約 1 cm²の皮をナイフを用いてうすく切り取り、大貫・花田³⁾の方法に従って、CF11 セルロースを用いて RNA を簡易精製した。えられた RNA (20 μ l) の中の 1 μ l を、既報の SPFMV-S と SPFMV-O の両方に共通な

塩基配列部分の合成 DNA をプライマー³⁾とした RT-PCR に供試した。また、その検出限界を知るために、この 1 μ l を蒸留水を用いて 100 倍ごとに段階希釈したものの 1 μ l を用いて RT-PCR を行った。

RT-PCR によってえられた産物を廣近²⁾の方法に従って、Bluescript SK の Eco RV 部位にライゲーションしてクローニングした。その末端の塩基配列をシーケンサーを用いたダイデオキシ法によって決定した。決定した配列を、DNASIS を用いて既報の SPFMV-S や SPFMV-O の対応する部位の配列と比較した。

結 果

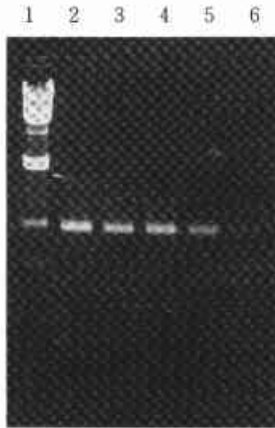
1. RT-PCR による大分県のサツマイモからの SPFMV の検出

大分県の帯状粗皮病を呈していたサツマイモの皮から抽出した RNA を用いて、RT-PCR を行ったのちアガロースゲルで電気泳動した結果、第 1 図、第 2 図に示したようにプライマーから想定される約 550bp の増幅 DNA 断片が検出された。典型的な帯状粗皮病を示していた 3 株いずれからも、SPFMV に特異的な明瞭なバンドがえられた。この結果は、他のサツマイモ 1 株でも同様であった。なお、ここで供試した三重株は大分県の三重町で肌荒れ症状を呈していたサツマイモであり、千葉株は千葉県で採取されたサツマイモ潜在ウイルス感染株で抗血清による診断で SPFMV は検出されないものであった。

このサツマイモ皮を用いた RT-PCR 法による検出限界を知るために、100 倍ごとに解釈した RNA 試料を用いて RT-PCR をおこなった。その結果、1 万倍希釈までは容易に SPFMV 特異的なバンドを検出でき、100 万



第1図 大分県のサツマイモの皮から簡易精製した RNA を用いた RT-PCR による SPFMV の検出
 1: 大分県の帯状粗皮病サツマイモ①からの試料
 2: 大分県の肌あれ症サツマイモからの試料
 3: 千葉県のスツマイモからの試料
 4: 分子量マーカー (λ DNA/HindIII)
 RT-PCR 産物100 μ l のうちの 8 μ l を 1% アガロースゲルで電気泳動したもの。



第2図 大分県のサツマイモからの RT-PCR による SPFMV の検出及びその検出限界の検討
 1: 分子量マーカー (λ DNA/HindIII)
 2, 3: RT-PCR 産物100 μ l のうちの 8 μ l を 1% アガロースで電気泳動したもの。
 2: 大分県の帯状粗皮病サツマイモ②からの試料
 3: 大分県の帯状粗皮病サツマイモ③からの試料
 4~6: 大分県の帯状粗皮病サツマイモ①からの試料を100倍ごとに段階希釈してえた RT-PCR 産物100 μ l のうちの 8 μ l を電気泳動したもの。
 4: 10^2 倍希釈, 5: 10^4 倍希釈, 6: 10^6 倍希釈

倍希釈でも弱いバンドが認められた (第2図)。

2. 大分県のサツマイモから RT-PCR によって増幅された cDNA の末端の塩基配列

これらの RT-PCR 産物をクローニングして、その cDNA の末端の塩基配列を決定した結果を第3図に示した。この配列は、既報の SPFMV-S や SPFMV-O と94%以上の相同性を示したことから、大分県の帯状粗

皮病を示していたサツマイモに SPFMV が感染していたことが確認された。第3図で、プライマーとして用いた3'末端から3~11番目の塩基が cDNA クローンと SPFMV-S とで1塩基ずつずれているが、これはプライマーがゲノム RNA とアニールする際にゲノム3'末端のポリ A を除いた最後の塩基からではなく、1塩基だけ5'側にずれて始まったためであると考えている。

今回用いたプライマーでは、えられた増幅 DNA が、サツマイモ帯状粗皮病の病原ウイルスである SPFMV-S 由来であるか SPFMV-O 由来であるかは、両系統に共通な配列部位を用いたので判定が困難であり、SPFMV-S であるかどうかは他のプライマーを用いた検討が必要である。

考 察

宇杉¹³⁾は純化ウイルスを用いて SPFMV の抗血清を作製し、SPFMV の診断に抗血清の利用が可能であることを報告している。また、SPFMV は長さ約 850nm のひも状ウイルスであるので電子顕微鏡観察によってもその存在を知ることができる。SPFMV に対する有効な防除法としてウイルスフリー苗の利用が進められており⁵⁾、かなりの効果をあげてきている県もある。しかし、ウイルスフリー苗の一部でもウイルスに感染していることがあっては、かえってウイルス感染を拡大する危険が増すことになる。SPFMV は、サツマイモの生長点を 0.2~0.4mm で切り出してもウイルスが除去できない個体があるという海外の報告もある⁵⁾ことから、ウイルスフリー化処理した苗が本当にウイルスフリーであるかどうかの確認が必要である。しかし、フリー化処理苗では当然ウイルス濃度がきわめて低い場合が多いと考えられ、抗血清や電子顕微鏡観察を用いた判定では困難であろう。そこで、この確認のために高感度でしかも比較的簡単に SPFMV を検出可能な RT-PCR を用いた本診断法が利用できる。

SPFMV の遺伝子診断はサツマイモに含まれる阻害物質のためにサツマイモでは困難とされ、はじめはアサガオでのみ可能であった⁶⁾が、RNA を特異的に吸着する CF11 の利用により、サツマイモ葉から検出も可能となった。今回、さらにサツマイモの塊根の皮の一部を用いても SPFMV の検出ができることが判明した。

ウイルスフリー化処理苗がウイルスフリーであることを確認するためであれば、検定しようとする SPFMV の系統は重要ではないので、今回は日本の2系統およびアメリカの2分離株すべてで共通して保存されている配列部分をプライマーとして用いた。帯状粗皮病の病原で

5' AGGGGTGTGCAATAGGACATCCTCTGCACTGTAGTTTATACTTATGTTATCTTTAGTATGCCTTTAATTT

 5' AGGGGTGTGCAATAGGACATCCTCTGCACTGTAGCTTATACTTATGTTATCTTTAGTATGCCTTTAATTT

AAATTCGTGTCTTTTCAGTCCCGAAGGAGATGGTTGAGTGCATAACATGGTGGGATTATATCTCGGTTATT

 AAATTCGTGTCTTTTCAGTCCCGAAGGAGATGGTTGAATGCATAACATGGTGGGATTATATCTCGGTTATT

GCATTTGAGAAGTCCGCTTTTCTATTACGTATCATAAGGGACTCTTAAAAGTGAGGAGTACCTCGTAAGAA

 GCATTTGAGAAGTCCGCTTTTCTATTACGTATCATAAGGGACTCTTAAAAGTGAGGAGAACCTCGTAAGAA

AAGCCTTTTTGGTTCGTGATCGAGCC 3'
 ***** * *
 AAGCCTTTTTGGTTCGTGATCGAGCC 3'

第3図 大分県の帯状粗皮病サツマイモ①からえられた RT-PCR 産物の cDNA クローンと SPFMV-S との 3' 末端塩基配列の比較
 上段：SPFMV-S-RNA の塩基配列（ポリ A 配列は除く）⁴⁾
 下段：大分県サツマイモからのクローンの塩基配列
 *：同一配列

ある強毒系統を他の系統と区別して検定する必要があるときは、両者の塩基配列の異なる RNA 部位を含むプライマーを作成して用いればよい。強毒系統に特異的な配列部位を含む、そのようなプライマーもすでに考案されている⁶⁾。しかし、強毒系統については全塩基配列が決定されている^{3,9)}が、1分離株のみの配列しか決定されていないこと及び普通系統についても1株のみの一部の配列が解析されていること³⁾、また SPFMV-RNA のどの部分の配列が帯状粗皮病の誘発に決定的なのかは必ずしも明らかでないことから、帯状粗皮病誘発系統特異的なプライマーのデザインのためにはさらに検討する必要があると思われる。

検出感度については、サツマイモ葉を用いた場合は 0.5g の葉の抽出試料から 1,000 倍希釈まで検出可能であった⁸⁾のに対し、今回の塊根皮を用いる方法では 50mg の組織試料から 1 万倍希釈でも容易に検出でき、100 万倍希釈でもうすいバンドがみとめられた。この検出感度の違いはサツマイモ組織内のウイルス濃度の差異および RT-PCR を阻害する物質の量に主として由来すると考えられる。長田⁵⁾は SPFMV がサツマイモの葉より茎の方が電子顕微鏡で多く観察され、茎の方がウイルス濃度が高いことを示唆している。したがって、根の方がさらに茎よりウイルス濃度が高まっていることも考えられ、そのことが SPFMV の塊根を通じた次代への伝搬に寄与している可能性がある。SPFMV は、植物の根でよく増殖するように適応したウイルスであるかもしれない。

わが国のサツマイモに発生している SPFMV には、上記 2 系統の他に徳島系統¹¹⁾と F 系統⁷⁾が知られている。これらは、まだ一部でしか発生していないと思われるが、本研究で使用した共通プライマーを用いてもこれらの系統は、RT-PCR で安定して検出できなかった（大貫・花田、未発表）ことから、徳島系統や F 系統の発生が拡大してきたら、これらの系統も同時に検出可能なプライマーの選定が必要となるであろう。また、わが国のサツマイモに発生しているひも状ウイルスには、SPFMV の他にサツマイモ潜在ウイルス (SPLV) およびサツマイモシンプトムレスウイルス (SPSV) がある¹²⁾。これらのウイルスもまだその分布はそれほど広くないが、この 2 種のウイルスについても遺伝子診断を行えるように九州農業試験場で検討しているところである。SPLV については、すでにそのゲノム RNA の cDNA クローニングを行ってその末端の塩基配列を決定しており¹⁰⁾、その RT-PCR も可能になった。SPSV についても塩基配列の決定を進めており、適切なプライマーの配列もまもなく明らかにできるとと思われる。

引用文献

- 1) ABAD, J. A., CONKLING, M. A. and MOYER, J. W. (1992) Arch. Virol. 126: 147-157.
- 2) 廣近洋彦 (1995) 植物の PCR 実験プロトコル (島本功・佐々木卓治編) 秀潤社: 153-156.
- 3) MORI, M., USUGI, T., HAYASHI, T. and NISHIGUCHI, M. (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58: 965-967.
- 4) MORI, M., SAKAI, J., KIMURA, T., HAYASHI, T., HANADA, K. and

- NISHIGUCHI, M. (1995) Arch. Virol. 140 : 1473-1482. 5) 長田龍太郎 (1990) 宮崎總農試報 25 : 77-90. 6) NISHIGUCHI, M., MORI, M., SUZUKI, F., NAGATA, R., MORISHITA, T., SAKAI, J., HANADA, K. and USUGI, T. (1995) Ann. Phytopath. Soc. Japan 61 : 119-122. 7) 大貫正俊・宇杉富雄・中野正明・酒井淳一・花田 薫 (1993) 日植病報 59 : 332. 8) 大貫正俊・花田 薫 (1996) 植物防疫 50 : 102-105. 9) 酒井淳一・大貫正俊・森 昌樹・宇杉富雄・花田 薫 (1994) 日植病報 60 : 740. 10) 酒井淳一・大貫正俊・宇杉富雄・花田 薫 (1996) 日植病報 62 : 335 11) 宇杉富雄 (1992) 植物防疫 7 : 229-232. 12) USUGI, T., NAKANO, M., ONUKI, M. and HAYASHI, T. (1994) Ann. Phytopath. Soc. Japan 60 : 545-554.

(1996年4月30日 受領)