

Print-capture PCR(P-PCR) 法によるジェミニウイルス 保毒虫の簡易検定

大貫 正俊・花田 薫
(九州農業試験場)

A rapid and simple procedure for distinguishing geminivirus-infected viruliferous silverleaf whiteflies by print-capture PCR(P-PCR). Masatoshi Onuki and Kaoru Hanada
(Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan)

Key words : print-capture PCR, Sweet potato leaf curl virus, Tomato yellow leaf curl virus, viruliferous silverleaf whitefly, virus assay

ジェミニウイルスは熱帯・亜熱帯ではとくに重要なウイルスに位置づけられているが、近年はウイルス媒介虫であるシルバーリーフコナジラミ (*Bemisia argentifolii* Bellows and Perring) の分布拡大に伴い、温帯でも無視できなくなっている (Brown, 1994)。わが国においても1989年のシルバーリーフコナジラミの侵入とその後の定着を背景として、1996年には長崎 (大貫ら, 1997) および静岡、愛知両県下 (Kato et al., 1998) でジェミニウイルス科ベゴモウイルス属の1種であるトマト黄化葉巻ウイルス (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) によるトマト黄化葉巻病が発生した。本病はその後九州で分布拡大を続け、1999年には佐賀、福岡、熊本県での発生が確認された。九州以外では中部地方の静岡、愛知、三重ならびに関東の群馬県で発生が確認されている。なお、西南暖地ではTYLCVの他、タバコ巻葉ウイルス (*Tobacco leaf curl virus*, TLCV) によるトマト黄化萎縮病の発生報告も相次いでおり、ジェミニウイルスに起因する病害の被害は拡大する傾向にある。

ジェミニウイルスの伝搬経路を解明し、病害の発生実態を把握するうえで、さらには、病害の蔓延を未然に防止するうえで、ウイルス保毒虫の検定は重要な鍵となる。これまでコナジラミからのウイルス検出には虫体からの核酸抽出とそれに続く polymerase chain reaction (PCR) あるいは特異的プローブとのハイブリダイゼーション等の煩雑な操作が必要であった。ところが、最近、核酸抽出を要しない print-capture PCR (P-PCR) 法が考案され (Olmos et al., 1996)、ジェミニウイルス保毒虫検定の簡易化が図られるようになった (Atzmon et al., 1998; Navas-Castillo et al., 1998)。そこで、本報では2種のジェミニウイルス、TYLCVとサツマイモ葉巻ウ

イルス (Sweet potato leaf curl virus, SPLCV) を対象に P-PCR 法による保毒虫の簡易検定について検討したのでその概要を報告する。

材料および方法

1. 供試虫

1999年9月、熊本県宇土市網田町で多発したトマト黄化葉巻病発病トマト (品種、マイロック) 上で採集したシルバーリーフコナジラミ (以下、コナジラミと略記する) 成虫を TYLCV 推定保毒虫として供試した。また、1995年4月に SPLCV 感染アサガオ上で飼育してウイルスを保毒させた後、 -20°C の低温貯蔵庫内に長期保存しておいたコナジラミ成虫を SPLCV 保毒虫として供試した。健全対照のコナジラミは1999年夏期に九州農試のガラス室内のメロンに発生した成虫を用いた。TYLCV 保毒虫および健全対照のコナジラミは実験に供試する直前まで 4°C の冷蔵庫内で保存した。

2. プライマー配列

P-PCR に供試した TYLCV 特異検出用プライマー (TY プライマー) は $5'$ 側相同プライマーを $5'$ - CTCGAAGGTTCCCGAAGG- $3'$ 、 $3'$ 側相補プライマーを $5'$ - TTGAAAAATTGG (G/A) CTCTCAA- $3'$ の配列とした。TY プライマーは TYLCV の外被タンパク質 (CP) の一部を含む約 1.3 kb の領域を増幅させるものである。本プライマーは TLCV と推定される複数のウイルス株のゲノム塩基配列とはアニールしないように設計してあるため、TYLCV 種特異的検出が可能である。一方、SPLCV 特異検出用プライマー (SPCV プライマー) は $5'$ 側相同プライマーを $5'$ - TACGAGCCAGGAACCTTAGG- $3'$ 、 $3'$ 側相補プライマー

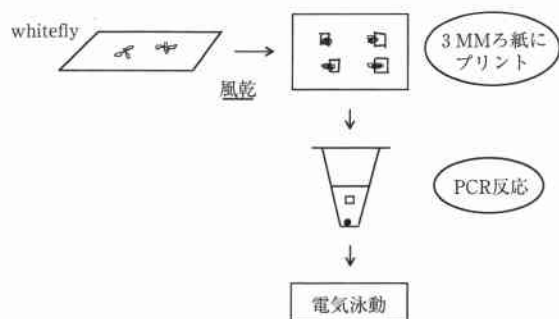
を5′-TGCTATTCACAGTTGGACTG-3′の配列とした。SPCPプライマーはSPLCVのCPの全域を含む約1.0 kbの領域を増幅させるものである。

3. P-PCR

P-PCR法の手順の概略を第1図に示した。まず、コナジラミ成虫をワットマン3 MMろ紙の上に置き、その上に厚手の透明ビニールを被せてビニールの上からボールペンのペン先を虫体に強く押し当てて、虫体成分をろ紙に転写した。ろ紙を風乾後、約1×2 mmの大きさに切り取り、直接0.5 ml容のPCRチューブに移して反応させた。PCR反応には*Ex Taq* DNA polymerase (TaKaRa)を用い、dNTPおよびMgCl₂濃度は*Ex Taq*に添付されているプロトコールに従った。プライマー濃度は20 pmol/μlとした。PCRの温度条件は95℃、2分間を1サイクル、95℃、50秒→55℃、1分→72℃、1分30秒のサイクルを35サイクル行い、最後に72℃、10分間処理した。なお、比較のためにTYLCVに感染したトマトおよびSPLCVに感染したサツマイモから抽出した全核酸を用いて同様にPCRを行った。PCR反応液50 μlのうち、7 μlをTAE (40 mM Tris-acetate pH8.0, 1 mM EDTA)を泳動用緩衝液とした1%アガロースゲル電気泳動に供試し、PCR産物の有無を確認した。

4. PCR産物のクローニングと塩基配列の解析

TYおよびSPCPプライマーにより増幅されたPCR産物の末端を平滑化し、クローニングベクターpCR-Script Amp (STRATAGENE)の*Srf* Iサイトに挿入した。これを宿主大腸菌XL1-Blueに受容させて形質転換した。TYLCV保毒虫のPCR産物由来の陽性クローンから得たプラスミドをpTYWF10、SPLCV保毒虫のPCR産物由来の陽性クローンから得たプラスミドをpSPWF13と名付けた。プラスミド調製はアルカリ法により行い、蛍光DNAシーケンサー(PE ABI)を用い



第1図 Print-capture PCR (P-PCR)法によるシルバーリーフコナジラミ保毒虫検定の手順

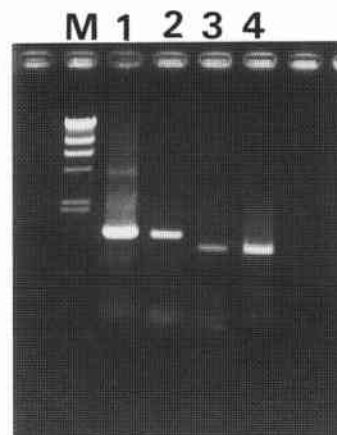
たダイデオキシ法により塩基配列を決定した。塩基配列の解析にはDNA解析ソフト、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング)を用いた。

結 果

1. シルバーリーフコナジラミ保毒虫から増幅された特異的PCR産物

TYおよびSPCPプライマーにより感染植物および保毒コナジラミから増幅されたPCR産物のゲル電気泳動図を第2図に示した。レーン1のTYLCV感染トマトおよびレーン2のTYLCV保毒コナジラミ由来のPCR産物の泳動度は同じで産物の大きさはともに約1.3 kbpと推定された。また、レーン3のSPLCV感染サツマイモおよびレーン4のSPLCV保毒コナジラミ由来のPCR産物の泳動度も同じで産物の大きさは約1.0 kbpと推定された。得られた4つのPCR産物の大きさはいずれもプライマー配列から想定されるものと一致した。これらの結果から、TYおよびSPCPプライマーにより、コナジラミ体内に存在するウイルスのゲノムDNAの一部領域が増幅されたものと考えられた。

レーン3のPCR産物はSPLCVに感染したサツマイモ生葉からの抽出核酸を材料にしているがPCR産物量は相対的に少なかった。一方、レーン4のSPLCV保毒虫に由来するPCR産物はサツマイモ生葉を材料とするPCR産物量に比べて明らかに多く、レーン2のTYLCV



第2図 感染植物およびウイルス保毒虫(1頭)から増幅された特異的PCR産物

- M: λ/Hind III
 1: TYLCV-Ng感染トマト/TYプライマー
 2: TYLCV保毒虫/TYプライマー
 3: SPLCV感染サツマイモ/SPCPプライマー
 4: SPLCV保毒虫/SPCPプライマー

保毒虫のそれと量的にはほぼ同じであった。

2. P-PCRによる保毒虫の検定

宇土市網田町のトマト黄化葉巻病発病ハウスから採集したコナジラミ成虫およびSPLCVを保毒させたコナジラミ成虫をP-PCRに供試し、ウイルス検定を行った。本実験で供試したTYLCV保毒虫は推定保毒虫として限定的に扱ったが、供試した成虫5頭からはすべて約1.3 kbpの特異的産物が得られた。一方、同様に処理した健全成虫5頭からは特異的産物は検出されなかった。また、SPLCVの検定に供試した保毒成虫10頭についてもすべての個体から特異的約1.0 kbpのPCR産物が得られ、健全成虫5頭からは特異的なDNA断片は検出されなかった。以上、P-PCR法により、ウイルスを保毒したコナジラミ成虫からは個体ごとに確実にウイルス特異的な産物が得られた。本実験の検定個体数は多くはなかったものの、ウイルス保毒虫の検定効率率は100%となった。

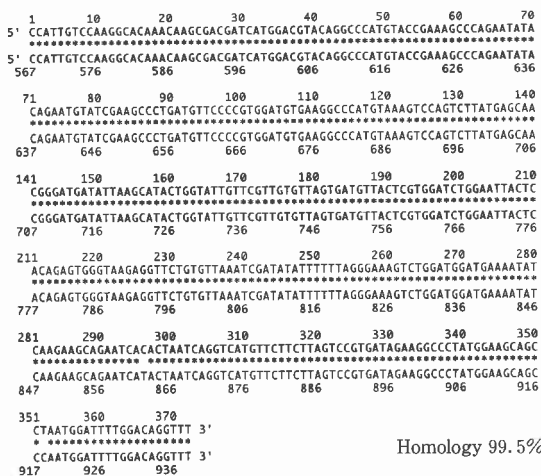
3. PCR産物のクローニングと塩基配列の解析

TYLCV保毒虫由来のpTYWF10およびSPLCV保毒虫由来のpSPWF13のプラスミドの塩基配列ならびにそれらから推定されるアミノ酸配列をpTYWF10についてはTYLCV長崎株(TYLCV-Ng, Ng), pSPWF13についてはSPLCV熊本株(SPLCV-Km, Km)のデータ

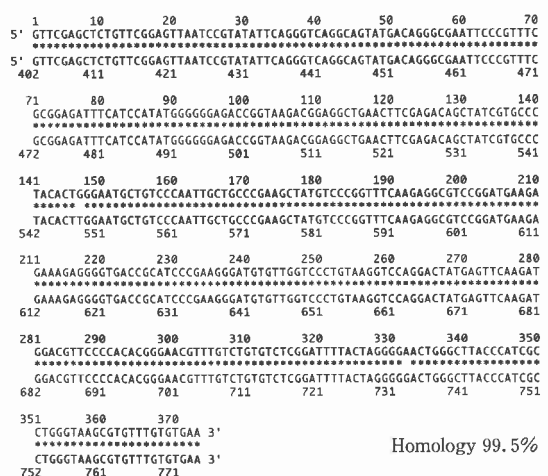
(未発表)と比較した。pTYWF10の一部塩基配列(372塩基)はNgのゲノム塩基配列の567番~938番に相当し、相同性は99.5%と極めて高い値を示した。この一部塩基配列からは123残基のアミノ酸配列が導き出され、NgのCP領域アミノ酸の35番~157番に相当し、相同性は99.2%であった(第3図)。pSPWF13の一部塩基配列(373塩基)はKmのゲノム塩基配列の402番~774番に相当し、相同性は99.5%、そして、これから推定される108残基のアミノ酸配列はCP領域アミノ酸の1番~108番に相当し、相同性は99.1%であった(第4図)。以上の結果は、TYLCVおよびSPLCV保毒虫から得られたPCR産物がそれぞれのジェミニウイルスのゲノムDNAを鋳型として増幅されたものであることを明確に証明するものである。

考 察

P-PCR法は最初、RNAウイルスであるPlum pox virus (Potyviridae)の簡易検出を目的として考案されたものであり(Olmos et al., 1996)、その後、Atzmon et al. (1998)、Navas-Castillo et al. (1998)によりDNAウイルスであるTYLCVの検出に応用された。本法の特徴は核酸抽出を必要としない点にある。ただし、P-PCR



第3図 TYLCV保毒虫から得られたPCR産物に由来するpTYWF10の一部塩基配列および推定アミノ酸配列のTYLCV-Ngとの比較
上段:pTYWF10, 下段:TYLCV-Ng



第4図 SPLCV保毒虫から得られたPCR産物に由来するpSPWF13の一部塩基配列および推定アミノ酸配列のSPLCV-Kmとの比較
上段:pSPWF13, 下段:SPLCV-Km

は植物体を材料にする場合、植物の種類や用いる植物体の部位によっては、そこに含まれる阻害物質などによりPCR産物量にばらつきが生じ、再現性が低くなることもある(大貫・花田, 1999)。これに対し、虫体を材料にする場合は、第2図に示したとおりPCR産物量に大きな差は認められない。従って、サツマイモ等の核酸抽出が容易でない植物(大貫・花田, 1996)を宿主とするジェミニウイルスでは、コナジラミ虫体を材料にしてPCR増幅の方が安定した検定結果が得られる可能性が高い。

筆者らは、P-PCRの操作をより簡便化するためにReady-To-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia)を用いたTYLCV保毒虫の検定についても検討したが(未発表), *Ex Taq*を用いた実験系に比べてPCR産物量は少なかった。P-PCRは一般的なPCRに比べて操作が簡略化されているだけに、DNA polymeraseは増幅効率の高いものを用いる必要があると判断された。

P-PCRによるコナジラミ虫体からのウイルス検出はTYLCV, SPLCVに関しては確実に行えることが本実験により明らかになった。本法はコナジラミ虫体を材料にする限りは、宿主植物成分の影響を考慮する必要がなく、広範囲のコナジラミ伝搬性ジェミニウイルスのゲノムDNA増幅に利用できると考えられる。また、操作が簡便であり、圃場で採集したコナジラミの保毒虫率のモニタリング等にも十分活用できると考えられる。

九州で発生しているTYLCVは分子的特徴からイスラエルで報告された*Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-Is, Is)と同種である(大貫, 2000)。Ghanim et al. (1998)はIsとイスラエルのタバココナジラミB系統(=シルバーリーフコナジラミ)個体群の組み合わせにおいて、ウイルスの経卵伝染が起こることを実験的に証明した。九州で発生しているTYLCVでも同様な経卵伝染が認められるかどうかは農業上極めて重要な問題である。P-PCRは孵化後のコナジラミ虫体内のウイルスの有無を確認するための有効な手段の一つと考えられる。

引用文献

- Atzmon, G., van Oss, H. and Czosnek, H. (1998) PCR-amplification of tomato yellow leaf curl virus: application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 189-194.
- Brown, J. K. (1994) Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agro-ecosystems worldwide. *FAO Plant Prot. Bull.* 42: 3-31.
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M. and Czosnek, H. (1998) Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the *Bemisia tabaci*. *Virology* 240: 295-303.
- Kato, K., Onuki, M., Fuji, S. and Hanada, K. (1998) The first occurrence of tomato yellow leaf curl virus in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 552-559.
- Navas-Castillo, J., Diaz, J. A., Sanchez-Campos, S. and Moriones, E. (1998) Improvement of the print-capture polymerase chain reaction procedure for efficient amplification of DNA virus genomes from plants and insect vectors. *J. Virol. Meth.* 75: 195-198.
- Olmos, A., Dasi, M. A., Candresse, T. and Cambra, M. (1996) Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of Plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 24: 2192-2193.
- 大貫正俊・花田 薫 (1996) RT-PCR法を利用したサツマイモウイルス病の高感度簡易診断. *植物防疫* 50: 102-105.
- 大貫正俊・花田 薫 (1999) Print-capture PCR (P-PCR)法によるトマト黄化葉巻病の簡易診断. *日植病報* 65: 647 (講要).
- 大貫正俊・小川哲治・加藤公彦・花田 薫 (1997) 長崎県のトマトに発生したジェミニウイルスの塩基配列. *日植病報* 63: 482 (講要).
- 大貫正俊 (2000) トマト黄化葉巻病. *農および園* 75: 108-113.

(2000年4月30日 受領)