

RT-PCR と融合タンパク質抗血清を用いた サツマイモ葉からの SPFMV の検出

田中 裕子^{1)*}・大西 克典^{2)**}・奥田 充^{1)*}・酒井 淳一^{1)*}・大貫 正俊^{1)***}・花田 薫^{1)*}
(¹⁾九州農業試験場・²⁾熊本工業大学工学部)

Detection of SPFMV from sweet potato leaves by using RT-PCR and fusion protein antiserum. Yuko Tanaka ^{1)*}, Katsunori Onishi ^{2)**}, Mitsuru Okuda ^{1)*}, Jun-ichi Sakai ^{1)*}, Masatoshi Onuki ^{1)***} and Kaoru Hanada ^{1)*} (¹ Kyusyu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan. ² Kumamoto Institute of Technology, Kumamoto, Kumamoto 860-0082, Japan)

Key words: antiserum, fusion protein, RT-PCR, SPFMV

緒 言

わが国のサツマイモに発生するウイルス病のうち、主なものは帯状粗皮病、斑紋モザイク病および葉巻病である(大貫・花田, 1996)。また、サツマイモでの病徴発現は明らかではないものの2種のひも状ウイルスが発生することが報告されており、サツマイモ潜在ウイルス(Sweet potato latent virus)及びサツマイモシンプトムレスウイルス(Sweet potato symptomless virus)と呼ばれている(Usugi et al., 1991)。

これらのウイルスの中でサツマイモ斑紋モザイクウイルス(*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV)はポテトウイルス科に属するひも状ウイルスで、わが国のサツマイモ栽培地において広く発生している。SPFMVにはいくつかの系統が存在するが、特に、サツマイモ帯状粗皮病の病原であるサツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統(SPFMV severe strain, SPFMV-S)および強毒系統と血清学的に極めて近縁な普通系統(SPFMV

ordinary strain, SPFMV-O)がサツマイモの栽培上、特に重要である(宇杉ら, 1990)。サツマイモに発生するウイルスに対しては、これまでいくつかの血清学的な検出法が試みられているが、非特異反応により検定結果が不安定であることが指摘されている。そこで、我々は大腸菌発現タンパク質を抗原として利用することによって特異性の高い抗血清を作製し、サツマイモウイルスの血清学的検出に利用することを検討し、これをRT-PCRによる検出と比較した。

材料および方法

1. 供試サツマイモ

サツマイモ葉は、大分県の吉松氏・山崎氏に分譲していただいたものを供試した。病徴はそれぞれ、部分的な退緑斑紋、一面の退緑斑紋、モザイク、葉脈透化が見られた(第1表)。

2. RT-PCR による検出

感染葉0.05gを用いて大貫・花田(1996)の方法に準じてRNAを抽出し、RT-PCRに用いた。SPFMVの検出プライマーとして、核封入体b遺伝子の3'端から外被タンパク質(CP)遺伝子の5'端までの約1.3kbの領域を増幅するために設計されたもの(5', GTGC (GT) GA (CT) AACACACTTATGGTTGT;3', CGCGCAA GACTCATATCAGT)を用いた。RT-PCRにはRNA PCR Core キット(Perkin Elmer)を用い、添付のプロトコールに従って塩濃度及びプライマーの濃度を決定した。RT-PCRの温度設定には、ヒートブロック式のプログラム温度制御装置(PROGENE, TECHNE)を用い、RNAのcDNAへの逆転写は42℃、30分、次いで99℃、5

*現在 農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター

*Present address: National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan.

**現在 立命館大学理工学部

**Present address: Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kusatsu, Siga 525-8577, Japan)

***現在 国際農林水産業研究センター沖縄支所

***Present address: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Okinawa Subtropical Station, Ishigaki, Okinawa 907-0002, Japan

第1表 RT-PCR および ELISA による SPFMV の検出

サツマイモ感染株	病徴 ^{a)}	RT-PCR ^{b)}	ELISA ^{c)}
1	chs	+	0.45
2	sv. chs	+	0.31
3	chs	+	0.40
4	sv. chs	+	0.47
5	m. chs	+	0.22
6	vc. chs	+	0.48
7	vc. chs	-	0.21
8	m. chs	+	0.34
9	vc. chs	+	0.34
10	m. chs	+	0.40
ウイルスフリー株	-	-	0.03
アサガオ感染株 S ^{d)}			0.16
O			0.15
T			0.00
JC			0.15

a) chs, 部分的な退緑斑紋; sv. chs, 一面の退緑斑紋; m, モザイク; vc, 葉脈透化

b) +, SPFMV が検出された; -, SPFMV が検出されなかった

c) 405nm の吸光度 (2 ウェルの平均値)

d) SPFMV の各系統

分間処理で逆転写酵素を失活させた。cDNA の増幅は DNA 変性に 95°C で 40 秒, プライマーの会合に 50°C, 60 秒, DNA 鎖の伸長に 72°C で 2 分間反応させ, これを 40 サイクル行った。

3. 大腸菌プラスミドへの SPFMV-S-CP の導入

SPFMV の CP を Glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として発現させるため, 遺伝子発現ベクター pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia) を用いた。まず, 制限酵素 *Xho*I と *Not*I の認識配列を付加したプライマー (5', AACTCGAGATCTAGTGAACGTA-CTGAAC; 3', AAGCGCCGCTATTGCACACCCC-TCATTC) を作製し, SPFMV-S の CP 遺伝子領域を増幅した後, 上記発現ベクターの *Xho*I と *Not*I サイトに挿入した。ベクターに正しく挿入されていることを DNA 塩基配列の解析により確認した。

4. 大腸菌からの GST 融合タンパク質の精製と抗血清の作製

大腸菌をプラスグロウ液体培地 (ナカライテスク) で 20 時間ほど培養した。集菌して PBS (NaCl 8.5g, 0.5M リン酸バッファー 20mL/l) で溶解し, TritonX-100 を終濃度 1% になるように加えて 1 分間超音波破碎した。上清に Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) を加え, 融合タンパク質 (GST+CP) を特異的に結合

させた。PBS で洗浄後, Glutathione Elution Buffer (Amersham Pharmacia) で溶出し GST+CP の存在を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で確認した。また SPFMV 粒子に対する抗血清を用いたウエスタンブロッティングによって GST+CP が抗血清と反応することを確認した。

得られた GST+CP を, ウサギに 2 回の筋肉注射 (1 回目 2mL, 2 回目 1mL) と 1 回の静脈注射 (1mL) を行って抗血清を作製した。

5. 血清学的検定

今回, 作製した融合タンパク質に対する抗血清 (FPAS) を一次抗体として用いたサツマイモ感染葉からの SPFMV の検出法として, ウエスタンブロッティング, DIBA (dot immunobinding assay) および ELISA の利用を検討した。二次抗体にはすべて市販の抗ウサギ IgG-アルカリフォスファターゼラベル (CHEMICON INTERNATIONAL) を用いた。

ウエスタンブロッティングは, 12% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後, 湿式の転写装置でタンパク質をニトロセルロースメンブレン (Amersham Pharmacia) に転写し, Hibi and Saito (1985) の方法により免疫染色を行った。FPAS は 500~8,000 倍希釈で使用した。分子量マーカー (Dr. Western, ORIENTAL YEAST) により, 検出されたタンパク質の大きさを推定した。

DIBA は Hibi and Saito (1985) の方法に従って行い, 10~1,000 倍まで希釈した強毒系統または普通系統に感染したアサガオ, 健全アサガオまたはタバコの磨砕汁液をニトロセルロースメンブレンにスポットし, ウエスタンブロッティングと同様にして免疫染色を行った。

ELISA は, 100 倍希釈したサツマイモまたはアサガオの感染葉汁液をマイクロタイタープレートに分注し, 37°C で 90 分吸着させた。FPAS は 500 倍希釈で使用し, 37°C で 1 時間静置後, 二次抗体と反応させ, *p*-nitrophenyl phosphate を基質として用い, 発色反応の程度を測定した。

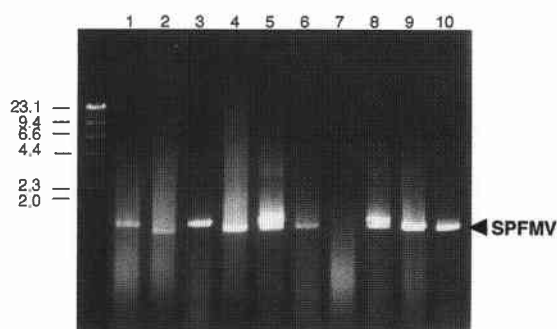
実験結果

1. RT-PCR による SPFMV の検出

サツマイモ感染葉から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR を行った。その結果, プライマー配列から予想される約 1.3kb の増幅断片が, 供試した 10 サンプルのうち 9 つのサンプルから検出された (第 1 図)。RT-PCR による希釈限界は 1,000 倍以上であった。

2. FPAS の特性

ウエスタンブロット解析により, FPAS は SPFMV-



第1図 RT-PCRによるSPFMVの検出
 レーン1~10は感染サツマイモ
 左の数字は分子量マーカー (kbp)

CPと4,000~8,000倍希釈まで反応が見られた。純化ウイルスに対する抗血清は5,000倍希釈まで反応した。

DIBAでは、FPASは強毒系統に感染したアサガオ磨砕液とは100倍希釈まで、普通系統では汁液希釈10倍まで反応が見られたが、健全葉とは反応が認められなかった。

ELISAでは、サツマイモ感染葉ではすべて陽性反応が見られ、ウイルスフリー葉では見られなかった(第1表)。

これらの方法ではFPASはサツマイモ感染葉からのウイルス検出には有効であり、汁液の希釈は10倍から100倍の範囲が適当であった。純化ウイルスに対する抗血清では、FPASと同一条件下で行ったDIBAやELISAでは非特異反応が強く認められ、実用的ではなかった。

また、SPFMVの他の系統に対するFPASの反応を感染アサガオを用いて検討した結果、SPFMV-Sと近縁なOやJCは反応したが、近縁でないT(酒井ら, 1998)とは反応が認められなかった(第1表)。

考 察

サツマイモのウイルスに対しては、RT-PCRによる検定法がほぼ確立されている(大貫・花田, 1996)。RT-PCRは高い検出感度、操作の簡便性の両面を備えた優れた方法である一方、検定コストがかかることや、多検

体を扱うことが困難である。サツマイモウイルスの血清学的検出の利用も検討したが、感染植物からの純化ウイルスに対する抗血清において、簡易ELISA法では非特異反応が出やすかった。

本研究において融合タンパク質から作製した抗血清FPASは、SPFMV-CPとウエスタンブロットでよく反応し、健全植物成分とはほとんど反応が認められなかった。圃場のサツマイモ葉からのSPFMVの検出に、FPASを用いたELISAは、RT-PCRによるSPFMVの検出結果と1試料を除いて一致したことから、本抗血清を用いたELISAによってSPFMVが検出可能であることが判明した。RT-PCRでSPFMV感染が確認できなかったサツマイモ1株についてはその原因を明らかにしておく必要がある、今後検討する。

今後、融合タンパク質としてではなくウイルスの外被タンパク質だけを大腸菌内あるいは*in vitro*で発現させたものを抗原として抗血清を作製し、ウイルス検定に利用すること、SPFMVの他の系統、サツマイモで発生する他のウイルスについて、同様の手法を用いて検討していきたい。

引用文献

- Hibi, T. and Y. Saito (1985) A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol.* 66: 1191-1194.
- 大貫正俊・花田 薫 (1996) 植物防疫50: 102~105.
- 酒井淳一・甲斐由美・花田 薫 (2000) 日植病報 66: 258.
- 酒井淳一・内田敦士・花田 薫 (1998) 日植病報 64: 588.
- 宇杉富雄・中野正明・大貫正俊・林 隆治 (1990) 日植病報 56: 423.
- Usugi, T., M. Nakano, A. Shinkai and T. Hayashi (1991) *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 57: 512-521.
- Usugi, T., M. Nakano, M. Onuki, T. Maoka and T. Hayashi (1994) *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 60: 545-554.

(2001年4月30日 受領)