

PCR-マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法による メロン黄化えそウイルス (MYSV) の検出

下元 祥史¹⁾・佐藤 仁敏^{2)*}・畠谷 達児³⁾・早野由里子⁴⁾・眞岡 哲夫⁴⁾

(¹⁾ 高知県病害虫防除所・²⁾ 種苗管理センター北海道中央農場・

³⁾ 北海道大学大学院農学研究科・⁴⁾ 北海道農業研究センター)

Detection of Melon yellow spot virus (MYSV) by a PCR-microplate hybridization method.

Yoshifumi Shimomoto¹⁾, Masatoshi Sato^{2)*}, Tatsuji Hataya³⁾, Yuriko Hayano-Saito⁴⁾ and Tetsuo Maoka⁴⁾ (¹⁾Kochi Plant Protection Office, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan. ²⁾National Center for Seeds and Seedling Hokkaido-Chuo Station, Kitahiroshima, Hokkaido 061-1102, Japan. ³⁾ Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan. ⁴⁾ National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Hitsujigaoka, Sapporo 062-8555, Japan)

Melon yellow spot virus (MYSV) is a new tospovirus which is spreading quickly in Kochi Prefecture, Japan. A PCR-microplate hybridization (PCR-MPH) method for the detection of MYSV from plants (cucumber) and thrips was developed. A primer set (NF3, 5'-TTAAACTCTCAATGGACTTAGAYCTG-3'; NR3, 5'-TTAAACTTCAATGGACTTAGAYCTG-3') was designed based on degenerate sequences of the nucleocapsid protein gene on the S RNA of MYSV. A DNA fragment of approximately 900 bp was amplified from MYSV-infected plant tissues and labeled with digoxigenin (DIG). The sensitivity of PCR-MPH was compared with those of ELISA and RT-PCR. The total RNA was purified from 0.02 g of MYSV-infected plant tissue, and diluted in 5-fold steps from 5¹ to 5¹⁰. MYSV was detectable from a 5¹⁰-fold dilution by PCR-MPH, which is 625 times more sensitive than ELISA or RT-PCR. Moreover, MYSV was also detected from individual thrips by PCR-MPH with a higher sensitivity than RT-PCR.

Key words : cucumber, Melon yellow spot virus, N protein, PCR-MPH, *Thrips palmi*

緒 言

メロン黄化えそウイルス (Melon yellow spot virus, MYSV) は1992年に静岡県の温室メロンで初めて発生したトスボウイルスである (Kato et al., 1999)。その後、静岡県では発生記録はないが (池田ら, 2001), 1995年に高知県の施設栽培キュウリに発生し、翌年には同県のメロンでも発生が確認された。MYSVはメロン、キュウリの葉に黄化えそ症状を起こし、甚大な被害をもたらす。高知県においては、発生地域・面積とも大きく

増加し、2001年6月にはキュウリ、メロンでの発生面積が304.4haとなった。

MYSVはミナミキイロアザミウマ (*Thrips palmi*)によって永続的に伝搬されるが (Kato et al., 1999; 竹内ら, 2001), その発生生態は十分解明されていない。MYSVの発生生態を明らかにし、適切な防除を行うためには、植物および保毒虫から高感度にウイルスを検出する方法が必要である。本ウイルスの検出法として、これまでELISA, RT-PCR等が報告されているが (竹内ら, 2001, 加藤・花田, 2000), 保毒虫から安定的にウイルスを検出できる方法は未だ確立されていない。一方、佐藤ら (1999) は、RT-PCRとジゴキシゲニン (DIG) 標識DNAプローブによるマイクロプレート・ハイブリダイゼーション (MPH) を組み合わせたPCR-マイクロ

*現在 種苗管理センター

* Present address: National Center for Seeds and Seedling, Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-0852, Japan.

プレート・ハイブリダイゼーション (PCR-MPH, Hataya et al., 1994) を用い、モモアカアブラムシからジャガイモ葉巻ウイルス (PLRV) の検出を試み、ELISA, RT-PCR より高感度にウイルスを検出できることを報告している。そこで本報告では、PCR-MPH を用いた MYSV の検出について検討を行った。

なお本研究に用いたミナミキロアザミウマを分譲していただいた、高知県農業技術センターの古味一洋氏、MYSV 抗血清を分譲していただいた同竹内繁治博士に厚くお礼申し上げる。

材料および方法

1. ウィルス株

ウィルス株は、2001年8月に高知県春野町のキュウリ（品種不明）より採取した「春野株」を用いた。本株は、高知県農業技術センターより分譲された MYSV 抗血清（竹内ら, 2001）と血清関係が認められた（データ未表示）。本株凍結葉を用いて以下の実験を行った。

2. RT-PCR

ウィルス感染葉または媒介虫からの RNA の抽出にはトリゾール (Invitrogen) を用い、添付説明書の方法に従って抽出した RNA を $20\mu\text{l}$ の RNase free 蒸留水に懸濁し、このうち $1\mu\text{l}$ を RT-PCR の錫型として用いた。トスボウイルスの RT-PCR に広く利用されている SRNA 上のスクレオカプシド (N) タンパク質遺伝子 (Okuda and Hanada, 2001) を増幅するため、既報の MYSV (加藤・花田, 2000) および MYSV と同一種と報告されている Physalis severe mottle virus (PSMV, Cortez et al., 2001; 加藤・花田, 2000) の同配列を参考に、N タンパク質遺伝子を含む領域を増幅させるプライマーセット (NF 3: 5'-TTAAACTTCAATGGACTTA GAYCTGG-3', NR3: 5'-TTAAACTTCAATGGACTT AGAYCTG-3') を作製した。

RT-PCR は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用して以下の手順で行った。 $1\mu\text{M}$ リバースプライマー (NR3), 4units RNase inhibitor, 5mM MgCl₂, 0.5mM dNTPs, 1 unit AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa) に、酵素添付 $10\times$ buffer (TaKaRa) $1\mu\text{l}$ 、上記方法で抽出した錫型 RNA $1\mu\text{l}$ を加え、蒸留水で $10\mu\text{l}$ とした。 42°C 20分逆転写反応を行い、 99°C 5分、 4°C 5分の反応で逆転写酵素を失活させた。この反応液 $4\mu\text{l}$ に、 $0.5\mu\text{M}$ フォワードおよびリバースプライマー (NF3, NR3), 0.25mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1.25unit Taq ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), 酵素添付 $10\times$ buffer

(Applied Biosystems) $4\mu\text{l}$ を加え蒸留水で $40\mu\text{l}$ とし、 95°C 9分の反応後、 94°C 1分、 55°C 2分、 72°C 3分の反応を30サイクル繰り返し、最後に 72°C 7分の反応を行って cDNA を増幅した。RT-PCR 産物は、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色して解析した。

3. MYSV N タンパク質の塩基配列解析

RT-PCR で増幅された cDNA をプラスミド (pT7-Blue T-Vector, Novagen) にクローニングし、大腸菌 (JM109株) を形質転換後、目的の MYSV N タンパク質遺伝子を持つクローンを選抜した。塩基配列の決定は、DNA シークエンサー (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) により、ダイターミネーター法で行い、3 クローンについて双方向から配列を読取った。決定した塩基配列は、DNASIS-Windows (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて解析した。

4. MYSV 特異的標識プローブの作製

シークエンスに供試した精製プラスミド (pT7-MYSV7, 20ng/ μl) $1\mu\text{l}$ を錫型に、Hataya et al. (1994) の方法に基づいて DIG 標識プローブの作製を行った。プライマーは NF3, NR3 各 $0.4\mu\text{M}$ を用い、1.25 unit AmpliTaq Gold と酵素添付 $10\times$ buffer を用い、PCR を行った。PCR の温度条件は 94°C 4分、 50°C 2分、 72°C 2分の反応後、 94°C 1分、 56°C 2分、 72°C 1分の反応を30サイクル行い、最後に 72°C 7分の反応を行った。この反応物をカラム (SizeSep 400 Spun columns, Amersham Pharmacia Biotech) で精製した。

5. PCR-MPH

PCR-MPH は、Hataya et al. (1994) の方法により行った。ただし、MYSV キュウリ感染葉から RNA を抽出し、発色基質として p-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム $100\mu\text{l}$ を添加し、吸光度 (A405nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。判定は、健全葉との吸光度差が 0.02 以上のものを陽性とした。

6. 検出感度の比較

MYSV 感染キュウリ葉を供試し、ELISA, RT-PCR, PCR-MPH を行って各検出法の検出限界を比較した。ELISA は、高知県農業技術センター分譲の抗 MYSV ポリクローナル抗体および抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Sigma) を用いた間接法 (竹内ら, 2001) で行った。試料は、1ウェルあたり感染葉 0.02 g 相当が含まれるように 0.05M 炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈したものを 5^{-1} 希釈とし、 5^{-10} まで段階希釈して用いた。判定は、基質添加30分後に吸光度 (A405nm) を測定し、健全葉の2倍以上のものを陽性とした。RT-PCR も 1 チューブあ

たり感染葉0.02g相当から抽出したRNAを鋳型として用いた場合を 5^{-1} 希釈とし、 5^{-10} まで段階希釈して行った。またPCR-MPHは上記RT-PCRの増幅産物を用いて行い、基質添加3時間後に吸光度を測定した。RT-PCR, PCR-MPHとも上述の方法で行った。

7. ミナミキイロアザミウマからのMYSVの検出

ミナミキイロアザミウマ成虫を、MYSV感染キュウリ葉に放飼して産卵させ、2齢幼虫を用いてMYSVの検出を行った。RNA抽出、RT-PCR、PCR-MPHは、それぞれ上述の方法により行った。PCR-MPHは基質添加1時間後に吸光度を測定した。

結 果

1. MYSV Nタンパク質遺伝子の増幅および塩基配列

MYSV「春野株」キュウリ感染葉から抽出したRNAを鋳型にRT-PCRを行った結果、約900bpのDNA断片の増幅が認められた(第1図レーン2)。健全キュウリ葉からは、このようなDNA断片は増幅されなかった(データ未表示)。この増幅断片の塩基配列は、既報MYSV静岡株と97%、PSMVとは96%の相同性を示した。推定されるNタンパク質のアミノ酸数は279で、既報のMYSV静岡株およびPSMVとの相同性は98.9%と高かった。またMYSV高知株とは全てのアミノ酸配列が一致し、本株が既報MYSV分離株と極めて近い関係にあることが示された(第2図)。

2. PCR-MPH

PCRにより作製したDIG標識プローブをアガロース電気泳動したところ、同一プライマーで増幅したRT-PCR断片(第1図レーン2)に較べ、DIG-11-dUTPの取り込みによる移動度の遅れが観察され、プローブの正

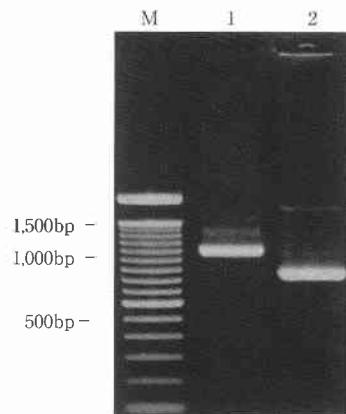
常な作製が確認された(同レーン1)。このプローブを用いてPCR-MPHを行ったところ、感染葉のRT-PCR増幅断片からのみ高い吸光値が得られた。一方、健全葉を供試してPCR-MPHを行ったところ、全く反応が認められなかった(データ未表示)。

3. 検出感度の比較

MYSV感染キュウリ葉を用い、ELISA、RT-PCR、PCR-MPHによる検出限界を比較したところ、ELISA、RT-PCRでは 5^{-6} 希釈まで検出が可能であった。これに対し、PCR-MPHは 5^{-10} 希釈まで検出ができた(第3図)。

4. ミナミキイロアザミウマからのMYSVの検出

ミナミキイロアザミウマ2齢幼虫1個体からRT-PCRおよびPCR-MPHでMYSVの検出を試みた。その結果、RT-PCRでは供試15個体中4個体からMYSVを検



第1図 RT-PCRによるMYSV Nタンパク質遺伝子領域の増幅産物ならびにMYSV DIG標識プローブのアガロース電気泳動

M、分子量マーカー(100bp ラダー、GIBCO BRL)；1、MYSV DIG標識プローブ；2、MYSV感染キュウリ葉。

	1	50	100	
春野株	MSTVAKLTKE K1QELLSSGGK SEVEIETEES TEGFNFHSSFF	RDVRDEVKLN YNNGITILKS RKQVYAAACKS GNYKFCGKKI	VASGDNVGPQ	DWTFKRTEAV
高知株	MSTVAKLTKE K1QELLSSGGK SEVEIETEES TEGFNFHSSFF	RDVRDEVKLN YNNGITILKS RKQVYAAACKS GNYKFCGKKI	VASGDNVGPQ	DWTFKRTEAV
静岡株	MSTVAKLTKE K1QELLSSGGK SEVEIETEES TEGFNFHSSFF	RDVRDEVKLN YNNGITILKS RKQVYAAACKS GNYKFCGKKI	VASGDNVGPQ	DWTFKRTEAV
PSMV	MSTVAKLTKE K1QELLSSGGK SEVEIETEES TEGFNFHSSFF	RDVRDEVKLN YNNGITILKS RKQVYAAACKS GNYKFCGKKI	VASGDNVGPQ	DWTFKRTEAV
101				
春野株	IRTMISIAE KTENEEEEKQK MYEKAMQLPL VAAYGLTVPA KFDNTALRLL LC1GGPLSLL ASLHSLCPVW LPLAYFQNVK KEQLGIKNFS TYEQICKIAR			
高知株	IRTMISIAE KTENEEEEKQK MYEKAMQLPL VAAYGLTVPA KFDNTALRLL LC1GGPLSLL ASLHSLCPVW LPLAYFQNVK KEQLGIKNFS TYEQICKIAR			
静岡株	IRTMISIAE KTENEEEEKQK MYEKAMQLPL VAAYGLTVPA KFDNTALRLL LC1GGPLSLL ASLHSLCPVW LPLAYFQNVK KEQLGIKNFS TYEQICKIAR			
PSMV	IRTMISIAE KTENEEEEKQK MYEKAMQLPL VAAYGLTVPA KFDNTALRLL LC1GGPLSLL ASLHSLCPVW LPLAYFQNVK KEQLGIKNFS TYEQICKIAR			
201		150	200	
春野株	VMSASNMTFK KEFDELFKSC VKILADCKPG TTSGISLK1Y NEQVQFMEQA FKSSLVVDGM GESSSKSKAS SSRSKSIEV			
高知株	VMSASNMTFK KEFDELFKSC VKILADCKPG TTSGISLK1Y NEQVQFMEQA FKSSLVVDGM GESSSKSKAS SSRSKSIEV			
静岡株	VMSASNMTFK KEFDELFKSC VKILADCKPG TTSGISLK1Y NEQVQFMEQA FKSSLVVDGM GESSSKSKAS SSRSKSIEV			
PSMV	VMSASNMTFK KEFDELFKSC VKILADCKPG TTSGISLK1Y NEQVQFMEQA FKSSLVVDGM GESSSKSKAS SSRSKSIEV			

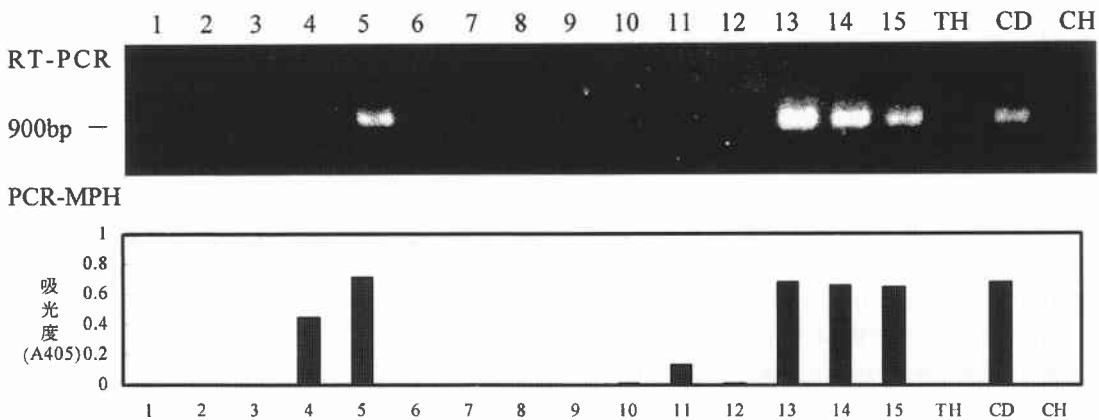
第2図 MYSV各分離株とPSMVのNタンパク質アミノ酸配列の比較

アミノ酸配列が異なる個所を反転文字で示した。春野株の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBankへ登録した(AB076250)。各分離株のアクセスションNo.または引用文献は次の通り。高知株、竹内ら(2001)；静岡株、(AB038343)；PSMV、(AF067151)。

	希釈率	5^{-1}	5^{-2}	5^{-3}	5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}	5^{-7}	5^{-8}	5^{-9}	5^{-10}
ELISA (A ₄₀₅)	感染葉	0.297	0.425	0.376	0.319	0.297	0.147	0.010	0.000	0.000	0.000
	健全葉	0.000	0.000	0.000	0.003	0.026	0.033	0.011	0.000	0.004	0.000

RT-PCR	900bp —										
PCR-MPH (A ₄₀₅)	感染葉	0.439	1.827	1.838	1.863	1.858	1.862	1.218	1.321	0.272	0.030
	健全葉	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

第3図 ELISA, RT-PCR, PCR-MPHによるMYSV検出感度の比較



第4図 RT-PCR, PCR-MPHによるアザミウマ1個体からのMYSVの検出

1～15, MYSV 感染キュウリ葉で飼育したミナミキイロアザミウマ2齢幼虫; TH, 健全ミナミキイロアザミウマ2齢幼虫; CD, MYSV 感染キュウリ葉; CH, 健全キュウリ葉。

出した(第4図レーン5, 13, 14, 15)。これに対し、PCR-MPHでは上記4個体に加え、RT-PCRでは検出できなかった2個体(同レーン4, 11)からもウイルスを検出した。

考 察

本報告では、RT-PCRとDIG標識プローブによるハイブリダイゼーションを組み合わせたPCR-MPH法を用いて、MYSV感染キュウリ葉およびミナミキイロアザミウマから高感度にウイルスの検出ができる事を示した。供試したMYSV「春野株」のNタンパク質の塩基配列は、既報MYSV2分離株と極めて高い相同性を示したことから、作製したDIG標識プローブは、MYSVの検出に広く利用できるものと思われる。

PCR-MPHの検出感度は、ELISAおよびRT-PCRの625倍で、感染葉から抽出した全RNAの約1,000万倍希釈液からもウイルスを検出した。竹内ら(2001)は、

ELISAで感染キュウリ葉の約13万倍希釈液からMYSVを検出しているが、本報告ではさらに高感度な検出法を確立することができた。

本法を用い、MYSV感染キュウリ上で飼育したミナミキイロアザミウマからウイルス検出を試みた結果、供試15個体中6個体からウイルスが検出された。このうち2個体は、RT-PCRではウイルスが検出できなかった。この2個体のPCR-MPHでの吸光度は、両法で検出が確認できた4個体の吸光度より低く、個体内のウイルス蓄積量が微量であることが示唆された。Tsuda et al. (1994)は、RT-PCRを用いてアザミウマからトマト黄化えそウイルス(TSWV)を検出し、TSWVを伝搬しないアザミウマ個体からもウイルスが検出されることを報告している。本試験では供試アザミウマのウイルス伝搬を確認していないため、これらの個体がウイルス伝搬能を持つかは不明である。MYSVにおいても、媒介虫であるアザミウマ個体でのウイルス蓄積量と伝搬能の関係

を明らかにすることは重要であり、本法を利用し、両者の関係を明らかにしていく必要がある。

MYSV の根絶のためには、植物およびアザミウマからウイルスを高感度かつ簡便に検出する手法が必要である。本法は、検出感度については問題はないが、RNA 抽出・RT-PCR・ELISA の各作業段階を要するため、簡便性には欠ける。今後、手技の簡便化を検討することにより、本法の利用範囲はさらに広がると考えられる。

摘要

高知県で発生している MYSV について、PCR-マイクロプレート・ハイブリダイゼーション (PCR-MPH) 法による植物 (キュウリ) およびアザミウマからの検出を試みた。MYSV「春野株」の N タンパク質遺伝子領域を RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定したところ、既報 MYSV 静岡株と 97%, PSMV とは 96% の相同意性を示した。推定されるアミノ酸数は 279 で、MYSV 高知株と全アミノ酸配列が一致した。この領域を用いて DIG 標識プローブを作成し、PCR-MPH を行ったところ、MYSV 感染キュウリ葉からのみ特異的にウイルスが検出された。PCR-MPH の検出感度は ELISA, RT-PCR の 625 倍であり、MYSV 感染キュウリ葉から抽出したウイルス RNA の 1,000 万倍希釈液からのウイルス検出が可能であった。また MYSV 感染キュウリで飼育したミナミキイロアザミウマ 2 歳幼虫 1 個体からウイルスの検出を行った結果、RT-PCR では供試 15 個体中 4 個体からウイルスが検出されたが、PCR-MPH では RT-PCR では検出できなかつた 2 個体からもウイルスが検出された。

引用文献

Cortez, I., J. Saaijer, K.S. Wongjkaew, A.-M. Pereira, R. Goldbach, D. Peters and R. Kormelink (2001) Identification and characterization of a novel

tospovirus species using a new RT-PCR approach. Arch. Virol. 146 : 265-278.

Hataya, T., A.K. Inoue and E. Shikata (1994) A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection. J. Virol. Methods. 46 : 223-236.

池田二三高・加藤公彦・塚本剛弘 (2001) 静岡県におけるメロン黄化えそ病根絶の経過. 植物防疫 55 : 397-400.

加藤公彦・花田 薫 (2000) メロン黄化えそウイルスの S RNA の特性. 日植病報 66 : 252-254.

Kato, K., K. Hanada and M. Kameya-Iwaki (1999) Transmission mode, host range and electron microscopy of a pathogen causing a new disease of melon (*Cucumis melo*) in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65 : 624-627.

Okuda, M. and K. Hanada (2001) RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. J. Virol. Methods. 96 : 149-156.

佐藤仁敏・畠谷達児・川上賢一・鹿野恭・盛文江 (1999) PCR-マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法によるアブラムシからのジャガイモ葉巻ウイルスの検出. 北日本病虫研報 50 : 65-70.

竹内繁治・奥田 充・花田 薫・川田洋一・亀谷満郎 (2001) メロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus*) によるキュウリ (*Cucumis sativus*) の黄化えそ病. 日植病報 67 : 46-51.

Tsuda, S., I. Fujisawa, K. Hanada, S. Hidaka, K. Higo, M. Kameya and K. Tomaru (1994) Detection of Tomato spotted wilt virus S RNA in individual thrips by reverse transcription and polymerase chain reaction. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60 : 99-103.

(2002年4月30日受領；6月26日受理)