

大腸菌発現タンパク質抗血清を用いた トマト黄化葉巻ウイルスの検出

上田 重文¹⁾・石井 貴明²⁾・花田 薫¹⁾*・岩波 徹¹⁾*

(¹⁾九州沖縄農業研究センター・²⁾福岡県農業総合試験場)

Detection of Tomato yellow leaf curl virus using antiserum against recombinant viral coat protein. Shigenori Ueda¹⁾, Takaaki Ishii²⁾, Kaoru Hanada¹⁾* and Toru Iwanami¹⁾

(¹⁾ National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan. ²⁾ Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan)

Key words: antiserum, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)

緒 言

トマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV) を病原とするトマト黄化葉巻病は、1996年に静岡、愛知、長崎各県から相次いで発生が報告されたわが国における新しい病害である (Kato et al, 1998; 大貫ら, 1997)。以降、主に九州と東海地方で年々発生地域が拡大し、現在ではトマト栽培上の最重要病害の一つとして警戒されるようになっている。また、トルコギキョウの葉巻症を引き起こす病原であることが確認されている (道添, 2001; 内川ら, 2002)。TYLCV はジェミニウイルス科ベゴモウイルス属に属し、1990年代前半に海外から国内に侵入してきたと考えられるシルバーリーフコナジラミ (*Bemisia tabaci* B biotype) によって媒介される。国内で発生している TYLCV はウイルスゲノムの塩基配列が解析され、九州地方で発生しているウイルスは TYLCV-Is に、東海地方で発生しているウイルスは TYLCV-Is. M にそれぞれ極めて近縁な系統であることが確認された (Kato et al, 1998; 大貫, 2000)。これまで国内では、TYLCV 検出のための抗血清が存在しなかったことから、トマト等の罹病株の診断法として、専らウイルスゲノムに相補的なプライマーを用いた PCR による遺伝子診断が実施されている (大貫・花田, 2000)。そのため、より普及性の高い酵素結合抗体法 (ELISA) に適用できるような TYLCV 抗血清の作出が強く望まれている。また、本ウイルスは汁液接種が不可能であること、師部局在性であること等の理由から

抗血清作製のための均一かつ多量なウイルス抗原を得ることが容易ではない。そこで、本研究では大腸菌内タンパク質発現系を用いて外被タンパク質 (CP) を作製し、特異性の高い抗血清の作出を試みた。また、作製した抗血清を用い、簡易 ELISA によるトマト葉からのウイルス診断法を検討した。

材料および方法

1. CP 遺伝子の発現ベクターへのクローニング

TYLCV 長崎系統罹病トマト葉から大貫ら (1999) の方法で抽出した全核酸を鋳型 DNA として PCR に供試した。TYLCV の CP 遺伝子をコードする領域に特異的なプライマーを用いて CP 領域の全長または、C' 末端側約 1/2 の断片を増幅した。PCR は、Ex *Taq* polymerase (Takara) を用いて、96°C、3分間の後、96°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分、30サイクル、72°C 5分、1サイクルで行った。CP 遺伝子の増幅に使用したプライマーを下記に示す。

TYLCV/CP/atg

(GTGTAGGCGAATTCATGTCTGAAGCGACCAG)

TYLCV/CP/taa

(GGCGTCTGCAGTTAATTTGATATTGAATC)

TYLCV/CP/330

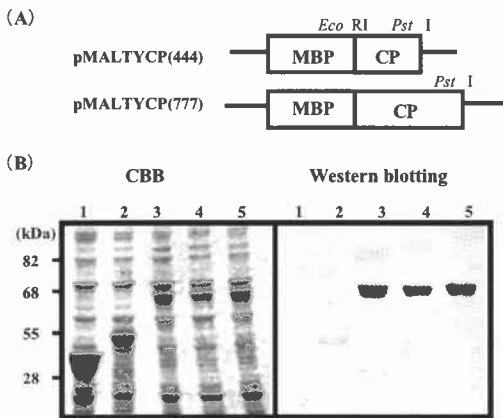
(GTGTAGGCGAATTCCTTCTGTGTTAAATCGA)

CP 全長断片の増幅には TYLCV/CP/atg と TYLCV/CP/taa を、1/2 領域部の増幅には TYLCV/CP/330 と TYLCV/CP/taa の組合せを用いた。

増幅した PCR 断片をそれぞれ制限酵素 *EcoRI*, *PstI* で切断後、ベクター pMAL-c 2 へ挿入し pMALTYCP (777) 及び pMALTYCP (444) を構築した (第 1 図

*現在 農業生物資源研究所

*Present address: National Agricultural Research Institute, Tsukuba, Ibaraki, Japan



第1図 TYLCV CP 融合タンパク質の大腸菌内発現
(A) MBP - CP 発現ベクターのコンストラクト
(B) 発現タンパク質のウエスタンブロッティングによる確認 Lane 1 ; pMAL-c2, 2 ; pMALTYP(444), 3-5 ; pMALTYP(777)

(A))。

2. 大腸菌内タンパク質発現と抗血清の作製

pMALTYP(444) 及び pMALTYP(777) を用いて、大腸菌 DH5 α を形質転換し、常法に従ってタンパク質の発現及び融合タンパク質の精製を行った。変性処理した培養菌液を 12.5% SDS-PAGE に供試し泳動後、クマジーブリリアントブルー (CBB) で染色した。さらに、Hybond-C (Amersham) に転写後、1,000倍希釈した抗 TYLCV 血清 (ADGEN) を用いてウエスタンブロッティングによりウイルス由来の CP が大腸菌内でマルトース結合タンパク質 (MBP) と融合タンパク質として発現していることを確認した (第1図 (B))。MBP と CP の融合タンパク質 (MBP-CP) の精製には、MBP 親和性リジン (NEB) を用いた。

精製した MBP - CP (計約 500 μ g) をウサギに免疫し、抗血清を作製した。さらに、作製した抗血清より、ImmunoPure IgG (Protein A) Purification Kit (PIERCE) を用いて IgG を精製し、血清学的検定に供試した。

3. 血清学的検定

抗血清より精製した IgG または、アルカリフォスファターゼ標識したコンジュゲートを用いて ELISA 及びウエスタンブロッティングによる血清学的検定法を検討した。供試した純化ウイルスは、TYLCV 長崎系統罹病トマトより Luisoni ら (1995) の方法に準じて精製した。

ELISA に供試した純化ウイルスの希釈、およびウイルス罹病葉の磨砕には抽出バッファー (50 mM Tris-

HCl, 60 mM Na₂SO₄, 2.5 mM EDTA, pH 8.5, 1% メルカプトエタノール, 0.5% TritonX-100) を用いた。

IgG の純化ウイルスに対する特異性検定は以下の通り行った。マイクロプレートの 1 ウエル当たり純化ウイルスを各 1, 0.2, 0.1 μ g および対照として MBP-CP 0.03 μ g となるように抽出バッファーで希釈後、各ウエルに分注し、37°C で 2 時間固層させた。PBST で洗浄後、PBST + 5% スキムミルク溶液で 500 倍希釈した IgG 溶液を各ウエルに分注した。以降は常法 (Clark and Adams, 1977) に準じて、2 次抗体処理、*p*-nitrophenyl phosphate を基質とした発色反応による吸光度 (O.D.405 nm) をマイクロプレートリーダー (Biolabs) で測定した。試験は、1 検体につき 2 反復で行い、両測定値の平均を試験区の吸光度とした。

ウイルス罹病トマト葉を用いた検定は次の通り行った。ウイルス罹病株 (品種: ハウス桃太郎) の上位葉または新葉各 100mg を乳鉢内で 1 ml の抽出バッファー (但し 1% TritonX-100) で磨砕した後、磨砕液をチューブへ移し 5 分間激しく懸濁した。300 μ l のクロロホルムを加えさらに 5 分間同様に懸濁後、室温で 12,000rpm 5 分間遠心し上清を回収した。上清に等量の 50mM 炭酸ナトリウム溶液 (pH9.6) を加えて 2 倍希釈後各ウエルに分注し、37°C で 2 時間固層させた。PBST で洗浄後、PBST + 2% BSA 溶液で 1,000 倍希釈したコンジュゲート溶液を各ウエルに分注し、以降は上述と同様に行った。

結 果

大腸菌内タンパク質発現

CP 遺伝子全長または 1/2 領域部を pMAL-c2 へ挿入し構築した pMALTYP(777) および pMALTYP(444) はいずれも、大腸菌内で既知のアミノ酸配列より推定される分子量 (61.5 及び 47.5 kDa) に相当する融合タンパク質が合成され、かつ TYLCV 抗体に対し特異的に反応することが確認された (第1図)。両試料を比較すると CP 遺伝子全長を発現させた融合タンパク質が抗体に対し高く反応したことから、抗血清の作製に pMALTYP(777) 由来の MBP-CP を抗原として用いた。

血清学的検定

作製した抗血清の力価を検討するために、抗血清および抗血清より精製した IgG 溶液を用いて、抗原として用いた MBP-CP および純化ウイルスに対してウエスタンブロッティングを行った。その結果、いずれも MBP-CP に対しては感度の高い特異的反応性を示したが、純化ウイルスに対しては弱い反応しか得られなかった。そ

ここで、抗原を未変性条件下で抗体と反応させるため、抗原固相法による ELISA (間接 ELISA) による検出を試みた。その結果、MBP-CP のみならず純化ウイルスに対して特異的反応が認められた (第 2 図)。また、純化ウイルスに対しては IgG 溶液 500 倍のみならず 1,000 倍希釈条件下でも十分な陽性反応が認められた。

本結果に基づいて、MBP-CP 特異的 IgG より作製したコンジュゲートを用いて、罹病トマト葉からの ELISA による診断法確立のため、各段階の条件を検討した。当初、有意な結果が得られなかったが、磨砕液をクロロホルム処理した後の上清を供試することで大幅に検出感度が向上し、長崎系統の罹病トマト葉から、健全葉に比べ 2 倍を超える吸光度が検出された (第 3 図)。しかし、本条件下で静岡・愛知株罹病葉を用いた場合は、陽性値を得ることができなかった。

考 察

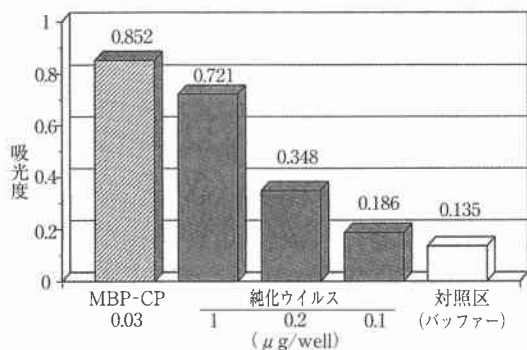
TYLCV は、宿主植物の師部組織の細胞核に局在し、植物体中のウイルス濃度も高くない。そのため、抗血清を作製するために必要な高純度のウイルス試料の精製は容易ではない (Luisoni ら, 1995)。そこで、大腸菌発現系を用いて TYLCV 長崎系統に対する抗血清の作製とその抗血清による罹病葉からの検出法を検討した。作製した抗血清は、抗原に用いた MBP-CP に対しては、ウエスタンブロッティングおよび ELISA で高い特異的反応を示した。一方、純化ウイルス試料に対してはウエスタンブロッティングでは明瞭な反応が検出できず、ELISA のみ特異的な反応を確認できた。この原因として、融合タンパク質として発現させた MBP-CP のウイルス CP 内に存在する抗原基のいくつかが高次構造上変化してしまい、免疫時に機能しなかった可能性が推測された。

本抗血清より精製した IgG を用いた間接 ELISA では、純化ウイルス試料のみならず TYLCV 長崎系統罹病トマト葉磨砕試料においても特異的反応が認められた。したがって、本抗血清は九州内で発生している TYLCV 長崎系統の診断に有効であることが確認された。一方、本試験では静岡・愛知系統に対しては長崎系統に比べ、十分に検出可能な結果が得られなかった。長崎系統と静岡・愛知系統間の CP アミノ酸配列間の相同性は約 98% である。この僅かな差異が本結果に大きく影響したとは考えにくく、むしろ植物体中での複製能力の差異等が、大きく作用している可能性が示唆された。

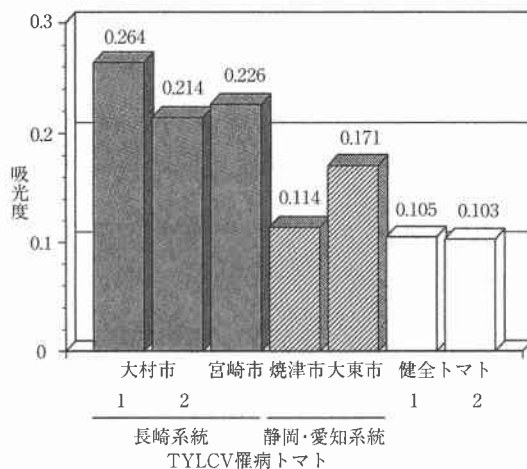
本研究および石井ら (2003) の純化ウイルスを用いて作製した抗血清が普及することにより、国内でも近い将来トマト黄化葉巻病並びにトルコギキョウ葉巻症の診断が、PCR による遺伝子診断法に依存せずに容易に ELISA 等のできるようになるであろう。

摘 要

トマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) の血清学的手法による検出技術を確認するため、大腸菌内で発現させたウイルス外被タンパク質 (CP) を抗原として作製した抗血清でウイルスの検出を試みた。大腸菌内発現用ベクター pMAL-c 2 に、マルトース結合タンパク質 (MBP) と融合タンパク質として TYLCV 長崎系統の CP が発現するように導入したクローンを構築した。このクローンをを用いて形質転換した大腸菌で MBP-CP 融合タンパク質を発現させ、親和性カラムで精製した融合タンパク質を抗原としてウサギに免疫し、抗 TYLCV-CP 血清を作



第 2 図 純化ウイルスに対する特異性 (間接 ELISA, コンジュゲート 1,000 倍希釈)



第 3 図 罹病トマト葉からの検出 (間接 ELISA, IgG500 倍希釈)

製した。本抗血清より精製したIgGを用いてELISA法で検討したところ、純化ウイルスおよびTYLCV長崎系統罹病トマト葉磨砕液に対し特異的な陽性反応が認められた。

引用文献

- Clark, M. F. and A. N. Adams (1977) Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- 石井貴明・上田重文・花田 薫・嶽本弘之 (2003) 抗トマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) 血清を用いたELISA法によるトマト黄化葉巻ウイルスの検出。平成15年度日植病大会講演要旨集501。(講要)
- Kato, K., M. Onuki, S. Fuji and K. Hanada (1998) The first occurrence of tomato yellow leaf curl virus in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 64: 552-559.
- Luisoni, E., R. G. Milne and M. Vecchiati (1995) Purification of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Microbiologica*. 18:253-260.
- 道添英昭 (2001) 長崎県におけるトマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) の発生について。 *農業研究*46: 1-5.
- 大貫正俊 (2000) トマト黄化葉巻病。 *農業及び園芸*75: 108-113.
- 大貫正俊・花田 薫 (2000) 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。 *九病虫研究会報*46: 54-57.
- 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・酒井淳一・花田 薫 (1999) ナス科作物に対する2種の類似ジェミニウイルス病害のPCR診断。 *日植病報*65: 382。(講要)
- 内川敬介・上田重文・大貫正俊・花田 薫 (2002) Tomato yellow leaf curl virusによるトルコギキョウ葉巻病 (新称) の発生。 *日植病報*68: 50。(講要)
(2003年4月15日受領; 6月4日受理)