九病虫研会報 49：50-55（2003）
Kyushu Pl. Prot. Res. 49：50-55（2003）

ワンステップ・イムノキャプチャーＲＴ-ＰＣＲ法による カンキツからのリンゴステムグルービングウイルスの検出

草野　成夫・井樋　昭宏
（福岡農総試果樹苗木分場）

Detection of *Apple stem grooving virus* from citrus plants by one-step immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction（One-Step IC-RT-PCR）. Nario Kusano and Akihiro Ibi（Fruit Tree Sapling Branch, Fukuoka Agricultural Research Center, Tanushimaru, Fukuoka 839-1212, Japan）

Apple stem grooving virus（ASGV）is the pathogen which causes bud-union creases in citrus trees grafted on triforiate orange rootstocks. A one-step immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction (One-Step IC-RT-PCR) for detection of ASGV from citrus plants was developed. In this method, it is possible to use the one PCR reaction tube through all steps. Moreover, the virus could be detected from about one million dilution of clarified extracts obtained from young citrus leaves when 0.1% TritonX-100 was added to extraction buffer. The result showed that One-Step IC-RT-PCR is a highly sensitive and simple method for the detection of ASGV in citrus.

Key word : *Apple stem grooving virus*, heat treatment, One-Step IC-RT-PCR

緒　　言

カラタチ台カンキツ樹で接ぎ木部異常病を起こす（Calavan et al., 1963）病原である，リンゴステムグルービングウイルス（*Apple stem grooving virus*, ASGV）は，従来，カンキツタターリーフウイルス（Citrus tatter leaf virus, CTLV）と呼ばれていたが，ウイルスゲノムの構造解析からASGVへ名称変更が行われた（Yoshikawa et al., 1993, Magome et al., 1997）。日本ではカンキツ栽培の台木として最も広くカラタチを用いているが，本ウイルスに感染すると台木部と穂木部の間に離層が形成され，樹液の流動が阻害されることにより樹勢や収量が低下し，やがては枯死に至ることから，カンキツ栽培上重要な病害となっている。福岡県では，本病害を予防するため，酵素結合抗体法（enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA）による検定を年間約3,500検体実施している。しかし，ELISAでは，検定に用いるサンプルの採取時期が新梢発生時に限られていることや，判定が困難な擬陽性の試料が存在する等の問題がある。そこで，下村ら（2002）は，Kinard et al.(1996）やNemchinov et al. (1995）等の方法を参考にイムノキャプチャーRT-PCR法（immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction）をASGVへ適用し，ELISAでは検出が困難な硬化葉や樹皮でも検定可能であることを示した。今回，更により高感度，簡易，迅速な方法として，抗体によるウイルス粒子の捕捉からRT-PCR反応までの処理を１本のPCRチューブ内で行うワンステップ・イムノキャプチャーRT-PCR（ワンステップIC-RT-PCR）を検討し，良好な結果を得たので報告する。

材料および方法

１．供試ウイルス

供試ASGVとして，徳島果樹試験場より1981年に分譲され当試験場で保存しているBD-44（興津早生），TO-1（興津早生），一般ほ場より採集し温州萎縮ウイルスも保毒しているSC-1（上野早生）の３株を使用し，５月の新梢（茎部含む）および11月の硬化葉を検定試料として供試した。

２．PCR用プライマー

ASGVは遺伝的に変異を起こしやすいと言われており，カンキツにおいても接ぎ木部異常の程度に差がある様々な系統が報告されている（岩波ら，1991）。また，リンゴやナシでは，同一樹体内に複数の塩基配列変異株が存在することが明らかにされている（Yoshikawa et al., 1996)。今回は，第１表に示した３種類のプライマー

第1表　使用したプライマーと位置

〈プライマーセット　NO.1〉	〈位置[a]〉
①　5'-AGTTTGGAAGACGTGCTTCG-3'	5644-5663
②　5'-AGAGTGGACAAACTCTAGAC-3'	6496-6477
〈プライマーセット　NO.2[b]〉	〈位　置〉
①　5-AGGCAGAACTCTTTGACCGA-3'	6049-6068
②　5'-AGAGTGGACAAACTCTAGAC-3'	6496-6477
〈プライマーセット　NO.3〉	〈位　置〉
①　5'-AAGAAATGGCCCAAAGCTTT-3'	6163-6182
②　5'-AGAGTGGACAAACTCTAGAC-3'	6496-6477

a）Yoshikawa et al.（1996）のASGV（P-209）ゲノムにおける塩基配列
b）①：CTLV-CP2(+)，②：ASCT-3'（-）

セットを用いたが，下村ら（2002）が，使用したプライマーの中で多数の分離系統を検出するのに有効と結論づけたプライマーセットNo.2［CTLV-CP2(+)およびASCT-3'(-)］を特に記述しない限り使用した。

3．ELISA，RT-PCRおよびワンステップIC-RT-PCR用試料の調整

植物試料を磨砕する際の緩衝液の種類は，0.1%チオグリコール酸加用0.1Mクエン酸緩衝液（CB-T：クエン酸三ナトリウム3.4g，蒸留水1L，pH7.2）とした。植物体0.2gに対し10倍容（2 *ml*）のCB-Tを使用し，磨砕後5,000rpmで10分間遠心して，その上清（10倍希釈磨砕液）をELISAおよびワンステップIC-RT-PCR試験に使用した。なお，磨砕液の段階希釈には磨砕緩衝液を用いた。また，磨砕緩衝液への添加剤として，ELISAで検出感度向上のために用いられることがあるトリトンX-100およびブロックエース（大日本製薬）を組み合わせて検討を行った。なお，RT-PCRには，RNA抽出試薬であるISOGEN（ニッポンジーン）を用い，添付マニュアルに従って抽出したRNA試料を鋳型として使用した。

4．ELISA，RT-PCRおよびワンステップIC-RT-PCR

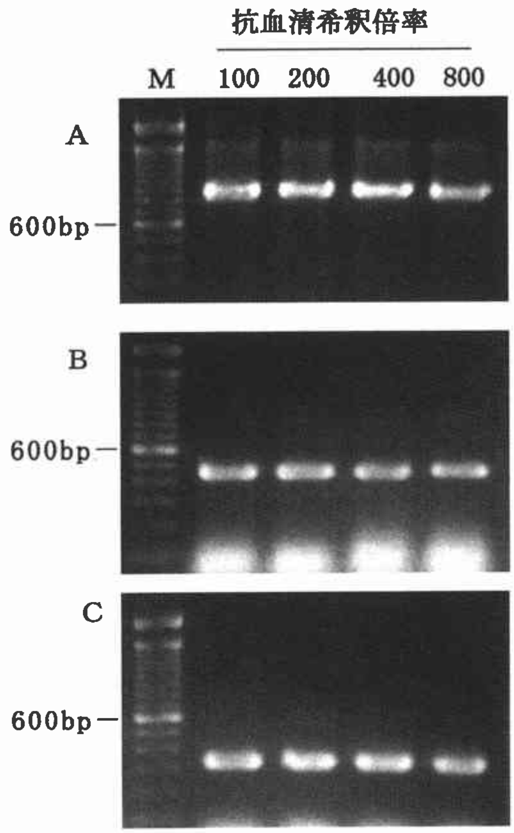
ELISAの手順は，既報（草野ら，1995）に従った。ELISAには，ヌンク社の96穴のマイクロプレートおよびグライナー社のイミュロン600のマイクロプレートを使用した。マイクロプレートリーダー（SLT社，EAR400FW）により，発色操作120分後に吸光度（OD 405nm）を測定した。なお，各ステップの間には，発色基質分注まで0.05% Tween20加用0.02Mリン酸緩衝液（リン酸一カリウム0.2g，リン酸二水素ナトリウム1.15g，塩化カリウム0.2g，塩化ナトリウム0.2g，蒸留水1L，pH9.6，以下PBS-T）による3回の洗浄を行った。

また，ワンステップIC-RT-PCRは，以下の手順で行った。200 μlのPCR用チューブ（Treff Lab）に，0.05M炭酸緩衝液（炭酸ナトリウム1.59g，炭酸水素ナトリウム2.93g，蒸留水1L，pH9.6）で100倍から800倍に希釈した50 μlの抗ASGV血清（日本植物防疫協会）を入れ，4℃，1晩または37℃，1時間インキュベートした後，PBS-Tで3回洗浄した。このコーティング済みチューブに前述のように調整した40 μlの試料を加えて，4℃で1晩静置した。試料を除去後，PBS-Tで3回洗浄し，次のステップであるRT-PCRを行った。また，通常のIC-RT-PCRで行われるPCRチューブ内で捕捉したウイルス粒子からRNAを蒸留水等で抽出するための熱処理（65℃，10分）の必要性の有無についても検討を行った。ワンステップIC-RT-PCRに用いるRT-PCR試薬としては，cMaster RTplusPCR System (eppendorf)，逆転写酵素M-MLV（invitrogen）とDNAポリメラーゼHotMaster Taq（eppendorf）またはPremix Taq（TaKaRa）の3種類の組み合わせを検討し，反応溶液中に逆転写酵素とDNAポリメラーゼを同時に添加した。サーマルサイクラー（PC808，アステック）の温度・時間等の条件は，35～68℃，50分で最適逆転写反応温度を検討し，PCRは熱変性94℃，20秒，アニーリング60℃，10秒，伸長反応72℃，30秒で35サイクル行い，逆転写反応とPCR反応を1本のチューブ内で連続的に行った。なお，比較対照として行ったRT-PCRは，下村ら（2002）の方法に準じた。PCR産物は，1.5%アガロースゲル電気泳動後，エチジウムブロマイドで染色を行った。

結果および考察

1．ワンステップIC-RT-PCRに用いるプライマーの種類と抗体濃度

第1図は，ウイルス粒子を捕捉するためのPCR用チューブのコーティング用抗血清希釈倍率別およびプライマーセット別にワンステップIC-RT-PCRによる特異的DNA断片の増幅程度を示したものである。この結果からは，100倍から800倍までその増幅産物量に明らかな差が認められず，3種類のプライマーセットとも良好であることが明らかとなった。なお，他の2株のASGVについても同様の結果となった（データ省略）。また，コーティング済みPCRチューブの保存試験も併せて行ったが，コーティング後すぐに使用したものと-80℃で6ヶ月保存したものでも増幅程度に差が認められなかった（データ省略）。よって，その後の試験においては，PCR用チューブに抗血清希釈倍率400倍でコーティ



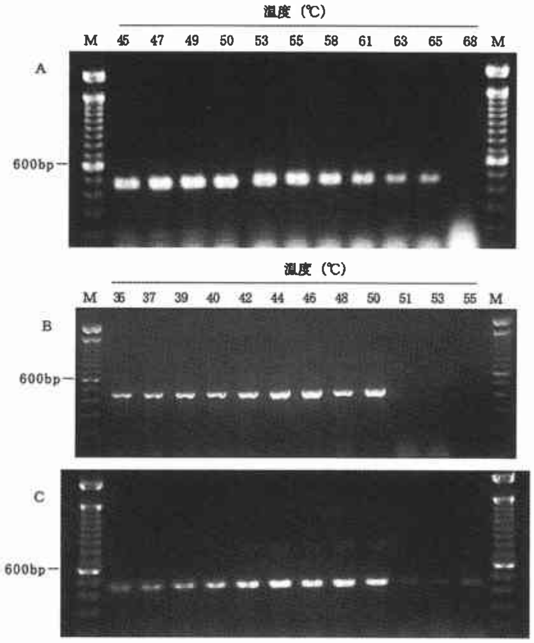
第1図　抗血清希釈倍率およびプライマーの種類の検討

A：プライマーセット No.1：850bp
B：プライマーセット No.2：450bp
C：プライマーセット No.3：330bp
M：100bp ラダー
供試試料：BD-44（興津早生）の新梢
抗体によるウイルス粒子捕捉後の熱処理なし

ングを行い，予め凍結したものを使用した。なお，コーティング抗体によるウイルス粒子捕捉後の熱処理の有無についても検討を行った。新梢磨砕液10倍希釈倍率で比較すると，熱処理の有無にかかわらず同程度のDNA断片が増幅された（データ省略）。したがって，その後の試験では熱処理を省略し，RT-PCR反応溶液をPCRチューブに直接添加することとした。

2．ワンステップIC-RT-PCRにおける逆転写酵素反応時の温度

cMaster RTplusPCR Systemを利用した場合は，49～50℃で増幅が良好であった（第2図）。また，逆転写酵素としてM-MLVを用いた場合，使用するDNAポリメラーゼの種類（HotMaster TaqおよびPremix Taq）にかかわらず44～48℃でPCR産物が最大となった（第2図）。よって，試薬コストの面から，M-MLVとPremix Taqとを組み合わせ，逆転写反応を45℃としてワンステップIC-RT-PCRを行うことが安価で最良と考えられ，その後の試験は本方法により実施した。なお，この場合のRT-PCR反応溶液組成は第2表の通りである。



第2図　逆転写反応時における酵素・温度別増幅程度

A：cMaster RTplusPCR System,
B：M-MLV+ HotMaster Taq,
C：M-MLV+Premix Taq
M：100bp ラダー,
供試株名：BD-44（興津早生）の新梢

第2表　ワンステップ・イムノキャプチャーRT-PCRの反応溶液組成

RNase-free Water	15.0μl
RNase Inhibitor（40units/μl）（TOYOBO）	0.2
Forward primer（100pmol/μl）	1.0
Reverse primer（100pmol/μl）	1.0
M-MLV reverse Transcriptase（Invitrogen）	0.2
PreMixTaq DNA polymerase（TaKaRa）	15.0
Total	32.4μl

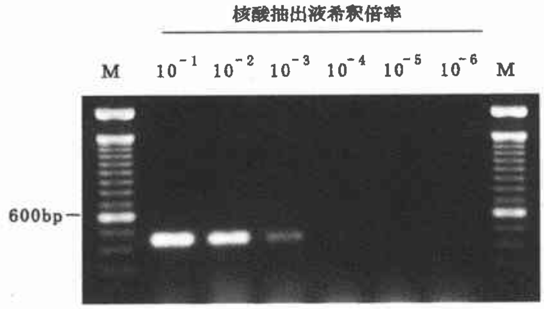
3．ELISA，RT-PCRおよびワンステップIC-RT-PCRによるASGV検出感度

ELISAにおける検出感度は，第3表の通りである。この結果からは，希釈倍率で810倍まで感染葉が健全葉の2倍以上の吸光度を示し検出可能であったが，下村ら（2002）は90倍までと報告している。これは，市販の

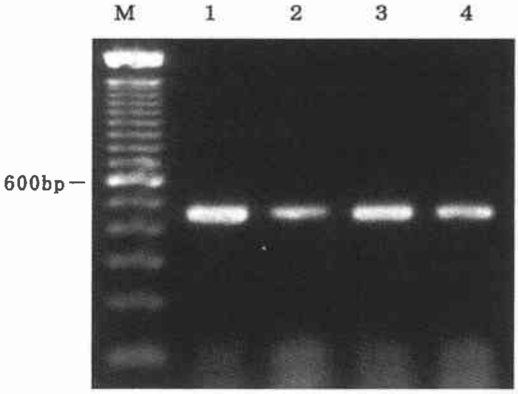
第３表　ELISA による検出感度

磨砕液希釈倍率	1 /10	1 /30	1 /90	1 /270	1 /810	1 /2430	1 /7290
感染葉 a)	0.785 c)	0.818	0.602	0.356	0.207	0.115	0.087
健全葉 b)	0.062	0.068	0.058	0.057	0.060	0.058	0.056

a）BD-44（興津早生）の新梢
b）ウイルスフリー興津早生の新梢
c）ELISA 値：OD405nm の吸光度

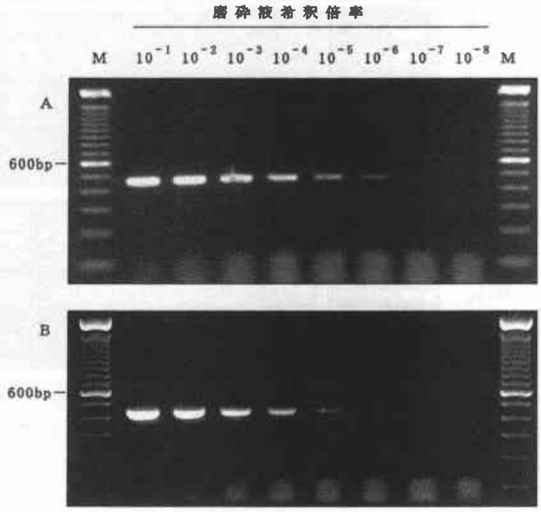


第３図　RT-PCR によるカンキツ新梢葉核酸抽出液からの ASGV 検出限界
抽出：ISOGEN
M：100bp ラダー
供試株名：BD-44（興津早生）
核酸抽出は ISOGEN を用いて行った



第４図　イムノキャプチャー時における磨砕緩衝液への添加剤の効果
M：100bp ラダー
1：トリトンX-100（0.1%），2：無添加，
3：トリトンX-100（0.1%）+ブロックエース（1%）
4：ブロックエース（1%）
供試試料：TO-1（興津早生）の新梢

ELISA キットではロット毎に力価に相違があることも一因として考えられる。また，比較対照のため RT-PCR を行ったが，RNA 抽出液の1,000倍希釈まで予想されたサイズの DNA 断片が確認された（第３図）。下村ら（2002）は，IC-RT-PCR（プライマーセットとして CTLV-ON（+）および ASCT-3'（−）を使用）により，

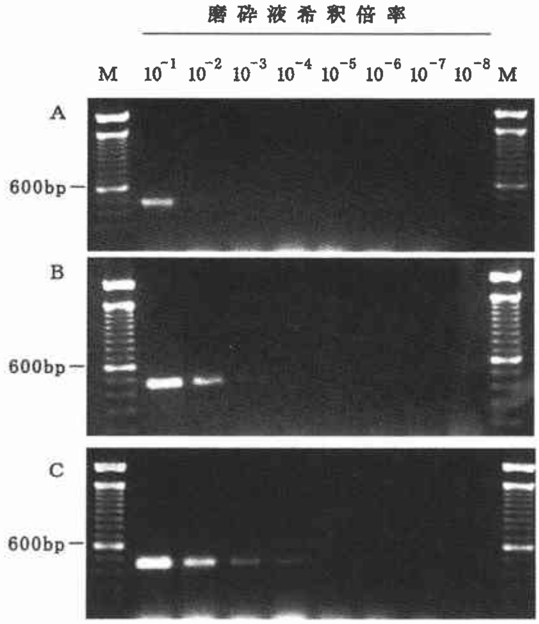


第５図　カンキツ新梢からのワンステップ IC・RT-PCR による ASGV 検出限界
A：0.1%トリトン-X添加
B：0.1%トリトン-X無添加
M：100bp ラダー
供試株名：BD-44（興津早生）

新梢磨砕液（BD-44株）の希釈倍率2,430倍まで検出可能であったと報告している。今回，ワンステップ IC-RT-PCR を行う際に，植物試料の磨砕緩衝液への添加剤としてトリトンX-100やブロックエースを利用する検討を行ったところ，トリトンX-100（0.1%）で増幅効果が認められ（第４図），トリトンX-100を添加して新梢を磨砕した試料を使用した IC-RT-PCR では100万倍希釈までバンドが確認できた（第５図 A）。これを使用新梢重量から換算すると従来の RT-PCR と比較して約500倍，また，トリトンX-100無添加（第５図 B）と比較して10倍以上検出感度が向上することが明らかとなった。

４．ワンステップ IC-RT-PCR による硬化葉からの ASGV 検出感度

トリトンX-100を添加した磨砕試料を用いて，硬化葉からの検出感度を検討した。第６図はその結果であるが，硬化葉からも ASGV が３株全てにおいて検出できた。



第6図　ワンステップIC-RT-PCRによるカンキツ硬化葉からのASGV検出限界（0.1%トリトンX-100添加）
A：SC-1（SDVとASGVの混合感染）
B：BD-44（ASGV単独感染）
C：TO-1（ASGV単独感染）
M：100bpラダー

ただし，その検出限界には差が認められ，温州萎縮ウイルス（SDV）とASGVの混合感染株のSC-1株では試料希釈倍率10倍，BD-44株では100倍，TO-1株では1,000倍程度であった。その原因については，今後の検討が必要である。なお，ELISAによる検定も行ったが，3株とも全く検出することが出来なかった（データ省略）。

以上のことから，ワンステップIC-RT-PCRによるASGVの検出は，検定試料に新梢を用いた場合は100万倍希釈の磨砕液からも検出可能で，ELISAでは検出困難な硬化葉からの検出も容易になるなど，極めて高感度であることが明らかとなった。また，本法はRT-PCRでは不可欠な，検体組織からの煩雑なウイルス核酸の抽出操作が不要であり，通常のIC-RT-PCRで必要な，抗体によるウイルス粒子捕捉後の熱処理も省略できる。さらに，本法は反応溶液への逆転写酵素とDNAポリメラーゼの同時添加により，1本のPCRチューブをサーマルサイクラーに1度セットするだけで逆転写反応とPCR反応を連続的に行うことが出来るため，通常のIC-RT-PCRに比べて試薬類の分注操作が簡略化されており，結果的にピペッターの誤操作による試料汚染の危険性が低くなっている。従って，本法の利用により，ELISA，RT-PCR，IC-RT-PCRに比べて，より高精度，簡易かつ迅速なASGVの検定が可能と考えられる。

摘　　要

リンゴステムグルービングウイルス（ASGV）をカンキツから高感度，簡便に検出するため，ワンステップIC-RT-PCRの利用を検討した。その結果，試料磨砕緩衝液へトリトンX-100（0.1%）を加えることと，逆転写反応を使用試薬に応じた最適温度で行うことによって検出感度が向上し，カンキツ硬化葉ならびに100万倍に希釈した新梢磨砕液からも検出が可能であった。本法は，通常のIC-RT-PCRで必要な，抗体によるウイルス粒子捕捉後の熱処理が省略でき，また，反応溶液への逆転写酵素とDNAポリメラーゼの同時添加により，1本のPCRチューブ内で逆転写反応とPCR反応を連続して行うので試薬類の分注操作が簡略化できる。さらに，抗体をコーティングしたPCRチューブをすぐに－80℃に保存すれば6ヶ月後でも使用可能であった。本方法により，抗体によるウイルス粒子の捕捉からRT-PCR反応までを1本のPCRチューブ内で連続して行うことが可能となり，従来法に比べ，より高感度，簡易，迅速にASGV保毒の有無を診断できると考えられた。

引　用　文　献

Calavan, E. C., D. W. Christiansen and C. N. Roistacher (1963) Symptoms associated with tatter-leaf virus infection of Troyer citrange rootstocks. Plant Dis. Rep. 47：971-975.

岩波徹・加納健・小泉銘冊（1991）カンキツタターリーフウイルスの病原性の変異について．日植病報57：74.（講要）

Kinard, G. R., S. W. Scott and O. W. Barnett (1996) Detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus by RT-PCR. Plant Dis. 80：616 - 621.

草野成夫・下村克己（1995）カンキツタターリーフウイルス検出のためのELISAの改良．福岡農総試報14：163-166．

Magome, H., N. Yoshikawa, T. Takanashi, T. Ito and T. Miyakawa (1997) Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear and citrus tree. Phytopathology 89：389-396.

Nemchinov,V., A. Haddai, J. J. Foster, T. Candresse and T. Verderevskaya (1995) Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. Acta Hortic. 386：51-62.

下村克己・草野成夫（2002）イムノカプチャー逆転写遺伝子増幅法（IC-RT-PCR）によるカンキツからのリンゴステムグルービングウイルスの検出．福岡農総試報21：87－91.

Yoshikawa, N., M. Imaizumi, T. Takanashi and N. Inoue (1993) Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. J. Gen. Virol. 74：2743-2747.

Yoshikawa, N., K. Sasamoto, M. Sakurada, T. Takanashi and H. Yanase (1996) Apple stem grooving and citrus tatter leaf capilloviruses obtained from a single shoot of Japanese pear (*Pyrus serotina*). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62：119-124.

（2003年4月28日受領；7月23日受理）