

新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究

第7報 遺伝子増幅法によるダイズモザイクウイルス (SMV) の検出

村山 貴之・佐野 義孝・棚橋 恵*・原澤 良栄*・小島 誠

Takayuki MURAYAMA, Yoshitaka SANÔ, Megumu TANAHASHI*, Ryouei HARASAWA*
and Makoto KOJIMA : Studies on soybean virus diseases in Niigata Prefecture (7).
Detection of soybean mosaic virus by gene amplification method

Summary

The sensitive gene diagnosis method based upon the polymerase chain reaction (PCR) was designed and used for the detection of soybean mosaic virus (SMV) in the infected leaf tissues. A set of primers, whose the sequences were derived from the conserved regions among the 3' terminal sequences of SMV-B and -C genomes (data from our previous work), was constructed. From the infected soybean leaf tissue, the total RNA sample was extracted with guanidine HCl followed by lithium chloride (LiCl) precipitation and subjected to the reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) assay using the thermostable reverse transcriptase. The SMV-specific DNA fragment could be amplified from the infected sample. Furthermore, the sensitivity of the RT-PCR was shown to be higher than the conventional serological tests.

ダイズモザイクウイルス (SMV) は、日本におけるダイズ栽培の重要病害のひとつであるダイズモザイク病を引き起こす。近年、新潟県においても転換畑の増加に伴い、ダイズ栽培が以前に比べて増加の傾向にあり、本病によるダイズ収量および品質の低下が問題となってきている²⁾。日本において SMV は判別品種に対する反応を基に 5 系統 (A, B, C, D, E 系統) に分類されている^{6,10)}。これらはいずれも極めて相同性の高い外被タンパク質をもつものと考えられるため血清学的に系統判別は困難である。このうち、新潟県では B, C, D 系統が発生しており、奨励品種である 'エンレイ' では特に C 系統が多く発生していることが報告されている³⁾。本病発生防除のためには罹病株の早期発見が重要であり、そのために鋭敏なウイルスの検出法が必要である。本研究においては、既に我々によって解析された SMV-B 系統および C 系統の外被タンパク質遺伝子の塩基配列^{8,9)} をもとに作製したプライマーと耐熱性逆転写酵素を用いた遺伝子増幅法 (PCR 法) が、SMV の診断法として有効であるかを検討した。

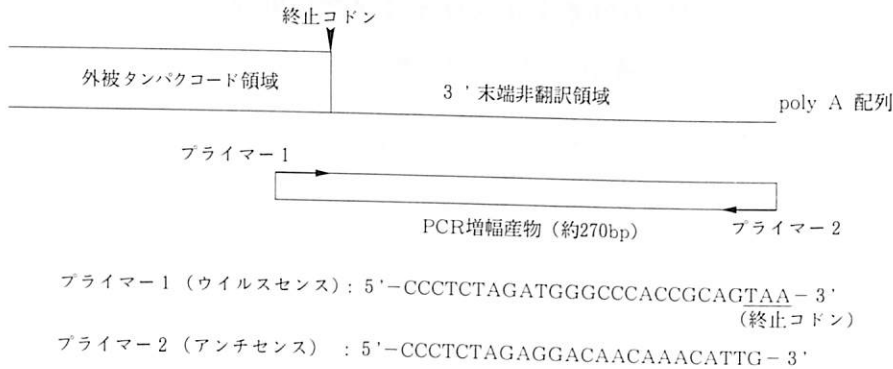
材料及び方法

1. 供試ウイルスと植物

本試験には SMV-B 系統および C 系統を用い、ダイズ品種エンレイで増殖維持した。罹病葉は -20°C で凍結保存した⁵⁾。

2. 核酸抽出法

試料となるダイズ葉に、8 倍量のグアニジン抽出緩衝液 (8 M 塩酸グアニジン, 0.02 M MES, 0.02 M EDTA, 0.5% 2-メルカプトエタノール) を加え、1.5 ml のマイクロ遠心管中で、ベレットミキサー (トレフ社製) を用いて 1~2 分間磨砕した。この粗汁液に等量のフェノール/クロロフォルム (1:1) を加え激しく攪拌し、4°C 下で 14,000rpm, 15 分間遠心分離した。上清を再びフェノール/クロロフォルム抽出した後、1/2 倍量の 7.5 M 酢酸アンモニウムおよび 2 倍量のエタノールを加えて -80°C 下で 20 分以上静置し、4°C 下で 14,000rpm, 15 分間遠心分離した。沈殿物を滅菌水で懸濁し、1/4 倍量の 10 M 塩化リチウムを加え、4°C 下で 2 時間以上静置した後、14,000rpm, 15 分間遠心分離することにより RNA 成分を回収した。得られた沈殿物は、70% エタノールと共に攪拌した後、14,000rpm, 10 分間遠心分離した。上清を除き減圧乾燥した沈殿物を 15 μ l の滅菌水で懸濁し、これを RT-PCR 法に用いる核酸標品 (全 RNA 試料) とした。



第1図 SMVゲノミックRNAとRT-PCR法による増幅箇所およびプライマーの配列

3. RT-PCR法 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

抽出した核酸標品から3 μ l をとり、これを鋳型として、以下の要領でRT-PCRを行った。500 μ l ミクロ遠心管に、3 μ l の鋳型 (RNA 試料)、TET-Z DNAポリメラーゼ (アマシャム社製、5 U)、250nM 各プライマー (図1)、200 μ M 各 dNTP、 $\times 10$ 逆転写反応液 (酵素に添付) および滅菌水を加えて最終量を20 μ l とし、ミネラルオイルを数滴重層し、60°C 下で15分間の逆転写反応を行った。反応後、試料を直ちにサーマル・サイクル・リアクター (TOYOBO 社製) へ移し、94°C-20秒、58°C-40秒、72°C-60秒の反応サイクルを30回繰り返し、増幅した。PCR反応液は、1.5% アガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイドで染色し、増幅されたDNA断片を観察した。

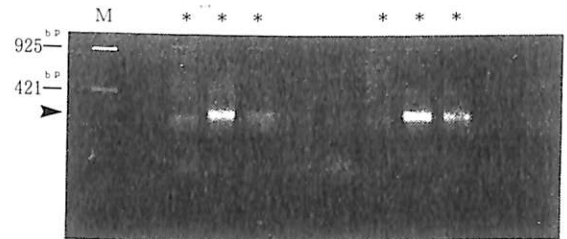
試験結果

1. RT-PCR法

SMV感染葉より抽出したRNA標品を鋳型とし、RT-PCR法によって増幅した試料をアガロースゲル電気泳動にかけたところ、易動度約270bpの付近に予想される分子量のDNAバンドを検出することができた (図2)。このバンドはSMV-BおよびC系統ともに認められたが、健全葉では認められなかった。

2. RT-PCR法と血清学的手法 (DIBA法, ELISA法) との比較

1993年9月9日~10日に上越・中越地方を中心に圃場調査を行い、SMV感染と疑われたもの22検体についてRT-PCR、ELISA法⁹⁾、DIBA法¹¹⁾を用いてSMV検定を行った。その結果、DIBA法では22検体中7検体、ELISA法では22検体中10検体、RT-PCR法で



第2図 RT-PCR法によるダイズ葉からのSMVの検出
注) 矢印は目的の増幅産物を示す
M: 分子量マーカー, *: 陽性反応

は22検体中21検体で陽性となり、血清学的手法に比べてRT-PCR法による検定では高感度にSMVを検出することが可能であった (表1)。

考察

米国ではSMVの3系統について¹²⁾、日本ではSMV-BおよびC系統の外被タンパク領域の塩基配列が決定されており^{8,9)}、これらSMVの外被タンパク領域は90%以上の高い相同性をもつことが確認されている。本研究で用いたプライマーはこれまで解析されたSMV系統のすべてにおいて塩基配列が保存されている箇所を参考に作製したものであり、B、C以外のSMV系統も検出されるものと思われる。圃場調査によって採取されたSMV感染と疑われたものについて検定した結果、本法が血清学的手法に比べて高感度な診断法であることが明らかとなり、今後有力な検定手段として活用できるものと考えられた。なお、今回の検定において、血清を利用した診

第1表 ダイズモザイクウイルス検定における RT-PCR法と血清学的方法の比較

検体採集地	DIBA法	ELISA法	RT-PCR法
1 小千谷市 片貝	-	±	-
2 "	-	±	+
3 十日町市	+	+	+
4 "	+	+	+
5 "	+	+	+
6 "	-	±	+
7 津南町 見坂	-	±	+
8 "	+	+	+
9 "	+	+	+
10 " 沖之原	-	±	+
11 "	-	-	+
12 糸魚川市 田中	-	±	+
13 "	-	-	+
14 "	-	+	+
15 " 堀切	+	+	+
16 "	+	+	+
17 "	-	±	+
18 " 滝川原	-	±	+
19 "	-	±	+
20 "	-	+	+
21 " 新町	-	±	+
22 上越市 藤塚	-	+	+
陽性反応/検体数	7/22	10/22	21/22

注) +は陽性, -は陰性反応を示す。なお, ELISA 検定において発色度(405nm 吸光値)が低く, 判別が困難なものは±で示した。

断法(DIBA, ELISA)では, 検定結果にかなりの誤差が生じたが, これは採取時がダイズの生育後期であり, 植物体中のウイルス濃度がいずれも低かったことによると考えられる。これまで報告されている植物ウイルスの RT-PCR 法による検定では, ①逆転写酵素による cDNA 合成, ②その cDNA を用いての PCR, と 2 段階の操作が必要であった。今回, 我々は逆転写活性をもつ耐熱性 DNA ポリメラーゼを用い, 1 回の操作で RT-PCR を行うことによって診断手順の簡略化をはかることを可能にした。なお, PCR に用いる RNA 標品は, 感染葉からグアニジンで抽出した全核酸試料を, さらに塩化リチウムを用いて精製した方が安定した結果が得られた。

摘 要

1. PCR (Polymerase Chain Reaction) を用いたダイズモザイクウイルス (SMV) の診断法について検討した。既に SMV-B および C 系統のゲノミック

RNA の 3' 末端領域の塩基配列を解析しており, これをもとに両系統に共通の配列箇所に対応する DNA プライマーを合成した。SMV 感染葉から塩酸グアニジンおよび塩化リチウムを用いて抽出した全 RNA 標品を鋳型とし, 逆転写活性をもつ耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて逆転写-PCR (RT-PCR) を行ったところ, SMV-B および C 感染検体から特異的に DNA 断片が増幅されることを確認した。

2. 圃場より採集したダイズ葉検体を RT-PCR にかけたところ, DIBA 法や ELISA 法よりも高感度で SMV の検出が可能であり, 本手法が実用的な SMV の遺伝子診断法となりうると考えられた。

引用文献

- 1) Eggenburger, A.L., Stark, D.M. and Beachy, R.N. (1989) The nucleotide sequence of a soybean mosaic virus coat protein coding region and its expression in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco callus. *J. Gen. Virol.* 70: 1853~1860.
- 2) 藤巻雄一・原沢良栄・矢尾板恒雄・小島 誠 (1987) 新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第 1 報). ダイズモザイクウイルスと褐斑粒の発生実態. *北陸病虫研報* 35: 66~68.
- 3) 原沢良栄・藤巻雄一・小島昭雄・立見康明・小島 誠 (1988) 新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第 5 報). ダイズモザイクウイルスの系統と品種エンレイの病原ウイルスの種類. *北陸病虫研報* 36: 64~67.
- 4) Jayaram, C., Hill, J.H. and Miller, W.A. (1992) Complete nucleotide sequences of two soybean mosaic virus strains differentiated by response of soybean containing the *Rsv* resistance gene. *J. Gen. Virol.* 73: 2067~2077.
- 5) 小島 誠・高野直行・原沢良栄・藤巻雄一 (1987) 新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第 2 報). ダイズモザイクウイルスの精製と血清試験. *北陸病虫研報* 35: 69~71.
- 6) 越水幸雄・飯塚典男 (1963) 大豆のウイルス病に関する研究. *東北農試研報* 27: 1~103.
- 7) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487~491.
- 8) 佐野義孝・棚橋 恵・小島 誠 (1991) ダイズモザイクウイルス (SMV) の遺伝子解析 I. 外被タン

- バク遺伝子のクローニングと塩基配列. 日植病報
57: 453~454.
- 9) 棚橋 恵・佐野義孝・小島 誠 (1992) ダイズモザイクウイルス (SMV) の遺伝子解析 II. SMV-B 系統の 3'末端領域の塩基配列. 日植病報 58: 63.
- 10) 高橋幸吉・田中敏夫・飯田 格・津田保昭 (1980)
日本におけるダイズウイルス病と病原ウイルスに関する研究. 東北農試研報 62: 1~130.
- 11) 立見康明・小島 誠・原沢良栄・藤巻雄 (1988)
新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第4報). DIBA 法によるダイズモザイクウイルスの検出. 北陸病虫研報 36: 61~63.
(1994年8月8日受領)
-