

新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究

第8報 RT-PCR法によるラッカセイわい化ウイルス (PSV) およびダイズ萎縮ウイルス (SSV) の検出

千田茂樹・高橋義行*・原澤良栄**・小島 誠

Shigeki CHIDA, Yoshiyuki TAKAHASHI*, Ryohei HARASAWA** and Makoto KOJIMA :
Studies on soybean virus diseases in Niigata Prefecture (8). Detection by RT-PCR of
peanut stunt virus (PSV), soybean stunt virus (SSV) and their satellite RNAs

Summary

The molecular technic involving the enzymatic gene amplification (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) was applied to the detection and identification of the genomic and subgenomic RNAs of the two cucumoviruses which infect legume plants, peanut stunt virus (PSV) and soybean stunt virus (SSV). The oligonucleotide primers, which were constructed on the bases of the nucleotide sequences of cucumber mosaic virus (CMV)-RNA 3, could support the three cucumoviruses (CMV, PSV, SSV)-specific amplification at the detection level comparable to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The sensitivity of the RT-PCR could be further increased up to 10 to 100 times by applying the amplified products to the 2nd PCR assay. The DNA fragment generated either from PSV or SSV infected tissue could be distinguished by the digestion with the restriction enzyme at the unique site. Using another set of primers specific for the CMV-satellite RNA 5, the DNA fragments of expected size were amplified from SSV, as well as from PSV preparation.

新潟県のダイズ栽培において、ウイルス病によるモザイク症状や種子への褐斑粒の発生が報告され、被害の拡大が懸念されている。筆者らは1987年よりダイズウイルス病の発生実態とその病原ウイルスに関する研究を行い、現在までにダイズモザイクウイルス (SMV)、ラッカセイわい化ウイルス (PSV) およびダイズ萎縮ウイルス (SSV) が主要な病原ウイルスであることを明らかにした^{16,8,15}。これらのウイルスは容易にアブラムシ伝搬し、種子伝染もするため、防除対策としては抵抗性ダイズ品種の育成や健全種子の確保などが行われている。

これらのウイルスの検出には血清学的手法であるELISA法やDIBA法が用いられている。Potyvirus groupに属するひも状のウイルスであるSMVについては既に高い力価の抗血清が作製され、本県ダイズ圃場での発生状況が調査されている^{8,11,15}。一方キュウリモザイクウイルス (CMV) をタイプメンバーとするCucumovirus

groupに属するPSVとSSVでは、PSVに対する抗血清は作製され検定に利用されているが⁸、SSVに対する高感度な抗血清はウイルスの純化が困難なため得られていない。このため血清学的類縁関係の深い¹⁴ CMVの抗体を用いた検定が行われている。抗CMV抗体を用いた間接ELISA法によりPSVおよびSSVを検出できるが、ウイルス間の識別は困難である。また種子検定ではウイルス濃度も低いため、これまで以上の高感度なウイルス検出・識別手法の確立が望まれている。

CMVでは、病徴を軽減させるサテライトRNAを利用したトマトモザイク病の防除が試みられている^{9,12,16}。PSVでもPARNA5とよばれるサテライトRNAが出現することが確認されているが¹⁰、ダイズモザイク病の防除に利用できるかについては検討されていない。なおSSVからのサテライトRNAの検出の報告はない。血清学的手法による検出が困難であるサテライトRNAの検出には、ウイルスを純化し、これからRNAを抽出し、電気泳動して対応するバンドの有無によって判定するという、時間と手間のかかる手法が用いられている。このためサテライトRNAによるダイズモザイク病の防除の研究を推進するためには、PSVやSSVの感染葉から容易に検出できる手法の開発が望まれた。

新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata University,
Niigata 950-21

* 日本植物防疫協会研究所 Institute of Japan Plant
Protection Association, Ushiku, Ibaraki 300-12

** 新潟県農業試験場 Niigata Agricultural Experiment
Station, Nagakura, Nagaoka 940

本研究において筆者らは、Saikiら¹³⁾によって開発された分子生物学的手法の一つである逆転写酵素-遺伝子増幅 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction; 以下 RT-PCR) 法を用いた PSV と SSV の検出手法の確立、およびこれらウイルスのサテライト RNA の検出を試みたのでここに報告する。

なお本研究を行うに当たって SSV 分離株および抗 SSV 抗体を分譲していただいた社団法人日本植物防疫協会研究所高橋幸吉博士には厚くお礼を申し上げる。

材料および方法

1. 供試ウイルス株および抗血清

ウイルス株は PSV-N89⁸⁾, SSV-A¹⁴⁾, CMV-Y⁷⁾ および CMV-O をダイズまたはタバコに接種し、病徴発現後あるいは接種 10 日後にその感染葉を収穫し、RT-PCR および ELISA 検定に供試した。

ELISA 検定は常法²⁾に従い、PSV-N89 に対する抗血清 (力価 1:1,024), SSV-A に対する抗血清 (力価 1:640) および CMV-ラゲナリア系を用いて作製した抗血清 (力価 1:1,024) をそれぞれ供試した。

2. 核酸抽出

ウイルス感染葉から約 1 cm² (約 20mg) 切り取り 200 μ l の核酸抽出用緩衝液 (10mM トリス, 100mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 0.5% SDS, 120 μ g/ml プロテアーゼ K) を用いて磨砕し、60°C で 1 時間静置後、フェノール・クロロフォルム処理を 3 回繰り返し、エタノール沈殿物をドライアップし、これに 50 μ l の滅菌水を加えて溶解し粗抽出核酸とした。

3. プライマー

本研究で用いたプライマーを第 1 表に示した。プライマーセットの P1-P2 は CMV サブグループ I に属する CMV-Y 系統の外被タンパクの塩基配列¹⁾をもとに、またプライマーセットの P3-P4 はサブグループ II に

属する CMV-Q 系統の外被タンパクの塩基配列³⁾をもとに合成した。サテライト RNA 検出用プライマーセットの SP1-SP2 は、CMV-S 系統のサテライト RNA の塩基配列¹⁾をもとに合成した。

4. RT-PCR

ウイルス感染葉から抽出した粗抽出核酸から、逆転写酵素 (M-MLV Reverse Transcriptase; BRL 社, USA, 以下 RT とする) を用いて cDNA を合成した。合成は付属の試薬を用いて、所定のプロトコールに従った。すなわち、0.5ml マイクロチューブに A₂₆₀ 値 10 前後になるよう調製した粗抽出核酸と 4 μ l の 5 \times 緩衝液、2 μ l DTT, 4 μ l dNTP および A₂₆₀ 値 10 前後になるよう下流プライマーを添加し、95°C で 5 分間加熱した後、42°C まで自然冷却させ、これに 200unit の RT を加えて最終量を 20 μ l とし、42°C で 1 時間静置して cDNA を合成した。PCR は Promega 社 (USA) の TaqDNA ポリメラーゼと付属の試薬を供試した。すなわち合成した cDNA に 8 μ l の 10 \times 緩衝液、4 μ l dNTP, 4 μ l MgCl₂, A₂₆₀ 値 10 前後になるように調製した上流プライマー、2.5unit の TaqDNA ポリメラーゼをそれぞれ添加し、滅菌水を加えて 100 μ l とし、ミネラルオイルを上層して PCR を行った。各反応条件は、熱変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 60°C で 30 秒、プライマーの伸長反応を 72°C で 60 秒、これを 1 サイクルとして計 30~40 回行った。

判定 (各ウイルスの有無) は、RT-PCR の増幅産物の一部を 1%~2% のアガロースゲル電気泳動により特異バンドの有無により行った。RT-PCR の結果、DNA 断片が増幅されない場合は、その一部をテンプレートとして再度 PCR を行う 2nd PCR によって反応陰性を確認した。また増幅産物は制限酵素 (*Hind* III, *Nru* I および *Xho* I) を用いて消化し、その電気泳動のバンド・パターンからそれぞれを識別した。

第 1 表 プライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列 (5' - 3')	対応部位
P1	ATCTGAATCAACCGAGTGGTGGTC	414-436
P2	AATCAGACTGGGAGCACTCCAGA	1041-1064
P3	ATCTGGCTCTCCCAATGCTAG	1228-1248
P4	CTCAGCACTCGCGATTGAGAG	1911-1931
SP1	TGTTAGAGAATTGCGTAGAGGGG	9-31
SP2	ATGGAATGTTAGACATTCACCGA	292-312

注 a) プライマーセット P1-P2 により CMV-Y 系統の外被タンパクをコードする RNA から 651bp と 486bp の断片が、P3-P4 により CMV-Q 系統から 706bp の断片がそれぞれ増幅されると予想される。また SP1-SP2 により CMV-S 系統のサテライト RNA から 321bp の増幅断片が得られると予想される

実験結果

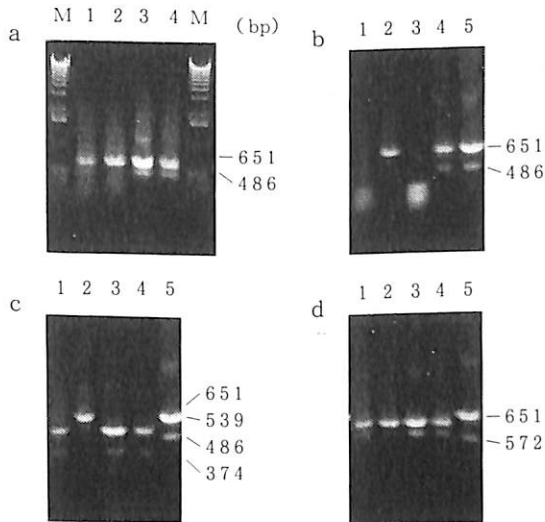
1. PSV および SSV の検出

プライマーセット P1-P2 を用いた RT-PCR によって、PSV-N89 感染葉から CMV-Y、-O 系統と同じように約 650bp と約 500bp の増幅産物が検出されたが、SSV-A 感染葉からは約 650bp の DNA 断片のみが増幅された (第1図a)。一方プライマーセット P3-P4 を用いた場合は、2nd PCR でも増幅産物は認められなかった。

RT-PCR によるウイルス検出の感度を ELISA 法と比較した結果、本法は 10ng/ml の CMV 純化標品を検出でき、ほぼ同等であった。さらに 2nd PCR を行うことで約 100pg/ml まで検出可能であり、これは直接 ELISA 法の約 10~100 倍高い検出感度であった。

2. PSV および SSV の識別

RT-PCR 検定の結果、PSV-N89 は CMV-O、-Y と同じように同一分子量 2 本のバンドが得られたのに対して、SSV-A からは 1 本のバンドのみが増幅されたことから両者が区別できた (第1図 a)。さらに



第1図 RT-PCRによるPSVおよびSSVの検出

- 注) レーン1: PSV, レーン2: SSV, レーン3: CMV-Y, レーン4: CMV-O, M: 分子量マーカー
 a: RT-PCR により各ウイルス感染葉から DNA 断片を特異的に増幅させた
 b: RT-PCR 産物を制限酵素 *Hind*III で消化したもの, レーン5 は制限酵素処理しないもの
 c: RT-PCR 産物を制限酵素 *Nru*I で消化したもの, レーン5 は制限酵素処理しないもの
 d: RT-PCR 産物を制限酵素 *Xho*I で消化したもの, レーン5 は制限酵素処理しないもの

各ウイルスの RT-PCR 増幅産物を 3 種の制限酵素で消化した結果、PSV-N89 は CMV-Y とほぼ同じように切断されたが、SSV-A は *Hind*III および *Nru*I では切断されなかった (第1図 b, 1図 c および 1図 d)。このため本法によって SSV-A を PSV-N89 や CMV-O、-Y から識別できることが判明した。一方、PSV-N89 抗体を用いた ELISA 検定では SSV-A や CMV-O、-Y 両系統と PSV-N89 を識別することができたが、SSV-A や CMV-ラゲナリア株の抗体を用いた場合には PSV-N89 を検出できず、また SSV-A と CMV-O、-Y も区別できなかった。

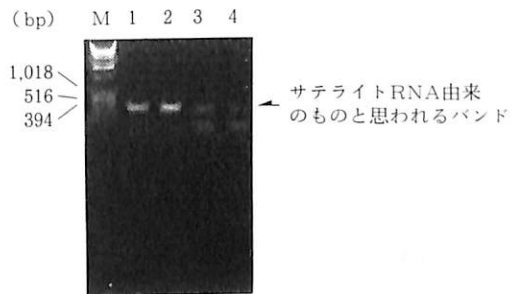
3. PSV および SSV のサテライト RNA の検出

プライマーセットの SP1-SP2 を用いた場合に、両ウイルスの核酸抽出物から CMV-O と同じように約 300bp のサテライト RNA 由来のものと思われる増幅断片が得られた (第2図)。

考 察

プライマーセット P1-P2 によって PSV-N89、SSV-A から CMV-Y および CMV-O のそれと同様に RT-PCR でそれぞれのウイルス由来のものと思われる DNA 断片が増幅されたことから、両ウイルスには CMV のサブグループ I に属する CMV の外皮タンパクの塩基配列と部分的に共通の配列が存在する可能性が示唆された。

PSV-N89 において、CMV-O、-Y と同様に 2 本の特異バンドが増幅されたこと、制限酵素によりほぼ同じ様に消化されたことから、PSV-N89 の外皮タンパクの塩基配列には部分的に相同性の高い配列が存在しているのではないかと考えられた。しかし PSV-N89 は、SSV-A および CMV-ラゲナリア株の抗体を用いた ELISA 検定で検出できなかったことから、それらの配列はエピトープの構造に影響を及ぼさない部位では



第2図 RT-PCRによるPSVおよびSSVサテライトRNAの検出

- 注) レーン1およびレーン2: PSV, レーン3およびレーン4: SSV, M: 分子量マーカー

ないかと推察された。一方、SSV-AとCMV-O、-Yはそれぞれの抗体を用いたELISA検定で両者を区別できなかったことから、SSV-AのRT-PCR増幅産物に見られる核酸配列の差異はエピトープの構造に大きな影響をおよぼさないのではないかと推察された。Hanada⁶⁾はCMVの5系統、PSVの3系統およびSSVの5系統の外皮タンパクの電気泳動度を比較し、ウイルス間で異なること、また系統間でも差異の認められる系統が存在することを報告している。従って、今回供試したプライマーが各ウイルスの系統も含めてRT-PCRによって検出・同定が可能かどうか、今後確認する必要がある。特にSSVの5系統は血清学的には識別できず、各ダイズ品種での病徴の違いから分類されているが、RT-PCRにより識別が可能になれば、よりの確な抵抗性品種の選抜に利用できるのではないかと考えられる。また、既に判別植物との反応や、血清学および電気泳動による核酸の易動度などから、SSVをCMVのマメ科系統としてとらえる報告がなされている^{5,10)}。本研究の結果は、これらウイルス間での核酸の塩基配列レベルでの相同性の高さを示すのではないかと考えられ、前述の報告を支持するものではないかと考えられる。しかしこの点についても、SSVおよびCMVの他の系統や分離株との詳細な比較が必要であると思われる。

供試したウイルス株の純化標品から抽出した粗抽出核酸を電気泳動してもサテライトRNAは確認できなかったが、プライマーセットを用いてRT-PCRを行った結果、PSV-N89およびSSV-AからサテライトRNAが検出された。PSVのサテライトRNAは、CMVのサテライトRNAとは相同性は低いが5'末端および3'末端の10塩基以内の配列は相同性が高い^{1,10)}。そのためCMVのサテライトRNAの塩基配列をもとにしたプライマーによってPSVのサテライトRNAが増幅されたと推察される。SSVのサテライトRNAの存在については未報告であり、今後その塩基配列の決定など、詳細な研究が必要であると考えられる。

本研究の結果、ELISA法などの血清学的手法では困難であったSSVとCMVの識別、さらにPSVとSSVのサテライトRNAを分子生物学的手法の一つであるRT-PCR法で検出できることが示された。RT-PCRの検出感度は2nd PCRを行うことによってELISA法の約10~100倍と高く、これまで陰性とされた検体からもウイルスの検出が可能となり、より確実な健全種子の確保や抵抗性品種の育成にも利用できると考えられる。さらに簡便にまた高感度にサテライトRNAが検出できることから、これらのサテライトRNAを利用したダイズウイルス病の防除法の開発にも利用できるものと期待される。

摘 要

分子生物学的手法である逆転写酵素-遺伝子増幅(RT-PCR)法を用いてPSV、SSVの検出および識別、これらウイルスのサテライトRNAの検出を試みた。CMVの塩基配列をもとに合成したプライマーを供試したRT-PCR法により、PSVおよびSSVは検出可能であり、その検出感度はRT-PCR法では従来のELISA法とほぼ同等、RT-PCRの増幅産物を再度PCRで増殖する2nd PCR法を併用した場合には約10~100倍高感度であった。また増幅産物を制限酵素で消化することによってPSVとSSVの識別も可能であった。さらに、CMVサテライトRNA検出プライマーを用いたRT-PCRによりPSVとSSVのサテライトRNAがそれぞれ検出された。

引用文献

- 1) Avila-Rincon, M.J., Collmer, C.W. and Kaper, J.M. (1986) In vitro translation of cucumoviral satellites: Purification and nucleotide sequence of cucumber mosaic virus-associated RNA 5 from cucumber mosaic strain S. *Virology* 152: 446-454.
- 2) Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme linked immuno sorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol* 34: 475-483.
- 3) Davies, C. and Symons, R.H. (1988) Further implication for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA-3. *Virology* 165: 216-224.
- 4) 藤巻雄一・原澤良栄・矢尾板恒雄・小島 誠 (1987) 新潟県におけるダイズモザイク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ダイズ褐斑粒の発生実態. *北陸病虫研報* 35: 66-68.
- 5) Hanada, K. (1984) Electrophoretic analysis of virus particle of fourteen cucumovirus isolates. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 50: 361-367.
- 6) 原澤良栄・藤巻雄一・小嶋昭雄・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.
- 7) Hayakawa, T., Hazama, M., Onda, H., Komiya, T., Mise, K., Nakayama, M. and Furusawa, I. (1988) Nucleotide sequence analysis of cDNA

- encoding the coat protein of cucumber mosaic virus : Genomu organization and molecular features of the protein. *Gene* 71 : 107-114.
- 8) 石川 寛・守屋 透・原澤良栄・小島 誠 (1991) 新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第6報) ラッカセイわい化ウイルスの分離. *北陸病虫研報* 39 : 79-82.
- 9) Kaper, J.M., Duriat, A.S. and Tousignant, M.E. (1986) The 368 nucleotide satellite of cucumber mosaic virus strain Y from Japan does not cause lethal necrosis in tomato. *J.Gen.Virol.* 67. 2241-2246.
- 10) Kaper, J. M., Tousignant, M. E., Diaz - Ruiz, J. R. and Tolin, S. A. (1978) Peanut stunt virus-associated RNA 5 : Second tripartite genome virus with an associated satellite - like replicating RNA. *Virology* 88 : 166-170.
- 11) 小島 誠・高野直行・原澤良栄・藤巻雄一 (1987) 新潟県におけるダイズモザイク病に関する研究 (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.
- 12) Mossop, D. M. and Francki, R. I. B. (1979) Comparative studies on two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* 95 : 395-404.
- 13) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R.G., Horn, G.T., Mullins, K.B. and Erlich, H. A. (1988) Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487-491.
- 14) 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の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.
- 15) 立見康明・小島 誠・原澤良栄・藤巻雄一 (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.
- 16) Tien, P. and Wu, G. (1991) Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Adv. Virus Res.* 39 : 321-339.

(1994年8月8日受領)