

## 逆転写PCRを用いたダイズからのCucumovirus属ウイルスの検出

黒田智久・名畑越夫・堀 武志・石川浩司

Tomohisa KURODA, Koshio NABATA, Takeshi HORI and Kouji ISHIKAWA :

Reverse transcription-polymerase chain reaction for detection of cucumoviruses in the soybean

キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) とラッカセイわい化ウイルス (*Peanut stunt virus*, PSV) を同時に検出できる逆転写PCR用プライマーの設計を試みた。まず、データベースに登録されているCMV5分離株とPSV2分離株のRNA3の塩基配列上の相同性の高い部位にデジェネレートプライマー univCucumo-F (5'-GYTRCCYTWCAACAGATTAKCTGAG-3') と univCucumo-R (5'-GACCATTTTAGCCGTDAGCTGGATG-3') を設計した。本プライマーを用いて、国内で分離されたCMV5分離株とPSV3分離株について逆転写PCRを行ったところ、いずれの分離株からも予想される約1350bpのDNA断片が得られた。検出限界を測定したところ、CMV-E5では  $5 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ 、PSV-N89では  $5 \times 10^{-8} \mu\text{g}$  であった。さらに、野外よりサンプリングしたウイルス様症状を呈するダイズ162株について、本法によるCMVおよびPSVの検出を試みたところ、48株からDNA断片の増幅が認められた。

Key words : *Cucumber mosaic virus*, *Peanut stunt virus*, degenerate primer, RT-PCR

新潟県においてダイズは転作の主要品目で、平成16年現在、作付面積7280ha (全国6位)、収穫量7640t (全国5位) である<sup>13)</sup>。近年は、国産ダイズの需要拡大から転作物目における作付面積率が高いレベルで推移している。一方で、消費者や実需者の品質に対する要求が高まり、紫斑粒や褐斑粒のような病害に起因する被害粒の発生を抑えることが課題となっている。

ダイズの褐斑粒は、植物ウイルスの感染によって種皮に生じる病徴のひとつである。国内においてダイズに発生する植物ウイルスは13種類であるが<sup>14)</sup>、そのうちキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、ラッカセイわい化ウイルス (*Peanut stunt virus*, PSV)、ダイズモザイクウイルス、インゲンマメモザイクウイルス、インゲンマメ南部モザイクウイルスの5種類によって褐斑粒は引き起こされることが確認されている<sup>18,19)</sup>。特にCucumovirus属に含まれるCMVとPSVは、ともに多犯性でアブラムシ伝染性の植物ウイルスであることから、ダイズにおける種子伝染対策だけでなく、周辺の栽培環境を含めた防除対策をとることが重要である。すなわち、ほ場内のダイズや周辺で栽培されている作物等に発生するCucumovirusを診断し、確実に除去する必要がある。また、ウイルス病を診断するためには多くの

時間、費用、労力を要することから、同時に複数の診断を行う技術が求められている。新潟県では、CMVとPSVを同時に検出するためには、CMVに対するポリクローナル抗体が利用されてきた。CMVに対するポリクローナル抗体は、間接ELISA法 (enzyme-linked immunosorbent assay) やDIBA法 (dot immunobinding assay) に限り両ウイルスを同時検出できる場合があるが<sup>5)</sup>、一般にCMVに対する抗体のPSVに対する反応は弱いことから、作製した抗体の力価や非特異反応の程度によっては判断を誤る可能性がある。そこで、CMVとPSVをとともに検出できるデジェネレートプライマーを設計し、逆転写PCRを用いた診断法を検討した。

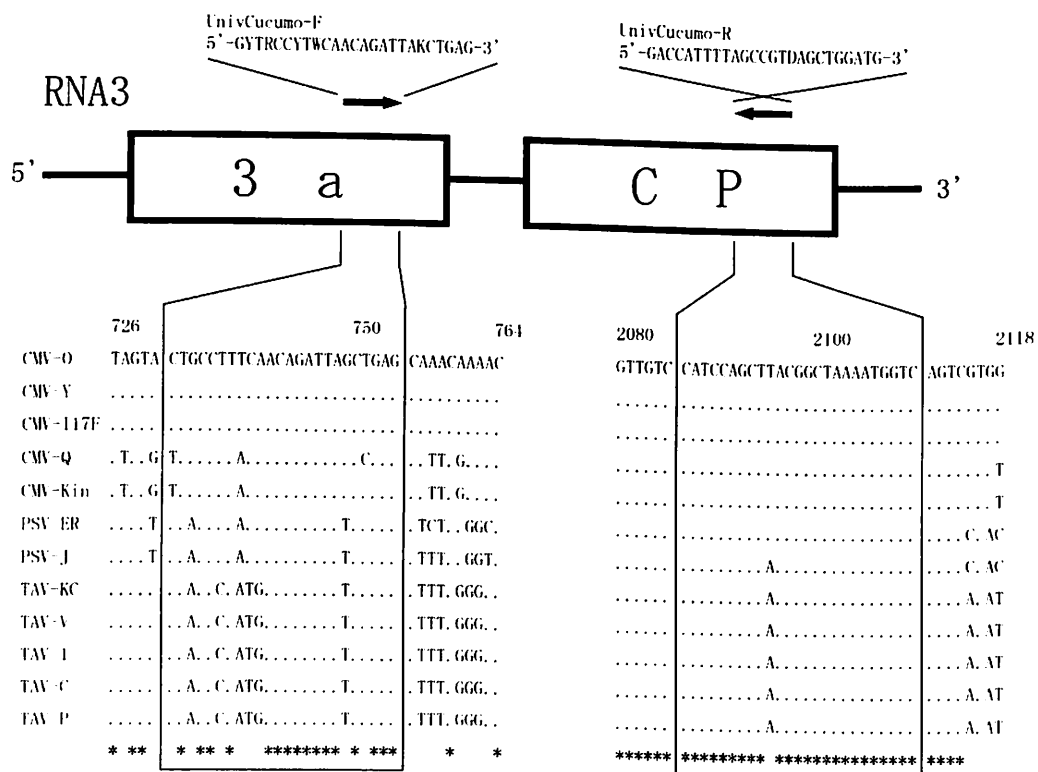
なお、本研究を行うに当たり、京都府農業資源研究センター小坂能尚博士からPSV-TとPSV-K<sup>9)</sup>を、元新潟大学農学部小島誠博士からPSV-N89<sup>5)</sup>を、(財)岩手生物工学研究センター鈴木一実博士からCMV-E5<sup>11)</sup>を、宇都宮大学農学部夏秋知英博士からCMV-UD8とCMV-UN3<sup>17)</sup>をそれぞれ分譲いただいた。ここに記して、感謝の意を表す。

まず、データベースに登録されているCMV-O (D00385)、CMV-I17F (X16386)、CMV-Y (D12499) (以上 subgroup I)、CMV-Q (M21464)、CMV-Kin (Z12818)

(以上 subgroup II), PSV-ER (U15730), PSV-J (D00668) のRNA3の塩基配列からClustal X<sup>7)</sup>を用いてアライメントを行い, 相同性が高くプライマーを設定するのに適当と思われる領域を検討した。その結果, 3aタンパク質遺伝子領域内に相同プライマー (univCucumo-F; 5'-GYTRCCYTWCAACAGATTAKCTGAG-3') を, 外被タンパク質遺伝子領域内に相補プライマー (univCucumo-R; 5'-GACCATTTTAGCCGTDAGCTGGATG-3') を設定した (第1図)。RNAの抽出にはISOGEN (ニッポンジーン) を, 逆転写反応にはランダムヘキサマーとFirst-Strand cDNA Synthesis Kit (アマシャムバイオサイエンス) を用いた。方法はそれぞれのメーカーの説明書に従った。また, PCRはExTaq DNA Polymerase (TaKaRa) を用い, 94℃ 5分間変性し, 94℃ 30秒, 55℃ 30秒, 72℃ 1分を35サイクル, そして最後に72℃ 5分の伸長反応を行った。PCR終了後は, 1%アガロースゲルによる電気泳動を行い, 臭化エチジウムで染色してバンドの有無を確認した。

供試ウイルス分離株のうちCMV-E5, CMV-UD8,

CMV-UN3, PSV-N89, PSV-T, PSV-Kは *Nicotiana benthamiana* または *N. glutinosa* で維持した。また, CMV-S-2<sup>18)</sup> (MAFF104058) と CMV-Y68-4<sup>6)</sup> (MAFF104059) は農業生物資源ジーンバンクより配布を受け, ダイズ (品種エンレイ) で維持した。これらのウイルス感染葉から全RNAを抽出してRT-PCRを行い, 電気泳動により増幅断片を確認した。いずれの分離株も予想される約1350bpのDNA断片が効率よく増幅されたが (第2図), PSV-N89ではこれ以外にやや分子量の小さい非特異的増幅断片が認められた (第2図レーン6)。そこで約1350bpのDNA断片が目的領域のものであるか確認するため, 断片の両末端付近の塩基配列を調べた。供試した8分離株のDNA断片すべてにおいて, DDBJ/EMBL/GenBankデータベースに登録された同種のウイルスの配列とはほぼ一致し, 設計プライマーを用いた逆転写PCRによってCMV, PSVの目的領域が特異的に増幅できることが確認された。本法による検出限界をCMV-E5とPSV-N89について検討した。各分離株の純化ウイルス試料10μgからISOGEN (ニッポンジーン) を用い



第1図 *Cucumovirus*属ウイルスのRNA3の模式図とプライマー設定部位付近の塩基配列

注) 模式図中の長方形はORF (open reading frame) を, 3aは3aタンパク質遺伝子を, CPは外被タンパク質遺伝子をそれぞれ示す。塩基配列は最上段のCMV-Oを基準とし, 各分離株の相同部位の塩基配列がこれと同一の場合, 異なる場合はその塩基を記した。全ての分離株間で同一塩基である場合, 最下段に\*を付した。

ゲノムRNAを抽出した。そして、 $10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  から  $10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  まで10倍ごとの希釈シリーズを調整し、各  $1 \mu\text{l}$  を用いて逆転写反応を行った。PCRは逆転写産物の1/10量を用い20  $\mu\text{l}$  の反応系で行った。PCR終了後、10  $\mu\text{l}$  を1%アガロースゲル電気泳動したところ、CMV-E5では $10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  区まで、PSV-N89では $10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  区まで増幅が認められた(データ不掲載)。すなわち検出限界RNA量は、CMV-E5では $5 \times 10^{-7}$ から $5 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ の間、PSV-N89では $5 \times 10^{-8}$ から $5 \times 10^{-10} \mu\text{g}$ の間であると考えられた。

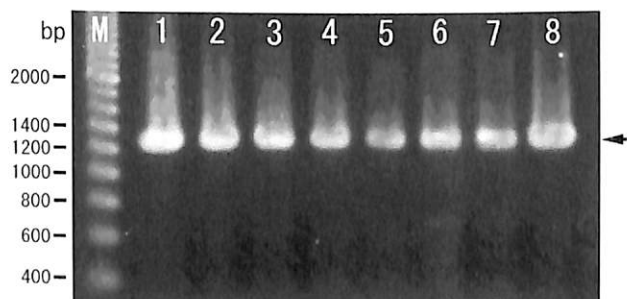
本法を用い、新潟県内のダイズにおける*Cucumovirus*の分布を調査した。平成16年6月から平成17年8月にかけて、ウイルス病様の症状を呈する162株のダイズを採取し、葉組織0.1gからISOGENを用いて全RNAを抽出した。そして、それぞれ適当量の抽出RNAを用いて逆転写PCRを行った。その結果、48株から約1350bpのcDNAの増幅が認められた(第1表)。立見ら(1988)<sup>20)</sup>のDIBA法を用いた調査では、新潟県内のダイズ(エダマメを含む)95株のうち、5株からCMVを、60株からSMVを、18株からCMVとSMVを検出している。また、石川ら(1991)<sup>5)</sup>は、従来新潟県で行われてきた抗CMV血清を用いたDIBA法や間接ELISA法でCMVと診断されてきたダイズウイルス病の中には、PSVによるものも含まれている可能性を指摘している。これらの報告から、当時はCMVやPSVに比べ、SMVがダイズウイルス病の最重要病原であったと考えられる。本研究ではSMVの調査は行っていないが、約30%の試料から*Cucumovirus*属ウイルスが検出されている。よって、現在新潟県で

は、*Cucumovirus*属ウイルスも重要なダイズの病原ウイルスであると考えられた。

PCR法は少量の鋳型でもウイルスを検出可能で、かつ高い特異性を併せ持つある反面、ターゲットの配列によってはわずかの塩基置換でも増幅が認められない場合がある。そのような問題を解決するために、デジェネレートプライマーを用いたウイルス診断法がいくつかのウイルス属について報告されている<sup>2,3,4,8,10,11,12,15,16)</sup>。Choiら(1999)<sup>3)</sup>は、*Cucumovirus*属のCMV、PSVとトマトアスパーミーウイルス(*Tomato aspermy virus*, TAV)のRNA3のアライメントを作成し、外被タンパク質遺伝子領域に20塩基の相同、相補プライマーを設計した。これらのプライマーを用い36-48℃のアニーリング温度で40サイクルのPCRを行い、3種類のウイルスが検出可能であることを報告している。しかし、低いアニーリング温度でかつ多くのサイクル数を要することから、実用場面で非特異的なDNAの増幅が懸念される。そこで、本研究ではダイズに発生するCMVとPSVの検出を念頭に置いて、デジェネレートプライマー-univCucumo-

第1表 RT-PCRを用いたモザイク症状を呈するダイズからの*Cucumovirus*属ウイルスの検出

採集地	試料数	陽性試料数
魚沼市(旧北魚沼郡守門村)	2	1
小千谷市	4	2
柏崎市	4	3
五泉市	5	0
佐渡市	4	1
三条市(旧南蒲原郡栄町)	6	3
新発田市	8	1
上越市(旧上越市内)	2	0
(旧中頸城郡頸城村)	2	0
(旧中頸城郡三和村)	4	2
燕市	4	1
十日町市(旧十日町市内)	8	0
(旧中魚沼郡中里村)	6	0
長岡市(旧長岡市内)	25	9
(旧三島郡越路町)	14	2
(旧三島郡三島町)	5	0
新潟市(旧新津市)	7	0
(旧白根市)	13	5
(旧西蒲原郡岩室村)	2	1
(旧西蒲原郡中之口村)	12	1
南魚沼市(旧南魚沼郡塩沢町)	7	3
(旧南魚沼郡大和町)	3	2
岩船郡荒川町	2	2
岩船郡神林村	4	4
中魚沼郡津南町	3	3
南魚沼郡湯沢町	6	2
計	162	48



第2図 デジェネレートプライマーを用いたキュウリモザイクウイルス(CMV)およびラッカセイわい化ウイルス(PSV)の検出

注) レーンM, 200bp DNA ladder (TaKaRa); レーン1, CMV-UD8; レーン2, CMV-UN3; レーン3, CMV-S-2; レーン4, CMV-Y68-4; レーン5, CMV-E5; レーン6, PSV-N89; レーン7, PSV-K; レーン8, PSV-T

F及びunivCucumo-Rを設計した。これらのプライマーは、CMV、PSV分離株の配列と相同性が高く、25塩基と比較的長いことから、高い温度でのアニーリングが可能であり、高い特異性と検出感度を両立させることが出来た。なお、TAVの分離株KC(AJ237849)、V(AJ277268)、1(AJ277269)、P(L15335)、C(D01015)とプライマー配列を比較すると相同プライマーで3塩基の相違が認められ、相補プライマーでは完全に一致した(第1図)。本邦ではTAVによるダイズウイルス病は報告されていないが、他の作物におけるTAV検出にも対応できる可能性があるため、今後検討が必要と考えられた。

### 引用文献

- 1) Chaumpluk Piyasak・佐々木由紀子・斉藤 光・小岩弘之・曳地康史・鈴木一実(1994) 岩手県のリンドウから分離されたキュウリモザイクウイルス(CMV)について. 北日本病虫研報 45: 88~92.
- 2) Chen, J., Zheng, H. Y., Antoniw, J. F., Adams, M. J., Chen, J. P. and Lin, L. (2004) Detection and classification of alexiviruses from garlic in China. Arch. Virol. 149: 435~445.
- 3) Choi, S. K., Choi, J. K., Park, W. M. and Ryu, K. H. (1999) RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. J. Virol. Methods 83: 67~73.
- 4) Gibbs, A. and Mackenzie, A. (1997) A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. J. Virol. Methods 63: 9~16.
- 5) 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. 北陸病害虫研報 39: 79~82.
- 6) 飯塚典男・柚木利文(1974) ダイズ萎縮ウイルスの1新系統. 北日本病虫研報 25: 29.
- 7) Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem. Sci. 23: 403~405.
- 8) Karasev, A. V., Nikolaeva, O. V., Koonin, E. V., Gumpf, D. J. and Garnsey, S. M. (1994) Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. J. Gen. Virol. 75: 1415~1422.
- 9) 小坂能尚(1997) ダイズウイルス病の病原ウイルスと防除法に関する研究. 京都農研報 20: 1~100.
- 10) 黒田智久・窪寺裕子・鈴木一実(2003) ソラマメウイルス2(BBWV-2)の分離株の多様性. 日植病報 68: 32(講要).
- 11) Langeveld, S. A., Dore, J. M., Memelink, J., Derks, A. F., van der Vlugt, C. I., Asjes, C. J. and Bol, J. F. (1991) Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72: 1531~1541.
- 12) Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. (1996) An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 57: 109~115.
- 13) 農林水産省大臣官房統計部(2005) 平成16年産大豆の収穫量. 農林水産省統計. 平成17年4月.
- 14) 大木 理(1997) 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. 148, 日本植物防疫協会, 東京.
- 15) Pappu, S. S., Brand, R., Pappu, H. R., Rybicki, E. P., Gough, K. H., Frenkel, M. J. and Niblett, C. L. (1993) A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. J. Virol. Methods 41: 9~20.
- 16) Robertson, N. L., French, R. and Gray, S. M. (1991) Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. J. Gen. Virol. 72: 1473~1477.
- 17) Suzuki, K., Kuroda, T., Miura, Y. and Murai, J. (2003) Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum* spp. Plant Dis. 87: 779~783.
- 18) 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.
- 19) 高橋幸吉・田中敏夫・小坂能尚・河野敏郎(1995) ダイズの褐斑粒生成ウイルスと褐斑抵抗性(無斑)品種に関する研究. 茨城病虫研報 34: 47~53.
- 20) 立見康明・小島 誠・原澤良栄・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．

（2005年10月31日受領）

---