

RT-PCRによるカンキツウイルス・ウイロイド病の診断

清水伸一・三好孝典

(愛媛県立果樹試験場)

Diagnosis for Viruses and Viroids from Citrus by Reverse Transcription -
Polymerase Chain Reaction.

By Shinichi SHIMIZU and Takanori MIYOSHI (Ehime Prefectural Fruit Tree Experiment
Station, Matsuyama, Ehime 791-0112)

緒 言

カンキツ類に発生する重要なウイルスおよびウイロイド病として、ステムピッチング病、かいよう虎斑病、接木部異常病、温州萎縮病およびエクソコーティス病があり、ステムピッチングおよびかいよう虎斑病の病原はカンキツトリステザウイルス (CTV)、接木部異常病はリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV)、温州萎縮病は温州萎縮ウイルス (SDV) およびその近縁ウイルス、およびエクソコーティス病はカンキツエクソコーティスウイロイド (CEVd) と報告されている(家城, 1999)。これらのウイルスおよびウイロイドは主に接木により伝搬されることから、採穂用カンキツ樹(母樹)がウイルスおよびウイロイドを感染しているとそれから作られる苗木も感染し、長期にわたって被害をもたらすことになる。現状ではウイルスおよびウイロイドを栽培ほ場内に持ち込まないことがもっとも有効な防除法であることから、愛媛県では農業団体等の母樹を対象としてウイルスおよびウイロイドの保毒検定を行い拡散防止を図っている。

これらを検出する方法としてCTV, ASGVおよびSDVでは特異性が高く、迅速な検出が可能な血清学的技法の酵素標識抗体法(ELISA)が、RNAのみで構成されている病原体であるCEVdはELISA診断ができずエトログシトロン(*Citrus medica* L.)による生物検定法が用いられている。ところが、近年のELISAによるASGVおよ

びSDV検定では、陽性判定を低い吸光度で行わなければならない試料が多く認められ、判定作業に苦慮している。また、CEVdの生物検定では感染の有無を判定するために数カ月を要するだけでなく、一度に多数の試料を検定することが難しいことが問題点である。そこで、これらを解決する方法としてELISAより高感度であり、ウイルスに加えウイロイドについても検定することができる逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によるカンキツウイルスおよびウイロイドの検出を試み、その有効性について検討した。

本実験を行うに当たり、全RNAの抽出およびRT-PCRの手法を御教示いただいた独立行政法人農業技術研究機構果樹研究所カンキツ研究部口之津の伊藤隆男氏およびASGVのPCRプライマーの配列情報を提供いただいた福岡県農業総合試験場の下村克己氏に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

供試材料および病徴観察

愛媛県立果樹試験場および愛媛県内現地ほ場のウイルスおよびウイロイドの感染が疑われるカンキツ樹36株を実験に用いた。検定用の試料として、ELISAでは2000年4月~5月に新梢の先端部を、RT-PCRには同年4月~8月にかけて前年の春葉を採取し、使用するまで-80℃で凍結保存した。また、病徴は試料採取時にCTVを除いた各ウイルスおよびウイロイドについて特徴的な症状(加

納, 1989) の出現部位を観察して確認した。

ELISA

ELISAは日本植物防疫協会作製のCTV, ASGV およびSDV検出セットを用いて, CTVおよびSDVはClark and Adams (1977) による二重抗体法で, ASGVは試料汁液とコンジュゲートを混合して同時にインキュベートする河合・塚本 (1992) による二重抗体法の変法で行った。なお, 試料汁液は凍結保存していたカンキツ春芽を10倍量 (W/V) の0.5Mクエン酸緩衝液を加え磨砕して調製した。判定は, 基質注入3時間後にマイクロプレートリーダーで吸光度を測定し, 健全試料の吸光度の2倍値以上を陽性, 1.5倍値以上を擬陽性とした。

全RNA抽出およびRT-PCR

全RNAは凍結保存していた約300mgの試料をハンマーで破砕して得られた約50 μ lの粗汁液から, RNA抽出キット (MagExtractor Viral-RNA, 東洋紡) を用いて第1図の手順に従って抽出した。

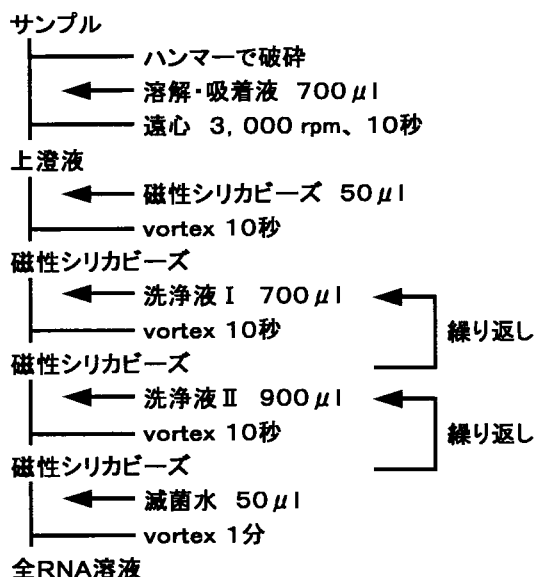
逆転写反応は0.125ユニット AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa), 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP Mixture, 2.5 μ M Random 9 mers, 0.5ユニットRnase Inhibitor (TaKaRa)

および2 μ l全RNA溶液を含む10 μ lの反応液を調製して, 30°Cで10分, 42°Cで30分, 99°Cで5分の条件で行った。PCR反応は1ユニット Ex Taq DNA Polymerase (TaKaRa), 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP Mixture, 0.2 μ M各プライマーおよび1 μ l逆転写産物 (逆転写反応終了後の反応液に20 μ lの滅菌蒸留水を添加したもの) を含む20 μ lの反応液を調製して, 94°Cで2分の熱変性後, 増幅反応 (94°Cで15秒の熱変性, 52~58°Cで15秒のアニーリングおよび72°Cで30秒の伸長) を40サイクル, 最後に72°Cの伸長を7分の条件で行った。PCR産物は反応液5 μ lを1.5%アガロース電気泳動した後, 臭化エチジウム染色により検出した。なお, PCRプライマーは, CTVがMehtaら (1997) およびHilfら (1999), CTLVが下村・草野 (1999) およびCEVdがYangら (1992) によって報告されたものを使用した (第1表)。またSDVはIwanamiら (1999) により報告された同ウイルスRNA2の塩基配列をもとに, ウイルス外被タンパク質遺伝子の一部を増幅するCPF3 (3933 - GCTGATCACTACTCTCAATC - 3952) およびCPR3 (4460 - GTGTATTCTCA CGGTGGATAA - 4440) を設計して供試した。

結果および考察

ELISAあるいは生物検定でCTV, ASGV, SDVおよびCEVdの感染を確認している本試験場保存株 (品種: 清見) から抽出した全RNAをテンプレートとして, 第1表に掲げた検出プライマーを用いてRT-PCRを行った。その結果, 4種のウイルスおよびウイロイドすべてについて期待される大きさのPCR産物を確認することができた。また, 健全樹より抽出した全RNAからはいずれのPCR産物も検出されなかった (第2図)。また, RT-PCRおよびELISAの検出感度を比較するため, 前述の清見から調製した全RNA液または汁液を10段階希釈しRT-PCRまたはELISAを行いSDVにおける検出限界を調査した。その結果, RT-PCRでは1,000倍, ELISAでは100倍希釈まで検出が可能であったことから, 検出感度はRT-PCRが優れていた (データ未掲載)。

次に, 本試験場および現地から採集した36試料

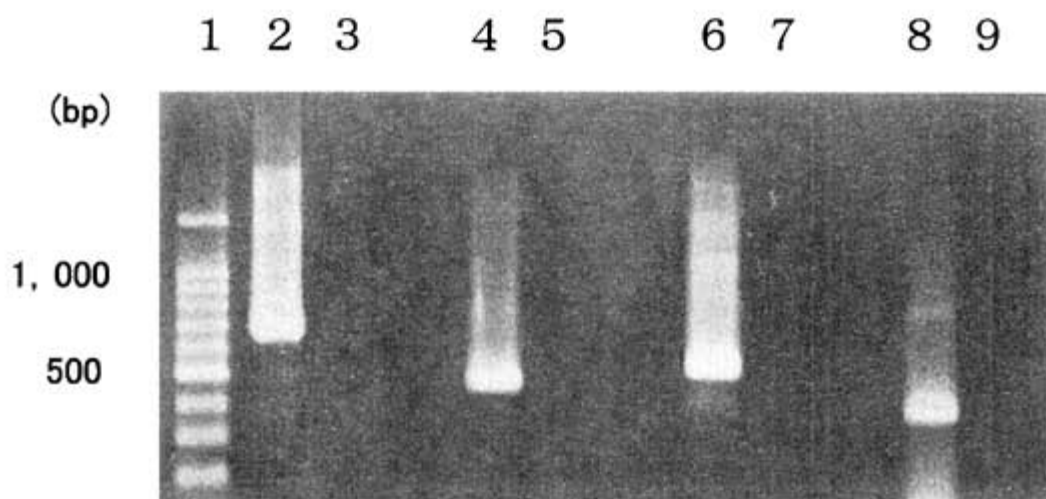


第1図 カンキツ組織から全RNAの抽出手順

第1表 カンキツウイルスおよびウイロイドの検出に用いたプライマーの配列

ウイルス・ウイロイド	プライマー	配列	増幅産物のサイズ(bp)	引用文献
CTV	36CP(+) ^{a)}	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG	672	Hilf <i>et al.</i> (1999)
"	C74(-)	GAAGATCTTCAACGTGTGTTGAATTTCC		Mehta <i>et al.</i> (1997)
ASGV	CTLV-CP2(+)	AGGCAGAACTCTTTGAATGA	428	下村・草野 (1999)
"	ASCT-3(-)	AGAGTGGACAAACTCTAGAC		"
SDV	CPF3(+)	GCTGATCACTACTCTCAATC	523	清水・三好 (本報告)
"	CPR3(-)	CACATAAGAGTGCCACCTATT		"
CEVd	CEV 24-mer primer(+)	ATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAG	371	Yang <i>et al.</i> (1992)
"	CEV 20-mer primer(-)	CCCTGAAGGACTTCTTCCCC		"

a) (+)は+鎖, (-)は-鎖に対するプライマーを示した。



第2図 RT-PCRによるカンキツウイルスおよびウイロイドの検出

1は100bpサイズマーカー, 2と3はCTV特異的プライマー, 4と5はASGV特異的プライマー, 6と7はSDV特異的プライマー, 8と9はCEVd特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。なお, 2, 4, 6および8はウイルスあるいはウイロイド感染カンキツ, 3, 5, 7および9は健全カンキツより抽出した全RNAを鋳型として用いた。

から全RNAを抽出し各ウイルスおよびウイロイドの感染の有無をRT-PCRにより確認したところ, 陽性判定されたものはCTVが35点, ASGVが11点, SDVが24点およびCEVdが6点であった。RT-PCRの結果と供試樹の病徴を比較した

ところ, ASGV, SDVおよびCEVdではそれぞれに特異的な症状が確認された供試樹のRT-PCRの診断結果もすべて陽性であった。しかし, 病徴が確認されなかった供試樹についてもRT-PCRで陽性判定されたものが多く認められた(第2表)。

第2表 RT-PCRおよびELISAによる診断結果の比較

カンキツ名	RT-PCR				ELISA ^{a)}			病徴 ^{b)}
	CTV	ASGV	SDV	CEVd	CTV	ASGV	SDV	
日南1号	+	-	+	-	NT	NT	NT	Dw
上野早生	+	-	+	-	NT	-	±	Dw
〃	+	-	+	-	NT	NT	NT	Dw
〃	+	-	+	-	NT	NT	NT	Dw
興津早生	+	-	+	-	NT	NT	NT	Dw
〃	+	-	+	-	NT	NT	NT	Dw
〃	+	-	+	-	NT	NT	NT	Dw
宮内伊予柑	+	-	+	-	+	-	+	SL
〃	+	-	+	-	+	-	+	SL
〃	+	-	+	-	+	-	±	SL
〃	+	-	+	-	+	-	-	SL
〃	+	-	+	-	NT	-	-	-
〃	+	-	+	-	NT	-	+	SL
不知火	+	+	-	-	+	+	-	-
〃	+	+	-	-	+	+	-	-
〃	+	+	-	-	NT	±	-	-
〃	+	+	-	-	NT	±	-	-
〃	+	-	+	-	NT	NT	NT	-
〃	+	+	+	-	NT	NT	NT	AL
清見	-	+	-	-	-	+	-	AL
〃	+	+	+	+	NT	+	+	Ex
〃	+	-	+	-	NT	NT	NT	SL
〃	+	-	+	-	NT	-	-	SL
〃	+	-	+	-	NT	NT	NT	-
〃	+	-	-	+	NT	NT	NT	Dw
〃	+	-	-	+	NT	NT	NT	Dw
〃	+	+	-	+	NT	NT	NT	SL
ポンカン	+	+	-	-	NT	+	-	AL
〃	+	+	-	-	NT	+	-	AL
カラ	+	+	-	-	NT	NT	NT	AL
ユズ	+	-	+	-	+	-	+	-
天草	+	-	+	-	+	-	+	SL
西之香	+	-	+	-	+	-	+	SL
クレメンティン	+	-	-	+	+	-	-	Ex

a) +は陽性, ±は擬陽性, 陰性は-, NTは未検定を示した。

b) 病徴はDwはわい化, SLは小葉, ALは離層, Exは剥皮を示した。

さらに一部の供試樹について、ASGVおよびSDVの感染の有無をELISAで確認した後、RT-PCRでの検定結果と比較した。その結果、いずれのウイルスについてもELISAで陽性判定されたものはRT-PCRでも同じ結果であった。ところが、ELISAで擬陽性と判定されたASGVの2点およびSDVの3点はRT-PCRではすべて陽性を示した。またSDVでは、ELISAで陰性であった3点がRT-PCRでは陽性判定され異なった結果となった(第2表)。ASGVおよびSDVにおいてRT-PCRとELISAの判定結果が異なったのは、RT-PCRの検出感度がELISAよりも高いため、ELISAでは検出できない低濃度のウイルスでも検出されたためと考えられる。なお、本実験でのELISAの陽性判定は、本試験場で現在運用している基準に基づき行なったが、さらに多くのRT-PCRとELISAの判定データを蓄積し、現状のELISAにおける判定基準の妥当性を検討する必要があると考えられる。

次に、ELISAとRT-PCRによる検出時間の比較を行った。検定実施者が1人の場合、ELISAでは108点の試料をASGVおよびSDVについて2反復で検定したところ、完了させるために2日間を必要とした。それに対しRT-PCRでは、全RNAを抽出し逆転写後にPCR(24ウエルタイプのサーマルサイクラー使用)を行う場合に、前述2種のウイルスの検定を2日間で完了させるためには20点が限界であった。このことからRT-PCRでは多数の検定を一度に行うには適さないと考えられた。

以上をまとめると、RT-PCRによるカンキツウイルス病の検定はELISAで感染の有無を確認しづらい株でもRT-PCRでは明確に検定できたことより、ELISAと比較して検出感度が優れているものと考えられた。また、CEVdにおいても通常数カ月から1年必要である生物検定(加納, 1989)と比較して、RT-PCRは数日で感染の有無を判定することが可能であることから検出期間の大幅な短縮が可能であった。ところが、処理点数の面でRT-PCRがELISAに比べ劣ったことから、短期間に多数の試料を処理しなければならないカンキツウイルス検定をRT-PCRで行うことは難しいと考えられた。以上のことから、多量検定ではELISAを中心として行った後に擬陽性

試料等を補完のためにRT-PCRで再検定したり、またCEVdを検定範囲に含める必要がある場合にはRT-PCRを中心に行うなど、検定の実施目的に応じて使い分けることで、効率かつ確実な診断が可能と考えられる。

近年、植物ウイルス等のPCRを利用した診断は、ウイルス・ウイロイドの遺伝子解析の進展とともに遺伝子診断法の一つとして確立されてきた。花田(2001)は、プライマー作製で多くのウイルスが検出可能で、しかも血清学的手法では検出されないウイロイドが検出できることや低濃度のウイルスも検出することができるなどPCRの利点を総説の中で挙げている。今後はPCRの検出段階での迅速化・簡易化が図られ多量検定に対しても対応できるようなPCRが開発され、さらに効果的なカンキツウイルス検定が可能となるものと考えられる。

摘 要

カンキツ類に発生する重要なウイルス、ウイロイド病の病原であるカンキツトリステザウイルス(CTV)、リンゴステムグルーピングウイルス(ASGV)、温州萎縮ウイルス(SDV)およびカンキツエクソコーティスウイロイド(CEVd)の確実な検定を行なうため、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によるこれらウイルスおよびウイロイドの検出を試みた。これらのウイルスおよびウイロイドに対して特異的なプライマーを作製し、各ウイルス等を感染したカンキツから抽出した全RNA試料を用いてRT-PCRにより検出を行なったところ、感染試料のみから特異的なDNA断片が確認された。次に、現地発病株等を用いてRT-PCRとELISAの検出結果を比較したところ、ELISAでは感染の有無を確認しづらい株でもRT-PCRでは明確に検定できたことより、RT-PCRの検定結果がELISA検定より優れていた。しかしながら、RT-PCRは一回の検定で処理可能な検体数が限られることから、多量検定をRT-PCRのみで実施することは難しいものと考えられた。以上のことから、カンキツウイルスおよびウイロイドの検定ではELISAを中心とし、それを補完する形でRT-PCRを行うことで効果的な検定が可能であると考えられた。

引用文献

- Clark, M. F. and A. N. Adams (1977) : Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34 : 475~483.
- 花田 薫 (2001) : 植物ウイルスの遺伝子診断. *植物防疫*, 55 : 491~494.
- Hilf, M. E., A. V. Karasev, M. R. Albiach-Marti, W. O. Dawson and S. M. Garnsey (1999) : Two paths of sequence divergence in the citrus tristeza virus complex. *Phytopathology*, 89 : 336~342.
- 家城洋之 (1999) : クリーン種苗の生産技術 : 果樹病害. *植物防疫*, 53 : 454~457.
- Iwanami, T., Y. Kondo, M. Kobayashi, S. S. Han and A. V. Karasev (1999) : Nucleotide sequences and taxonomy of satsuma dwarf virus. *J. Gen. Virol.*, 80 : 793~797.
- 加納 健 (1989) : カンキツウイルス病の検定方法(2). *植物防疫*, 43 : 344~348.
- 河合 昭・塚本貴敬 (1992) : モノクローナル抗体を用いたカンキツタターリーフウイルスのELISA法による検出方法. *植物防疫*, 46 : 348~352.
- Mehta, P., R. H. Bransky, S. Gowda and R. K. Yokomi (1997) : Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of citrus tristeza virus in aphids. *Plant Dis.*, 81 : 1066~1069.
- 下村克己・草野成夫 (1999) : イムノキャプチャーRT-PCRによるカンキツタターリーフウイルスの検出. *日植病報*, 65 : 382. (講要)
- Yang, X., A. Hadidi and S. M. Garnsey (1992) : Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82 : 279~285.