

## 直接吸着RT-PCRによるトマト黄化えそウイルス(TSWV)の検出

森田泰彰・竹内繁治\*・川田洋一\*

(高知県農業技術課営農支援室・高知県農業技術センター\*)

### Direct Binding RT-PCR for Detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

By Yasuaki MORITA, Shigeharu TAKEUCHI\* and Youichi KAWADA\* (Agricultural Technology Division, Kochi Prefectural Government, Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, and \*Kochi Prefectural Agricultural Research Center, Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023)

#### 緒 言

トマト黄化えそウイルス (TSWV) は多くの植物に感染し、様々な病徴を呈することが知られている (奥田, 2002)。本ウイルスの検出法として、ELISAやRT-PCR等が用いられている。しかし、ELISAでは検定植物によっては非特異反応が強く出るため検出が不可能であったり、検出感度が低くなる場合がある (千田ら, 1994)。また、検定植物からの全核酸抽出物を用いたRT-PCRでは、植物の種類によってはPCR反応が阻害されたり非感染植物においても特定のDNAが増幅されることがあるなど、安定した検定ができない (藤ら, 1997)。そこで、藤ら (1998) は、TSWV抗体を利用してウイルス粒子をマイクロチューブに吸着させてから核酸を抽出し、RT-PCRを行うイムノキャプチャーRT-PCR (IC・RT-PCR) を検討し、その有効性を報告した。

しかし、IC・RT-PCRはウイルス抗体を必要とし、マイクロチューブをコーティングする手間も必要となる。そこで、TSWV抗体を用いず、PCR用ポリプロピレンチューブに直接ウイルス粒子を吸着させてから核酸を抽出し、RT-PCRを行う直接吸着RT-PCR (DB・RT-PCR) (Rowhani *et al.*, 1995) の適用を検討した。

#### 材料および方法

##### (1) 供試植物

タバコ (Xanthi-nc), ピーマン (ワンダーベ

ル, トサヒメ, 京波), ナス (千両二号), ヒラナス (イタリヤ赤茄子), トマト (ハウス桃太郎), シロバナチョウセンアサガオ, カブ (金町小かぶ), ホウレンソウ (オーライ法蓮草), ダイズ (えんれい大豆), エンドウ (スナップ豌豆), ササゲ (つるあり三尺ささげ), センニチコウ (赤花), トルコギキョウ (あすかの新雪), ヒャクニチソウ (ポーラーベアー) にTSWV (1996年に高知県のスターチスに発生した発病株由来) を汁液接種して病徴が発現した上位葉もしくは接種葉を感染葉とし、適宜、以下の試験に供試した。

##### (2) DB・RT-PCR

RT-PCRにはTaKaRa RNA PCR Kit ver. 2.1 (タカラバイオ株式会社) を使用し、Rowhani *et al.* (1995) の報告を参考にして実施した。すなわち、10倍量 (W:V) の磨砕用緩衝液で磨砕した供試植物の粗汁液20  $\mu$ lを200  $\mu$ l用のPCRチューブ (Molecular Bio Products, Pure Pak™ またはビーエム機器株式会社, 8連PCRチューブ) に入れ、4℃に一晚静置した。0.05%ツイーン20を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBST) で洗浄した後、キットの逆転写反応液 (逆転写酵素を含まないもの) を19  $\mu$ l加えて80℃で5分間熱変性後、直ちに氷中に1分間保った。ここに逆転写酵素を1  $\mu$ l加え、42℃30分間の逆転写反応と、99℃5分間の酵素失活反応処理を行った。これに同キットのPCR反応液を加えて94℃で3分間の熱

変性後、94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒を35サイクル繰り返し、72℃で5分間保った。なお、プライマーは藤ら(1998)の報告したプライマーAとBを用いた。PCR産物は、1～2%のアガロースゲルで電気泳動後エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射下でTSWVに特異的な457bpのバンド(藤ら, 1998)の有無を観察した。

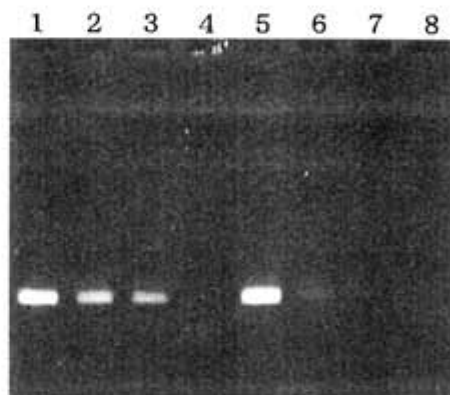
なお、磨砕用緩衝液の種類が検出感度に及ぼす影響を検討するため、ピーマン(京波)のTSWV感染葉を10倍量の0.05M炭酸緩衝液pH9.6(CB)またはPBSTで磨砕し、これらを原液として、健全葉の粗汁液で $10^{-5}$ まで段階希釈したものを用いて検出感度を比較した。また、粗汁液を捨てた後のチューブの洗浄回数が検出感度に及ぼす影響を検討するため、PBSTによる洗浄回数を0～3回として、同様に検出感度を比較した。

### (3) IC・RT-PCR

IC・RT-PCRは、亀谷ら(1999)の報告を参考にして実施した。すなわち、CBで $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したTSWV抗体 $20\mu\text{l}$ を $200\mu\text{l}$ 容量のPCR用ポリプロピレンチューブに入れ、37℃に2時間保った。PBSTで3回洗浄後、10倍量のPBSTで磨砕した供試植物の粗汁液を $20\mu\text{l}$ ずつ加えて4℃に一晩静置し、その後、PBSTで3回洗浄した。以降のRT-PCRは、DB・RT-PCRと同様に行った。

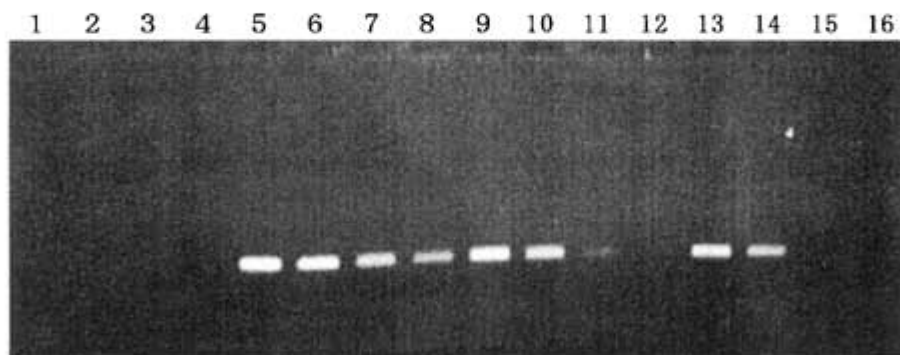
### (4) DB・RT-PCRとIC・RT-PCRとの感度比較

TSWV感染葉を10倍量(W:V)の磨砕用緩衝液で磨砕し、これを原液として、健全葉の磨砕液で $10^{-7}$ まで段階希釈した。これらを用いてDB・RT-PCRおよびIC・RT-PCRを行い、両者の検出感度を比較した。なお、DB・RT-PCRにおける磨砕用緩衝液にはCBを用い、磨砕液を捨てた後のチューブの洗浄は1回とした。



第1図 磨砕用緩衝液の違いによる検出感度の比較

1～4 : CBで磨砕, サンプルの希釈は順に, 原液( $10^0$ ),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$   
5～8 : PBSTで磨砕, サンプルの希釈は順に, 原液( $10^0$ ),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$



第2図 チューブの洗浄回数の違いによる検出感度の比較

1～4 : 洗浄回数0, サンプルの希釈は順に, 原液( $10^0$ ),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$   
5～8 : 洗浄回数1, サンプルの希釈は順に, 原液( $10^0$ ),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$   
9～12 : 洗浄回数2, サンプルの希釈は順に, 原液( $10^0$ ),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$   
13～16 : 洗浄回数3, サンプルの希釈は順に, 原液( $10^0$ ),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$

## 結 果

### (1) DB・RT-PCRにおける磨砕用緩衝液およびチューブの洗浄回数

ピーマンを用いて検定した結果、磨砕用緩衝液としてはCBの方がPBSTよりも検出感度が高かった(第1図)。また、チューブの洗浄回数は多くなるにつれて感度が低下したが、洗浄を行わないと目的のDNAが増幅されなかった(第2図)。

### (2) DB・RT-PCRによる各種植物からの検出 供試したいずれの植物においても、感染葉から

はTSWVに特異的なバンドが認められたが、健全葉からは認められなかった(第3図)。

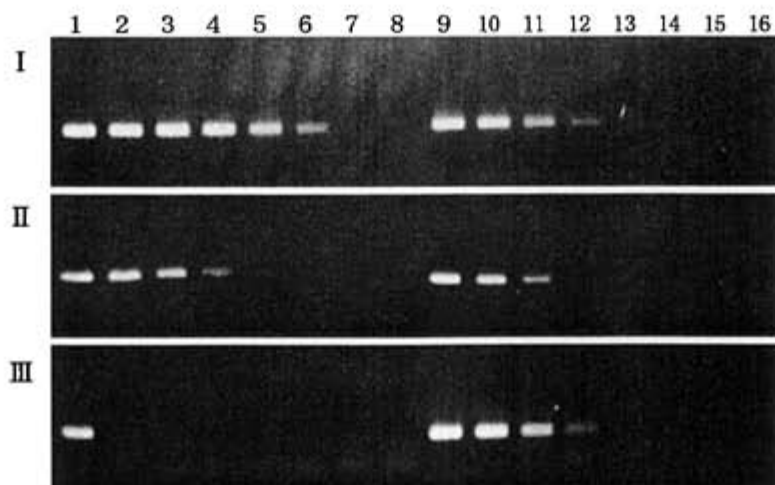
### (3) DB・RT-PCRとIC・RT-PCRとの感度比較

トマトを用いて感度比較を行ったところ、IC・RT-PCRでは $10^{-5}$ に希釈したサンプルまで検出可能であったのに対し、DB・RT-PCRでは $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ まで検出可能であった。また、ナスを用いて比較したところ、IC・RT-PCRでは $10^{-4}$ に希釈したサンプルまで検出可能であったのに対し、DB・RT-PCRでは $10^{-3}$ まで検出可能であった。



第3図 DB・RT-PCRによる各種植物からのTSWVの検出

1 : タバコ, 2 : ピーマン, 3 : ナス, 4 : ヒラナス, 5 : シロバナチョウセンアサガオ,  
6 : カブ, 7 : ホウレンソウ, 8 : ダイズ, 9 : エンドウ, 10 : ササゲ, 11 : センニチコウ,  
12 : トルコギキョウ, 13 : ヒャクニチソウ  
T : TSWV感染葉, H : 健全葉



第4図 IC・RT-PCRとDB・RT-PCRとの検出感度の比較

I : トマト, II : ナス, III : ピーマン, 各レーンは次のとおり  
1 ~ 8 : IC・RT-PCR, サンプルの希釈は順に原液( $10^0$ )~ $10^{-7}$ ,  
9 ~ 16 : DB・RT-PCR, サンプルの希釈は順に原液( $10^0$ )~ $10^{-7}$

一方、ピーマンを用いて比較したところ、IC・RT-PCRでは原液でのみ検出可能であったのに対し、DB・RT-PCRでは $10^{-3}$ まで検出可能であった(第4図)。

## 考 察

RT-PCRによって各種植物からTSWVの検定を行う場合、フェノール/クロロホルムなどのタンパク変性剤を用いて全核酸を抽出する必要があるが、核酸抽出に大きな労力を要するうえ、植物によっては逆転写あるいはPCR反応阻害物質を多く含むものがあり、感染株の判定が不可能な場合がある。ウイルス抗体を利用したIC・RT-PCRを用いると、核酸抽出に要する手間が少なく、検定を行いたいいずれの植物においても感染葉の検定ができる(森田ら, 2003)。しかし、IC・RT-PCRではウイルス抗体でPCRチューブをコーティングする必要がある。そこで、さらに作業の簡便化を図るためDB・RT-PCRの検討を行った。

感染葉の磨砕用緩衝液としてCBを用いて、粗汁液を捨てた後のチューブの洗浄回数を1回とすることで検出感度が高まることが明らかとなるとともに、供試したいずれの植物においても感染葉のみから特異的バンドが検出され、本法がTSWVの検出に有効であることが明らかとなった。本法ではウイルス抗体のコーティングが必要なく、チューブの洗浄回数も少ないことから、大きく作業の簡便化が図られる。

DB・RT-PCRはIC・RT-PCRよりも検出感度が低いとされている(Rowhani *et al.*, 1995)。今回、両法の検出感度を比較したところ、DB・RT-PCRの感度はIC・RT-PCRよりも $1/10\sim 1/100$ 程度に低下する場合が見られたものの、粗汁液を $10^{-3}\sim 10^{-4}$ に希釈しても検出可能であった。

これらの結果から、TSWVの検定において、DB・RT-PCRは作物によってはIC・RT-PCRと比較してやや検出感度が低いが、抗体を必要とせず、作業性に優ることから、多くの試料を同時に検定する場合には極めて有効な実用技術であると考えられる。特に、ピーマンにおいては、フェノール/クロロホルム法により抽出した全核酸ではTSWVの検出ができない(森田ら, 2003)。また、ピーマンにおいてはIC・RT-PCRの感度が非常に低く、かえってDB・RT-PCRの方が感度が高かった。このことより、ピーマンでのTSWVの検定にはDB・RT-PCRは非常に有効な技術で

ある。さらに、DB・RT-PCRは抗体を必要としないことから、抗体の入手が容易でないウイルスの検出にも利用できると考えられる。

## 摘 要

PCR用ポリプロピレンチューブに直接検定植物の粗汁液を入れてウイルス粒子を吸着させてから核酸を抽出し、RT-PCRを行う直接吸着RT-PCRにより、各種植物からTSWVの感染を検定できる。本法は、ウイルス抗体を利用するイムノキャプチャーRT-PCRと比較すると検出感度が低下する場合もあるが、ピーマンでは感度が高くなる。本法は各種植物から安定してTSWVの検出ができるうえ、核酸抽出作業が簡便であることから、各種植物におけるTSWVの検定に有用である。

## 引 用 文 献

- 千田茂樹・高橋義行・河野敏郎・小島 誠(1994): 花卉類のELISA検定における非特異反応. 関東病虫研報, 41: 163~164.
- 藤 晋一・平野哲司・中込暉雄・大石一史・中前均(1997): キクえそ病(TSWV)の診断. 関西病虫研報, 39: 61~62.
- 藤 晋一・大石一史・中前 均(1998): イムノキャプチャーRT-PCRによるキクえそ病の診断. 関西病虫研報, 40: 111~112.
- 亀谷満朗・山口和彦・原 知子・伊藤真一・藤 晋一・鍛冶原寛・田中秀平(1999): イミュノキャプチャーPCRによるイチョウイモ(*Dioscorea opposita* Thunb. cv. ichoimo)からのヤマノイモモザイクウイルス(JYMV)の検出とそのPCR-RFLPによる強毒株と弱毒株の判別. 日植病報, 65: 494~497.
- 森田泰彰・竹内繁治・川田洋一(2003): RT-PCRによるTSWVの検出における核酸抽出法の簡易化. 四国植防, 38: 59.
- 奥田 充(2002): 我が国におけるトスポウイルス病の発生状況. 植物防疫, 56(1): 18~21.
- Rowhani, A., M. A. Maningas, L. S. Lile, S. D. Daubert and D. A. Golino (1995): Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85: 347~352.