

逆転写遺伝子増幅法による温州萎縮ウイルスの高感度検出

下村克己¹⁾・野口保弘²⁾
(果樹苗木分場)

温州萎縮ウイルスの高感度検出にRT-PCRおよびIC-RT-PCR法が適用可能かどうか検討した。その結果、新たに設計したプライマー [CP-L1(+), CPL-R(-)] を用いたRT-PCR法は、今回供試したSDVの2系統およびその近縁ウイルスであるCiMVの3系統の検出に有効であった。IC-RT-PCR法の検出感度は、ELISA法の30倍以上であった。また、ELISA法では検定が不可能な冬季のカンキツの葉や樹皮からもRT-PCR法によってSDVの検出が可能であった。

以上のことから、RT-PCRおよびIC-RT-PCR法は、SDVおよびCiMVの高感度検定に有効であると考えられた。

[キーワード: カンキツ、温州萎縮ウイルス、高感度検出、RT-PCR、IC-RT-PCR]

Sensitive Detection of Satsuma Dwarf Virus by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction SHIMOMURA Katsumi and Yasuhiro NOGUCHI (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 22 :99-102 (2003)

We examined whether reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR) methods were suitable for sensitive detection of satsuma dwarf virus (SDV) in citrus. All tested strains of SDV as well as the closely related virus, citrus mosaic virus, were detectable only by RT-PCR using a new primer pair, [CP-L1(+), CPL-R(-)], designed based on the nucleotide sequence of coat protein region of SDV-58. The detection ability of IC-RT-PCR with use of the new primer pair was 30 times higher than that of enzyme-linked immunosorbent assay. RT-PCR was useful for detection of SDV in citrus leaves and bark in winter. These results indicated that RT-PCR and IC-RT-PCR methods were useful for sensitive detection of SDV in citrus.

[Key words: citrus, satsuma dwarf virus, sensitive detection, RT-PCR, IC-RT-PCR]

結 言

温州萎縮病は、わが国の主要なカンキツである温州ミカン (*Citrus unshu* marc.) において、葉の奇形や樹勢および収量の低下を招く重要病害である⁸⁾。

本病は、温州萎縮ウイルス (SDV) によって引き起こされ、その伝染様式は接ぎ木や汁液によるほか、土壌伝染するとされ^{6, 7)}、ウイルスフリー化も抜本的な対策とはなっていない。土壌による伝染機構については十分解明されていないため、本病の防除においては、母樹の早期検定による伝染拡大防止が、実用上最も有効な対策の一つとなっている。

本県では、その防除対策の一環として、酵素結合抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)^{1, 2)} による検定を、年間3,500試料について実施している。本法は、大量の検定を行う際には、簡易かつ効率的であるが、検出感度の限界から、判定が困難な擬陽性の試料が存在すること、また試料の採取時期がウイルス濃度の高い時期に限定されるなどの問題がある。特に、擬陽性の試料について正確な再検定を実施するには、樹体内のウイルス濃度が高まる翌年の春期の新芽を供試するか、あるいは生物検定を行う必要があり、いずれも判定に長期間を要する。一方、最近の苗木生産現場では、生産計画が整う冬季における検定の要望が増加しており、それ

が可能な検定法の確立が望まれている。筆者らは、カンキツ栽培においてSDVと並んで重要なウイルスであるリンゴステムグルーピングウイルス (apple stem grooving virus: ASGV) の検定法について検討し、リンゴやヤマノイモのウイルスの検出で報告のある逆転写遺伝子増幅法 (reverse transcript polymerase chain reaction: RT-PCR)^{7, 10, 11)} およびイムノカプチャー逆転写遺伝子増幅法 (immuno-capture RT-PCR: IC-RT-PCR)^{6, 11)} を適用することにより、ELISA法よりもさらに高感度な検定が可能であることを報告した¹²⁾。

今回は、RT-PCRおよびIC-RT-PCR法が、SDVの高感度検出に適用可能かどうかについて検討したので、その概要について報告する。

なお、今回報告する内容は、平成11年度農林水産省依頼研究員研修において、農林水産省果樹試験場 (現独立行政法人 農業技術研究機構 果樹研究所) で実施した研究の一部をまとめたものである。

材料および方法

1 供試ウイルス

独立行政法人 農業技術研究機構 果樹研究所において各種カンキツから分離・保存されているSDVの2系統、SDV-58^{3, 5)}、MIE-88³⁾ およびその近縁ウイルスであるカンキツモザイクウイルス (CiMV) の3系統 Ci-968^{3, 5)}、CiMV下津、CiK[Ⓞ] を供試した。

休眠期の試料からの検出の検討には、1980年に農林水

1) 現園芸研究所

2) 退職

産省 果樹試験場 口之津支場 (現 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) から分譲され、当场においてウイルスフリー化した '林温州' に接種し、無加温ビニールハウス内で保存している SDV²⁾ を供試した。

2 RT-PCR法

検出用プライマーは、Iwanami,Tらが報告したSDVの強毒系統SDV-58の外被タンパク領域 (CP) およびその上流の塩基配列⁴⁾ に基づき設計した (Table 1, Fig. 1)。

Table 1. Primers for detection of SDV

<FORWARD>	
S58-s1(+)	:5'-GAT GAT GAC TTC TTC TTC AC-3' (84- 103*)
CP-L1(+)	:5'-TCT TTA CGT TCC GTC TAT GC-3' (3084-3103)
CP-L3(+)	:5'-AGC GCT GAT CAC TAC TCT CA-3' (3928-3947)
CP-S1(+)	:5'-TGC CTA TTA CTA TGG GAC AC-3' (4460-4479)
<REVERSE>	
BCP-2(-)	:5'-TGG ATA CGC ACG AGC ATT GA-3' (1853-1834)
CPL-R(-)	:5'-TAC CTG CAA ATA TAT CGC AG-3' (4237-4218)
S58-r1(-)	:5'-ACG CAG CGA TGG CAT CAG GA-3' (5013-4994)

* nucleotide positions based on the sequence of SDV-58⁴⁾

ウイルスRNAは、供試ウイルス各系統を保毒したカンキツ旧葉の0.05gから、核酸抽出剤ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて全核酸を抽出後、20μLの再蒸留水に懸濁して調製した。

RT-PCRは、抽出・調整した全核酸 1μLを鋳型に用い、既報¹²⁾ に準じて実施した。

3 IC-RT-PCR法とELISA法の感度の比較

SDV-58を保毒したラフレモン (*Citrus jambhiri* LUSH.) の新芽0.05gを、10倍容の0.1%チオグリコール酸を含む0.02Mクエン酸緩衝液 (pH5.5) で磨砕後、遠心 (5,000rpm, 10分間) して得られた上清を、同様にして調製した健全なラフレモン汁液で段階希釈し、ELISA法とIC-RT-PCR法に供試した。

ELISAおよびIC-RT-PCRは、既報¹²⁾ に準じて行った。

結果および考察

1 RT-PCR法における検出用プライマーの選抜

今回新たに設計した相補、相同プライマー (Table 1) 組み合わせのうち、理論上増幅可能な8組み合わせ

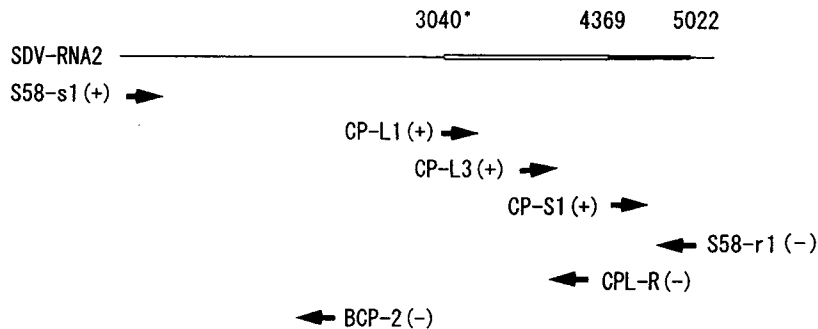


Fig.1 Location of primers used for the PCR amplification of SDV-58 genome.

□, ▭ mean large and small coat protein regions of SDV, respectively.

* means nucleotide position.

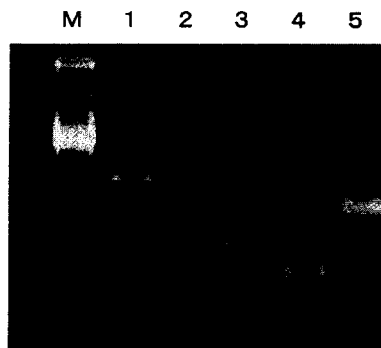


Fig.2 Agarose gel electrophoresis of DNAs amplified by RT-PCR from leaf samples of a citrus tree infected with SDV-58. Lane M, DNA 100bp ladder marker, lanes 1 to 5, DNA products from SDV-infected samples. Primer pairs used were lane 1, [S58-s1(+).BCP-2(-)], lane 2, [CP-L1(+), CPL-R(-)], lane 3, [CP-S1(+), S58-r1(-)], lane 4, [CP-L3(+), CPL-R(-)], lane 5, [CP-L3(+), S58-r1(-)] . respectively.

についてSDV-58を保毒したラフレモンから抽出した全核酸を供試して検討した。その結果、そのうちの5組み合わせ、[S58-s1(+),BCP-2(-)]、[CP-L1(+),CPL-R(-)]、[CP-S1(+),S58-r1(-)]、[CP-L3(+),CPL-R(-)]、[CP-L3(+),S58-r1(-)]において、想定される位置にDNAの増幅が認められ(Fig.2)、[S58-s1(+),CPL-R(-)]、[S58-s1(+),S58-r1(-)]および[CP-L1(+),S58-r1(-)]の組み合わせでは、認められなかった(データ略)。

そこで、増幅が認められた5つのプライマー組み合わせによるRT-PCRを、SDVの2系統およびCiMVの3系統から抽出した全核酸を用いて実施した。その結果、SDVの2系統については、すべての組み合わせにおいて想定される位置にDNAの増幅が認められたのに対して、CiMVの3系統については、[CP-L1(+),CPL-R(-)]の組み合わせのみ増幅が認められた(Table 2)。

これは、CiMVを検出できなかった組み合わせのプライマーのうち、少なくともも相同、相補いずれかがアニールする位置にSDVとは異なる塩基配列が存在するためと考えられた。

Table 2. Detection of strains of SDV and CiMV by RT-PCR using 5 primer pairs

strains	primer pair				
	S58-s1(+)	CP-L1(+)	CP-S1(+)	CP-L3(+)	CP-L3(+)
	BCP-2(-)	CPL-R(-)	S58-r1(-)	CPL-R(-)	S58-r1(-)
SDV-58	+	+	+	+	+
MIE-88	+	+	+	+	+
Ci-968	-	+	-	-	-
CiMV-Shimozu	-	+	-	-	-
CiMV-Cik⑤	-	+	-	-	-

+ : amplified, - : not detected

このことから、カンキツのウイルス検定においては、プライマーとして[CP-L1(+),CPL-R(-)]の組み合わせを用いることにより、SDVだけでなくCiMVの検出も可能と考えられた。

2 IC-RT-PCR法とELISA法の感度の比較

SDV-58を保毒したラフレモンの新葉から得た汁液をラフレモンの実生の新葉から得た汁液で段階希釈して調製した液を用いてELISA法により検定した結果、270倍希釈液まで判定可能であった(Fig.3)。

一方、IC-RT-PCR法では、7,290倍希釈液でも判定に十分な量のDNAの増幅が認められ(Fig.4)、約30倍高感度な検出が可能であったASGVの場合¹²⁾と同様、ELISA法では判定が不正確な擬陽性の試料のより正確な検定が可能であり、SDVの検定に有効であると考えられた。

3 休眠期の試料からのSDVの検出

カンキツの休眠期に当たる1月に、無加温ビニールハウスにおいて保存しているSDV保毒‘林温州’の葉お

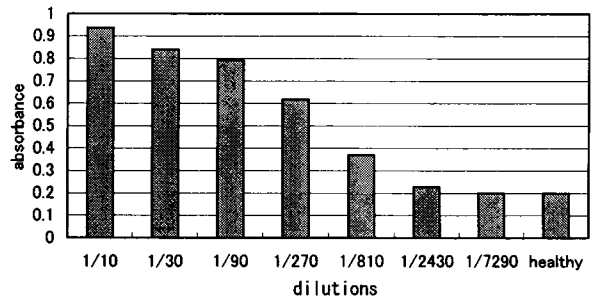


Fig.3 Enzyme-linked immunosorbent assay of sap from SDV-58-infected citrus leaves.

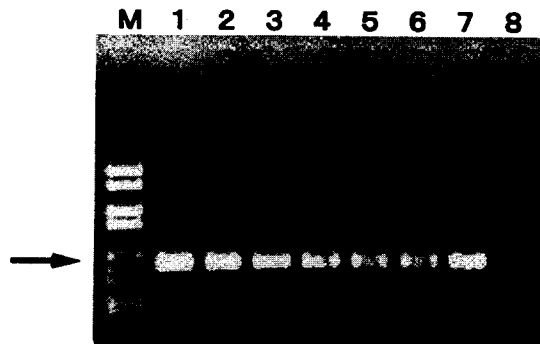


Fig.4 Agarose gel electrophoresis of DNAs amplified from leaf samples of a citrus tree infected with SDV-58 by IC-RT-PCR using the primer pair, [CP-L1(+),CPL-R(-)]. Lane M, DNA molecular weight marker VI (Beilinger Manheime), lanes 1 to 7, DNA products from threefold dilution samples from 1/10 to 1/7,290, respectively. Lane 8, a product from a healthy sample. The arrow indicates the SDV specific band.

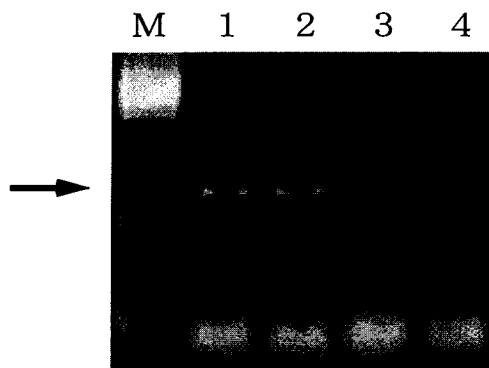


Fig.5 Agarose gel electrophoresis of DNAs amplified from leaf and bark samples of a citrus tree infected with SDV by RT-PCR using the primer pair, [CP-L1(+), CPL-R(-)], in winter. Lane M, DNA 100bp ladder marker, lanes 1 and 2, DNA products from RNAs extract from leaf and bark samples of a citrus tree infected with SDV. Lanes 3 and 4, DNA products from RNAs extract from leaf and bark samples of healthy one. The arrow indicates the SDV specific band.

よび樹皮を用いて、全核酸を抽出し、RT-PCR法により検定した。その結果、葉、樹皮いずれの部位からも判定に十分な量のDNAの増幅が認められた (Fig.5) ことから、休眠期における母樹の検定も十分実施可能であると考えられた。

以上のことから、IC-RT-PCR法は、ASGV同様SDVにおいてもELISA法よりも高感度の検定が可能と考えられた。また、RT-PCR法は、従来、ウイルス濃度が低く、検定が不可能であった休眠期の検定を可能にすることから、接ぎ木直前の母樹や穂木の検定に基づくウイルスフリー苗の効率的な生産を可能にするものと考えられた。なお、Iwanami,Tらは、SDVには、抗血清の反応が異なるいくつかの系統が存在することを報告している³⁾。このことから、今後、これら系統に対するRT-PCRおよびIC-RT-PCR法の適応性を検討し、本手法によるSDV諸系統およびその近縁ウイルスの検出法を早急に確立する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、農林水産省果樹試験場岩波徹博士 (現 農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター)、家城洋之博士 (現 農業技術研究機構果樹研究所ブドウカキ研究部)、加納健博士 (現 農業技術研究機構本部 総合企画調整部) には、懇切なる御指導・御助言を頂いた。ここに記して、厚く感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 平島敬太・野口保弘・山田耕路・村上浩紀(1990) モノクローナル抗体による温州萎縮ウイルスの検出. 第1報 ウイルスの純化とモノクローナル抗体の作出. 福岡農総試研報B- 10:87-90.
- 3) Iwanami,T, M.Koizumi and H.Ieki (1993) Diversity of

Properties among Satsuma Dwarf Virus and Related Viruses.*Ann.Phytopathol.Soc.Jpn.*59:642-650.

- 4) Iwanami,T, Y. Kondo, Y. Makita, C. Azeyanagi and H.Ieki (1998) The nucleotide sequence of the coat protein genes of satsuma dwarf virus and navel infectious mottling virus. *Archives of Virology.* 143:405-412.
- 5) Iwanami,T,M.Omura and H.Ieki (1991) Susceptibility of Several Citrus Relatives to Satsuma Dwarf Virus.*In proc .12th Conf.IOCV.IOCV,Reverside.*:352-356.
- 6) Kameya-Iwaki,M., Yamaguchi,K., Hara,T., Ito,S., Fuji,S., Kajihara,H. and Tanaka,S.(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.
- 7) Kinard,G.R.,Scott,S.W. and Barnett,O.W. (1996) Detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus by RT-PCR. *Plant Dis.* 80:616-621.
- 8) 岸國平編(1998)日本植物病害大事典. 全国農村教育協会, 東京: p868
- 9) Koizumi,M., T.Kano, H.Ieki and H.Mae (1988) China Laurestine: A symptomless Carrier of Satsuma Dwarf Virus which Accelerates Natural Transmission in the Fields. *In proc .10th Conf.IOCV.IOCV,Reverside.*:348-352.
- 10) Marinho,V.R.A., Kummart,J., Ruflard,G.,Clinet,D. and Lepoivre,P.(1998) Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. *Plant Dis.*82:785-790.
- 11) Nemchinov,L., Hadidi,A., Foster,J.J., candresse,T. and Verderevskaya,T(1995) Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR,or multiplex IC-RT-PCR.*Acta hortic.*386: 51-62.
- 12) 下村克己・草野成夫(2001)イムノキャプチャー逆転写遺伝子増幅法 (IC-RT-PCR)によるカンキツからのリンゴシステムグルーピングウイルスの検出. 福岡農総試研報21: 87-91