

# 福岡県に発生したトマト黄化葉巻ウイルスに対する抗血清を用いたDAS-ELISA法およびTissue Printing-immuno Assay法による検出

石井貴明 \*・嶽本弘之<sup>1)</sup>・上田重文<sup>2)</sup>・花田 薫<sup>3)</sup>

わが国のトマト栽培においてTomato yellow leaf curl virus (TYLCV) を病原とするトマト黄化葉巻病は、1996年の初発生以来、現在も発生地域が拡大しており、依然として問題である。本病の防除に必要な血清学的診断技術を確立するため、純化した本ウイルス粒子を抗原として家兎を免疫し、抗血清を作製した。作製した抗血清から精製したIgGを用いたDAS-ELISA法で検討した結果、本ウイルス福岡株および系統の異なる静岡株の罹病トマト葉磨碎液に対し、特異的な陽性反応が認められた。また、トマト以外の宿主植物であるチョウセンアサガオおよびペチュニアの罹病葉からも検出が可能であった。さらに、より簡易な手法であるTissue Printing-immuno Assay法を本ウイルス福岡株の罹病トマトに対して検討したところ、本ウイルスを特異的に検出することができた。以上から、作製した抗トマト黄化葉巻ウイルス血清を用いたDAS-ELISA法およびTissue Printing-immuno Assay法はトマト黄化葉巻病の診断に利用できることが確認された。

[キーワード：トマト、トマト黄化葉巻ウイルス、DAS-ELISA、Tissue Printing-immuno Assay]

Preparation and use of antiserum against tomato yellow leaf curl virus in double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays and tissue printing immunoassays. ISHII Takaaki, Hiroyuki TAKEMOTO, Shigenori UEDA and Kaoru HANADA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent. 30:14-17(2011)

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) was purified from infected tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. A white rabbit was given a series of injections containing purified TYLCV, and antiserum to the virus with a 1/1,000 titer was obtained. Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assays (DAS-ELISA) successfully detected the TYLCV-Fukuoka isolate in diseased tomato leaves, and also detected the TYLCV-Shizuoka isolate, which belongs to a distinct group of TYLCV. TYLCV was also detected in diseased datura (*Datura stramonium*) and petunia (*Petunia hybrida*) leaves. Furthermore, tissue printing immunoassays using the antiserum specifically detected TYLCV in young stems of diseased tomato plants. These results indicate that DAS-ELISA and TPI can be used to detect TYLCV in diseased tomato plants.

[Key words: Tomato, Tomato yellow leaf curl virus, DAS-ELISA, Tissue Printing-Immunoassay]

## 緒 言

トマト黄化葉巻ウイルス (tomato yellow leaf curl virus 以下TYLCV) によるトマト黄化葉巻病（以下黄化葉巻病）は、1996年に静岡、愛知、長崎県で確認されて以降、九州、中国四国、近畿東海、関東などに発生が拡大してきた（本多 2005）。黄化葉巻病に罹病したトマトは、退緑と黄化を伴う葉巻症状を呈し、症状が激しい場合には成長部付近は縮葉、叢生し、株全体が萎縮する。そのため、本病により果実生産が受ける被害は極めて大きく、現在ではトマト栽培における重要病害の 1つとなっている（嶽本・石井 2005）。わが国で発生しているTYLCVは、そのゲノムの塩基配列から症状が激しいTYLCV-イスラエル系統、もしくは症状がやや穏やかなTYLCV-イスラエル・マイルド系統に極めて近縁である系統のどちらかに分類されることが確認されている（Ueda ら 2004, 上田 2008）。

TYLCVはタバココナジラミ *Bemisia tabaci* によって容易に媒介されるため、発生施設内では本病が急速に蔓延する危険性が高い。従って本病の防除対策上、早

期発見に基づく罹病株の除去が重要である。国内では、これまで本病の診断には特異プライマーを用いたPCRによる遺伝子診断が行われてきた（大貫・花田 2000）。しかし、検出に要する経費、大量な検体の診断時の操作性、PCRに必要な特別な機器の使用等を比較した場合、より汎用性の高い診断法として血清学的診断法が望ましく、そのためにはTYLCV抗血清の作製が必要である。上田ら（2003）は、大腸菌で発現させたTYLCV外被タンパク質を抗原として作製した抗血清を用いて、トマト罹病葉からELISA法によって罹病葉からTYLCV-イスラエル系統の検出が可能であったことを報告したが、高い力価を有するものではなかった。これまで、国内では力価の高いTYLCV抗血清は作製されていない。また、市販のTYLCV抗体は海外からの輸入品のみで、極めて高価かつ割高である。そこで純化したTYLCV粒子を抗原として、高い力価を有する抗血清の作製を試みた。また、作製した抗血清によるDAS-ELISA法やより簡易な手法であるTissue Printing-immuno Assay法（以下TPI法）によるトマトからのTYLCV診断法について検討した。

\*連絡責任者（病害虫部：tishii@farc.pref.fukuoka.jp）

受付2010年7月28日；受理2010年11月16日

1) 現 福岡県農林水産部経営技術支援課

2) 独立行政法人農業・食料産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター

3) 独立行政法人農業・食料産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター

## 材料および方法

### 1 TYLCV粒子の精製と抗血清の作製

純化ウイルスは、TYLCV福岡株（TYLCV-イスラエル系統）の罹病トマト葉を材料にLouisoniら（1995）の方法に準じて精製した。ただし、しょ糖密度勾配遠心では10, 20, 30, 40% (W/V) の段階的密度勾配とした。遠心後、遠心チューブの底部から0.4mLずつ10画分を分取し、分画試料とした。分画試料には早く分取した順に1～8まで番号を付した。各分画試料は、電子顕微鏡で観察するとともにウェスタンブロッティングにより精製の程度を確認した。すなわち、ウェスタンブロッティングでは、精製したウイルス粒子を含む試料を変性処理し、SDS-PAGEに供試した後、クリアプロット-P膜(ATTO)に転写した。1,000倍希釈した抗TYLCV血清(ADGEN)を用いて、分子量約30kのウイルス由来の外被タンパク質を指標に確認した。なお、純化ウイルスの定量は、Louisoniら（1995）の方法に準じた。抗血清の作製には、精製したウイルス試料をFreundの完全アジュvantで乳化したもの家兔に1週間間隔で3回皮下注射し、続いて1週間後に静脈注射した。最後の注射から10日後に採血した。なお、総量として160 μgの精製ウイルスを用いた。得られた抗血清は、先に述べた方法と同様にウェスタンブロッティング解析し、力値を測定した。その後、Immuno Pure (A) IgG Purification Kit (PIERCE)により抗血清からIgGを精製し、DAS-ELISA法およびTPI法の血清学的検定に供試した。

### 2 DAS-ELISA法による血清学的検定

#### (1) DAS-ELISA法によるTYLCVの検出

精製したIgGまたは、アルカリフォスファターゼ標識したIgG（コンジュゲート）を用いてDAS-ELISAによるTYLCV福岡株の罹病トマト葉磨碎液からの特異的検出について検討した。罹病葉の磨碎には抽出緩衝液（組成：50mM Tris-HCl, 2.5mM EDTA, 10mM 亜硝酸ナトリウム, 2.0% PVP, 0.2%BSA (pH8.0)）を用いて以下のとおり行った。すなわち、罹病株（品種『ハウス桃太郎』）の新葉0.1gを乳鉢内にて0.9mLの抽出緩衝液で磨碎した後、磨碎液をマイクロチューブに移し、室温で8,000g×5分間遠心し、その上清を検出用試料とした。なお、DAS-ELISAにおける実際の操作は常法（Clark and Adams 1977）に準じ、コーティングは0.5, 1.0, 2.0および4.0 μg/mLのIgG濃度を設け、25°Cで1時間保持、ブロッキングは、PBSTPB (2.0%PVPおよび0.2%BSAを含むphosphate buffered saline (最終濃度で0.85%NaClおよび0.02%Tween20を含む50mM リン酸緩衝液、以下PBS (pH7.4) ) で25°C、1時間保持、ウイルス試料液は、磨碎液の5倍希釈液を分注し、4°Cで一晩保持した。コンジュゲートは、500倍、1,000倍および2,000倍希釈区を設定し、分注後、25°Cで2時間保持した。発色反応は、p-nitrophenylphosphateを基質とし、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。1検体につき2反復を設定し、両値の平均を試験区の吸光度とした。

#### (2) 異なる系統に属するTYLCV分離株のDAS-ELISAによる検出

作製したTYLCV抗体の反応特異性を調べるために、抗血清の作成に用いたTYLCV福岡株とは異なるTYLCV-イスラエル・マイルド系統に属するTYLCV静岡株の罹病葉磨碎液を試料として、DAS-ELISAによる検出について検討した。対照としてTYLCV福岡株および熊本株（いずれもTYLCV-イスラエル系統）の罹病葉を対照として供試した。DAS-ELISA法は、2-(1)に準じた。また、トマト以外の宿主植物であるチョウセンアサガオおよびペチュニアにTYLCV福岡株を接種した罹病葉からのDAS-ELISAによる検出も同様に検討した。

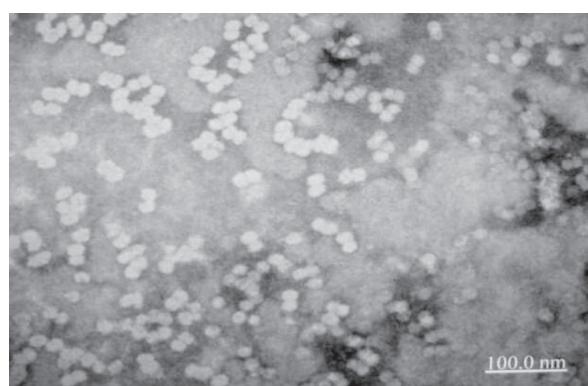
### 3 TPI法による血清学的検定

TPI法はLinら(1990)の方法に準じ、検出にはTYLCV福岡株の罹病トマト株の新葉、または生長点付近の複葉葉柄の茎部を供試した。すなわち、小葉を葉巻状に固く卷いた中央部、または葉柄茎部を鋭利なカミソリで横断後、断面を検出用メンブレンシートに押しつけ、TPIの試料シートとした。なお、検出用メンブレンシートにはHybond-P (Amersham) を用いた。1次抗体として精製IgGを0.5 μg/mLになるようにトリス緩衝液で希釈したものを用い、2次抗体は、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG-ヤギIgG (EY Laboratories) をトリス緩衝液で3,000倍に希釈したものを供試した。発色基質および発色剤にはBCIP/NBT Color Substrate (Promega) を用いた。試料シートのTissue-プリント部位に特異的な赤紫色の発色が認められた場合を陽性とした。

## 結 果

### 1 TYLCV粒子の精製および抗血清の作製

しょ糖密度勾配遠心後の分画試料4, 5および6にTYLCVと思われるジェミニウイルス特有の形状を有した粒子が多数観察された（第1図）。さらに各分画試料をウェスタンブロッティング法で分析したところ、分画4から6にSDS-PAGEの泳動像で認められる分子量約30kの位置にTYLCVの外被タンパク質の存在を示す強い発色が認められた（第2図）。以上の結果から、分画4, 5および6に含まれる粒子をTYLCV粒子と判断し、これらの分画を集めたものを純化ウイ

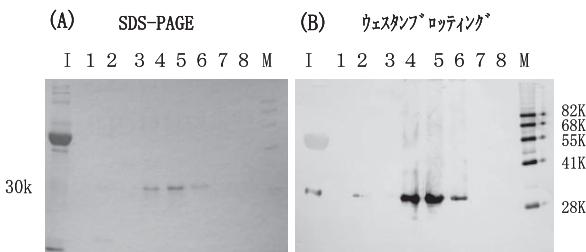


第1図 純化したTYLCV粒子 (15万倍)

ルス標品とした。純化したウイルス粒子を抗原として家兔を免疫して得られた抗血清を希釀してウェスタンプロッティング法により力価を調べたところ、罹病葉磨碎液では500倍希釀、純化ウイルス 100pgでは、500倍および1,000倍希釀でTYLCVを検出できた（第3図）。

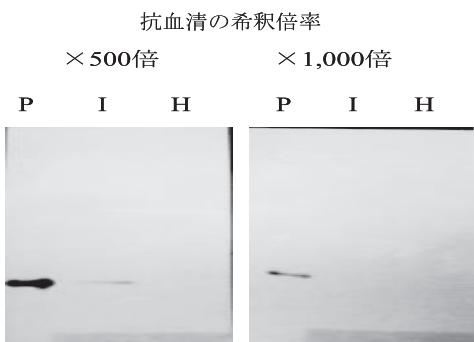
## 2 DAS-ELISA法による血清学的検定

作製した抗血清から精製したIgGを用いて、DAS-ELISAによる罹病トマト葉からのTYLCVの検出法を確立するため、コーティング用IgGおよびコンジュゲート希釀倍率の至適条件を検討した。その結果、TYLCV福岡株の罹病葉から、コーティング用IgGおよびコンジュゲートがそれぞれ $0.5\text{ }\mu\text{g}$ および2,000倍と最も希釀倍率の高い組み合わせの場合でも、健全葉と比較して5倍以上の吸光度が検出された（第4図）。本結果に基づいて、異なる系統に属するTYLCV静岡株やトマト以外の宿主植物であるチョウセンアサガオおよびペチュニアの罹病葉からの検出を試みたところ、いずれも特異的検出が可能であった（第1表および第2表）。以上の結果からDAS-ELISA法では、コーティング用IgGを $0.5\text{ }\mu\text{g} / \text{ mL}$ 、コンジュゲートを2,000倍で使用するのが適当と考えられた。



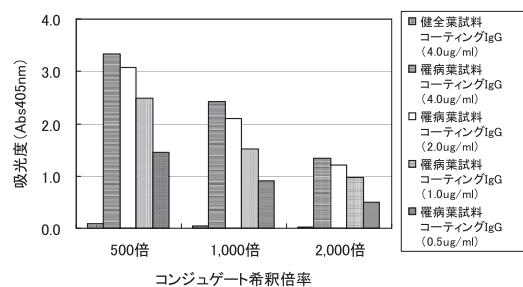
第2図 しょ糖密度勾配遠心分画のSDS-PAGE  
およびウェスタンプロッティング

レーンI：罹病トマト葉粗汁液、1～8：各遠心分画試料  
M：分子量マーカー



第1図 ウェスタンプロッティングによる  
力価の解析

レーンP；精製したTYLCV (100pg/ウェル)  
レーンI；罹病トマト葉粗汁液  
レーンH；健全トマト葉粗汁液



第4図 DAS-ELISAによる罹病トマト葉からの検出

第1表 DAS-ELISAによる異なる系統に属する  
TYLCV検出

供試株	吸光度 (Abs405)	
	発病葉区	健全葉区
<b>イスラエル・マイルド系統</b>		
静岡株	1.17	0.14
<b>イスラエル系統</b>		
熊本株	1.35	0.14
福岡株	1.35	0.14

1)吸光度は3反復の平均

2)コーティング :  $1.0\text{ }\mu\text{g} / \text{ mL}$

コンジュゲート : 2,000倍希釀

第2表 トマト以外の罹病宿主植物からのDAS-ELISA  
によるTYLCVの検出

	吸光度 (Abs405)	
	発病葉区	健全葉区
チョウセンアサガオ	1.73	0.09
ペチュニア	1.93	0.09

1)吸光度は3反復の平均

2)コーティング :  $1.0\text{ }\mu\text{g} / \text{ mL}$

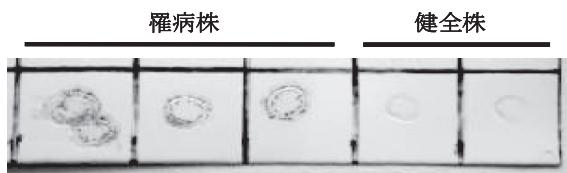
コンジュゲート : 2,000倍希釀

## 3 TPI法による血清学的検定

TPI法を利用したTYLCV福岡株の罹病苗からの検出結果を第5図に示した。罹病苗の生長点付近の複葉葉柄の茎部では、全てのTissue Print部位に発色が検出された。特に茎部の師管部にあたる部位に点状の強い発色が認められ、健全株ではこのような点状の発色は全く認められなかった。これに対して罹病小葉を試料とした場合、検出用メンブレンシートに植物由来の色素が沈着し褐変したため、発色の識別が難しかった（データ略）。

## 考 察

わが国で初めて精製した純化TYLCV粒子を用いてTYLCV福岡株に対する抗血清を作製するとともに黄化葉巻病の血清学的検定法について検討した。その結果、作製した抗血清由来のIgG（抗体）によるELISA法では、上田らの作製した抗体に関する報告（上田ら 2003）を元に比較した場合、クロロホルムによる特別な試料処理を必要とせず、同等の希釀倍率条件下で5倍を超える吸光度であった。このことから、本抗体は十分に高い力価を有するものと考えられた。また、



第5図 TPIによる罹病トマト株からのTYLCV検出

注) 1 試料はトマト成長点付近の複葉葉柄の茎部

本抗体はTYLCV福岡株の罹病トマト葉ばかりでなく、異なる系統に属するTYLCV静岡株の罹病葉からも特異的検出が可能であった。従って、本抗血清はわが国で発生している2種類の系統に属するTYLCVのDAS-ELISAによる診断に利用できることが明らかとなつた。さらに、本抗体はトマト以外の宿主植物であるチョウセンアサガオおよびペチュニアの罹病葉からもTYLCVを特異的に検出できたことから、他の宿主植物(Moriones and Navas-Castillo 2000)の黄化葉巻病診断にも広く利用できる可能性が推測された。今後、供試したチョウセンアサガオおよびペチュニア以外のトルコギキョウなどの宿主植物やピーマンなど病徴を示さない不顯性感染する宿主についても本法が適用できるか検討を要する。

植物ウイルス病の診断においてDAS-ELISA法は最も一般的に利用されている手法である。しかし、大量の検定試料を同時に処理する場合や各段階での操作の煩雑さなどの点でやや操作性に劣る。これらの短所を解決するために、DAS-ELISAよりも操作性に優れたTPI法が適用できないか検討した。その結果、TYLCV福岡株の罹病トマト株の若い小葉からの検出は難しかったが、若い葉柄茎部からはTYLCVを特異的に検出することができた。罹病株の葉柄茎部の場合、検出用メンブレンシート上のtissue-プリントされた師管部断面部位に点状の極めて強い発色が認められた。TYLCVは、宿主植物の師管部組織の細胞核に局在していることが知られており(Lousoniら1995)，検出用メンブレンシート上の師部組織に相当する部位の強い点状のシグナルは、局在するTYLCVを検出したものと考えられ、診断の際の目安となると考えられた。以上のことから、TPI法は黄化葉巻病の簡易診断技術として利用できることが確認された。本法はELISA法と比較して磨碎試料液の調整が不要な点で極めて簡易な検出法であり、検体当たりのコストも同等である。そのため大量検体の診断に有効な手法である。また、特別で高価な機材が不要で手法の習得も容易であることから、普及指導センターなどへの普及も可能と考えられる。

現在、抗血清を利用した最も簡易かつ迅速な診断法として迅速免疫ろ紙検定法(RIPA法)が、さまざまな植物ウイルスを対象に開発されている。今後、罹病株の早期発見、除去のために、本試験で作製した抗血清がRIPA法に適用できるか検討することが望まれる。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、抗血清の作製に必要な純化ウイルスの材料の罹病トマト株を大量に分譲頂いた長崎県総合農林試験場病害虫科ならびに熊本県農業研究センターの病害虫研究室の皆様方に厚くお礼申し上げる。

## 引用文献

- Clark M F, Adams A N(1977) Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay of the detection of plant virus-es. J. Gen. Virol. 34:475-483.
- 本多健一郎 (2005) トマト黄化葉巻病と媒介コナジラミをめぐる最近の研究情勢.植物防疫59 (7) : 1-6.
- Lin N S, Hsu Y H, Hsu H T(1990) Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopath. 80:824- 828.
- Lousoni E, Milne R G, Vecchiati M(1995) Purification of tomato yellow leaf curl geminivirus. Microbiologica. 18:253- 260.
- Moriones E, Navas-Castillo J(2000) Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Res. 71:123- 134.
- 大貫正俊・花田 薫 (2000) Print-capture PCR (P-PCR) 法によるジェミニウイルス保毒虫の簡易検定. 九病虫研会報46 : 54 - 57.
- 嶽本弘之・石井貴明 (2005) トマト黄化葉巻病と媒介虫の防除.農耕と園芸60 (5) : 58 - 61.
- 上田重文・石井貴明・花田 薫・岩波徹 (2003) 大腸菌 発現タンパク質抗血清を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出.九病虫研会報49 : 41 - 44.
- Ueda S, Kimura T, Onuki M, Hanada K, Iwanami T(2004) Three distinct groups of isolates of Tomato yellow leaf curl virus in Japan and construction of an infectious clone. J. Gen. Plant Pathol.70: 232-238.
- 上田重文 (2008) トマト黄化葉巻病の流行と予防. 植物 防疫62 (8) : 10 - 13.