

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

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	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
発行元	日本植物病理學會
巻/号	65巻4号
掲載ページ	p. 494-497
発行年月	1999年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



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

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*

Mitsuro KAMEYA-IWAKI*, Kazuhiko YAMAGUCHI*, Tomoko HARA*, Shin-ichi ITO*,
Shin-ichi FUJI**, Hiroshi KAJIHARA*** and Shuhei TANAKA*: Detection of Japanese
Yam Mosaic Virus from Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb. cv. ichoimo)
by Immunocapture PCR and Differentiation of Virulent and Attenuated
Isolates by PCR-RFLP Analysis

Abstract

Detection of Japanese yam mosaic potyvirus (JYMV) in Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb. cv. ichoimo) by the immunocapture polymerase chain reaction (IC-PCR) and differentiation of virulent and attenuated isolates using restriction fragment length polymorphism (RFLP) of IC-PCR products using *Tsp* 509 I were investigated. JYMV was detected by IC-PCR from diseased leaves, bulbils, tubers or diseased leaves frozen at -40°C for 6 months with a sensitivity of 10^8 , 10^5 , 10^6 and 10^7 -fold dilutions, respectively. The sensitivity of IC-PCR for the detection of JYMV from diseased leaves was about 8000-fold over ELISA and 10,000-fold over RT-PCR. PCR-RFLP revealed different banding patterns for the virulent and attenuated isolates of JYMV. This will be useful for distinguishing virulent and attenuated isolates from Chinese yam (cv. ichoimo).

Key words: Japanese yam mosaic virus, virulent and attenuated isolates, Chinese yam (cv. ichoimo), IC-PCR, PCR-RFLP.

わが国のヤマノイモ類にはヤマノイモモザイクウイルス (Japanese yam mosaic virus, JYMV)^{1,3,4,6)}, ヤマノイモえそモザイクウイルス (Chinese yam necrotic mosaic virus)⁵⁾, ソラマメウルトウイルス (Broad bean wilt virus)⁶⁾ の発生が知られている。山口県においてはヤマノイモの一種であるイチョウイモが栽培されているが, JYMV によるモザイク病が広く発生しており, 生産が抑えられている。この被害を回避するためウイルスフリー株が育成され, 普及されている。しかし, このウイルスフリー株は圃場において短期間にウイルスに再汚染し, 被害を生じるため, ウイルスフリー株の特性を長期間持続させるために, 弱毒ウイルスを接種したいもの栽培も進められている。

このようなウイルスフリー株や弱毒ウイルスの検定はこれまで酵素結合抗体法 (ELISA) により行われてきた⁷⁾。しかし, この ELISA による JYMV の検出感度は高いとはいえず, 近年ウイロイドやウイルスの検出に利用されている

逆転写 PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR) の適用も検討したが, その検出感度は後に述べるように ELISA より劣っていた。

そこで, 検出感度がより高いとされているイミュノキャプチャー PCR (IC-PCR)¹⁰⁾ を試みたところ, 極めて高感度に検出でき, また, この PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism, 制限酵素断片長多型性) において, 山口県産イチョウイモに発生している JYMV の強毒株と弱毒株でパターンが異なり, これらの判別に利用できる可能性が示された。

本試験の供試材料としては山口県産の明瞭なモザイク病徴を生じているイチョウイモ (強毒株, Y1) と山口県で選抜された弱毒株 (T3) を用いた。

IC-PCR は Rowhani *et al.*⁹⁾ の方法に準じて行った。RT-PCR に用いたプライマーは JYMV の外被タンパク質のコア領域 241 bp を増幅可能なプライマー C2 (5'-GTGGCA-TGTACGCTCTTTCTTG-3')²⁾ および S2 (5'-CTAGAT-

* 山口大学農学部 Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

** 愛知県農業総合試験場 Aichi-Prefectural Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi 480-1193, Japan

*** 山口県農業試験場 Yamaguchi Prefecture Agricultural Experiment Station, Ouchimihori, Yamaguchi 753-0214, Japan

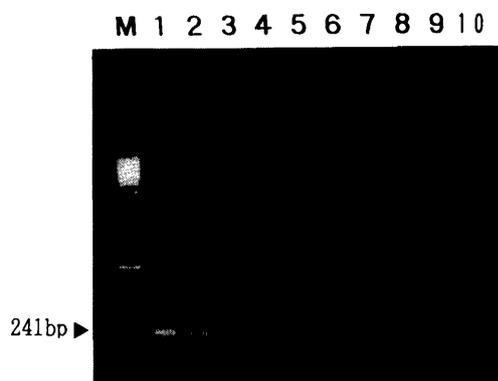


Fig. 1. Detection of JYMV from diseased leaves of Chinese yam (cv. ichoimo) showing severe mosaic symptoms using IC-PCR. Disease leaves were ground and diluted with extraction buffer (0.2M citrate buffer, 0.01M Na-Dieca, 0.005M 2Na-EDTA, 0.1% 2-ME, 0.4% L-ascorbic acid, 2% PVP, pH 5.8). M: marker, lane 1: 20 and lanes 2-10: 10^2 - 10^{10} -fold dilutions.

GACAGTTCGACAAA-3')²⁾ を使用した。

RNA の抽出 0.5 ml チューブに carbonate buffer (1.59 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 /l, pH 9.6) で希釈した 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウイルス抗体 (IgG)⁷⁾ を 50 μl 入れ、37°C に 2 時間置き、その後、PBS-T (0.02 M PB, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN_3 , 0.05% Tween 20, pH 7.4) で 3 回洗浄した。植物組織を乳鉢と乳棒を用いて、サンプル量の 20 倍量 (v/w) の抽出用 buffer (0.2 M citrate buffer, 0.01 M Na-DIECA, 0.005 M 2 Na-EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol (2-ME), 0.4% L-ascorbic acid, 2% polyvinylpyrrolidone (PVP), pH 5.8) を入れ、磨砕し、同じ buffer で希釈し、それぞれ 50 μl をチューブに入れた。4°C で 1 夜静置した後、PBS-T で 3 回洗浄し、50 μl の滅菌水を入れ、80°C で 5 分間処理し、ただちに氷上に 2 分間置いた。

cDNA の合成 RTG You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech 社) の入ったチューブに抽出 RNA 液 32 μl と 20 μM プライマー C 2 1 μl を加え、室温に 1 分間置いた後、37°C で 60 分間処理した。

PCR cDNA 液に 20 μM プライマー S 2 1 μl , 65 μl 滅菌水, 2.5 ユニット AmpliTaq DNA polymerase (PE Applied Biosystems 社) を入れた後、ミネラルオイル 1 滴を加え、Thermalcycler (ASTEPC PC-700) を用いて、92°C 3 分 1 回, 92°C 1 分・57°C 1 分・72°C 1 分 35 回, 72°C 5 分 1 回の条件で PCR を行った。

電気泳動 PCR 産物に GLB (ゲルローディング緩衝液: 0.25% bromophenol blue, 50% glycerol) 3 μl を加え、その 10 μl を 1.5% アガロースゲルを用いて、50 V でゲルの 2/3 程度まで泳動した。その後、ゲルを 0.1% エチジウムブロマイド溶液で 15 分間染色し、水で洗浄し、241 bp のバンドの検出を行った。

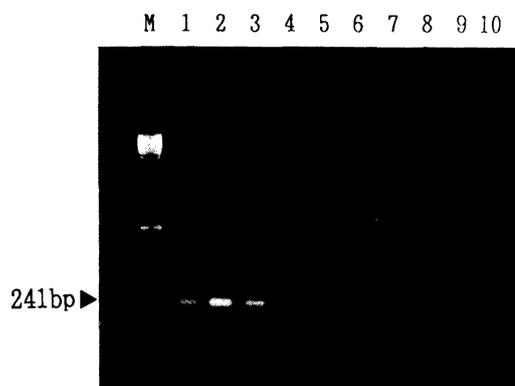


Fig. 2. Detection of JYMV from frozen diseased leaves using IC-PCR. Frozen diseased leaves were ground and diluted with extraction buffer as in Fig. 1. M: marker, lane 1: 20 and lanes 2-10: 10^2 - 10^{10} -fold dilutions.

Y 1 を含め山口県内の産地で採集した病株および弱毒株 (T 3) について試験したところ、いずれからも 241 bp のバンドが検出された (結果は省略)。

そこで、モザイク症状を示す強毒株 (Y 1) についてその検出限界を調べるため、100 mg の病葉に 2 ml の抽出用 buffer を加えて磨砕し、20 倍液とし、それを同 buffer で希釈して 10^2 ~ 10^{10} 倍液を調製し、IC-PCR を行った。その結果、 10^8 倍希釈まで検出可能であった (Fig. 1)。同じくむかごといもについて試験したところ、それぞれ 10^5 と 10^6 倍希釈まで検出できた。また、凍結葉について試験したところ、試験した -40°C での凍結期間 6 か月の場合、 10^7 倍希釈まで検出できた (Fig. 2)。

一方、Y 1 の病葉について、ELISA (200 倍液を 4 倍段階希釈) と RT-PCR (40 倍液を 4 倍段階希釈) を行ったところ、検出限界はそれぞれ 12,800 倍と 10,240 倍であった。

これらの結果、JYMV の検出において、IC-PCR は ELISA より約 8000 倍、RT-PCR より 10,000 倍検出感度が高いことが示された。また、ELISA において検出が難しいとされている凍結葉からの検出も可能であり、IC-PCR は JYMV の有用な検出法といえる。

次に、弱毒ウイルスを利用した防除試験において、強毒株と弱毒株を判別する方法は主に病徴の発現の有無によっているが、強毒株の感染の判定に長い期間を必要とする。そこで、PCR-RFLP による判別ができないかどうか検討した。

PCR 産物 (241 bp DNA) を QIAquickPCR 精製キット (QIAGEN 社) で精製したのち、JYMV の愛知株のシーケンズ⁸⁾ をもとに利用可能と考えられた 4 種類の制限酵素 (*Fok* I, *Mbo* II, *Sau* 3 AI, および *Tsp* 509 I) で消化した。消化物のバンドパターンを、4% メタファーアガロースゲル電気泳動 (FMC Bioproduct 社) で確認した。この結果、*Tsp* 509 I を用いた PCR-RFLP において、強毒株と弱毒株

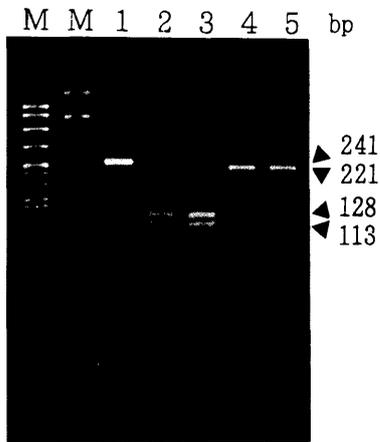


Fig. 3. Comparison of virulent and attenuated isolates of JYMV in Chinese yam (cv. ichoimo) by RFLP using *Tsp* 509 I of IC-PCR products. M: marker, lane 1: 241 bp, lanes 2, 3: virulent Yamaguchi isolate (Y1), lanes 4, 5: attenuated isolate (T3).

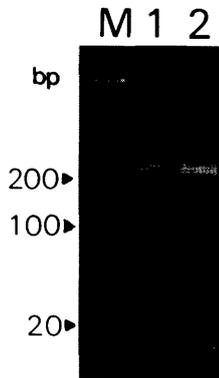


Fig. 4. Eelectrophoretic analysis of *Tsp* 509 I fragments of the 241 bp DNA from JYMV attenuated isolate (T3). M: marker, lane 1: 241 bp, lane 2: attenuated isolate (T3).

のバンドパターンに大きな差異が認められた。すなわち、メタファーアガロースゲル電気泳動において、強毒株では *Tsp* 509 I によって 128 bp と 113 bp 付近に 2 本のバンドが、弱毒株では 221 bp と不明瞭ではあるが 20 bp 付近の 2 本のバンドが生じた (Fig. 3)。弱毒株の 20 bp のバンドが不鮮明であったため、多量のサンプルを用いて電気泳動を行ったところ、20 bp 付近のバンドが確認された (Fig. 4)。なお、他の 3 種類の酵素を用いた PCR-RFLP では強毒株と弱毒株との間でバンドパターンに差異は見られなかった。

Tsp 509 I の認識部位が強毒株と弱毒株との間で異なることが示唆されたので、両者の 241 bp DNA を pT 7 Blue (R) ベクター (Novagen 社) にクローン化し塩基配列を調べた。シーケンシング反応には Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems 社) を用い、塩基配列の決定には自動シーケンサー

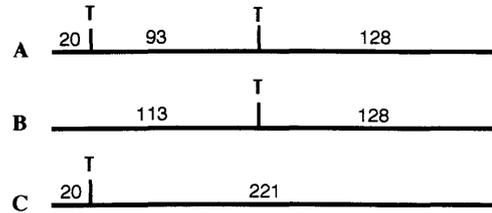


Fig. 5. Positions of *Tsp* 509 I-recognition sites in the 241 bp DNA sequences of IC-PCR products of JYMV. A: virulent Aichi isolate (data from Fuji and Nakamae¹⁾), B: virulent Yamaguchi isolate (Y1), C: attenuated isolate (T3).

(ABI PRISM 377) を使用した。その結果、*Tsp* 509 I 認識部位 (AATT) が両者で異なっており、既報の愛知株とも一部異なっていた (Fig. 5)。この結果は、PCR-RFLP のバンドサイズ (Fig. 3, 4) と一致した。なお、PCR-RFLP のパターンに差異が見られなかった 3 つの酵素の認識部位は強毒株と弱毒株で共通していた。

これらの制限酵素の認識部位の差異が病原性の強弱と関連しているかどうかは不明であるが、この方法を用いることにより、山口県のイチョウイモに発生する JYMV の強毒株と弱毒株の判別が可能となり、弱毒株接種植物への強毒株の感染の有無、植えつけ前のいもにおける弱毒株の検定などに有用と思われる。なお、山口県の産地で採集したイチョウイモの発病株 24 個体について PCR-RFLP を試みたところ、山口株 (Y1) と同じ *Tsp* 509 I 認識部位をもつ株が 18 個体から、また愛知株と同じ認識部位をもつ強毒株が 7 個体から検出され (1 個体からは重複検出)、これらはいずれも RFLP パターンから弱毒株 (T3) とは明確に区別できた。しかしながら、山口県で発生している JYMV 強毒株の中に弱毒株と同じ *Tsp* 509 I 認識部位をもつ株がないかどうかを明らかにするためには、今後さらに多くの発病個体について PCR-RFLP を行う必要がある。

引用文献

1. Fuji, S. and Nakamae, H. (1999). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a Japanese yam mosaic virus, a new potyvirus in Japan. Arch. Virol. 144: 231-240.
2. 藤 晋一・中前 均 (1999). ヤマノイモモザイクウイルスの ELISA と RT-PCR 法による検出. 日植病報 65: 207-210.
3. 藤 晋一・辻 孝子・岩田久史 (1995). 愛知県のジネンジョから分離されたヤマノイモモザイクウイルスの諸特性. 愛知農総試研報 27: 139-143.
4. 藤田 隆・佐山 玲 (1987). ヤマノイモ類 (*Dioscorea* spp.) のウイルス病に関する研究 (4) ヤマノイモモザイクウイルス (YMV) の純化について. 日植病報 53: 91 (講要).
5. 福本文良・栃原比呂志 (1978). ヤマノイモモザイクウイルス. 日植病報 44: 1-5.
6. 石川 亮・難波成任・山下修一・土居養二 (1985). ソラ

- マメウルトウイルスの純化と理化学的性状について. 日植病報 51: 352 (講要).
7. 村本和之・井上 興・亀谷満朗・宮川久義 (1995). ELISAによるヤマノイモモザイクウイルスの検出. 山口農試研報 46: 92-97.
 8. 奥山 哲・坂ひとみ (1978). ヤマノイモモザイクウイルス. 茨大農学術報告 26: 29-34.
 9. Rowhani, A., Maningas, M.A., Lie, L.S., Daubert, S.D. and Golino, D.A. (1995). Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85: 347-352.
 10. Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Meth.* 39: 27-37.
(平成 11 年 1 月 14 日受付; 平成 11 年 5 月 17 日受理)