RT-PCRによるAllium virus Xの検出方法の開発

誌名	植物防疫所調査研究報告
ISSN	03870707
著者名	勝,幸司 上田,幸史 坂田,博貴
発行元	横浜植物防疫所
巻/号	51号
巻号補足	
掲載ページ	p. 33-36
発行年月	2015年3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

AgriKnowledge

植物防疫所調査研究報告（植防研報）
第51号：33～36　　平成27年(2015)

短　　報

RT-PCRによるAllium virus Xの検出方法の開発

勝　幸司・上田　幸史[1)]・坂田　博貴[1)]

横浜植物防疫所

Development of detection methods for Allium virus X using RT-PCR. Koji Katsu, Koshi Ueda[1)] and Hirotaka Sakata[1)] (Tsukuba Center, Yokohama Plant Protection Station, 1-7 Nagamine, Tsukuba, Ibaraki, 305-0052, Japan. Narita Substation, Yokohama Plant Protection Station, Tennamino 2159, Komaino, Narita, Chiba 282-0021, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **51**: 33-36 (2015).

Abstract: During viral disease surveys of ornamental Allium bulbs from Holland at post-entry plant quarantine facilities in Japan in 2009 and 2010, leaf symptoms showing yellow or chlorotic streaks were observed on some Allium plants. On the basis of results of the diagnosis including the screening of virus genus by TEM, RT-PCR method employing universal primers for *Potexvirus* and sequence comparisons of its amplicons and so on, the presence of Allium Virus X (AlVX; Genus *Potexvirus*, Family *Alphaflexiviridae*) which is not known to occur in Japan was verified. However, except for Miglino *et al.* 2006 and Miglino *et al.* 2011, there are almost no reports of AlVX to our knowledge. Therefore, possible options for diagnostic methods for AlVX (use of newly designed species-specific primer sets) were studied. Results showed that the RT-PCR method using the species-specific primer set "AlVX6726(+)/AlVX7017(-)" newly designed in this study is simple, low cost and can detect AlVX with higher sensitivity.

Key words: Allium Virus X, AlVX, RT-PCR, specific primer

緒　　言

海外産花き球根に感染するウイルスの基礎資料を得るため、2009～2010年(平成21～22年)度に我が国の隔離ほ場施設においてオランダ産アリウム(*Allium* spp.)球根のウイルス病の調査を実施したところ、3～4月頃、葉に黄色条斑症状や退緑条斑症状等を呈する株を認めた。

これらの症状が確認された株の一部について、感染するウイルスを調査した結果、本邦未報告のAllium virus X(以下「AlVX」)に感染していることを確認した。

AlVXは*Alphaflexiviridae*科*Potexvirus*属に分類されるひも状の1本鎖RNAウイルスで(Miglino *et al.*, 2006)、オランダにおいては、黄色条斑又はモットル症状を呈する*Allium*属球根から発見された記録(Miglino *et al.*, 2006)があるが、それ以降の報告はされておらず、検定植物や遺伝子診断に用いる種特異的プライマー等については報告されていない。

このため、本ウイルスを検出するには、Miglino *et al.* (2006)が報告した*Potexvirus*属ウイルスを広く検出可能なユニバーサルプライマーを用いたRT-PCR法で増幅した後、PCR産物のシークエンス解析を行う必要があり、より簡便で高感度に、かつ、種特異的にAlVXを検出する手法が求められる。

このことから、植物検疫現場へのユニバーサルプライマーによらないRT-PCR法の導入について検討したので、報告する。

材料及び方法

1. 供試試料

葉に黄色条斑または退緑条斑症状を呈したオランダ産アリウム属植物10株（品種：Gladiator、Violet beauty)を供試した。

[1)] 横浜植物防疫所業務部生物検定担当(つくばほ場)
[2)] 現　横浜植物防疫所成田支所

2. ウイルス粒子の確認、RT-PCR及び塩基配列解析

ウイルス粒子の確認は、2%リンタングステン酸(PTA)でダイレクトネガティブ染色して電子顕微鏡観察を行った。

塩基配列の解析は次のとおりに行った。RNAの抽出はアリウムの生葉(50mg)より、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN社)を用い、キット付属のマニュアルに従って行った。属特異的プライマーを用いたRT-PCRは、Reverse Transcriptase (M-MLV, RNaseH+)(和光純薬工業株式会社)を用いて逆転写(以下「RT」)した後、TaKaRa Ex Taq(タカラバイオ株式会社)及び*Potexvirus*属ウイルスを検出するユニバーサルプライマーPotex4/Potex5 (Miglino *et al.*, 2006; 以下「Potex4/5」)を用いてPCRを行った。また、外被タンパク質(以下「CP」)領域のRT-PCRについてはRNA抽出液をDynabeads mRNA Purification Kit (Invitrogen社)を用い精製した後、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ株式会社)を用いてRTを行い、CP領域の全長を増幅するプライマーAlVX-F1 (5' - AGTCGTCGCCCATCTCAA -3') 及びAlVX-R1 (5' - TGCATATAGGTAGTCAGGCTTCG -3')を既知の塩基配列情報から新たに設計しPCRを行った。

得られたPCR産物についてはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems社)を用いてGenetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems社)にて塩基配列の解析を行い、得られた塩基配列データについてはNCBIのウェブサイトでBLAST(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)を行い、相同性の高いウイルスを検索した。

3. AlVXを特異的に検出するプライマーの設計及び検証

(1) AlVX特異的に検出するプライマーセットの設計

AlVXに感染していたアリウム属植物10株(品種:'Gladiator' B-10、1-B、2-B、3-B、35-B、75-C、87-C、96-C及び'Violet beauty' 20-F、41-G)から得られたCP領域の塩基配列データから、コンセンサス配列を作成し、その配列を基に種特異的プライマーセットAlVX6726 (+)/AlVX7017 (-)を新規に設計した(Fig. 1., Table 1)。

(2) プライマーの特異性及び検出感度の検証

プライマーセットAlVX6726 (+)/AlVX7017 (-)の種特異性を確認するため、AlVX株に加え、*Potexvirus*属の5種のウイルス(*Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV)、*Potato virus X* (PVX)、*Nerine virus X* (NVX)、*Asparagus virus*

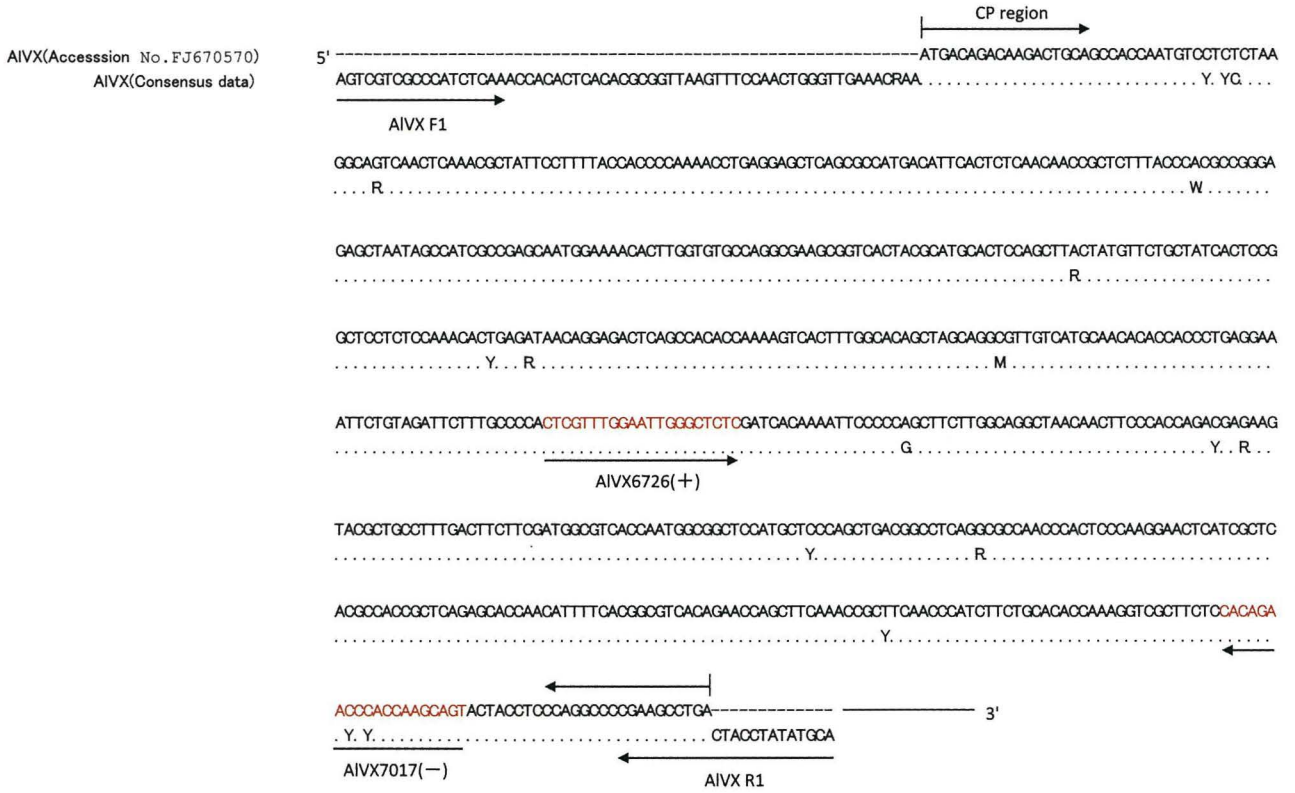

Fig. 1. Species-specific primer; AlVX6726(+)/AlVX7017(-) primer design domain

Table 1. The base sequence of the AlVX6726(+)/AlVX7017(-) primer

Primer	The base sequence	Amolification size (bp)
AlVX6726(+)	5'-CTCGTTTGGAATTGGGCTCTC-3'	292
AlVX7017(-)	5'-ACTGCTTGGTGGGTTCTGTG-3'	

3（AV3）及び*Narcisuss mosaic virus*（NMV））を供試し、RT-PCRを行った。

次に、種特異的プライマー（AlVX6726（+）/AlVX7017（-））とユニバーサルプライマー（Potex4/5）との検出感度を比較するため、AlVXに感染したアリウム植物体から抽出したRNA溶液をMilliQ水で2×10^0, 2×10^1, …, 2×10^6に段階希釈し、これを用いてRT-PCRを行った。

RT-PCRは、OneStep RT-PCR Kit（QIAGEN社）を用い、Table 2の組成で反応液を調製し、Veriti® 200（Applied Biosystems社）（以下のRT-PCR法も同様）にて増幅を行った。

結　果

1. ウイルス粒子の確認及び塩基配列解析の実施

黄色条斑症状を示したGladiator B-10株(Fig. 2. ①)の電子顕微鏡観察の結果、長さ約480-550nmの*Potexvirus*属ウイルスと考えられるひも状粒子を確認した(Fig. 2. ②)。

また、*Potexvirus*属のユニバーサルプライマーを用いたRT-PCRを行った結果、目的のサイズの増幅産物(約280bp)が得られ(Fig. 2: ③)、その産物のダイレクトシークエンス解析で得られた塩基配列について相同性検索を行った結果、AlVXの塩基配列(Accession No. FJ670570)と99%の高い相同性を示した。

さらに、全CP領域（約753bp)の塩基配列解析を実施し、データベース上のAlVX(Accession No. FJ670570)の塩基配列及びアミノ酸配列と比較したところ、それぞれ99%の高い相同性があった。

Table 2. Reaction liquid composition of OneStep RT-PCR

Master mix	Volume (μl)
RNase-free water	9
5×QIAGEN One Step RT-PCR Buffer	5
dNTP Mix(containing 10mM of each dNTP)	1
AlVX6726 forward primer(25μM)	1
AlVX7017 reverse primer(25μM)	1
Q solution	5
QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix	1
Template RNA	2
Total	25

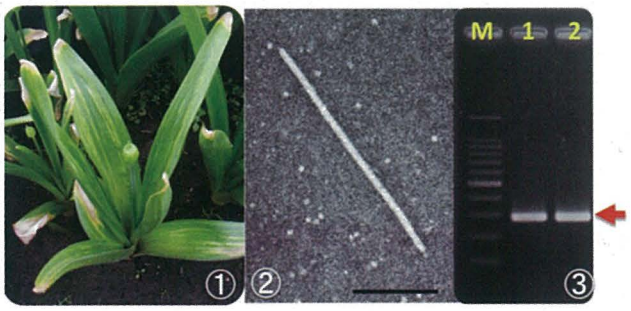

Fig. 2. Condition of the plant with which AlVX was infected, the viral particle of AlVX and amplification product acquired by PCR.

①:Condition of Gladiator by which infection of AlVX was checked. Yellow streak was observed in the leaf. condition. ②: The string-like particles observed by the electron microscope. (A bar shows the length of 200 nm.) ③: The electrophoresis photograph of the amplification product acquired by PCR. (An arrow shows the band size of about 280 bp.) Lanel, 2: Gladiator B-10, M: 100bp Ladder Marker

2. 遺伝子診断法(RT-PCR法)の確立

本研究でAlVXを特異的に検出することを目的に新規設計したプライマーセットAlVX6726（+）/AlVX7017（-）を用いて、AlVXを含む*Potexvirus*属の6種のウイルスについてRT-PCRを行ったところ、AlVXのみ想定サイズである約292bpのDNA

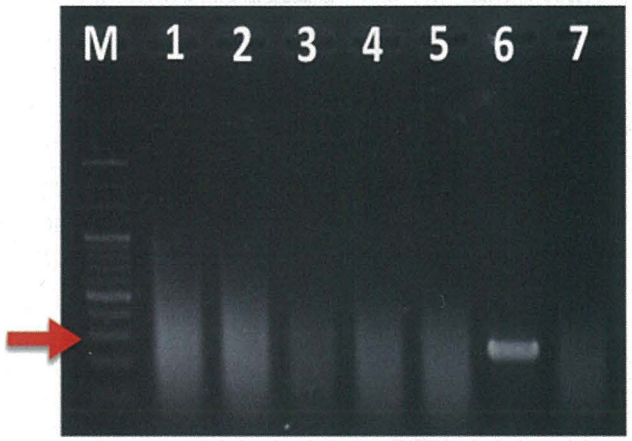

Fig. 3. AlVX6726(+)/AlVX7017(-) primer specificity study

M: 100bp ladder Marker (An arrow shows the band size of about 300 bp.)
Lane 1: PlAMV, Lane 2: PVX, Lane 3: NVX, Lane 4: AV3, Lane 5: NMV, Lane 6: positive control: Gladiator 35-B, Lane7: negative control: Purple sensation 74-F

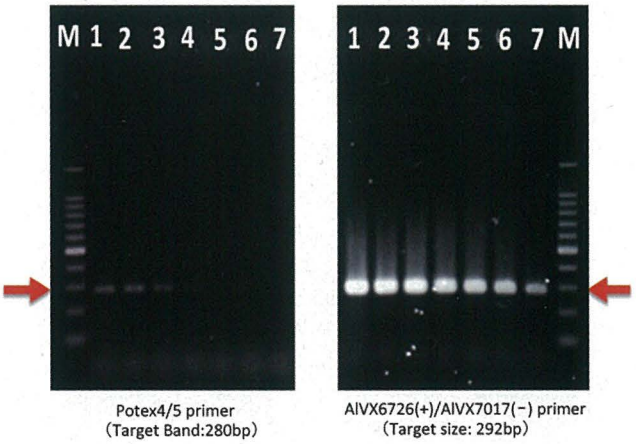

Fig. 4. Detection sensitivity controlled study of Potex4/5 primer and AlVX6726(+)/AlVX7017(-) primer under test: Violet beauty 20-F plant

M: 100bp ladder Marker (An arrow shows the band size of about 300 bp.)
Dilution magnification: Lane 1: 2, Lane 2: 2×10, Lane 3: 2×10^2, Lane 4: 2×10^3, Lane 5: 2×10^4, Lane 6: 2×10^5, Lane 7: 2×10^6
Left photograph: Potex4/5 primer ,right photograph: AlVX6726(+)/AlVX7017(-) primer

断片が増幅され、他の*Potexvirus*属の5種のウイルスについては全て陰性となった(Fig. 3.)。

また、本プライマーを用いてAlVXを検出する最適な反応条件を検討したところ、OneStep RT-PCRでは、50℃30分、95℃15分、(94℃30秒、63℃30秒、72℃45秒)を35サイクル、72℃10分、4℃∞の条件で行うことが最適であった。

さらに、ユニバーサルプライマーとの検出感度を比較したところ、本研究で開発したプライマーセットAlVX6726 (+)/AlVX7017 (-)の方が10,000倍以上高かった(Fig. 4.)。

考　察

本調査で観賞用のアリウム球根から検出されたウイルスは、塩基配列の解析結果から、AlVXであることが判明した。

AlVXが検出されたアリウム株は、黄色や退緑の条斑等の症状を呈していたが、アリウム属植物には多くのウイルスが感染し、条斑等の症状を呈する(Miglino *et al.*, 2011)ことから、病徴による診断は難しく、また、利用可能な抗血清もないことから、遺伝子診断を行う必要があった。しかし、これまでAlVXを特異的に検出する方法についての報告はなかった。

このため、本ウイルスを検出するには、*Potexvirus*属ウイルスを広く検出可能なユニバーサルプライマーを用いたPCRで検出した後、シーケンサーを用いて塩基配列を解析する必要があったが、検査時間と費用を要するのに加え、検出感度も高くないといった問題があった。

一方、本研究において開発したAlVXを特異的に検出可能なプライマーセットを用いることで、シーケンサー等の特別な機器も必要とせず、短時間・低コストで、既存のプライマーを用いた診断よりも高感度に診断を行うことが可能となった。

これらのことから、本研究で開発したRT-PCRによる診断法は、今後隔離検査等における本ウイルスの検出・同定に有効な方法であることが示唆された。

引用文献

Miglino, R., A. Jodlowska, A. R. van Schadewijk (2006) Detection and Identification of a Novel Potexvirus Infecting Allium by Paramagnetic Beads ssRNA Isolation and One Tube RT-PCR Assay with a New Potexvirus Genus Primer Set. *Acta Hort* **722**: 285-292.

Miglino, R., K. L. Druffel, A. R. van Schadewijk, H. R. Pappu (2011) Molecular characterization of allium virus X, a new potexvirus in the family Alphaflexiviridae, infecting ornamental allium. *Arch Virol* **156**: 2113-2115.