ヤマノイモモザイクウイルスの ELISA と RT-PCR による検出

藤 晋一*・中前 均*

Shin-ichi FUJI* and Hitoshi NAKAMAE*: Detection of Japanese Yam Mosaic Virus by ELISA and RT-PCR

Abstract

Japanese yam mosaic virus was detected using ELISA and RT-PCR assays. In ELISA, Japanese (*Dioscorea japonica*) and Chinese yams (*D. opposita*) infected with JYMV reacted positively, but white yam (*D. alata*) infected with JYMV, Chinese yam infected with CYNMV and virus-free yam did not react. ELISA values differed among JYMV isolates. In RT-PCR, the PCR product was detected from all yams infected with JYMV, but not from yam infected with CYNMV and virus-free yam. These results suggest serological diversity among JYMV isolates.

Key words: Japanese yam mosaic virus (JYMV), virus strains, ELISA, RT-PCR.

日本のヤマノイモ (*Dioscorea*) に発生するウイルスとしてヤマノイモモザイクウイルス (Japanese yam mosaic virus: JYMV)^{3,4,9,10}, ヤマノイモえそモザイクウイルス (Chinese yam necrotic mosaic virus: CYNMV)⁶, ソラマメウィルトウイルス (broad bean wilt virus: BBWV)⁸ の3種が報告されている。JYMV はジネンジョ (*Dioscorea japonica*), イチョウイモ, ツクネイモ, ヤマトイモ等 (*Dioscorea opposita*), そしてダイジョ (*Dioscorea alata*) に感染し, 葉にモザイク症状を引き起こし, ヤマノイモの収量に大きな影響を与えるウイルスである。JYMV は Potyviridae に属するウイルスで, これまでアフリカをはじめとした諸外国で発生が認められている yam mosaic virus¹³ と同一種であるとされてきたが, 近年ジネンジョから分離されたウイルスの塩基配列の解析によって, 別種であることが提唱された²。JYMV による被害を回避する手段としてウイルスフリー苗の育成が行われている。ウイルスフリー苗の検定には, 酵素結合抗体法 (ELISA) が一般的に用いられている。しかしながら, ジネンジョに感染している JYMV は, 藤田ら⁵ の作製したヤマトイモから分離した JYMV に対する抗体 (Yamato V 抗体) と Western Blotting においては反応するが, 二重抗体 ELISA (DAS-ELISA) においてはほとんど反応しなかった³。このことから, JYMV 分離株によって DAS-ELISA における反応がしばしば異なることが示唆された。JYMV に対する抗体としては, 村本ら⁹ のイチョウイモから分離した JYMV に対する抗体 (Ichou V 抗体) と著者らのジネンジョから分離した JYMV に対する抗体 (JYMV 抗体)³ が作

製されている。

そこで, 本試験ではこれら3種の抗体と種々の JYMV に感染したヤマノイモ類との DAS-ELISA における反応性を比較した。また, 近年ウイルスの検定に用いられている Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法による JYMV の検出を試みた。

供試ウイルス株 本試験に供試した JYMV 感染ヤマノイモは, 栽培ほ場でモザイク症状を呈した株の種イモあるいは購入種イモ (Table 1) を使用した。対照としてウイルスフリーのジネンジョ (健全株) と CYNMV 感染ナガイモを供試した。供試ヤマノイモは温室内で栽培・維持した。

ELISA 検定 DAS-ELISA は Clark and Adams¹⁾ の方法に基づいて行った。供試した3種の抗体 (JYMV, YamatoV, IchouV) はそれぞれの指針^{3,5,9} に基づいて希釈して使用した。供試試料は20倍量の PBS-T で磨砕後, 12,000×g 5分間の遠心分離により得られた上清を使用し, 検定は2反復性で行った。その結果, 3種の抗体はともにモザイク症状を呈したジネンジョ, ヤマトイモ, イチョウイモ, ツクネイモ葉と反応した。しかしながら, No. 4 においては JYMV 抗体との反応が他の供試抗体に比べて弱く, No. 3 においてはいずれの抗体とも反応が弱かった。モザイク症状を呈したダイジョ, CYNMV 感染ナガイモおよびウイルスフリー株ではほとんど反応が認められなかった (Fig. 1)。この DAS-ELISA による結果が, ウイルス量による違いか, 供試株と抗体との間の血清学的な違いかについて検討するため, JYMV 抗体の作製に使用した No. 1 と JYMV 抗体との反応が弱かった No. 3, 4 およびダイジ

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

Table 1. Samples analysed in the experiment

Sample No.	Plant	Cultivar	Sample
1	<i>Dioscorea japonica</i>	Jinenjyo	Field ^{a)}
2	<i>Dioscorea japonica</i>	Jinenjyo	Field
3	<i>Dioscorea japonica</i>	Jinenjyo	Field
4	<i>Dioscorea japonica</i>	Jinenjyo	Field
5	<i>Dioscorea japonica</i>	Jinenjyo	Field
6	<i>Dioscorea opposita</i>	Yamatoimo	Market
7	<i>Dioscorea opposita</i>	Tsukuneimo	Market
8	<i>Dioscorea opposita</i>	Ichouimo	Market
9	<i>Dioscorea alata</i>	Daijyo	Market
10	<i>Dioscorea opposita</i>	Nagaimo	Market ^{b)}
11	<i>Dioscorea japonica</i>	Jinenjyo	Mericlone ^{c)}

a) Japanese yam 1²⁾.

b) CYNMV.

c) Virus-free.

Fig. 2. Reactivity of four purified yam virus isolates in DAS-ELISA using JYMV antibody.

Fig. 1. Reactivity of virus-infected yam plants in DAS-ELISA using polyclonal antibodies. Sample No. reference to Table 1.

ヨ株 (No. 9) についてウイルスを精製^{2,4)} し、精製ウイルスを用いて JYMV 抗体で DAS-ELISA を行った。その結果、ウイルス濃度を一定にしたにもかかわらず、No. 3 および 4 では反応が弱く、ダイジョ株ではほとんど反応が認められなかった (Fig. 2)。この結果から、DAS-ELISA における反応の違いは供試株における血清学的な違いによることが示唆された。

ヤマノイモからの全 RNA の抽出 RT-PCR を行うためのヤマノイモからの全 RNA の抽出は JYMV の精製法^{2,4)} と Guanidine Thiocyanate (GTC) 法⁷⁾ を組み合わせて行った。ヤマノイモ葉 0.2 g を 1200 µl のウイルス抽出緩衝液 (0.5 M K₂HPO₄, 0.01 M sodium diethyldithiocarbamate trihydrate, 0.2% ascorbic acid, 0.5% sodium thioglycolate, 10% polyvinylpyrrolidone K30) で磨砕した後、四塩化炭素および chloroform を 400 µl ずつ加えてさらに磨砕し、12,000×g 5 分間の遠心分離を行った。水層に 1/100 倍量の 1 M CaCl₂ と 1/20 倍量の 0.2 M Na₂HPO₄ を加え 1 分間攪拌した後、12,000×g 5 分間の遠心分離を行った。得られた上清は phenol/chloroform 抽

出 (3 回) 後、エタノール沈殿し、粗核酸を得た。得られた粗核酸は 400 µl の滅菌水 (DW) に溶解した後 100 µl の 10 M LiCl を加え、30 分間氷上にて静置した。12,000×g 20 分間の遠心分離により得られた沈殿は 70% ethanol で洗浄、減圧乾燥の後、100 µl の DW に懸濁し、RT-PCR に供する全 RNA 試料とした。

RT-PCR 検定 RT-PCR に供したプライマーは JYMV の外被タンパク質 (CP) のコア領域 241 bp を増幅可能なプライマー S2 および C2 を使用した (Fig. 3)。RT 反応は You-Primed First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて行い、PCR 反応には Taq DNA polymerase (Takara) を用いた。PCR の反応条件は Fig. 3 に示した。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromide 染色により増幅 cDNA 断片を検出した。PCR 産物はまた電気泳動後 nylon membrane (positively charged: Boehringer Mannheim) に転写し、プラスミド pY43 から PCR により増幅した JYMV の CP 遺伝子をプローブとして ECL (Amersham Pharmacia Biotech)-Southern hybridization を行った。まずはじめ

Fig. 3. Nucleotide sequence and localization of primers and RT-PCR condition.

Fig. 4. Electrophoretic analysis of the RT-PCR products and hybridization. a) RT-PCR, b) Hybridization, Lane M, DNA ladder marker; Lane 1, Infected yam; Lane 2, Healthy yam.

Fig. 5. The RT-PCR assay of infected yam plants. Lane M, DNA ladder marker; Lane No. apply to Yam virus sample No. (Table 1).

における反応の違いは精製ウイルスを用いて、ウイルス量を一定にした場合も認められることから、これらウイルスおよび抗体の作製に使用したウイルスはすべて JYMV ではあるが、血清学的に若干異なっていることが示唆された。

一方、RT-PCR による検定ではダイジョを含むモザイク症状を呈したヤマノイモ類から特異的にウイルス遺伝子を検出することができた。ダイジョは DAS-ELISA においては JYMV を検出することができなかったが、RT-PCR では JYMV 遺伝子を検出することができた。また、村本ら⁹⁾はダイジョからも DAS-ELISA により JYMV を検出していることから、本試験に供試したダイジョには血清学的にかなり異なる JYMV が感染していることが示唆された。RT-PCR に用いたプライマーは CP のコア領域で設計したもので、potyvirus の CP のコア領域のアミノ酸配列はウイルス種の間で保存されていることが報告されている¹²⁾。一方、N 末端は同一種においても、多様性が認められる部位であるとともに、ウイルス表面に位置し、ウイルス抗原として認識されやすい¹¹⁾。したがって、JYMV の CP の N 末端には株ごとに多様性があり、DAS-ELISA における反応性の違いは、抗体が N 末端を多く抗原として認識していることによると考えられた。ELISA はさまざまなウイルス検定に広く利用され、比較的簡易な方法であるが、JYMV の検定においては、ダイジョから JYMV を検出できなかったことから、DAS-ELISA では JYMV の適正な検定ができないことが示唆された。一方、RT-PCR は JYMV を広く検出することが可能であった。しかしながら、本法における RT-PCR は RNA 抽出が煩雑である。近年、ウイルス RNA の抽出法として Immunocapture 法¹⁴⁾が利用されており、今後 JYMV の RNA 抽出法として検討する必要があると考えられた。

本研究を行うにあたり、ヤマノイモモザイクウイルス抗血清を分譲してくださった弘前大学農学部の藤田 隆氏、

に JYMV の塩基配列の決定に供した株ジネンジョ 1 と健全株から得た全 RNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、JYMV 感染株に予想される断片長 (241 bp) の cDNA 断片が特異的に検出された (Fig. 4 a)。また、この増幅断片は Southern hybridization において CP 遺伝子と反応した (Fig. 4 b)。そこで、モザイク症状を呈したヤマノイモ類と CYNMV 感染ナガイモについて RT-PCR による検定を行った結果、CYNMV 感染ナガイモを除くすべての株から 241 bp の cDNA 断片が検出された (Fig. 5)。

DAS-ELISA と RT-PCR 検定の比較 DAS-ELISA による検定ではダイジョを除くモザイク症状を呈したヤマノイモ類から 3 種の抗体とも JYMV を特異的に検出することができた。しかしながら、抗体と供試したヤマノイモとの間でそれぞれ特異性が異なっていた。この DAS-ELISA

山口県農業試験場の鍛冶原寛氏, ならびに本稿のご校閲をいただいた山口大学農学部 亀谷満朗教授に感謝の意を表す。

引用文献

1. Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
2. 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.
3. 藤 晋一・辻 孝子・岩田久史 (1995). 愛知県のジネンジオ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. 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 (5) ヤマノイモモザイクウイルス (YMV) の抗血清作製. *日植病報* 53: 420 (講要).
6. 福本文良・栃原比呂志 (1978). ヤマノイモえそモザイクウイルス. *日植病報* 44: 1-5.
7. 市川裕章・高辻博志 (1995). 植物の PCR 実験プロトコール (島本 功・佐々木卓治監修), 秀潤社, 東京, pp. 40-44.
8. 石川 亮・難波成任・山下修一・土居養二 (1985). ソラメウイ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).
9. 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.
10. 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.
11. Shukla, D.D., Frenke, M.J. and Ward, C.W. (1991). Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Can. J. Plant Pathol.* 13: 178-191.
12. Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. and Ward, C.W. (1988). The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* 69: 1497-1508.
13. Thouvenel, J.C. and Faquet, C. (1986). Yam mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 314.
14. Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelo-nandoro, 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10年10月16日受付; 平成10年12月24日受理)