ソラマメウルトウイルス 2 の 22-kDa 外被タンパク質に対する モノクローナル抗体の作製とその性状

黒田 智久^{1,2}・鈴木 一実^{1*}

ABSTRACT

KURODA, T.^{1,2} and SUZUKI, K.^{1*} (2003). Development and partial characterization of monoclonal antibodies against *Broad bean wilt virus 2* 22-kDa coat protein. Jpn. J. Phytopathol. 69: 403-406.

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to the 22-kDa coat protein (CP) of *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2) were produced. The 22-kDa CP of the IA isolate expressed in *E. coli* was used to immunize mice and three independent hybridoma cell lines were screened. In western blot analyses, the MAbs (MAb3-9B, MAb5-12A and MAb6-2A) reacted to the bacterially expressed 22-kDa CP of the IA isolate and most BBWV-2 isolates, but not to some other BBWV-2 isolates and other plant viruses. In immuno-electron microscopy, MAb3-9B and MAb6-2A reacted with BBWV-2 particles to the 10⁻⁵ dilution.

(Received December 12, 2002; Accepted April 2, 2003)

Key words: *Broad bean wilt virus 2*, 22-kDa coat protein, fusion protein, monoclonal antibody.

ソラマメウルトウイルス 2 (BBWV-2) はナス科, キク科, マメ科などの主要作物の他, 多くの花き作物に感染するきわめて宿主範囲の広い植物ウイルスである (大木, 1997; Taylor and Stubbs, 1972). BBWV-2 は以前ソラマメウルトウイルス (BBWV) として分類されていたもののうち, Serotype II に属するウイルスを別種としたものである (Wellink *et al.*, 2000). BBWV-2 ではいくつかの分離株について抗血清が作製され, 反応性の異なる分離株も報告されているが (Kobayashi *et al.*, 1999), 用いた血清, 実験法や研究者の解釈の違いからその血清関係は複雑である. それゆえ, 野外で発生している BBWV-2 の検出・診断を行う場合, 解釈が困難な場合もしばしば認められる. そこで, 効率よく BBWV-2 を検出するための高い特異性と高力価の抗血清を得るために, 大腸菌で融合タンパク質として発現させた 22-kDa 外被タンパク質を抗原とし, モノクローナル抗体の作製を行った.

BBWV-2 の IA 分離株 (Kuroda *et al.*, 2000) の感染 *Chenopodium quinoa* 葉から Kuroda *et al.* (2002) の方法に従って全 RNA を抽出し, First-Strand cDNA Synthesis

Kit (Amersham Biosciences) およびランダムヘキサマーを用いて cDNA を合成した. 22-kDa 外被タンパク質遺伝子の増幅のために, IA 分離株の RNA 2 の塩基配列 (Kuroda *et al.*, 2000) に基づいてプライマー 22KN (5'-CCGGAATTCACCATGGCACATGCAACACC-3') とプライマー 22KC (5'-GCGATACTTGATTGTCTTGAAGATAGGAG-3') を設計した. そして PCR 法で 22-kDa 外被タンパク質遺伝子領域を増幅し, 大腸菌発現用プラスミドベクター pRSET-C (Invitrogen) の *Pvu* II 部位に常法 (Sambrook *et al.*, 1989) に従ってクローニングし pRSET-22K を得た. 発現用大腸菌としては BL21 (DE3) pLys S を用いた. pRSET-22K で形質転換した大腸菌は SOB 培地 (Sambrook *et al.*, 1989) (50 µg/ml アンピシリンを含む) で終夜培養し, 新たに用意した SOB 培地 (50 µg/ml アンピシリンを含む) に 1/10 容加えて 37°C で 1 時間培養した. そして最終濃度が 1 mM になるように IPTG 溶液を加え, 更に 37°C で 6 時間培養した. 菌体は 6000 × g で 10 分間遠心して回収し, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で超音波破碎し, 12,000 × g で 10 分間遠心し可溶性画分と不溶性画分に分離

¹ 財団法人岩手生物工学研究センター (〒024-0003 岩手県北上市成田22-174-4) Iwate Biotechnology Research Center, Narita, Kitakami, Iwate 024-0003, Japan

² 日本学術振興会 (〒102-8471 東京都千代田区麹町5-3-1) Japan Society for the Promotion of Science, Kouji-machi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8471, Japan

* Corresponding author (E-mail: kasuzuki@ibrc.or.jp)

した。そしてそれぞれの画分を15% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Laemmli, 1970) したところ、融合タンパク質のほとんどは不溶性画分に認められた (データ不掲載)。そこで、Taniguchi *et al.* (1996) に従って菌体から分画遠心と40, 53, 70%ショ糖不連続密度勾配遠心で封入体を精製し、融合タンパク質精製キット Xpress System Protein Purification (Invitrogen) を用いて12 M 尿素存在下で融合タンパク質を精製した。精製融合タンパク質溶液は透析によって緩衝液を10 mM Tris-HCl 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM DTT, 2 M 尿素) に置換し免疫用抗原試料とした。

精製融合タンパク質 (100 µg) は Freund's 完全アジュバントに懸濁し、2 週間おきに3回、4匹のBALB/cマウスの腹腔内にそれぞれ投与した。免疫中のマウスの血清の力価を測定するために、3次免疫終了後5日目に部分採血を行った。そしてIA分離株感染 *C. quinoa* 葉の全タンパク質試料をウエスタンブロット (Towbin *et al.*, 1979) したニトロセルロース膜に供試した。まず、ニトロセルロース膜は3%スキムミルクを含むPBST (リン酸緩衝液生理食塩水 pH 7.4, 0.05% Tween 20, 0.02% アジ化ナトリウムを含む) 中で1時間ブロッキングし、PBST で500倍希釈した血清に1時間浸漬した。次に膜を0.3%スキムミルクを含むPBST で10分間3回洗浄後、0.3%スキムミルクを含むPBST で2000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗マウス Ig 抗体 (Roche) 液に1時間浸漬した。そして0.3%スキムミルクを含むPBST で10分間3回、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.5, 100 mM 塩化ナトリウム, 5 mM 塩化マグネシウムを含む) で10分間3回洗浄し、最後に6.8% NBT, 17% BCIP を含む100 mM Tris-HCl 緩衝液中でバンドを検出した。その結果、4匹のマウスには個体差はあるものの、一様に野生ウイルス外被タンパク質に対する抗体の産生が確認された (データ不掲載)。モノクローナル抗体の作製にはさらなる力価の上昇が必要と考えられたので、2回の追加免疫を行った。最終免疫の3日後、高い抗体力価が認められた2匹のマウスから脾臓を摘出して脾細胞試料を調製し、50%ポリエチレングリコール存在下でP3-X63-Ag8-U1 マウスミエロマ細胞と融合させた。ハイブリドーマはHAT培地に浮遊させ、37°C, 5%二酸化炭素存在下で培養した。抗体産生ハイブリドーマの選抜はNatsuaki *et al.* (1994) の方法で部分純化したIA分離株を抗原として間接ELISA法 (大木, 1997) で行った。その結果、精製ウイルス試料と強く反応する3つのモノクローナル抗体産生細胞 (3-9B, 5-12A, 6-2A) を得た。各モノクローナル抗体のアイソ

タイプを MonoAb ID Kits for Isotyping Mouse Monoclonal Antibodies (ZYMED) を用いて調べたところ、MAb3-9B と MAb6-2A は IgG2b, MAb5-12A は IgM であった (第1図)。

得られたモノクローナル抗体をウエスタンブロットにより評価した。試料は常法に従って調製し、15% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、PVDF膜 (Bio-Rad) にエレクトロブロットした (Towbin *et al.*, 1979)。抗体液としては抗体産生細胞培養上清 (10% FCS 含有 RPMI1640 培地) を用いた。融合タンパク質を発現している大腸菌と発現ベクター pRSET-C のみを有する大腸菌の全タンパク質試料では、いずれのモノクローナル抗体も融合タンパク質発現大腸菌試料にのみバンドが認められた (第2図)。しかし、MAb5-12A は他の2つに比べて反応が弱かった。さらにIA分離株の他、リンドウから分離された1-2 (Kobayashi *et al.*, 1999), C4T2, C4, C12, E3-1, 3-10 (以上、当センター保存株)、トルコギキョウから分離されたL (Kobayashi *et al.*, 1999)、エンドウから分離されたE (Kobayashi *et al.*, 1999)、ソラマメから分離されたMB7 (中村・本蔵, 1997)、ピーマンから分離されたIP

第1図 モノクローナル抗体のアイソタイプの同定
IA分離株部分純化試料をマイクロタイタープレートに吸着させ、ハイブリドーマ培養上清と反応させた。以後の操作は MonoAb ID Kits for Isotyping Mouse Monoclonal Antibodies (ZYMED) の説明書に従った。

第2図 モノクローナル抗体の大腸菌全タンパク質との反応
融合タンパク質発現大腸菌 (+) と発現ベクターのみを含む大腸菌 (-) から常法に従って全タンパク質試料を調製しウエスタンブロットを行った。矢印は融合タンパク質の位置を示す。

第3図 モノクローナル抗体 MAb3-9B 及び MAb6-2A の各種 BBWV-2 分離株との反応
健全 *Chenopodium quinoa* 葉あるいは各種 BBWV-2 分離株接種 *C. quinoa* 葉から全タンパク質試料を調製しウエスタンブロットした。レーン1, 健全 *C. quinoa* 試料; レーン2, パチョリマイルドモザイクウイルス; レーン3, C4T2; レーン4, 3-10; レーン5, IA; レーン6, MB7。

(Kobayashi *et al.*, 1999), SP (当センター保存株), JK (竹内繁治氏より分譲) 等 BBWV-2 分離株や *Patchouli mild mosaic virus* (PatMMV) (Natsuaki *et al.*, 1994) が感染した *C. quinoa* 接種葉の全タンパク質試料についてもウエスタンブロットを行った。その結果 MAb3-9B と MAb6-2A は分離株によって反応性の強弱はあるが、共に 1-2, C4T2, C4, C12, E3-1, 3-10, L, E, MB7 の各 BBWV-2 分離株や PatMMV と反応が認められたが、IP, SP, JK の各 BBWV-2 分離株ではまったく反応が認められなかった (第3図)。また、いずれのモノクローナル抗体も 44-kDa 外被タンパク質とは全く反応しなかった。一方、ソラマメウィルトウイルス1 (BBWV-1) PS3-1 分離株 (山下ほか, 2001), キュウリモザイクウイルス (CMV), トウガラシマイルドモットルウイルス, クローバー葉脈黄化ウイルス, トマト黄化えそウイルスとは全く反応しなかった (データ不掲載)。

免疫電子顕微鏡法を用い MAb3-9B と MAb6-2A の力価を測定した。MAb3-9B および MAb6-2A の抗体産生細胞をそれぞれ BALB/c マウスの腹腔内に注射し、10日後に腹水を採取して用いた。その結果、BBWV-1 とは MAb3-9B, MAb6-2A とともに全く反応しなかったが、IA 分離株と PatMMV は 10^5 倍希釈まで反応が認められた。また、CMV 粒子とも全く反応が認められなかった。

以上の結果、大腸菌発現 22-kDa 外被タンパク質を用いて作製したモノクローナル抗体は、多くの BBWV-2 分離株および PatMMV の 22-kDa 外被タンパク質と特異的に強く反応したが、一部の BBWV-2 分離株やその他のウイルスとは全く反応が認められなかった。

Fabavirus 属のメンバーには BBWV-2 の他、BBWV-1,

PatMMV, *Lamium mild mosaic virus* が分類されている (Wellink *et al.*, 2000)。PatMMV は当初既報の *Fabavirus* 属メンバーのウイルスとの血清関係や宿主範囲の違いから BBWV-2 とは別種のウイルスとして報告されたが、全塩基配列が決定され BBWV-2 の一系統である可能性が示唆された (Ikegami *et al.*, 1998, 2001)。本実験において得られたモノクローナル抗体は PatMMV と BBWV-2 を区別することが出来なかったが、BBWV-1 とは全く反応が認められなかった。

BBWV の血清型については大きく 2 つに分けられ Serotype I および Serotype II (Uyemoto and Provvidentii, 1974) とされてきたものが、それぞれ BBWV-1 と BBWV-2 の別種に分類された (Wellink *et al.*, 2000)。また、BBWV-2 の分離株の中には血清反応の異なる IP 分離株が報告されているが (Kobayashi *et al.*, 1999)、本実験で作製したモノクローナル抗体とは反応が認められなかった。SP ならびに JK 分離株も同様に反応が認められなかったことから、BBWV-2 には抗原性の異なる分離株が存在することが示された。今後さらに多くの BBWV-2 分離株を入手し、作製したモノクローナル抗体との反応を調べるとともに、BBWV-2 における血清型について整理する必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ウイルス分離株を分譲していた宇都宮大学教授夏秋知英氏、宮城県農業・園芸総合研究所中村茂雄氏、青森県グリーンバイオセンター山下一夫氏、中央農業総合研究センター本田要八郎氏、高知県農業技術センター竹内繁治氏に厚く御礼申し上げる。

引用文献

- Ikegami, M., Kawashima, H., Natsuaki, T. and Sugimura, N. (1998). Complete nucleotide sequence of the genome organization of RNA 2 of patchouli mild mosaic virus, a new fabavirus. *Arch. Virol.* 143: 2431-2434.
- Ikegami, M., Onobori, Y., Sugimura, N. and Natsuaki, T. (2001). Complete nucleotide sequence and the genome organization of patchouli mild mosaic virus RNA 1. *Inter-virology* 44: 355-358.
- Kobayashi, Y.O., Nakano, M., Kashiwazaki, S., Naito, T., Mikoshiba, Y., Shiota, A., Kameya-Iwaki, M. and Honda, Y. (1999). Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of broad bean wilt virus confirms the existence of two distinct species. *Arch. Virol.* 144: 1429-1438.
- Kuroda, T., Okumura, A., Takeda, I., Miura, Y. and Suzuki, K. (2000). Nucleotide sequence and synthesis of infectious RNA from cloned cDNA of broad bean wilt virus 2 RNA 2.

- Arch. Virol. 145: 787-793.
- Kuroda, T., Urushibara, S., Takeda, I., Nakatani, F. and Suzuki, K. (2002). Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction for simultaneous detection of viruses in gentian. J. Gen. Plant Pathol. 68: 169-172.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- 中村茂雄・本蔵良三 (1997). 宮城県内のモザイク病ソラマメから分離されたウイルスの性状. 北日本病虫研報 48: 80-84.
- Natsuaki, K.T., Tomaru, K., Ushiku, S., Ichikawa, Y., Sugimura, Y., Natsuaki, T., Okuda, S. and Teranaka, M. (1994). Characterization of two viruses isolated from patchouli in Japan. Plant Dis. 78: 1094-1097.
- 大木 理 (1997). 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. 日本植物防疫協会, 東京.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Taniguchi, M. and Sugiyama, T. (1996). Isolation, characterization and expression of cDNA clones encoding a mitochondrial malate translocator from *Panicum milaceum* L. Plant Mol. Biol. 30: 51-64.
- Taylor, R.H. and Stubbs, L.L. (1972). Broad bean wilt virus. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses. No. 81.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
- Uyemoto, K.J. and Provvidenti, R. (1974). Isolation and identification of two serotypes of broad bean wilt virus. Phytopathology 64: 1547-1548.
- Wellink, J., Le Gall, O., Sanfacon, H., Ikegami, M. and Jones, A.T. (2000). Family Comoviridae. In Virus Taxonomy (Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B., eds.). pp. 691-701, Academic Press, San Diego.
- 山下一夫・福井要子・藤 晋一 (2001). デルフィニウムから分離されたソラマメウルトウイルス1. 日植病報 67: 174 (講要).