Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法によるシンビジウムモザイクウイルス (CyMV) の検出

福田 至朗^{1*}・加藤 晋朗¹・吉田 桂子¹・水上 優子¹・石田 朗¹・上田 淳一¹・神戸三智雄¹・石本 佳之¹

ABSTRACT

FUKUTA, S.^{1*}, KATO, S.¹, YOSHIDA K.¹, MIZUKAMI, Y.¹, ISHIDA, A.¹, UEDA, J.¹, KANBE, M.¹ and ISHIMOTO, Y.¹ (2003). Detection of *Cymbidium mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction (RT-LAMP). Jpn. J. Phytopathol. 69: 411-414.

A rapid and simple procedure is described to detect the genomic RNA molecule of *Cymbidium mosaic virus* (CyMV). This method, named RT-LAMP, allows direct detection of RNA from infected plants without careful RNA extraction, rapid thermal cycling and gel electrophoresis. RT-LAMP was successfully used to detect CyMV from leaves of *Phalaenopsis* orchid infected with CyMV. A large amount of byproduct, pyrophosphate ion, is produced, yielding a white precipitate of magnesium pyrophosphate in the reaction mixture. The presence or absence of this white precipitate allows easy detection of the amplification of CyMV genomic RNA without gel electrophoresis.

(Received February 28, 2003; Accepted May 20, 2003)

Key words: *Cymbidium mosaic virus* (CyMV), detection, RT-LAMP, RT-PCR.

シンビジウムモザイクウイルス (*Cymbidium mosaic virus*, CyMV) はシンビジウムやカトレヤ、エビネなど40属以上のラン科植物に自然感染するラン科植物にとって最も重要な病原ウイルスの一つである。CyMVに感染したランでは、葉に退色斑が生じ、その後拡大しながらモザイク症状を起こす (井上, 1993)。我が国での洋ランへのCyMVの感染は、1964年に井上により最初に報告された。洋ランの栽培はこの40年間で飛躍的に増加したことにより、CyMVによる国内の被害も大きな問題となっている。特に愛知県は全国有数の洋ランの栽培地を有しており、ウイルスによる被害も大きいことからその対策が求められている。

CyMVの診断法としてこれまでに電子顕微鏡による観察、抗原抗体反応を用いたELISA法やDIBA法、RIPA法が行われている (Hsu, 1992; Tanaka *et al.*, 1997; Pearson and Cole, 1991; Vejaratpimol, 1999)。また、ウイルスRNAに相補的な核酸を利用する方法としてRT-PCR法 (Lim *et al.*, 1993)、immunocapture PCR法 (Barry *et al.*, 1996)、ジゴキシゲニン標識cRNAプローブ法 (Hu and Wong, 1998)、molecular beacon法 (Eun and Wong, 2000) が、外被タンパク質を検出する方法として液体クロマトグ

ラフィー/MALDI質量分析法 (Tan *et al.*, 2000) が、それぞれ高感度のCyMV診断法として報告されている。ところが、これらの遺伝子診断には特別な機器や技術が必要であり、さらに判定までに時間がかかることなどから、は場レベルでの診断には利用されないことが多かった。

Loop-mediated isothermal amplification法は新たな遺伝子増幅技術として、病原菌の検出など様々な検出に利用され、その有用性が認められている (Notomi *et al.*, 2000)。LAMP法は6カ所の塩基配列を認識する4種のプライマーを用いることから反応特異性が非常に高く、また、65°Cで1時間の反応で判定できることから、簡易さと精度の高さの両方を併せ持つ遺伝子増幅法である (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002)。さらに、遺伝子増幅の反応副産物としてピロリン酸マグネシウムが生成されるため、遺伝子が増幅した反応液は白濁する。従って、反応液が白濁するか否かによって遺伝子の増幅が確認でき、反応後の産物を電気泳動することなく目的遺伝子の検出が可能である (Mori *et al.*, 2001)。本研究ではLAMP法に逆転写反応を組み合わせたRT-LAMPによってCyMVの検出を試みた。

¹ 愛知県農業総合試験場 (〒480-1193 愛知県愛知郡長久手町岩作三ヶ峯1-1) Aichi-Pref. Agricultural Research Center, 1-1 Sagamine, Yazako, Aichi 480-1193, Japan

* Corresponding author (E-mail: sfukuta@agri-rc.pref.aichi.jp)

CyMVを検出する LAMP プライマーの設計 CyMVを検出する LAMP プライマーの設計には外被タンパク質遺伝子配列 (GenBank accession number : AJ301849, AJ301850, AF016915, X62665, AJ428273) の保存性の高い配列から, 第1図に示したような配列を用いた. LAMP プライマーとして 5' 側から CyMV-F3 (センス鎖, GCGTCCAAGAGTGCTACC), F1 領域のアンチセンス鎖に F2 領域のセンス鎖を連結した CyMV-FIP (AAGATCTGCGCGCAAGAGC-TGCTCGGTTTCTGCCCTA), B1 領域のセンス鎖に B2 領域のアンチセンス鎖を連結した CyMV-BIP (GTCACCCCCCGCCAGTTTTCGTTAGTGCCAGCATCAG), CyMV-B3 (アンチセンス鎖, CCTCCTGGAAACCAACCTTG) の4種を設計した.

RT-LAMP 反応液 RT-LAMP は 0.2 μ M CyMV-F3 と CyMV-B3, および 1.6 μ M CyMV-FIP と CyMV-BIP, 1.4 mM dNTP, 0.8 M betaine (Sigma-Aldrich), 2 mM $MgSO_4$, 5 mM DTT, 5 units の RNase Inhibitor (Promega), 5 units の AMV reverse transcriptase (Invitrogen) さらに付属の Thermopol buffer (2 mM $MgSO_4$ を含む) と 8 U の Bst DNA polymerase (New England Biolabs) に 1 μ l の RNA サンプルを添加した 25 μ l の反応液で行った.

total RNA を用いた RT-LAMP の条件設定 CyMV が感染したコチヨウラン (*Phalaenopsis aphrodite*) および健全コチヨウラン葉 100 mg から RNeasy Plant Mini Kit

(Qiagen) を用いて total RNA を抽出し, 30 μ l の RNase free water に溶解した. この RNA 液 1 μ l を鋳型として RT-LAMP 反応を行った. LAMP 反応は 65°C で 30・60・90 分行い, 反応液をマイクロタイタープレートに移し, マイクロプレートリーダー Model 450 (Bio Rad) を利用し 405 nm の吸光度を測定することにより反応液の濁度を決定した. その結果, 65°C 30 分の LAMP 反応では増幅が不十分で濁度の上昇は認められなかったが, 60 分では濁度が十分上がり, DNA が増幅されていることが明らかとなった (第2図). 以上のことから CyMV の RT-LAMP 反応を 65°C 60 分で行うこととした.

コチヨウランからの RT-PCR および RT-LAMP による CyMV の検出 コチヨウランから CyMV の検出を行った. それぞれのコチヨウラン葉 100 mg から total RNA を抽出し, 30 μ l の RNase free water に溶解した. この RNA 液 20 μ l を用いて You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia biotech.) により cDNA を合成し, この cDNA を鋳型にして EX-Taq DNA polymerase (Takara) を用いて PCR を行った. PCR 反応は, GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus) を用い, 94°C 3 分の後, 94°C 1 分, 50°C 1 分, 72°C 2 分を 40 サイクル行った. さらに 72°C で 10 分反応させた. プライマーとしては CyMV-F3 (センス鎖), CyMV-B3 (アンチセンス鎖) の2つのプライマーを用いた.

CyMV が感染したコチヨウランおよび健全なコチヨウランを用いて RT-PCR と RT-LAMP をそれぞれ行った結

```

1 aacaaccttg gcctccccgc cgacacagta ggtaccgcgg ccattgacct ggctcgtgccc
61 tacgctgacg tcggggcgctc caagagtgc accctgctcg gtttctgccc tacgaagcct
                                CyMV-F3                                CyMV-F2
121 gatgtccgctc gcgcgcgtct tgccgcgcag atcttcgtgg ccaacgctac cccccgccag
                                CyMV-F1                                CyMV-B1
181 ttttgcgctt attacgcaaa agtggtgtgg aatctgatgc tggccactaa cgatccgccc
                                                CyMV-B2
241 gccaaactggg ccaagggttg tttccaggag gatacccggt ttgccgcctt tgacttcttc
                                CyMV-B3
301 gatgccgctcg attccactgc gcgcgtggag cctgctgaat ggcagcgccg ccctactgac
361 cgtgaacgtg ccgcgcactc gatcgggaag tacggcgccc ttgccgctca gcgtatccag
421 aacggcaacc tcatcaccaa cattgccgag gtcaccaagg gccatcttgg ctccaccaac
481 actctctatg ctctgcctgc accccctact gaa

```

第1図 *Cymbidium mosaic virus* の外被タンパク質遺伝子の配列および LAMP プライマー設計部位 (GenBank accession number : AJ301849).

第2図 CyMV 遺伝子を増幅する RT-LAMP の反応時間による濁度および反応産物量の変化。
(A) RT-LAMP 反応前 (0 分) および 30 分, 60 分, 90 分後の反応液の濁度, (B) RT-LAMP 反応後 30 分, 60 分, 90 分後の反応液の電気泳動像. M: 100 bp ladder, 30, 60, 90: それぞれ 30 分後, 60 分後, 90 分後の RT-LAMP 反応産物.

果, 両方の結果は一致した (第 3 図). また, 電気泳動で DNA の増幅が確認できた試料では RT-LAMP の反応液は白濁しており (第 4 図), DNA の増幅は反応液の白濁で判定することができた.

RNA の簡易抽出による RT-LAMP 愛知県一色町でモザイク症状を呈する 10 個体のコチョウランを採取し, これらの葉から total RNA を抽出し, RT-LAMP を行った結果, すべての試料で CyMV に特異的なバンドが認められた. 一方, これらの葉 100 mg を 100 μ l の 0.5 N NaOH 中で磨碎し, 磨碎液 10 μ l を 190 μ l の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) に添加した. 簡易抽出液 1 μ l を鋳型として RT-LAMP を行った結果, すべての反応液で白濁が認められた. 以上の結果から, 簡易抽出法を用いた RT-LAMP が有効であることが確認された.

RT-PCR 法および RT-LAMP 法の検出限界 先に示した方法で CyMV に罹病したコチョウランから total RNA を抽出し, これを 10 倍ずつ 10^5 倍まで段階希釈した.

第3図 RT-PCR (A) および RT-LAMP (B) によるコチョウランからの CyMV の検出.
M: 100 bp ladder; 1: 健全植物; 2: CyMV 感染植物.

第4図 コチョウランからの CyMV 検出の RT-LAMP 反応後の反応液.
1: 健全植物; 2: CyMV 感染植物.

それぞれの RNA 希釈液を用い, 先に示した方法で RT-PCR および RT-LAMP を行った結果, RT-LAMP, RT-PCR とともに 10^4 倍希釈まで CyMV を検出することができた.

以上の結果から CyMV の検出において RT-LAMP 法が有効であることが確認できた. 本法はサンプルの調製が非常に簡易で, また反応液の白濁によってウイルスの感染を

判断することができることから、栽培現場での簡易なウイルス診断を可能とすると考えられる。

引用文献

- Barry, K., Hu, J.S., Kuehnle, A.R. and Sughi, N. (1996). Sequence analysis and detection using Immunocapture-PCR of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Hawaiian orchids. *J. Phytopathol.* 144: 179-186.
- Eun, A.J.-C. and Wong, S.-M. (2000). Molecular beacons: A new approach to plant virus detection. *Phytopathology* 90: 269-275.
- Hsu, H.T., Vongsatitorn, D., and Lawson, R.H. (1992). An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82: 491-495.
- Hu, W.W. and Wong, S.M. (1998). The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of cymbidium mosaic potexvirus (CyMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) in orchids. *J. Virol. Methods* 70: 193-199.
- 井上成信 (1964). ランのウイルス病について (I). *Cymbidium* に発生するウイルス病. *日本蘭協会誌* 10: 6-10.
- 井上成信 (1993). 作物ウイルス病事典 (土崎常男ほか編). pp. 571-587, 全国農村教育協会.
- Lim, S.T., Wong, S.M., Yeong, C.Y., Lee, S.C. and Goh, C.J. (1993). Rapid detection of cymbidium mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Methods* 41: 37-46.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 150-154.
- Nagamine, K., Kuzuhara, Y. and Notomi, T. (2002). Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1195-1198.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: e63.
- Pearson, M.N. and Cole, J.S. (1991). Further observation of the effects of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus on the growth of *Cymbidium* orchids. *J. Phytopath.* 131: 193-198.
- Tan, S.W.L., Wong, S.M. and Kini, R.M. (2000). Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI-mass spectrometry. *J. Virol. Methods* 85: 93-99.
- Tanaka, S., Nishii, H., Ito, S., Kameya-Iwaki, M. and Sommartya, P. (1997). Detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus and *Odontoglossum* ringspot tobamovirus from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant Dis.* 81: 167-170.
- Vejaratpimol, R., Channuntapipat, C., Pewnim, T., Ito, K., Iizuka, M. and Minamiura, N. (1999). Detection and serological relationship of cymbidium mosaic potexvirus isolates. *J. Biosci. Bioengin.* 87: 161-168.