2種のウイルスとキクスタントウイルスを検出する reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法の開発

福田至朗・新美善久*・大石一史・吉村幸江・穴井尚子
堀田真紀子・深谷雅博・加藤俊博・大矢俊夫・神戸三智雄

Shiro Fukuta, Yoshihisa Nimi*, Kazushi Ohishi, Yukie Yoshimura, Naoko Anai, Makiko Hotta, Masahiro Fukaya, Toshihiro Kato, Toshio Oya and Michio Kanbe: Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method for detection of two viruses and chrysanthemum stunt viroid

Summary

We developed a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method to detect two viruses: *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Chrysanthemum virus B* (CVB), and *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd). We designed the LAMP primers specific for the coat protein genes of CMV and CVB, and CSVd genomic RNA. The sensitivity of RT-LAMP was as high as the sensitivity of RT-PCR for detection of CSVd, and was higher than the sensitivity of RT-PCR for detection of CMV and CVB.

緒 言

植物ウイルスによる病害の診断では、抗原抗体反応を利用した ELISA 法や DIBA 法などと共に、検出精度が高く低濃度の病原体を検出することができる遺伝子診断が用いられている。現在、遺伝子診断では PCR 法の利用が一般的である^{1, 2, 11, 12)}。PCR 法は2つのプライマーに挟まれた領域を好熱性細菌由来の DNA polymerase によって増幅する反応であるが、遺伝子を増幅するためには熱変成とアニーリング、伸長の3つの反応を数十回繰り返すことが必要である。

LAMP 法は Loop-mediated isothermal amplification 法の略で、PCR 法に代わる迅速・精確・簡便な遺伝子増幅法である^{7, 8, 9, 10)}。LAMP 法には以下のような利点がある。

- ①鎖置換活性を持つ *Bst* DNA polymerase を用いるため、60~65°C の一定温度での反応により遺伝子の増幅が可能となる。
- ②6ヶ所の配列を持つ4種のプライマーを用いる。そ

のため、類似配列による非特異反応が少ない。

- ③*Bst* DNA polymerase の至適温度で行うため、DNA の増幅効率が高い。
- ④DNA の合成に伴ってできるピロリン酸マグネシウムによって反応液が白濁する。そのため、DNA の増幅を目視によって判定することができる。

LAMP 法は操作の簡易な遺伝子増幅法であることから、農業分野においても有効な技術であり、既にトマト黄化葉巻ウイルスについての検出法が報告されている³⁾。さらに、逆転写反応と LAMP 反応を組み合わせた RT-LAMP 法¹⁰⁾ を利用したジネンジョモザイクウイルス⁶⁾、シンピジウムモザイクウイルス⁴⁾、トマト黄化えそウイルス⁵⁾ についての検出法も開発されている。本研究ではこのような RT-LAMP 反応を利用して、キク栽培で問題となるキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、キク B ウイルス (*Chrysanthemum virus B*, CVB)、キクスタントウイルス (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) を検出する技術を開発した。

材料および方法

1. ウイルス及びウイルスフリーキク

CMV 及び CVB の検出限界を調べるため、凍結乾燥した CMV 及び CVB ポジティブコントロール (agdia) を用いた。また、愛知県内で採集した CMV 感染キュウリとグロリオサ、及び CVB 感染キクを用いた。

CSVd の検出には、愛知県内で採集した CSVd 感染キクを用いた。

ネガティブコントロールとして、ウイルスフリーキクを用いた。ウイルスフリーキクは滅菌は種し、40 ml の MS 培地 (0.3% アガー) を添加したプラントボックスで育てた。

2. 鋳型 RNA の簡易抽出

ウイルス感染植物及びウイルスフリーキクを200倍容の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) で磨砕し、10,000×g で1分間遠心した。この上清を鋳型 RNA として用いた。

また、各ウイルスのポジティブコントロールは2ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) でよく懸濁し、10,000×

g で1分間遠心した。上清またはこの上清を上記のウイルスフリーキクの磨砕液で希釈したものを鋳型 RNA として用いた。

3. RT-PCR 法

RT-PCR 反応は ReverTra Dash Kit (Toyobo) を用い、添付されたプロトコールに従って行った。それぞれのウイルス及びウイロイドの cDNA は第1表に示したアンチセンスプライマーを用いて作出した。さらにセンスプライマー (第1表) を添加して PCR 反応を行った。PCR 産物は2%アガロースゲルで電気泳動した。

4. LAMP プライマーの設計

それぞれのウイルス及びウイロイドを検出するための4種の LAMP プライマー (F3, B3, FIP, BIP) と LAMP 反応を促進する2種の Loop プライマー⁸⁾ を設計した。

CMV については国内で採取された C7-2 系統 (GenBank accession No. D42079), N 系統 (GenBank accession No. D28486), FT 系統 (GenBank accession No. D28487), Pepo 系統 (GenBank accession No. D28488),

第1表 ウイルスおよびウイロイドを検出するプライマーの配列

Name	Sequence	Position*
CMV-F3	5'-GACCGTGGGTCTTATTATGG-3'	D42079: 1521-1540
CMV-B3	5'-ATTAACCAGTACCGGTGAGGC-3'	1719-1739
CMV-FIP	5'-TAACTCGAATTTGAATGCGCGTATTACCTGATTACAGTCACGG-3'	1594-1614, 1552-1572
CMV-BIP	5'-CCGTAAAGTTCCTGCCTCCTCCCGTCCGCAAACATAGCAGAG-3'	1655-1675, 1697-1717
CMV-F-Loop	5'-AACAAGTTTCTTATC-3'	1578-1592
CMV-B-Loop	5'-ACTTATCCGTTGCCGCCA-3'	1678-1715
CMV-Sense	CMV-F3と同じ	
CMV-Antisense	CMV-B3と同じ	
CVB-F3	5'-CCTAATATGCGAGGGGATCC-3'	参考 (S60150) : 2351-2370
CVB-B3	5'-ATTACCCCTTCGGATCCTG-3'	2570-2589
CVB-FIP	5'-CCATATCCTCGGATGTCGCCGTGTCTACCGATTTCCTGTG-3'	2443-2462, 2390-2409
CVB-BIP	5'-CTGGGAGTGCCTACTGAGTCCGCACAATTGAGCACTAGACG-3'	2489-2508, 2528-2548
CVB-F-Loop	5'-GTTGTTAGAAATCCTCTGTGG-3'	2420-2440
CVB-B-Loop	5'-GTCAAAGAGGTGATCATC-3'	2510-2527
CVB-Sense	5'-TCCAGCCTCCACCTAATATGCGAG-3'	2340-2363
CVB-Antisense	5'-AGCCCATAGCCGACCAATCAGAAG-3'	2721-2744
CSVd-F3	5'-GAGGCGAAGAAGTCCTTCAG-3'	E13156: 66-85
CSVd-B3	5'-CCGGTGCTAAAGAAGGTTGG-3'	298-317
CSVd-FIP	5'-TACTCCTGTCTCGCAGGAGTGGGAAACCTGGAGGAAGTCCG-3'	143-164, 97-115
CSVd-BIP	5'-TCCTTCCTCTCCTGGAGAGGTCCAGTTGTTTCCACCGGGTAG-3'	198-219, 258-277
CSVd-F-Loop	5'-CCTAAGCCCCAACCGCGAT-3	121-139
CSVd-B-Loop	5'-CCCGGTCTTCGAAGCTTCCT-3	231-250
CSVd-Sense	5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3'	272-292
CSVd-Antisense	5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3'	150-169

CVB-Sense および CVB-Antisense は山本ら¹³⁾ の報告した CVBS1 と CVB-C1, CSVd-Sense と CSVd-Antisense は大石ら¹²⁾ の報告した forward プライマーと backward プライマーをそれぞれ用いた。

*: それぞれのプライマーを設計した塩基配列 (GenBank Accession No.) とその位置。CVB については愛知県農業総合試験場でシーケンスした配列を基に設計したが、参考として既報の配列を示した。

CS 系統 (GenBank accession No. D28489) のコートタンパク質をコードする塩基配列を比較し、各系統で保存されている領域を基に CMV-F3, CMV-B3, CMV-FIP, CMV-BIP, CMV-F-Loop, CMV-B-Loop の 6 種のプライマーを設計した (第 1 表)。

CVB については、県内で採集された CVB のコートタンパク質をコードする領域の塩基配列を解析し、この塩基配列を基に CVB-F3, CVB-B3, CVB-FIP, CVB-BIP, CVB-F-Loop, CVB-B-Loop の 6 種のプライマーを設計した (第 1 表)。

CSVd については、既報の塩基配列 (GenBank Accession E13156) から CSVd-F3, CSVd-B3, CSVd-FIP, CSVd-BIP, CSVd-F-Loop, CSVd-B-Loop の 6 種プライマーを設計した (第 1 表)。

5. RT-LAMP 反応液

RT-LAMP 反応は Fukuta et al.⁵⁾ に従った。即ち、反応液は 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgSO₄, 0.1% Tween 20, 0.8 M betaine (Sigma-Aldrich), 0.2 μM F3 及び B3 プライマー, 1.6 μM FIP 及び BIP プライマー, 0.8 μM F-Loop 及び B-Loop プライマー, 1.4 mM dNTPs, 16 ユニット *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs), 5 mM DTT, 8 ユニット RNase Inhibitor (Promega), 1.25 ユニット AMV reverse transcriptase (Invitrogen) を混合して 24 μl とし、これに 1 μl の RNA 抽出液を加えて反応を行った。反応は 63°C で 60 分間行った。

6. 濁度の測定

LAMP 反応液の濁度はリアルタイム濁度測定装置 LA-

200 (Teramecs) を用いて測定した。

結 果

1. CMV 検出における RT-PCR 法と RT-LAMP 法の検出限界の比較

CMV-Sense と CMV-Antisense を用いた RT-PCR, 及び CMV 検出用の LAMP プライマーを用いた RT-LAMP によって CMV の検出を行った。鋳型には、CMV ポジティブコントロールと、これをウイルスフリーキック磨砕液で 10 倍ずつ 10⁶ 倍まで希釈したものを用いた。また、ネガティブコントロールとして、ウイルスフリーキック磨砕液を用いた。結果を第 1 図に示した。RT-PCR 反応では CMV 由来の約 250 bp のバンドが 10⁰, 10¹ 倍希釈まで明瞭に観察されたが、10² 倍希釈ではやや薄く、10³ 倍希釈以上の希釈液からは検出されなかった (第 1 図 A)。一方、RT-LAMP 反応では、反応開始から約 20 分後に 10⁰ と 10¹ 倍希釈で濁度が上昇し始め、その後、23 分後に 10² 倍希釈、25 分後に 10³ 倍希釈、29 分後に 10⁴ 倍希釈のサンプルの濁度の上昇が認められた (第 1 図 B)。以上の結果、RT-PCR では 10² 倍希釈、RT-LAMP 反応では 10⁴ 倍希釈まで検出できたことから、RT-LAMP 法は ReverTra Dash Kit を用いた RT-PCR 法に比べ、約 100 倍検出感度が高いことが明らかとなった。

さらに、県内から採取したグロリオサ及びキュウリからの CMV の検出を行った。その結果、RT-PCR と RT-LAMP の検出結果は一致した。

第 1 図 (A) RT-PCR 反応および (B) RT-LAMP 反応による CMV の検出限界の比較

(A) CMV ポジティブコントロールを 10⁰~10⁶ 倍希釈したサンプルおよびウイルスフリーサンプルを用いた RT-PCR 産物の電気泳動像。M は 100 bp ラダー。RT-PCR の結果、CMV が検出されたサンプルでは約 250 bp の DNA が増幅される (図右の矢印⇐)

(B) CMV ポジティブコントロールを 10⁰~10⁶ 倍希釈したサンプルおよびウイルスフリーサンプルを用いた RT-LAMP 反応液の濁度の変化。■, 10⁰ 倍希釈; □, 10¹ 倍希釈; ◆, 10² 倍希釈; ◇, 10³ 倍希釈; ▲, 10⁴ 倍希釈; △, 10⁵ 倍希釈; ●, 10⁶ 倍希釈; ○, ウイルスフリー。RT-LAMP 反応は 63°C, 1 時間で行った。

2. CVB 検出における RT-PCR 法と RT-LAMP 法の検出限界の比較

既報¹²⁾ の CVB 検出用プライマー CVB-Sense と CVB-Antisense を用いた RT-PCR, 及び CVB 検出用 LAMP プライマーを用いた RT-LAMP によって CVB の検出を行った。鋳型には, CVB ポジティブコントロールとこれをウイルスフリーキク磨砕液で10倍ずつ10⁶倍まで希釈したものを用いた。また, ネガティブコントロールとして, ウイルスフリーキク磨砕液を用いた。検出の結果を第2図に示した。RT-PCR 反応では CVB 由来の約 400 bp のバンドが10⁰, 10¹倍希釈まで明瞭に観察されたが, 10²倍希釈ではやや薄く, 10³倍希釈以上のサンプルからは検出されなかった(第2図 A)。一方, RT-LAMP 反応では, 反応開始から約30分後に10⁰倍希釈サンプルで濁度が上昇し始め, その後, 33分後に10¹倍希釈, 37分後に10²倍希釈, 40分後に10³倍希釈, 43分後に10⁴倍希釈サンプルの濁度の上昇が認められた(第2図 B)。以上の結果, RT-PCR では10²倍希釈, RT-LAMP 反応では10⁴倍希釈まで検出できたことから, RT-LAMP 法は ReverTra Dash Kit を用いた RT-PCR 法に比べ, 約100倍検出感度が高いことが明らかとなった。

さらに, 県内から採取したキクからの CVB の検出を行った。その結果, RT-PCR と RT-LAMP の検出結果は一致した。

3. CSVd 検出における RT-PCR 法と RT-LAMP 法の検出限界の比較

既報¹¹⁾ の CSVd 検出用プライマー CSVd-Sense と Antisense を用いた RT-PCR, 及び CSVd を検出する LAMP プライマーを用いた RT-LAMP によって CSVd の

検出を行った。鋳型には, CSVd 感染キクとこれをウイルスフリーキク磨砕液で10倍ずつ10⁶倍まで希釈したものをを用いた。また, ネガティブコントロールとしてウイルスフリーキク磨砕液を用いた。検出の結果を第4図に示した。RT-PCR 反応では CSVd 由来の約 250 bp のバンドが10⁰~10⁵倍希釈まで明瞭に観察されたが, 10⁶倍希釈サンプルからは検出されなかった(第3図 A)。一方, RT-LAMP 反応では, 反応開始から約24分後に10⁰と10¹倍希釈のサンプルで濁度が上昇し始め, その後, 28分後に10²倍希釈, 32分後に10³倍希釈, 38分後に10⁴倍希釈と10⁵倍希釈のサンプルで濁度の上昇が認められた(第3図 B)。以上の結果, RT-PCR 法, RT-LAMP 法は共に10⁵倍希釈のサンプルまで検出することができ, 両法の検出感度はほぼ同等であると考えられた

考 察

本研究は, 愛知県内の農業, その中でも特にキク栽培で問題となっている2種のウイルスと1種のウイロイドに対し, RT-LAMP 法を利用した検出技術を開発したものである。

CMV は系統間で塩基配列の差異が多い。そのため, LAMP プライマーの設計には, 5系統の CMV の塩基配列を比較し, 各系統間で保存されている領域を利用した。これらのプライマーを用いた RT-LAMP 反応は, 従来の RT-PCR より100倍程度感度が高かった。また, 愛知県内で採集されたキュウリとグロリオサから CMV を検出することができた。一方, CVB については愛知県でキクに感染した CVB の塩基配列から LAMP プライマーを作出した。この塩基配列は既報の配列 (GenBank ac-

第2図 (A) RT-PCR 反応および (B) RT-LAMP 反応による CVB の検出限界の比較

(A) CVB ポジティブコントロールを10⁰~10⁶倍希釈したサンプルおよびウイルスフリーサンプルを用いた RT-PCR 産物の電気泳動像。M は 100 bp ラダー。RT-PCR の結果, CVB が検出されたサンプルでは約 400 bp の DNA が増幅される(図右の矢印⇐)

(B) CVB ポジティブコントロールを10⁰~10⁶倍希釈したサンプルおよびウイルスフリーサンプルを用いた RT-LAMP 反応液の濁度の変化。■, 10⁰倍希釈; □, 10¹倍希釈; ◆, 10²倍希釈; ◇, 10³倍希釈; ▲, 10⁴倍希釈; △, 10⁵倍希釈; ●, 10⁶倍希釈; ○, ウイルスフリー。RT-LAMP 反応は 63°C, 1 時間で行った。

第3図 (A) RT-PCR 反応および (B) RT-LAMP 反応による CSVd の検出限界の比較

(A) CSVd 感染葉を $10^0 \sim 10^6$ 倍希釈したサンプルおよびウイルスフリーサンプルを用いた RT-PCR 産物の電気泳動像。M は 100 bp ラダー。RT-PCR の結果、CSVd が検出されたサンプルでは約 250 bp の DNA が増幅される (図右の矢印⇨)
 (B) CSVd 感染葉を $10^0 \sim 10^6$ 倍希釈したサンプルおよびウイルスフリーサンプルを用いた RT-LAMP 反応液の濁度の変化。■, 10^0 倍希釈；□, 10^1 倍希釈；◆, 10^2 倍希釈；◇, 10^3 倍希釈；▲, 10^4 倍希釈；△, 10^5 倍希釈；●, 10^6 倍希釈；○, ウィルスフリー。RT-LAMP 反応は 63°C , 1 時間で行った。

cession No. S60150) とやや異なっていることから、CVB についても系統間の変異があるものと考えられた。これらのプライマーを用いた RT-LAMP 反応は、従来の RT-PCR に比べ約100倍の検出感度を有していた。

以上の CMV と CVB については、本研究の検出試験に供試したのは、愛知県内で採集された CMV と CVB のみであり、今後、他の系統に対する検出試験を行う必要があると考えられた。

CSVd については、報告された塩基配列 (GenBank Accession No. E13156) を基に 1 から192番目, 31から317番目, 66から317番目, 135から317番目, 186から97番目の塩基配列をそれぞれターゲットとする LAMP プライマーを設計した。これらのプライマーの内、検出効率が高く、安定して CSVd を検出できるのは、第1表に示した66から317番目の塩基の配列を基に設計したプライマーであった。CSVd は環状の1本鎖 RNA ではあるが、実際には自己分子内で相補性が高いため、多くの塩基対を形成し2本鎖 RNA 様の形状を取っている。今後、先の LAMP プライマーの検出効率と CSVd の形状についての関係について調べる必要がある。

RT-LAMP 法は、RNA を鋳型にして DNA を合成する逆転写反応と DNA を増幅する LAMP 反応を組み合わせたものである^{4, 5, 6, 10)}。同様な反応として RT-PCR 法がある。通常、RT-PCR を行う場合、逆転写反応と PCR 反応は温度条件が異なることから2段階に分けて行う^{1, 2, 12)}。ところが、RT-LAMP 法では、一本のチューブで 63°C 一定条件下において、これらの2つの反応を同時に行うことができる。

本研究で検出法を確立した2種のウイルスと CSVd は、キク栽培現場で広く感染している。これらのウイルス・ウイロイド病害を防除するためには、ウイルス・ウイロイドフリー苗の作出が効果的である。今後、このようなフリー苗の作出に、RT-LAMP 法による診断法を利用していきたい。

摘 要

CMV, CVB の2種のウイルスと CSVd について RT-LAMP 法による検出法を開発した。LAMP プライマーは、CMV 及び CVB についてはコートタンパク質領域、また、CSVd の66から317塩基の配列をもとに設計した。それぞれのプライマーを用い、 63°C 1時間の RT-LAMP 反応を行った結果、それぞれの病原ウイルス・ウイロイドを RT-PCR と同等またはそれ以上の精度で検出することができた。

引用文献

- 1) 藤 晋一・中前 均 (1997) 愛知農総試研報 29 : 151-156.
- 2) 藤 晋一・大石一史・中前 均 (1998) 関西病害虫研報 40 : 111-112.
- 3) Fukuta, S., S. Kato, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, K. Kanbe and Y. Ishimoto (2003) J. Virol. Methods 112: 35-40.
- 4) 福田至朗・加藤晋朗・吉田桂子・水上優子・石田 朗・上田淳一・神戸三智雄・石本佳之 (2003) 日植病報 69 : 411-414.
- 5) Fukuta, S., K. Ohishi, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida and M. Kanbe (2004) J. Virol. Method 121: 49-55.

- 6) Fukuta, S., T. Iida, Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, M. Kanbe and Y. Ishimoto (2003) Arch. Virol. 148: 1713-1720.
- 7) Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita and T. Notomi (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 289: 150-154.
- 8) Nagamine, K., T. Hase and T. Notomi (2002) Mol. Cell Probes 16: 223-229.
- 9) Nagamine, K., Y. Kuzuhara and T. Notomi (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 1195-1198.
- 10) Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000) Nucl. Acids Res. 28: e63.
- 11) 大石一史・奥村義秀・森岡公一 (2001) 園芸学雑 70別 2 : 192 (講要).
- 12) 山本英樹・木口忠彦・大屋俊英 (2001) 北日本病虫研報 52 : 85-86.