

# RT-PCR法を用いたイチゴマイルドイエローエッジアソシエートウイルスの検出と千葉県内の系統

鈴木 健\*・飯嶋 直人・花田 薫\*\*・吉井 幸子

キーワード：イチゴ,ウイルス検定,RT-PCR,SMYEAV

## I 緒 言

千葉県のイチゴの栽培面積及び生産額は、それぞれ228ha及び57億円(千葉の園芸と農産、2004)に上る。この生産基盤を支えるために、千葉県農業総合研究センター育種研究所は、イチゴのウイルスフリー基株を管理し、ウイルスフリー苗を生産農家に配布する体制にある。従来、イチゴのウイルス検定には検定用の植物に小葉を接木し、検定植物に現われる病徴を観察する方法(生物検定法)が採用されている。しかし、検定植物に現われる病徴は判断が難しく、また検定用植物の維持増殖が必要で、結果の判定は1か月を要するなどの問題がある。これに代わる手法としてRNAを数十万倍に増幅検出し、短時間でウイルス検出の結果が得られるRT-PCR法がある(佐野、1990)。しかし、RT-PCR法はイチゴ抽出液中に含まれる核酸以外の反応阻害物質が結果に影響を及ぼすので、筆者らはRNAの検出法を検討しRT-PCR法によるstrawberry mild yellow edge-associated virus (以下SMYEAVとする)の検出法を発表した(鈴木ら、1998)。その後、抽出法やプライマーについてさらに検討の結果、精度の高い検出法を明らかにした。また、本RT-PCR法と従来の生物検定法を比較検討するとともに、千葉県内の各地で採集したイチゴ株からSMYEAV由来のPCR産物を得て塩基配列を調査した。

本研究を遂行するに当たり、千葉県農業総合研究センター育種研究所 野菜花き育種研究室石川正美主席研究員には供試材料の提供とともに、生物検定に協力いただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。

## II 材料及び方法

### 1. 試験1：RNA抽出方法の検討

#### (1) 供試材料

1996年に千葉県農業試験場野菜研究室(現千葉県農業総合研究センター野菜研究室)から分譲された「とちおとめ」のNo.1及びNo.2株(第1表)を用いた。この2株は

第1表 本試験に用いた供試株の品種及び採集地

供試株No.	品 種	採集地
1	とちおとめ	千葉市
2	とちおとめ	千葉市
3	とちおとめ	千葉市
4	とちおとめ	千葉市
5	とちおとめ	千葉市
6	女 峰	茂原市
7	女 峰	千葉市
8	女 峰	千葉市
9	女 峰	千葉市
10	女 峰	八日市場市
11	女 峰	市原市
12	女 峰	丸山町
13	とよのか	茂原市
14	章 姫	館山市
15	とよのか	千葉市

分譲直後に、*Fragaria vesca*「系統名:UC-5」(以下「UC-5」とする)に小葉接木し、葉の萎縮や葉脈の壊疽などのウイルス病徴を確認した株である。これらを千葉県農業総合研究センター内の隔離網室で維持し、供試時には十分展開した成葉0.1g f.w.を用いた。

#### (2) RNA抽出法

##### i CF-11法

大貫ら(1996)がサツマイモ葉からのウイルス検出に用

2004年9月29日受理

\* 千葉県産業支援技術研究所

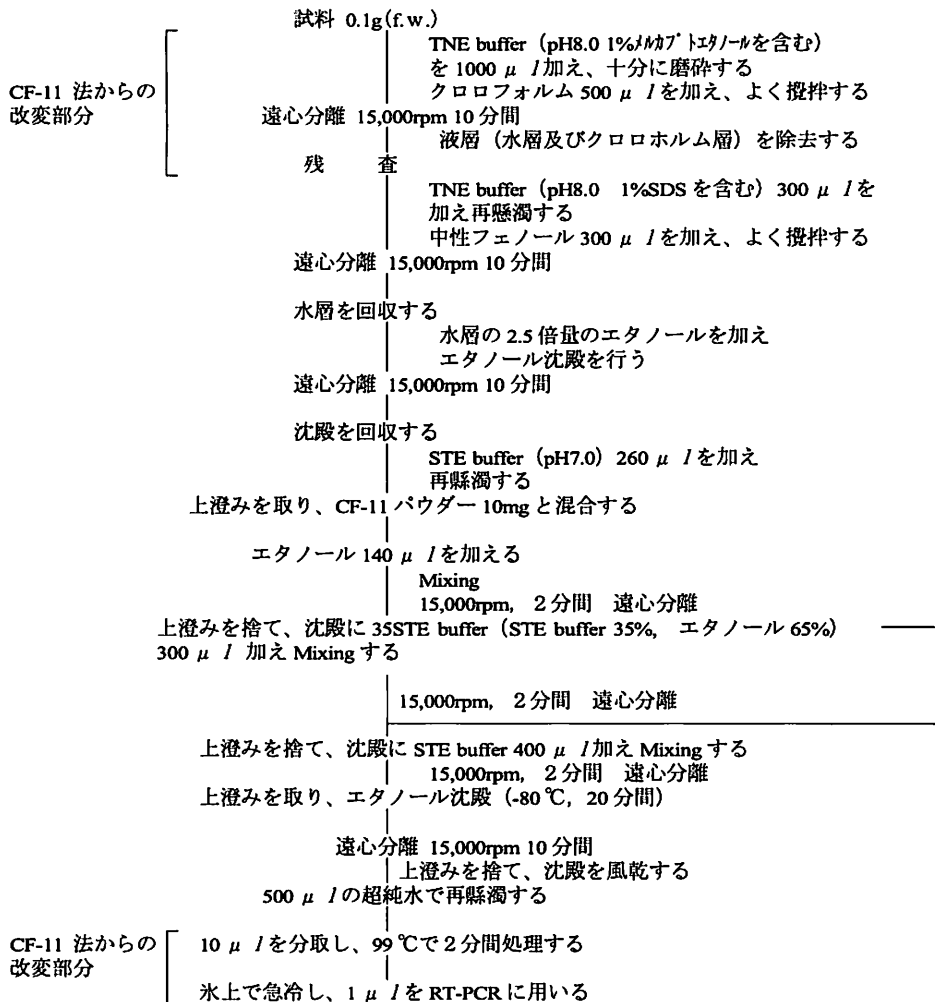
\*\* 独立行政法人農業生物資源研究所

いた方法で、試料をフェノール・クロロホルムにより処理し、CF-11セルロースパウダーを用いてウイルスRNAを抽出・精製した。

1/2量のクロロホルムと混合攪拌し、遠心分離を行い、不溶性の残渣を回収する工程を加えた。また、抽出したウイルスRNAを99℃ 2分間の熱処理を行い、氷上に静置し、2本鎖RNA(以下dsRNAとする)をRT-PCR用の試料とした。抽出方法の詳細を第1図に示した。

ii 改変CF-11法

CF-11法による精製を行う前に、イチゴ葉の磨砕液を



第1図 改変CF-11法によるRNAの抽出方法

iii AGPC法

筆者がサツマイモ葉からのウイルス検出に用いた方法(鈴木, 2002)で、グアニジンチオシアネートを主成分とする抽出バッファを用いて試料を磨砕し、タンパク質を変性させ、ウイルスRNAの粗抽出分画を得た。次に、この粗抽出分画にフェノール・クロロホルム処理を行い上清を回収し、1/2量の1.2M塩化ナトリウム、0.8Mクエン酸ナトリウムを含む高濃度塩溶液及び1/2量イソプロピルアルコールを加え核酸を沈殿させ、遠心分離により沈殿を回収した。回収した沈殿は500µlの超純水で再溶して試験に用いた。

iv CTAB+LiCl法

向井・山本(1997)の方法で、最初にポリエチレングリコールを含む抽出バッファで試料を磨砕し、遠心分離で沈殿を回収した。この沈殿をCetyl trimethyl ammonium bromide (以下CTABとする)を含むバッファで懸濁し、得られたウイルスRNAを含む抽出液に、最終濃度が2Mになるように高濃度の塩化リチウムを加え、-20℃で2時間以上放置し、遠心分離により沈殿を回収した。回収した沈殿は500µlの超純水で再溶して試験に用いた。

(3) SMYEAV検出用プライマー

GenBankに登録されているSMYEAV isolate:MY-18(Accession No.D12517)の塩基配列を基に、ウイルスコートタンパク質をコードしている領域の一部及びその上流域を増幅するプライマーとしてSMYEV-YF (5'-TGAAACCGGGCCAGACTATC-3')、STPX-R(5'-TGGTAACTTAACCCCTAATC-3')を設計し、試験に用いた。増幅されるPCR産物の大きさは0.85kbpである。

(4) RT-PCRの設定

RT-PCRにはTaKaRa社のOne-stepRT-PCR kitを用いた。RT-PCRの処理条件は、逆転写反応を42℃で20分間、その後95℃で5分間行った。続いて行ったPCR反応の処理条件は、94℃2分間の前処理後、1サイクルを熱変性94℃1分間処理、アニーリング55℃1分30秒間処理、伸長反応72℃2分間処理として、30サイクル行った。装置はApplied Biosystems社製Model9700サーマルサイクラーを使用した。

(5) 電気泳動によるPCR産物の検出

電気泳動装置はアドバンテック社製ミューツピット2を使用した。泳動バッファーは1×TAEバッファーを用い、1%アガーロースゲルを使用した。DNAの染色はエチジウムブロマイドを用い、260nm紫外光下で観察した。

2. 試験2：RT-PCR法と生物検定法の比較

(1) 供試材料

1996年に千葉県農業試験場野菜研究室(現農業総合研究センター野菜研究室)から分譲された「とちおとめ」4株(No.1～No.4)に加え、1996～2002年に千葉県内の栽培圃場より採取した「とちおとめ」「女峰」「章姫」「とよのか」の11株(No.5～No.15)を供試した(第1表)。これらの株は、15cm径の駄温鉢に植え付け、千葉県農業総合研究センター内の隔離網室にて10～33℃の環境下で維持した。

(2) RNA抽出法

試料は、十分展開した成葉を0.1g f.w.採取し、試験1に示した改変CF-11法でRNAを抽出した。

(3) SMYEAV検出用プライマー

SMYEAV検出用プライマーは、試験1で用いたものに加え、GenBankに登録されているSMYEAV isolate:D-74(Accession No.Y13983)の塩基配列を基に設計したSMYEV-D74F(5'-CAAGCGACATTATCAACAG-3')とSTPX-Rのプライマーセットを試験に用いた。SMYEV-D74FプライマーとSTPX-Rプライマーのセッ

トにより増幅されるPCR産物の大きさは0.6kbpであった。

(3) RT-PCRの条件

RT-PCRの設定及び電気泳動によるPCR産物の検出は試験1と同様に行った。

(4) 生物検定法

高井(1973)の方法に準じて、供試材料の小葉を切り取り、検定植物に接木接種した。検定植物として5葉前後展葉した「UC-5」及びFragaria vesca「EMC」(以下「EMC」とする)を用いた。接木接種は2003年2月27日に行い、2003年4月3日及び4月15日に病徴を観察した。この工程は千葉県長生郡長生村の育種研究所隔離温室で行い、接木接種から病徴観察の間は25℃前後で管理した。

3. 試験3：PCR産物の塩基配列及びアミノ酸配列調査

(1) 供試材料

TAクローニングに用いたテンプレートは、試験2でRT-PCRによって増幅されたPCR産物をQIAGEN社QIAEX II gel Extraction kitを用いてアガーロースゲルより回収したものをを使用した。精製したPCR産物は、Novagen社T-vectorに組み込み、TaKaRa社Ligation kit ver 2を用いて、東洋紡社コンピテントセルDH5αに形質転換した。この形質転換体からBio Rad社mini prep kitを用いてプラスミドを精製し、PE Applied Biosystems社Big Dye Terminator kitを用いてシーケンス反応を行った。

(2) シーケンス

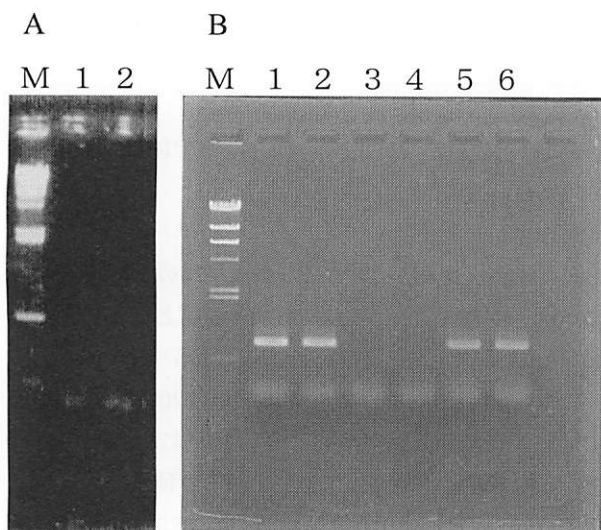
PE Applied Biosystems社model 377 DNAシーケンサーを用いて、塩基配列を調査した。この結果を、配列が公開されているSMYEAV isolate:MY-18(Accession No.D12517:アメリカオレゴン州より採取)及びSMYEAV isolate:D-74(Accession No.Y13983:ドイツより採取)との相同性を比較した。

## III 結 果

1. 試験1：RNA抽出方法の検討

CF-11法、改変CF-11法、AGPC法、及びCTAB+LiCl法の4種の抽出法で抽出したRNAをテンプレートとしたRT-PCR結果を第2図に示した。

改変CF-11法及びCTAB+LiCl法では目的のPCR産物の増幅が確認できた。しかし、CF-11法及びAGPC法で抽出した試料では目的のPCR産物の増幅は認められなかった。

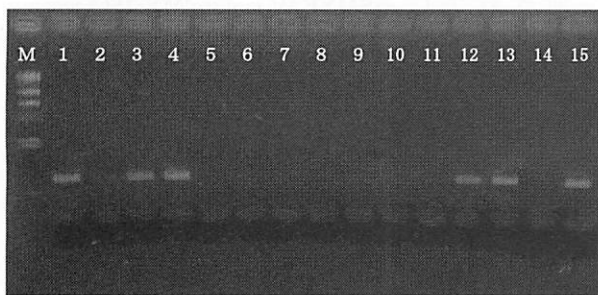


第2図 抽出方法の違いによるイチゴ葉からのSMYEAVの検出

A M:  $\lambda$ /HindIIIマーカー 1: No.1株のCF-11法抽出試料  
2: No.2株のCF-11法抽出試料  
B M:  $\lambda$ /HindIIIマーカー 1: No.1株の改変CF-11法抽出試料  
2: No.2株の改変CF-11法抽出試料  
3: No.1株のAGPC法抽出試料  
4: No.2株のAGPC法抽出試料  
5: No.1株のCTAB+LiCl法抽出試料  
6: No.2株のCTAB+LiCl法抽出試料

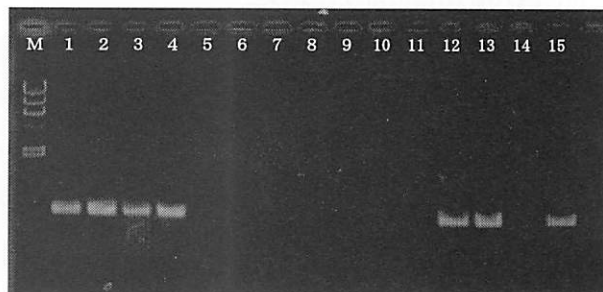
## 2. 試験2: RT-PCR法と生物検定法の比較

供試15株のRT-PCR法によるSMYEAV検出の結果を第3図及び第4図に示した。SMYEV-YF・STPX-Rプライマーセットを用いた結果ではNo.1~4, No.12, No.13及びNo.15で目的のPCR産物の増幅が確認できた。また、SMYEV-D74F・STPX-Rプライマーセットを用いて行った結果は、SMYEV-YF・STPX-Rプライマーセットを用いた結果と一致した。



第3図 SMMYEV-YF・STPX-Rプライマーを用いたRT-PCR法によるイチゴ葉からのSMYEAVの検出

M:  $\lambda$ /HindIII分子量マーカー 1~15: イチゴ葉試料No.1~15



第4図 SMMYEV-D74F・STPX-Rプライマーを用いたRT-PCR法によるイチゴ葉からのSMYEAVの検出

M:  $\lambda$ /HindIII分子量マーカー 1~15: イチゴ葉試料No.1~15

一方、接木接種した「EMC」及び「UC-5」の病徴観察から判定した結果を第2表に示した。

「EMC」では、No.1, No.3, No.4及びNo.13が陽性と判断され、「UC-5」ではNo.4が陽性と判定された。No.2, No.12及びNo.15はRT-PCR法でPCR産物の増幅が確認されたが、生物検定では「EMC」及び「UC-5」とも陰性と判定された。予備試験の生物検定では陽性であったNo.2は、今回の試験では陰性であった。

供試材料を接木して病徴を観察した検定植物の葉を試料としてRT-PCRを行った結果、供試材料のNo.1, No.3, No.4, No.12及びNo.13株を接木した「EMC」でPCR産物の増幅が認められた。また、供試材料No.2とNo.4株を接木した「UC-5」からもSMYEAVに特異的なPCR産物が増幅された。供試材料No.15株はPCR産物の増幅が認められたが、接木した検定植物のRT-PCR検定ではPCR産物の増幅は認められなかった。

## 3. 試験3: PCR産物の塩基配列及びアミノ酸配列調査

SMYEV-YF・STPX-Rプライマーセットを用いたRT-PCR法によって得られたPCR産物の塩基配列を決定し、7株の塩基配列の相同性を第3表に示した。

No.1~4及びNo.12~13は、96.7~99.4%の高い相同性を示したが、No.15との相同性は90.2~92.0%であった。これらの塩基配列はいずれもSMYEAV isolate:MY-18の塩基配列と82.7~84.2%の相同性であり、SMYEAV isolate:D-74の塩基配列とは83.8%~89.2%の相同性であった。

第2表 RT-PCR法及び生物検定法による千葉県内で栽培されたイチゴからのSMYEAV検出結果

供試株No.	供試株の RT-PCR検出	接種した検定植物の病徴観察		接種した検定植物のRT-PCR検出	
		EMC	UC-5	EMC	UC-5
1	+ 注1)	+ 注2)	- 注2)	+ 注3)	- 注3)
2	+	NT	-	NT	+
3	+	+	-	+	-
4	+	+	++	+	+
5	-	-	-	NT	NT
6	-	-	-	NT	NT
7	-	-	-	NT	NT
8	-	-	-	NT	NT
9	-	-	-	NT	NT
10	-	-	-	NT	NT
11	-	-	-	NT	NT
12	+	-	-	+	-
13	+	++	-	+	-
14	-	-	-	NT	NT
15	+	-	-	-	-

注1) +はPCR産物の増幅があった。-はなかった。

2) +は弱い病徴が認められた。++は壞疽等の強い病徴が認められた。-は無病徴。NTは試験を実施せず。

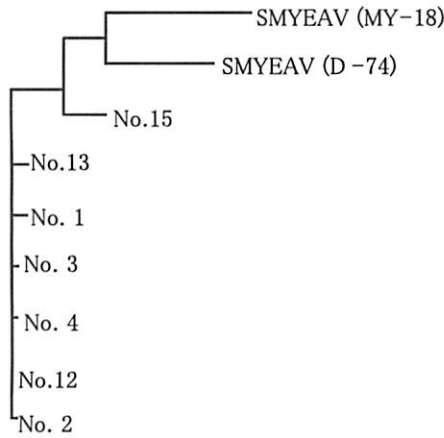
3) +はPCR産物の増幅があった。-はなかった。NTは試験を実施せず。

第3表 千葉県内のSMYEAV感染株から得られたPCR産物の塩基配列相同性 (%) の比較

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.12	No.13	No.15	SMYEAV (MY-18)	SMYEAV (D-74)
No.1	-	97.4	97.3	97.4	97.7	97.2	90.9	83.1	83.8
No.2	-	-	98.9	99.1	99.4	96.8	90.3	82.7	84.5
No.3	-	-	-	98.9	99.3	96.7	90.2	83.1	84.5
No.4	-	-	-	-	99.4	96.8	90.3	82.7	84.8
No.12	-	-	-	-	-	97.1	90.5	82.7	84.9
No.13	-	-	-	-	-	-	92.0	82.8	84.1
No.15	-	-	-	-	-	-	-	84.2	89.2
SMYEAV (MY-18)	-	-	-	-	-	-	-	-	84.4

注) SMYEAV (MY-18)は、SMYEAV isolate: MY-18 (Accession No.D12517)の塩基配列を、SMYEAV (D-74)は、SMYEAV isolate: D-74 (Accession No.Y13938)の塩基配列を参照した。第5図、第6図も同様とした。

また、塩基配列を基にマルチプルアライメント解析を行い、近隣結合法により作製した系統樹を第5図に示した。No. 1～4及びNo.12～13が1つのグループを形成し、No.15は別のグループとなった。



第5図 千葉県内に発生したSMYEAVの塩基配列から近隣結合法により作製した系統樹

塩基配列からコードされるコートタンパク質のアミノ酸配列は第6図に示すとおりである。今回調査したSMYEAVとSMYEAV isolate:MY-18とを比較すると、No.15は265アミノ酸残基中の3残基が異なり、No. 1～No. 4及びNo.12～13のグループは、265アミノ酸残基中の4残基が異っていた。また、SMYEAV isolate:D-74と比較すると、No.15は265アミノ酸残基中の3残基が異なり、No. 1～No. 4及びNo.12～13のグループは、265アミノ酸残基中の4残基が異っていた。SMYEAV isolate:MY-18と比較した場合とSMYEAV isolate:D-74と比較した場合には、それぞれ異なる部位でアミノ酸残基の違いがみられた。

SMYEAV-D74F・STPX-Rプライマーセットを用いて増幅されたPCR産物の塩基配列を調査した結果、SMYEAV-YF・STPX-Rプライマーセットを用いて増幅されたPCR産物と完全に一致した。

No. 1	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFDGLAHSNDFTAFDQSQ	60
No. 2	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFDGLAHSNDFTAFDQSQ	60
No. 3	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFDGLAHSNDFTAFDQSQ	60
No. 4	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFDGLAHSNDFTAFDQSQ	60
No.12	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFDGLAHSNDFTAFDQSQ	60
No.13	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFDGLAHSNDFTAFDQSQ	60
No.15	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFEGLAHSNDFTAFDQSQ	60
SMYEAV MY-18	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFEGLAHSNDFTAFDQSQ	60
SMYEAV D-74	1	VHLYGTHARYHRRHREIYQPSNIFINCEKTPADLDEWAKANWHFEGLAHSNDFTAFDQSQ	60
No. 1	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
No. 2	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
No. 3	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
No. 4	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
No.12	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
No.13	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
No.15	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
SMYEAV MY-18	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
SMYEAV D-74	61	DGANLQFEVIRAKFHNVPDSIINSYVELKTNAKVFLGVLKIHRLSCGCPITFDANTECSIÀ	120
No. 1	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
No. 2	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
No. 3	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
No. 4	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
No.12	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
No.13	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
No.15	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
SMYEAV MY-18	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
SMYEAV D-74	121	YHHTKYUVEPDVAQVYAGDSDAQDRTPVPRPSFNKIKDRRLGLVSKPLTHRQVPCDYATFC	180
No. 1	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
No. 2	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
No. 3	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
No. 4	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
No.12	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
No.13	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
No.15	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
SMYEAV MY-18	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
SMYEAV D-74	181	GUIITPKCVIRDPLRLYASLQLAIRRGRSHEVALSYAHDACLAYRLCDDLHSLVTFDEAH	240
No. 1	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
No. 2	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
No. 3	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
No. 4	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
No.12	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
No.13	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
No.15	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
SMYEAV MY-18	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265
SMYEAV D-74	241	AHQCTVRDLVRLNKKVEVLRPIWALD	265

第6図 千葉県内に発生したSMYEAVの遺伝子からコードされるアミノ酸配列の比較

#### IV 考 察

RT-PCR法は、簡便かつ高感度で短期間にウイルス感染の有無を判定できるので、塩基配列の一部が解明されているウイルスでは、検出用のプライマーが設計できる。しかし、植物生体中のポリフェノールや多糖類は、逆転写反応及びPCR反応を阻害し、PCR産物が増幅されないことが知られている(楠ら、1993;Nishiguti et al.,1995;佐野、1990)。イチゴについては、他の植物に比べ反応阻害物質が多いので(大木・荒川、1995)、通常の抽出方法では良好な核酸を得られないとされている(Kaden-Kreuziger et al.,1995)。このため、Kaden-KreuzigerらはSMYEAV抗体を用い、試料中のウイルス粒子を吸着し、RNAを抽出するイムノキャプチャーRT-PCR法を用いてSMYEAVの検出を行った。著者らは抗体を使用せず、簡便にRT-PCR法に適用できるRNAの抽出方法を検討した。大貫ら(1996)は、CF-11セルロースパウダーが65%エタノールを含む溶液中でRNAを吸着する特性を利用してRNAの抽出精製を行っている。しかし、イチゴ葉を供試材料とした場合は、試料の褐変が認められ、RT-PCRに用いるRNAとして不適であった。

そこで、CF-11による抽出の前に、イチゴ葉の磨砕液を1/2量のクロロホルムと混合攪拌し、遠心分離を行い不溶性の残渣を回収する工程を加えた改変CF-11法の実用性を検討した。この工程を加えることで、試料中の反応阻害物質の中でも水溶性分画、及び有機溶液可溶性分画が除去されたと考えられる。また、この方法では1本鎖RNA(以下ssRNAとする)とdsRNAが抽出精製される。dsRNAは、RNAウイルス感染組織中に特異的に現れることから、ウイルスの検出によく用いられる(大木、1992)。さらに、dsRNAは比較的安定した核酸であるため、ウイルス診断の利用に適していると考えられる。そこで、dsRNAをRT-PCR用の試料として使用するために、99℃ 2分間の熱処理を行い、氷上に静置する工程を加えた。その結果、改変CF-11法により抽出したイチゴ試料から目的のPCR産物が増幅できた。

著者らはこれまでにAGPC法を用いることでサツマイモ葉からサツマイモ斑紋モザイクウイルスが検出可能であることを報告している(2002)。この方法をイチゴ葉で検討したが、PCR産物は増幅できなかった。これは、イチゴ葉にはサツマイモ葉に比べRT-PCR反応阻害物質が多く、AGPC法では反応阻害物質の除去が不十分であるためと推察される。

CTAB+LiCl法は、最初にポリエチレングリコールを含む抽出バッファで試料を磨砕し、遠心分離で沈殿を回

収するため、試料中の水溶性反応阻害物質が除去されたと考えられる。また、高濃度の塩化リチウム溶液中では、RNAが特異的に沈殿する特性を利用しRNAの精製を行うため、RNAの純度が高くなったのであろう。この方法では、ssRNAがRT-PCRのテンプレートになっていたと考えられる。

改変CF-11法及びCTAB+LiCl法では、どちらも抽出した試料から目的のPCR産物が増幅できた。これらの方法は、植物細胞やウイルス粒子を破壊する前に水溶性分画を除去するので、CF-11法及びAGPC法に比べてポリフェノールや多糖類の混入が減少したと考えられる。また、RNAを特異的に精製する方法であるためRNAの純度が高くなり、イチゴ葉抽出試料からの遺伝子増幅ができたものと推察される。この2法を比較すると、CTAB+LiCl法は改変CF-11法に比べやや時間を要すること、フェノール・クロロホルム処理の回数が多く、有機廃液が多くなるのが難点である。また、dsRNAの方がssRNAより安定であることから、イチゴ葉からのSMYEAV検出のためのRNAの抽出には、改変CF-11法が適当であろう。

試験1及び2で用いたSMYEV-YF・STPX-RプライマーセットはGenBankに登録されているSMYEAV isolate:MY-18(Accession No.D12517)の塩基配列を基に作製した。筆者らが以前報告した(鈴木ら、1998)プライマーでは、PCR産物の増幅が不安定であり、非特異的なバンドが認められた。そこで、SMYEAVの塩基配列を再検討し、本プライマーを設計した。その後、SMYEAV isolate:D-74(Accession No.Y13983)の塩基配列(Lamprecht and Jelkmann,1997)に対応できるSMYEV-D74Fプライマーを再設計した。これらのプライマーを用いRT-PCR法によるSMYEAVの検出を行ったところ、SMYEV-YF・STPX-Rプライマーセットによる検出結果と一致した。従って、今回供試した株からのSMYEAV検出には、SMYEV-YF・STPX-Rプライマーセットの使用が可能であろう。

RT-PCR法を用いたSMYEAV検出法の実用性を検討するため、RT-PCR法と生物検定法を比較した。その結果、RT-PCR法は生物検定法では検出できない株からのSMYEAV検出が可能であった。

また、接木接種した検定植物を試料にRT-PCRを行ったところ、検定植物に病徴が確認できた株並びに病徴が認められない株からもSMYEAVが検出可能であった。このことは、RT-PCR法は生物検定法に比べ検出感度が高いことを示している。

RT-PCR法で陽性と判定された株を接木した検定植物をRT-PCR法により検定した結果から、陰性となった株

が認められた。また、以前の生物検定で陽性判定であった株を、再度生物検定を行ったところ陰性と判定される場合があった。これらは、接木接種による供試株からのウイルス感染が充分行われなかったためと考えられる。

千葉県内で採集したSMYEAVの7株について、得られたPCR産物の塩基配列及び塩基配列からコードされるコートタンパク質のアミノ酸配列を比較した。その相同性から、遺伝子レベルでNo.15のグループとNo.1、No.2、No.3、No.4、No.12及びNo.13のグループに分けられた。また、今回調査したSMYEAVは、SMYEAV isolate:MY-18ともSMYEAV isolate:D-74とも異なる系統であることがわかった。

本実験では、RT-PCR法を用いてイチゴ葉からSMYEAVを検出できる条件を明らかにした。今後は、さらに多くのウイルス感染株を収集しRT-PCRによる検出を行い検定精度を確認する必要がある。また、高温時期などのウイルス濃度が低下する時期でのウイルス検出の可否や試料採集部位などについて検討する必要がある。

## V 摘 要

RT-PCR法を用いたSMYEAVの検出方法を確立するために、簡便で、純度の高いRNAの抽出方法を検討した。また、RT-PCR法によるSMYEAV検出法と生物検定法を比較した。

1. 改変CF-11法を用いてSMYEAV感染イチゴ葉から抽出したRNAは、PCR反応阻害物質が少なく、RT-PCR法によるSMYEAVの検出が可能であった。

2. RT-PCR法と生物検定法を比較検討したところ、RT-PCR法は迅速な検出が可能であり、高い検出感度が得られた。

3. 千葉県に発生しているSMYEAVは、SMYEAV isolate:MY-18の塩基配列と82.7~84.2%、SMYEAV isolate:D-74の塩基配列と83.8~89.2%の相同性であった。また、アミノ酸配列を比較したところ、SMYEAV isolate:MY-18及びSMYEAV isolate:D-74において265アミノ酸残基中3~4残基が異なっていた。

## VI 引用文献

- Kaden-Kreuziger, D., S. Lamprecht, R. R. Martin and W. Jelkmann (1995). Immunocapture polymerase chain reaction assay and ELISA for the detection of strawberry mild yellow edge associated potexvirus. *Acta Hort.* 385:33-40.
- 楠 幹生・寺見文宏・寺内英貴・十河和博(1993). 逆転写-polymerase Chain Reaction(RT-PCR)によるキク矮化ウイロイドの検出. *関西病虫研報.* 35:7-12.
- Lamprecht, S. and W. Jelkmann (1997). Infectious cDNA clone used to identify strawberry mild yellow edge-associated potexvirus as causal agent of the disease. *Journal of General Virology* 78(9): 2347-2353.
- 向井 謙・山本直樹(1997). 新版 植物のPCR実験プロトコール. 60-62. 秀潤社. 東京.
- Nishiguchi, M., M. Mori, Y. Okada, T. Murata, T. Kimura, J. Sakai, K. Hanada, C. Miyazaki and A. Saito (1995). Specific detection of a Severe Strain of Sweet Potato Feathery Mottle Virus (SPFMV-S) by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 61:119-122.
- 大木 理(1992). 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. 86-88. 植物防疫協会. 東京.
- 大木 理・荒川征雄(1995). ネギ属野菜, イチゴ等に発生するウイルスのRIPA法による検出. *関西病虫研報.* 37:53-54.
- 大貫正俊・花田 薫(1996). RT-PCR法を利用したサツマイモウイルス病の高感度簡易診断. *植物防疫.* 50(3):102-105.
- 佐野輝男(1990). PCRによる植物病害の遺伝子診断法. *植物防疫.* 44:557-562.
- 鈴木 健・大越一雄・酒井淳一・花田 薫(1998). RT-PCRによるStrawberry mild yellow edge-associated potexvirusの検出(講演要旨). *日植病報.* 64:427.
- 鈴木 健(2002). RT-PCR法を用いたサツマイモ斑紋モザイクウイルスの検出方法. *千葉農総研研報.* 1:109-116.
- 高井隆次(1973). わが国におけるイチゴウイルス病に関する研究. *園芸試験場報告C.* 8:59-104.



## Detection of Strawberry mild yellow edge-associated potexvirus (SMYEAV) in Strawberry by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Virus isolate in Chiba prefecture .

Takeshi SUZUKI<sup>\*</sup>, Naoto IJIMA, Kaoru HANADA<sup>\*\*</sup> and Satiko YOSHII

Key words : Strawberry, Virus assay, RT-PCR, SMYEAV

### Summary

To establish the detection method of SMYEAV by the RT-PCR, a simple extraction method of RNA with high purity was investigated. In addition, detection methods of SMYEAV by RT-PCR and by bioassay were compared.

1. The RNA extracted from the SMYEAV-infected leaves of strawberry using the modified CF-11 method included a low content of PCR inhibitory substance and the detection of SMYEAV by RT-PCR was possible.
2. Compared to bioassay, RT-PCR was quicker to detect and higher in detection sensitivity.
3. The base sequence of SMYEAV emerged in Chiba prefecture was 82.7~84.2% homologous to that of SMYEAV isolate, MY-18, and 83.8~89.2% homologous to SMYEAV isolate, D-74.

(\*Present Address : Chiba Industrial Technology Research Institute, \*\*National Institute of Agrobiological Sciences)