

第4章 形質転換によるウイルス抵抗性植物の作出

目的

テンサイそう根病は化学的・耕種的防除が困難な土壤病害である(阿部, 1987; Asher, 1993)。そのため、欧米や日本では多くの抵抗性品種が開発され、汚染圃場では抵抗性品種が栽培されている(Asher, 1993)。抵抗性品種における抵抗性の機構は明らかではないが、一般に、罹病性品種に比べて主根内のウイルス濃度が低いとされている(Kaufmann *et al.*, 1992; Scholten *et al.*, 1994; Tamada *et al.*, 1999)。しかし、発病の激しいところでは抵抗性品種を用いても経済的な栽培が望めないことがあり、より強い抵抗性品種の開発が求められている。近年、遺伝子工学的手法による植物への抵抗性の付与が注目されており、BNYVVでは、これまでCP遺伝子を導入したテンサイが作られているが、抵抗性の程度はさまざまである(Bartsch *et al.*, 1996; Mannerloef *et al.*, 1996)。そこで、CP遺伝子を導入した植物(*Nicotiana benthamiana*)を作出したが、抵抗性個体を得ることができなかった。本研究では、ウイルスの移行タンパク質に注目し(Beck *et al.*, 1994; Seppanen *et al.*, 1997)、検定植物*N. benthamiana*を用いてTGB遺伝子の導入による抵抗性植物の作出を試みた。

材料および方法

1) ウイルス遺伝子のクローニング

*N. benthamiana*の形質転換に用いたBNYVV遺伝子の構築は、Fig. 3-1に示した。42k遺伝子(P42)は、BNYVVのS-0分離株(RNA-1+2)から、プライマー2F42k/2R42kを用いてRT-PCRにより増幅した：2F42k (5'-agGATccATGGTCCAAGTACAGCG-3', *Bam* HI +RNA-2の nt 2130-2149, ミスマッチの塩基は小文字で示す。以下同様), 2R42k (5'-CccgggTTATCTATCTTCGCAAAAAGT-3', RNA-2の nt 3284-3264 + *Sma* Iに相補的)。また、13k遺伝子(P13), 15k遺伝子(P15), 13kと15kとをつないだ遺伝子(1315)は、S分離株のRNA-2の3'末端側を含むcDNAクローンpMSD25から、それぞれ、プライマー2F13k/2R13k, 2F15k/2R15k, 2F13k/2RTGBを用いてPCRにより増幅した：2F13k (5'-AggatccATGTCTAGGGAAATAAC-3', *Bam* HI +RNA-2の nt 3284-3300), 2R13k (5'-AgagctcTTAA CCACAAGCACCATT-37, +*Sac* I+RNA-2の nt 3640-

3623に相補的), 2F15k (5'-AggatccATGGTGCTTGT GGTAA-3', *Bam* HI +RNA-2の nt 3624-3640), 2R15k (5'-CgagctcTTATCTATGACACCAAAA-3', *Sac* I +RNA-2の nt 4022-4005に相補的), 2RTGB (5'-aCcCgggTTATCTATGACACCAAAA-3', *Sma* I +RNA-2の nt 4022-4005に相補的)。PCR産物は、*Bam* HI / *Sma* Iまたは*Bam* HI / *Sac* Iで切断してpUC119の*Bam* HI / *Sma* I部位または*Bam* HI / *Sac* I部位に挿入して大腸菌NM522に形質転換した。P42, P13, P15, 1315の各クローンは、塩基配列を確認し、それぞれ、pMP42, pMP13, pMP15, pM1315と名付けた。42k遺伝子へのフレームシフト変異導入("CTAG" 4塩基を付加)には、得られたpMP42を*Spe* Iで切断してKlenow酵素により末端を修復し(Sambrook *et al.*, 1989)、再結合させた。13k遺伝子へのアミノ酸の置換変異導入には、pM1315を鋳型としてプライマー2F13kM/2R13kMによるinverse-PCRを用いた：2F13kM (5'-GctGcagCAAGGTCAGC TGAT-3', RNA-2の nt 3449-3469, 新たに挿入した *Pst* I 部位は下線で示す), 2R13kM (5'-TGctgCagC TCTGaATTTAgCAgCGTT-3', RNA-2の nt 3457-3431に相補的)。PCRは、94°C-1分, 55°C-2分, 72°C-3分のサイクルを35回行った。アミノ酸は、Beck *et al.* (1994)と同様に置換した。変異を導入して得られた各クローンの塩基配列を調べ、変異の導入を確認した。42k変異遺伝子のクローンはpMP42S, 1315変異遺伝子のクローンはpM1315Mと名付けた。

2) 植物発現ベクターの構築

アグロバクテリウム TiプラスミドのT-DNAの両端の左右境界配列を含む植物発現ベクター pBI121 (Clontech)を制限酵素*Bam* HIと*Sac* Iで切断してGUS遺伝子を取り除いたもの、あるいはさらに*Sac* I部位を平滑末端化したものを植物発現用のベクターとして用いた。ウイルス遺伝子の各クローンを*Bam* HI / *Sac* Iまたは*Bam* HI / *Sma* Iで切断してインサートを切り出し、発現ベクターに挿入し、大腸菌 NM522を形質転換した。生じたコロニーは、クローニングに用いたプライマーでPCRにより増幅して形質転換を確認した。変異を導入したクローンでは、元となったクローンを増幅したプライマーを用いた。この発現ベクターをもつ大腸菌 NM522とアグロバクテリウ

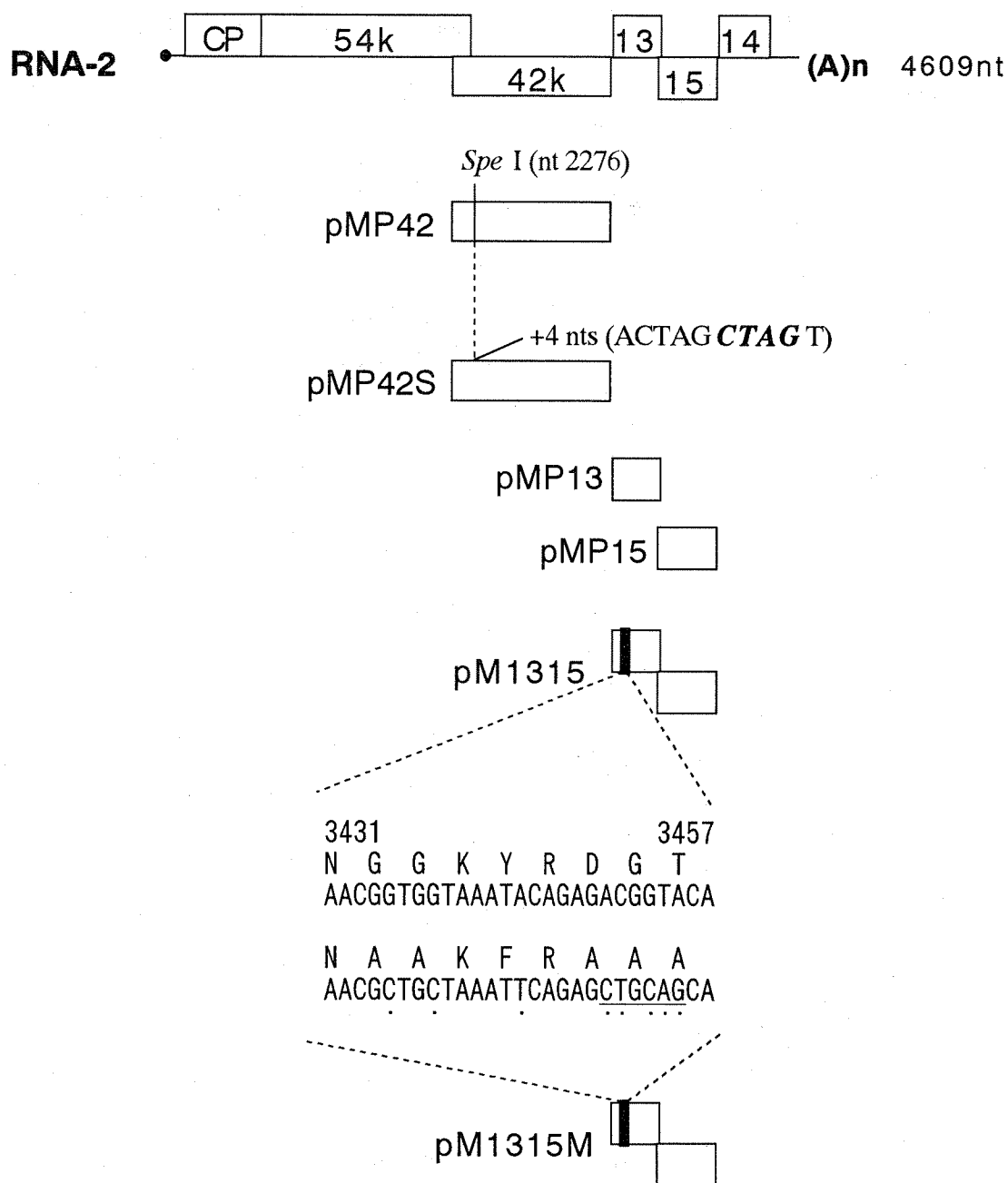


Fig. 3-1. Schematic representation of the BNYVV RNA-2 and construction of the virus genes. Genetic map of RNA-2 is shown above. Nucleotide substitution between nucleotides 3431 and 3457 is shown. Mutated nucleotides are indicated by dots. Additional nucleotides are indicated by bold italic and unique *Pst* I restriction site is underlined.

ムLBA4404 (Clontech) とヘルパープラスミド pRK2013 (Clontech) をもつ大腸菌 HB101 とを混合し、トリペアレンタルメイティング法 (Ditta *et al.*, 1980) によりウイルス遺伝子をアグロバクテリウムに導入した。

3) 無菌植物体の育成

0.25%ゲルライトを含むホルモン・フリーのMS培地 (Murashige and Skoog, 1962) 入りの培養びんに、70%エタノールと有効塩素濃度 1.5% のアンチホルミンで滅菌した *N. benthamiana* の種子を播き、陽光定温器内 (23°C, 16時間照明) で約1週間育てた。これを同じ培地に継代し、さらに約5週間育て、遺伝子導入のための無菌植物体として用いた。

4) 植物への遺伝子導入

構築した各遺伝子を含むアグロバクテリウムを LB培地で培養し、Benvenuto *et al.* (1991) に従ってリーフディスク法により *N. benthamiana* の無菌植物体葉片 (5~10mm角) に感染させた。共存培養を 23°C暗所で2日間行い、葉片をカナマイシン 100 µg/ml とクラフオラン 250 µg/ml を含むホルモン入り (BAP (ベンジル・アミノ・プリン) 1mg/ 培地1リットル, NAA (ナフタレン酢酸) 0.1mg/ 培地1リットル) のMS培地に移して 23°C-16時間照明下で約2週間培養し、さらに同じ培地に継代し、その約2週間後、リーフディスクから直接生じた幼植物体をカナマイシン 100 µg/ml を含むホルモンフリーのMS培地に継代して発根させた。発根の2~4週間後に石英砂を詰めた試験管に移植し、23°C16時間照明下で育て、約2週間後に温室で植木鉢に鉢上げした。これを再分化当代 (R₀世代) とし、自殖種子をとり、保存した。この種子を再分化次世代 (R₁世代) とし、以降の抵抗性検定に用いた。

5) 導入遺伝子の解析

再分化個体の葉から ISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて核酸を調製し、クローニングの際に用いたプライマーにより PCR でウイルス遺伝子を増幅し、目的の遺伝子が導入されたかどうかを調べた。プライマーは 10pmol 用いた。

6) R₁世代のカナマイシン耐性個体の選抜

培養びんにカナマイシン (200 µg/ml) を含むホルモン・フリーのMS培地 (0.25%ゲルライトを含

む) を分注し、これに、70%エタノールと 1.5% アンチホルミンで滅菌した形質転換体の種子 (R₁世代) を播き、陽光定温器内 (23°C, 16時間照明) で約1週間育てた。これを同じ培地に継代し、約5週間育てた。発現ベクターはカナマイシン耐性遺伝子を持つので、植物体がカナマイシン耐性であれば目的とする遺伝子が導入されていると考え、このカナマイシンを含む培地で発芽、生育したカナマイシン耐性個体を接種試験に用いた。対照の非形質転換体として無菌植物体を用いた。

7) ウイルスの接種と検定

ウイルスの接種、植物の育成は、陽光定温器内 (23°C, 16時間照明) で実施した。30ml注射筒または特製試験管 (排出管付き) に石英砂 (20~30メッシュ) を入れ、これに無菌的に育てた *N. benthamiana* 幼苗 (播種後約6週間) を移植した。培養液 (Hoagland & Arnon 氏液の改良液, pH7.0) (Tamada *et al.*, 1989) を毎日灌注した。BNYVV 分離株 No.96 (RNA-1+2+3+4) を汁液接種したツルナ接種葉から、第3章第1節に従ってウイルスを部分純化して 0.1mg/ml に調整し、播種後約7週間 (6~7葉) の形質転換体および対照の非形質転換体 (無菌植物体) の展開葉3枚にカーボランダムを用いて汁液接種した。接種後10日ごとに上位葉 (約0.1g) を採取し、ELISAによりウイルスの蓄積を調べ、感染の有無を判定した。

8) 形質転換体での導入遺伝子の発現解析

1315および1315M遺伝子を導入した植物体の一部の系統 (M1315-2, M1315-5, M1315M-1, M1315-7) について、導入遺伝子の発現解析を行った。各遺伝子産物に対する抗体がないため、導入遺伝子の発現をノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより解析した。ウイルスを接種後に解析すると、ウイルス由来のRNA分子が導入遺伝子由来の転写産物と類似の移動度 (約0.7kb) を示して両者の区別が困難となったため、ウイルスの接種前に葉を採取し、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて全RNAを抽出し、10 µgの全RNAを用いた。第5章第1節に従って電気泳動を行い、VacuGene XL blotting system (pharmacia) を用いてナイロン・メンブレン (Hybond N+, Amersham) に転写し、クロスリンカー (Stratagene) によりUV固定した。このメンブレンをハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムア

ミド, 5×SSC, 0.1% N-ラウロイルサルコシン, 0.02% SDS, 5% ブロッキング溶液) 中で42°C, 1~4時間インキュベートし, この液を捨て, ハイブリダイゼーション溶液にプローブ (0.1 µg/ml cDNA プローブ) を加えて42°C, 一晚インキュベートした。プローブにはジゴキシゲニン標識した pMSD25 の *Eco* RI断片 (RNA-2の2978-3790塩基を含む) を用いた。シグナルは, DIG Luminescent Detection Kit (Boeringer Mannheim) を用いて化学発光により検出した。発光基質にはCSPDを用い, 1~8時間X線フィルム (コダック) に露光し現像した。同一のメンブレンを用いてジゴキシゲニン標識アクチン RNA プローブ (ペーリンガー) によりハイブリダイゼーションを行い, 導入遺伝子とアクチン・プローブとのシグナルを比較して, 導入遺伝子の発現量を解析した。

結果

1) 形質転換植物の作出

構築した6種類のウイルス遺伝子をアグロバクテリウムを用いて *N. benthamiana* に導入した。得られた再分化個体は, それぞれ, MP42が3個体, MP42Sが3個体, MP13が4個体, MP15が3個体, M1315が5個体, M1315Mが4個体で, 置床葉片数に対する形質転換効率は2.8~14.3%であった。各再分化個体の葉から調製した核酸を用いてPCRにより目的とする遺伝子が導入されているかどうかを調べた結果, すべての再分化個体から目的とする大きさのバンドが検出された。これらの再分化当代 (R_0 世代) を系統とした。

2) ウイルス抵抗性の検定

R_0 世代22個体 (系統) の種子 (R_1 世代) から選抜したカナマイシン耐性個体にBNYVVを汁液接種し, 10日ごとに上位葉をELISA法により検定してウイルス感染の有無を調べた (Table 3-1)。実験は5回に分けて行った。その結果, MP42, MP13およびMP15の全系統, M1315およびM1315Mの一部の系統 (M1315-1, -5, -6, M1315M-3) のほとんどの個体は, 接種の10~20日後に典型的なモザイクまたはえその症状を示し, 上位葉からウイルスが検出され (Table 3-1), これらは, 非形質転換体からのウイルス検出程度と同様であった。しかし, M1315とM1315Mの植物体では, ウイルスの検出率が低いものがあつた (Table 3-1)。特に, M1315の中では2

と4の系統, M1315Mの系統では2と7の系統のウイルス検出率が低く (Table 3-1), 抵抗性が獲得されていると考えられた。

M1315とM1315Mについて, カナマイシン耐性の分離比を調べた結果, M1315-4を除いて耐性:感受性の分離比はほぼ3:1であつた (Table 3-2)。このことから, 導入した遺伝子が1カ所に挿入されたと考えられる。しかし, M1315-4は, 2カ所以上に挿入された分離比 (10:1) を示した (Table 3-2)。これらの個体について, さらにウイルスの接種検定を行ったところ, M1315-1, -5, -6およびM1315M-1, -3, -7の各系統では, 接種20日後~30日後には, 非形質転換体と同様に大部分の個体からウイルスが検出された (Table 3-2)。これに対して, M1315-2, M1315-4およびM1315M-2の3系統では, ウイルスの検出率が低かつた (Table 3-2)。

3) 導入遺伝子の発現解析

M1315-2, M1315-5, M1315M-1およびM1315M-7の4系統についてノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより導入遺伝子の発現を解析し, さらに抵抗性の検定を行った (Table 3-3, Fig. 3-2)。ウイルスの接種40日後まで, ほとんどの形質転換体の上葉からはウイルスが検出されなかつた (Table 3-3)。しかし, 接種10日後の接種葉からは全個体でウイルスが検出された。M1315-2, M1315-5, M1315M-1, M1315M-7, 非形質転換体の各系統の接種葉のELISAでの反応30分後の吸光度 (A_{405}) の平均は, それぞれ, 0.312, 0.342, 0.313, 0.319, 0.447で, 非形質転換体と形質転換との間にウイルス量の有意な差はなかつた。接種30日後では, 非形質転換体は, 形質転換体比べて生育が劣り (Plate 1-A, B), 健全植物 (Plate 1-C) には見られないモザイク (Plate 1-D) やえそ (Plate 1-E) の病徴が認められた。ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションでは, 形質転換体からのみ導入遺伝子に特異的な約0.7kbのバンドが検出された (Fig. 3-2)。このRNAの発現量は個体ごとに異なつたが, アクチンに特異的な1.8kbのシグナルは, ほとんど違いがなかつた。また, 1315および1315Mの2つのコンストラクトで, RNAの発現量に大きな差はなかつた。画像解析により導入遺伝子のシグナルの強さをアクチンのシグナルの強さと比較した結果, 導入遺伝子の発現量は, ウイルス濃度とは相関がなかつた (Table 3-3)。

Table 3-1. Resistance to BNYVV in self-pollinated progenies of transgenic lines.

Experiment	Construct	Line	Days after inoculation		
			10	20	30
I	MP13	1	3/6	5/6	6/6
		2	3/6	6/6	nt
		4	2/6	5/6	6/6
		5	0/6	6/6	nt
	MP15	1	0/6	1/6	4/6
		4	1/6	3/6	5/6
	M1315	1	0/6	0/6	3/6
		2	2/6	2/6	2/6
		4	1/6	1/6	1/6
		5	0/6	1/6	3/6
		6	0/6	3/6	3/6
	non-transgenic plant		1/6	3/6	4/6
II	MP42	1	3/6	6/6	nt
		2	3/6	6/6	nt
		3	4/6	5/6	5/6
	M1315M	1	0/6	0/6	1/6
		2	0/6	0/6	2/6
	non-transgenic plant		6/6	nt	nt
III	MP15	3	1/10	6/10	7/10
	MP42S	1	0/2	0/2	2/2
		3	1/3	2/3	3/3
	non-transgenic plant		0/10	9/10	10/10
IV	MP42S	5	4/10	10/10	nt
	M1315	2	1/10	1/10	1/10
		4	1/10	1/10	1/10
	M1315M	1	2/7	2/7	4/7
		2	1/10	1/10	2/10
		7	0/10	0/10	0/10
	non-transgenic plant		0/10	8/10	10/10
V	M1315M	2	3/19	9/19	9/19
		3	2/4	2/4	2/4
	non-transgenic plant		5/19	16/19	19/19

Figures indicate number of plants infected / number of plants inoculated.

'nt' indicates 'not tested'.

Virus infection of upper leaves was tested by ELISA.

Table 3-2. Resistance to BNYVV in self-pollinated progenies of transgenic lines of M1315 and M1315M.

Construct	Line	Percentage of kanamycin-resistant plants (%) ^{a)}	Days after inoculation			
			10	20	30	40
M1315	1	78.3	2 ^{b) c)}	8	8	10
	2	75.4	1	2	2	2
	4	90.9	0	3	3	3
	5	74.9	3	10	12	12
	6	69.3	3	11	12	12
M1315M	1	75.5	1	4	7	9
	2	68.9	0	1	4	4
	3	73.0	12	12	12	12
	7	76.4	4	6	7	10
non-transgenic plant		0	6	12	12	12

a) Percentage of kanamycin-resistant plants was calculated from sum of two independent experiments.

b) Figures indicate the number of infected plants out of 12 plants onto which the virus was inoculated.

c) Virus infection of upper leaves was tested by ELISA.

Table 3-3. Analysis of R1 progenies of lines 1315-2, 1315-5, 1315M-1 and 1315M-7.

Plant line	Number of plants tested	mRNA expression		Number of plants infected 40 days post inoculation
		Level	Number of plants	
M1315-2	11	+	1	0
		++	7	0
		+++	3	0
M1315-5	11	+	1	0
		++	8	2
		+++	2	0
M1315M-1	10	+	4	1
		++	5	0
		+++	1	0
M1315M-7	11	+	4	1
		++	4	1
		+++	3	0
non-transgenic	10	-	2	2
		nt	8	8

'+', '++' and '+++' indicate the intensity of signal of the transgene as compared to that of actin.

'nt' indicates not tested.

Virus infection of leaves was tested by ELISA.

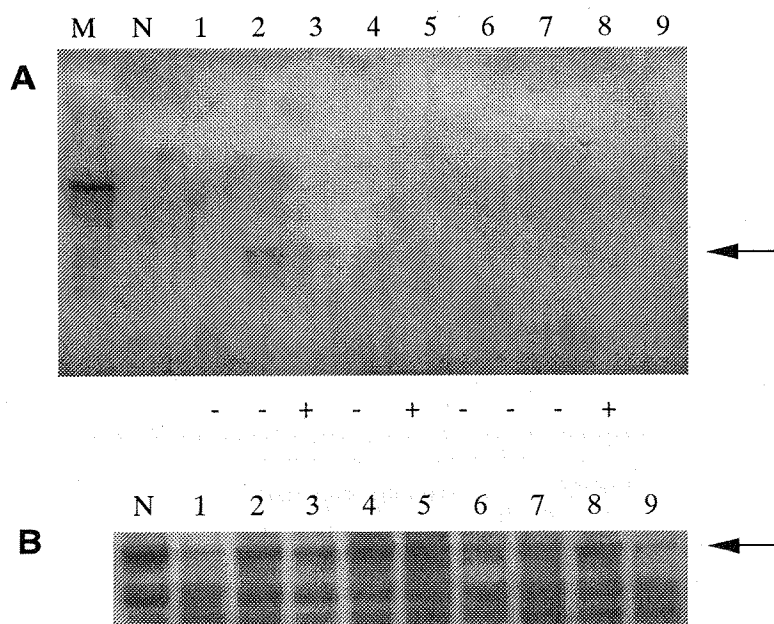


Fig. 3-2. Northern blot analysis of R₁ progenies of transgenic plants.

Total RNA was extracted from leaves before virus inoculation.

RNAs were hybridized with RNA-2 specific cDNA probe (A) or actin RNA probe (B). Lanes M and N are molecular marker and non transformed control plant, respectively. Lanes 1 to 4 are M1315M-1 plants and lanes 5 to 9 are 1315M-7 plants. Arrows indicate the positions of each mRNA. '+' and '-' indicate infected and not infected, respectively.

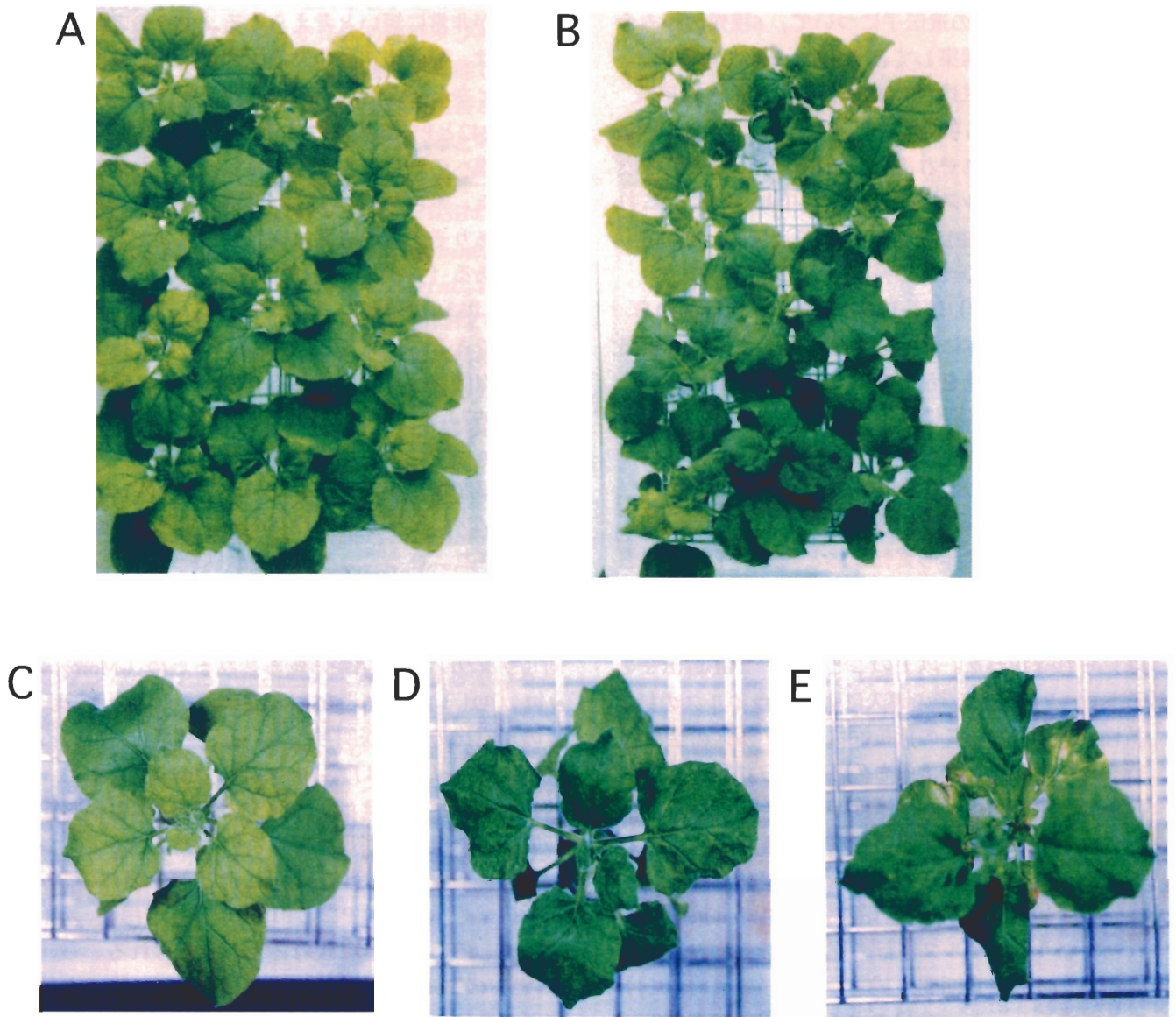


Plate 1. (A) Transgenic plants of M1315M-7 at 30 days after inoculation. (B) Nontransgenic control plants at 30 days after inoculation. (C) non inoculated plant. (D) Plant showing typical mosaic symptom. (E) Plant showing necrosis symptom.

論議

BNYVVのTGBの遺伝子について、6種類の組み合わせの遺伝子を構築して *N. benthamiana* に導入し、形質転換体の次世代 (R_1 世代) のウイルス抵抗性を汁液接種により検定した。P42, P13, P15, P42Sの各遺伝子をそれぞれ導入した植物は、非形質転換体と同様にウイルスに感染した (Table 3-2)。これに対して、P13とP15をつないだ遺伝子 (1315) を導入した植物の一部の系統 (M1315-2, 4, M1315M-1, 2, 7) は、P13の変異の有無に関わらず、非形質転換体に比べて上位葉でのウイルス検出率が低く、抵抗性を示した (Table 3-1, Table 3-2, Table 3-3)。個体別にみると、M1315-2とM1315-4の抵抗性は最も強く、1315M-1, 1315M-2および1315M-7の抵抗性は不安定であった (Table 3-1, Table 3-2, Table 3-3)。抵抗性が強く現れた系統でも、一部の個体は非形質転換体と同様ウイルスに感受性で、接種20日～30日後にはウイルスが検出される個体があった。接種葉でのウイルス増殖量には差は見られなかった。以上のことから、TGB遺伝子のうちP13とP15遺伝子の導入によってウイルスの抵抗性が獲得され、この抵抗性は、ウイルスの全身移行を遅らせることによるものと考えられる。抵抗性品種では主根のウイルス濃度が低く、細根から主根へのウイルスの移行が阻害されると考えられているが (Kaufmann *et al.*, 1992; Scholten *et al.*, 1994; Tamada *et al.*, 1999), 本研究で得られた抵抗性はこれと異なり、ウイルス移行の遅延である。 *N. benthamiana* の生育期間 (試験管への移植後約40日) を考慮すると、20～30日のウイルス移行の遅延は抵抗性として十分と考えられるが、テンサイにこの遺伝子を導入し発現させた場合に同様の現象が起こるかどうかわからない。

BNYVVのTGBの1番めのタンパク質P42は、核酸に結合する性質を持つ (Niesbach-Kloesgen *et al.*, 1990)。TGBの2番めのタンパク質P13は、そのN末端とC末端の16-20個のアミノ酸が疎水性である (Morozov *et al.*, 1991; Richards and Tamada, 1992)。この疎水性の領域は、'GXY(R/K)DG(T/S)(R/K)'モチーフを含む親水性のセグメントによって仕切られている (Morozov *et al.*, 1991; Richards and Tamada, 1992)。TGBの3番めのタンパク質P15は、疎水性の高いタンパク質である。P13とP42は感染植物の膜成分を含む画分から検出されるが、P15は細胞のどの画分から検出されず (Niesbach-Kloesgen *et al.*,

1990), P15は、発現量が非常に少ないあるいは発現時期が非常に短いと考えられる。P42のアミノ酸配列には、膜と親和性のある配列は見あたらない。このことからP13のC末端とN末端の疎水性の高い領域は、P42とP15との複合体を形成するのに都合がよく、膜への結合に大きく寄与していると想像される。また、3つのタンパク質の間には特異的な相互作用がありその機能または安定性に重要であるとの報告がある (Lauber *et al.*, 1998)。

P42とP13の発現は、それぞれ独立して相補することができるが、P15を過剰に発現させるとウイルスの細胞間移行が阻害される (Bleykasten-Grosshans *et al.*, 1997)。すなわち、TGBのうちのP15遺伝子の "replicon" (P15遺伝子のみが転写されるように設計した転写産物) を正常のRNA-1およびRNA-2と混合してキノアに接種したときにのみ、ウイルスの増殖が阻害され、さらに、P15の変異は野生型のウイルスに complement されなかった (Bleykasten-Grosshans *et al.*, 1997)。この現象には、P13とP15の遺伝子が同じサブゲノムRNAから転写されるため (Morozov *et al.*, 1991; Bleykasten-Grosshans *et al.*, 1997), 両者の相対比の制御が関与していると考えられている (Lauber *et al.*, 1998)。Bleykasten-Grosshans *et al.* (1997) の結果に従えば、本研究で、P15単独の形質転換により抵抗性が現れてもよいはずである。しかし、P13とP15の複合体を導入した形質転換体のみが抵抗性を示した。P13とP15との相互作用は、*cis* に発現しているときに現れるとも考えられる。BNYVVのTGBの3つのタンパク質の間には強い相互作用があるので (Lauber *et al.*, 1998), 3つのTGB遺伝子すべてを導入した形質転換体についても検討が必要である。

移行タンパク質遺伝子を導入した形質転換植物のウイルス抵抗性は、いくつかのRNAウイルスについて報告されている。Malysenko *et al.* (1993) およびLapidot *et al.* (1993) はTMVの変異30kタンパク質遺伝子で、Beck *et al.* (1994) は、White clover mosaic virus (WCIMV) のTGBの2番めの遺伝子13kの変異遺伝子で、Seppanen *et al.* (1997) は、Potato virus X (PVX) の2番めの遺伝子12kの変異遺伝子の導入により、ウイルス抵抗性植物を得ている。さらに、変異移行タンパク質を発現する形質転換植物は、異なるいくつかのウイルスに対して抵抗性を示した (Lapidot *et al.*, 1993; Beck *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1995; Seppanen *et al.*, 1997)。これらの形質

転換植物がなぜウイルス抵抗性を示すのかは正確には解明されていないが、変異体の移行タンパク質も野生型の移行タンパク質とほぼ同様に機能して競合が起こり、全身へのウイルスの移行が阻害され、タンパク質レベルで抵抗性が起こっていると考えられている (Lapidot *et al.*, 1993 ; Seppanen *et al.*, 1997) 。実際、WCIMVおよびPVXでは、TGBの野生型の2番めと3番めの遺伝子を発現する *N. benthamiana* はウイルスに感受性であった (Beck *et al.*, 1994 ; Seppanen *et al.*, 1997) 。TMVの場合も同様に、野生型の移行タンパク質を導入した形質転換植物は抵抗性を示さず、むしろ、変異をもつ移行タンパク質を complement した (Lapidot *et al.*, 1993 ; Cooper *et al.*, 1995) 。しかし、BNYVVでは、野生型の遺伝子 M1315でもウイルスに対する抵抗性を示した (Table 3-1, Table 3-2, Table 3-3) 。また、WCIMVのTGBの3番めのタンパク質 P7, PVXのTGBの3番めのタンパク質 P8は抵抗性に関わっていないが (Beck *et al.*, 1994 ; Seppanen *et al.*, 1997) , BNYVVでは、3番めのタンパク質 P15が抵抗性に大きく関与していると考えられる。なぜこのような違いがあるのかは不明である。Hobbs *et al.* (1993) が示したようなジェンサイレンシングによるトランスジーンの不活化、すなわちトランスジーンの転写後抑制が起こっている場合も考えられる。本研究で得られた BNYVVのTGBによる抵抗性については、さらに、詳細な解析が必要である。

第5章 遺伝子診断

第1節 ジゴキシゲニン標識法によるウイルスRNAの検出

目的

テンサイそう根病は、土壤中に存在する菌 *Polymyxa betae* によって媒介される土壤伝染性病害のため、防除対策上、圃場の土壌診断が重要である。この診断により発病圃場の早期発見、病土対策、抵抗性品種作付の指導が行われる。BNYVVがテンサイの根に感染すると、ウイルスは根に局在し葉に移行しないため、肉眼によるウイルスの診断は非常に困難である。地上部の黄化症状がそう根病の特徴であるが、他の病害、生理障害との区別が付きにくいので正確なウイルスの診断はELISA法によって行われている。その場合、テンサイ細根をサンプルとして検定する手法が一般的に用いられている。また、捕捉植物を用い、その根をELISA検定する土壌診断法が開発されている（内野ら、1990；阿部ら、1991）。

一方、BNYVVには通常4種類のRNA、ウイルス分離株によっては5種類のRNAを含み、これらのRNAは、それぞれ異なった機能を持っている。特に、病原性に関与するRNA-3とRNA-5は抵抗性品種に異なった病原性を示し、そう根病抵抗性品種においてその違いが顕著であり（Tamada *et al.*, 1990；1996a），RNA-5を含む分離株は通常の4種類のRNAのみを含む分離株よりさらに強い病原性をもつ（Tamada *et al.*, 1996a）。また、機械的に接種した室内分離株からは、時々これらのRNAの欠失変異が出現する（Richards and Tamada, 1992）。以上のことから、RNA種の検出は実用上からもきわめて重要である。ELISA法ではこのようなウイルスRNAを区別することができないので、各RNAを検出するためには遺伝子診断法の開発が必要である。ウイルスの遺伝子診断には主としてハイブリダイゼーション法とPCR法があるが、本節では、非放射性的ジゴキシゲニン標識によるウイルスRNAの検出条件を検討した。

材料および方法

1) ウイルス分離株

BNYVV室内分離株S-0（RNA-1+2），S-3（RNA-1+2+3），S-4（RNA-1+2+4），S-34（RNA-1+2+3+4），D-5（RNA-1+2+5）およびD-5a（RNA-1+2+5a）を用いた。これらの分離株は、ツルナ接種

葉での局部病斑分離によって野外分離株SまたはDから得られた分離株である（Tamada *et al.*, 1989）。また、12の野外分離株をウイルス保有 *Polymyxa betae* を用いてテンサイの根に接種し、根からのウイルスRNAの検出に用いた。また、これらの野外分離株をツルナに接種して葉からのウイルスRNAの検出に用いた。

2) ウイルスの純化とRNAの抽出

第3章第1節に述べた方法に従って、ウイルスを純化し、RNAを抽出した。

3) RNAのゲル電気泳動

部分純化ウイルスから抽出したRNAをアガロースゲル電気泳動して、分離株のRNA組成、RNAの分子量等を調べた（Tamada *et al.*, 1989）。

4) 標識

cDNAクローンを含むプラスミドDNA（3 μ g）をジゴキシゲニン（digoxigenin (DIG)-11-dUTP, Boehringer Mannheim）を用いてランダムプライム法（Feinberg and Vogelstein, 1983；1984）により標識した。cDNAクローンは、RNA-1由来のpMSD49，RNA-2由来のpMSD25，RNA-3由来のpMSC8，RNA-4由来のpMSD96，RNA-5由来のpMSD514を用いた（Fig.4-1）。

5) ノーザン・ブロッティング

RNAは、部分純化ウイルスあるいは植物組織から調製した。Maniatis *et al.*（1982）に従って電気泳動を行い、ニトロセルロース・メンブレンに転写した（Saito *et al.*, 1997）。すなわち、RNAをホルマリン・ホルムアミド（50%ホルムアミド，6%フォルムアルデヒド，20mM MOPS（20mM モルフォリノ・プロパン・スルホン酸，5mM 酢酸ナトリウム，0.5mM EDTA- Na_2 ，pH7.0），55℃で15分）で変性して1.5%アガロースゲル電気泳動し，20 $\times$ SSC（3M 塩化ナトリウム，0.3M クエン酸ナトリウム）を用いて一晩ニトロセルロース・メンブレン上に移し，真空オーブン中で80℃で2時間固定した。

6) ドット・ブロッティング

RNAを70℃で10分処理して水中で急冷して熱変性

し、ニトロセルロース・メンブレンにスポットし、真空オープン中で80°C2時間 固定した。通常、1 μ lをスポットした。

7) ハイブリダイゼーション

DIG labeling and detection kit nonradioactive (Boehringer Mannheim) に従って、プレハイブリダイゼーションをプレハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド, 5 $\times$ SSC (1 $\times$ SSC:0.3M塩化ナトリウム, 0.03Mクエン酸ナトリウム, 10mMリン酸ナトリウム, 5 $\times$ デンハルト溶液 (1 $\times$ デンハルト溶液:0.02%フィコル, 0.02%ポリヴィニルピロリドン, 0.02%BSA), 250 μ g/mlシン精子DNA) 中で42°C, 4時間, ハイブリダイゼーションをハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド, 4 $\times$ SSC, 10mMリン酸ナトリウム, 1 $\times$ デンハルト溶液, 200 μ g/mlニシン精子DNA, 0.1 μ g/ml プローブ) 中で42°C, 一晩行った。

8) 発色による検出

ハイブリダイゼーション後、メンブレンを洗浄し (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS 中, 室温, 5分2回; 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS 中, 42°C, 10分3回), 抗ジゴキシゲニン抗体・アルカリリンフォスファターゼ・コンジュゲート溶液中で30分間インキュベートした。これを0.05%トライトンX-100を含むAP7.5 (100mM トリス塩酸, 150mM 塩化ナトリウム, pH7.5) で洗浄し, 1mlのAP9.5 (100mM トリス塩酸, 100mM 塩化ナトリウム, 50mM 塩化マグネシウム, pH9.5) あたり4.5 μ lのNBT(nitro blue tetrazolium) 溶液 (75mg/ml 70%DMF (ジメチルホルムアミド)) と3.5 μ lのBCIP(5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate) 溶液 (50mg/ml DMF) を加えて発色させた。

9) サンプルの調製

植物組織からは、TSバッファー (Habibi *et al.*, 1987) を用いる方法で核酸を調製した。すなわち、約50~100mgの葉または根を1.5mlのマイクロテストチューブに入れ、0.4mlのTSバッファー (50mM トリス, 2%SDS, pH7.5) 中で磨砕し、フェノール抽出 (水飽和フェノール), クロロホルム抽出, エタノール沈澱を行い, 0.1mMEDTA-Na₂に溶解した (組織1mgあたり1 μ l)。ノーザン・ブロッティングおよびRT-PCRでは、部分純化ウイルス溶液からもTSバッファーを用いる方法で核酸を調製した。

すなわち、部分純化ウイルス溶液に終濃度が TS バッファーと同じになるようにトリス塩酸 (pH7.5) とSDSを加えて混ぜ、植物組織と同様にフェノール抽出 (水飽和フェノール), クロロホルム抽出, エタノール沈澱を行い, 0.1mMEDTA-Na₂に溶解した (葉1mgあたり1 μ l, 根1mgあたり0.25 μ l)。

結果

1) ノーザン・プロット・ハイブリダイゼーションによる検出

pMSD49, pMSD25, pMSC8, pMSD96, pMSD514の各cDNAクローンを digoxigenin(DIG)-dUTPを用いてランダムプライマー法により標識し、プローブとして用いた (Fig. 4-1)。BNYVV分離株のRNAを検出するため、5つのプローブを混合してノーザン・プロット・ハイブリダイゼーションを行った結果、RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4, RNA-5に相当する位置に強いシグナルが検出された (Fig. 4-2A)。室内分離株S-34, S-3, S-4, D-5, D-5a, S-0のRNA組成とRNAの大きさは、アガロースゲル電気泳動による解析の結果と一致していた。さらにそれぞれのクローンをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った結果、各プローブは、RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4, RNA-5とそれぞれ強く反応し、他のRNAとは反応せず、BNYVVの5種類のRNAをそれぞれのジゴキシゲニン標識 cDNA プローブにより、特異的に検出できた (Fig. 4-2B)。各RNAの比率は正確には見積もっていないが、5つのRNAの混合で1~10ng, ツルナの葉の全核酸で1~0.1mgのときに、検出に十分なシグナルが得られた。

プローブの特異性を調べるため、分離株 S-34とD-5の混合RNAの量を過剰にして、RNA-3, RNA-4, RNA-5のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った (Fig. 4-3A)。RNA-3のプローブにより、RNA-4とRNA-5に相当する位置に弱いバンドが検出された (Fig. 4-3A)。同様にRNA-4あるいはRNA-5のプローブでもRNA-3とわずかに反応した (Fig. 4-3A)。100ngのRNAを用いると、ブロードなバンドが検出された (Fig. 4-3A)。これは、クロス・ハイブリダイゼーションしたことを示している。このように、各RNAは、ホモログなRNAに強いシグナルを示したが、10ngより多いRNAを用いると、ヘテログなRNAにもシグナルを示した (Fig. 4-3A)。

RNA-3, RNA-4, RNA-5では、3'末端部分の約200

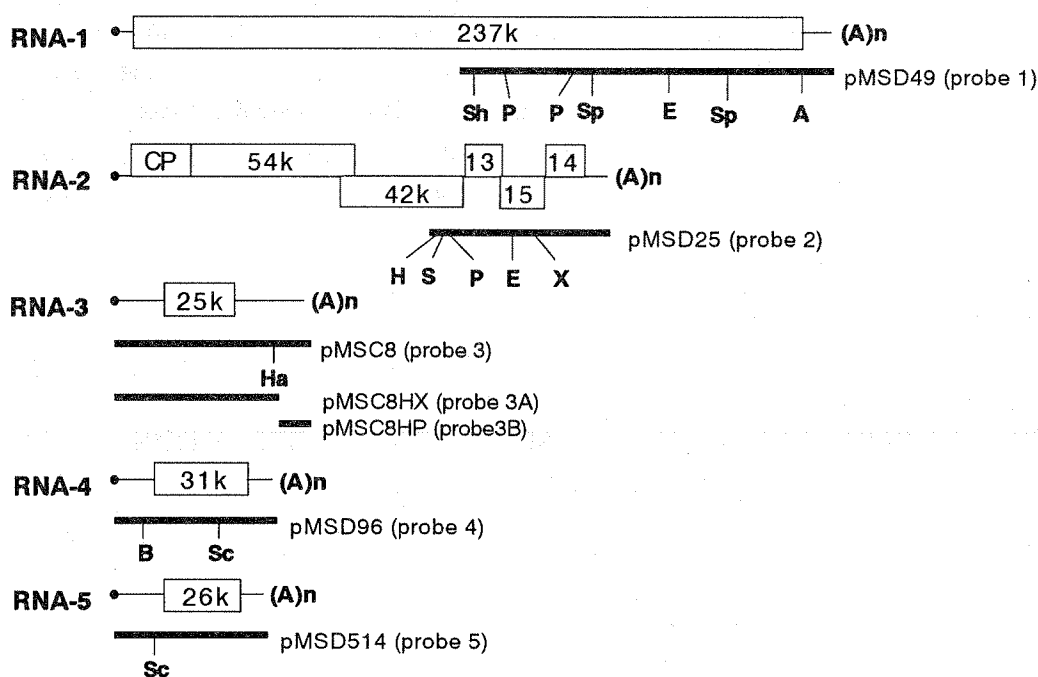


Fig. 4-1. Genetic map of the genome of BNYVV and the location of cDNA fragments used as probes for the detection of the RNAs. The boxes indicate the open reading frames. The solid circles indicate the cap structures at the 5' end; (A)n indicates the poly (A) tails at the 3' end; and CP indicates coat protein. The cloned cDNA inserts used as probes are represented as the thick lines and their names are shown at right side in the parentheses. The vertical bars below the lines indicate the restriction enzyme sites. The following enzymes were used: A *Acc* I; B *Bam* HI; E *Eco* RI; H *Hin* cII; Ha *Hap* II; P *Pma* CI; S *Sac* I; Sc *Sca* I; Sh *Sph* I; Sp *Spe* I; X *Xba* I.

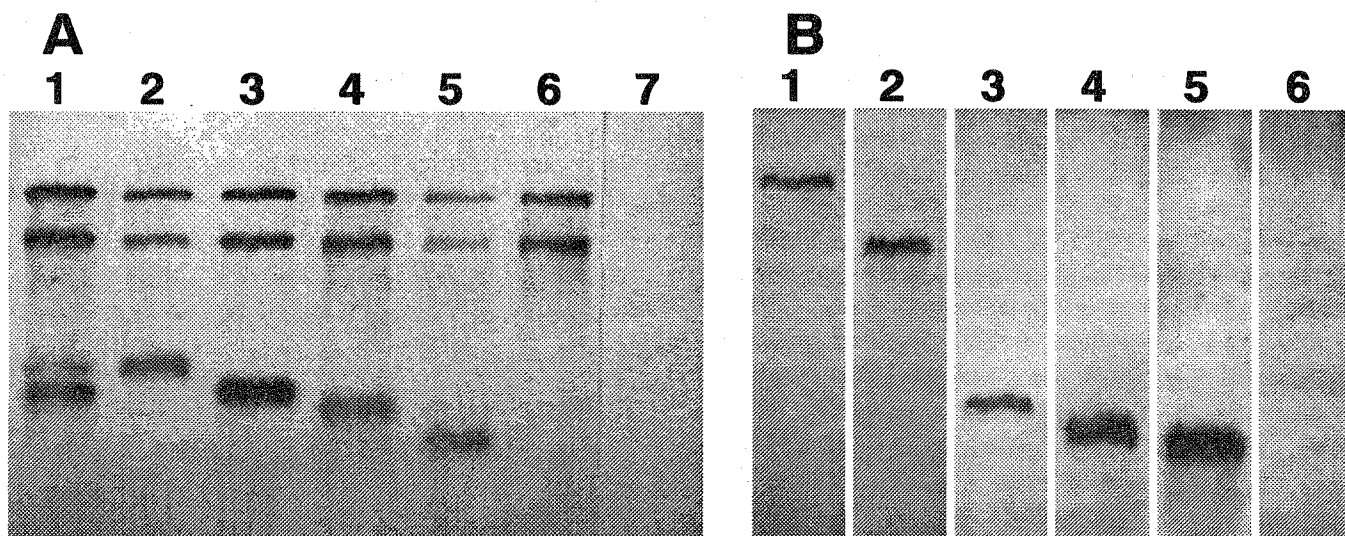


Fig. 4-2. (A) Northern blot hybridization for the detection of BNYVV RNAs of laboratory isolates containing different RNA components. The virus isolates used were S-34 (lane 1), S-3 (lane 2), S-4 (lane 3), D-5 (lane 4), D-6 (lane 5), S-0 (lane 6) and non-inoculated control sample (lane 7), each of which was hybridized with a mixture of five probes (probes 1 to 5). The RNA was prepared from partially purified virus particles of each BNYVV isolate. (B) Northern blot hybridization for the detection of each BNYVV RNA in samples containing a mixture of five RNAs (RNAs 1 to 5). The RNA samples were obtained from a mixture of isolates S-3, S-4 and D-5, which were hybridized with the probe 1 (lane 1), probe 2 (lane 2), probe 3 (lane 3), probe 4 (lane 4), probe 5 (lane 5) or non-labeled probe (lane 6). The RNAs were prepared from partially purified particles.

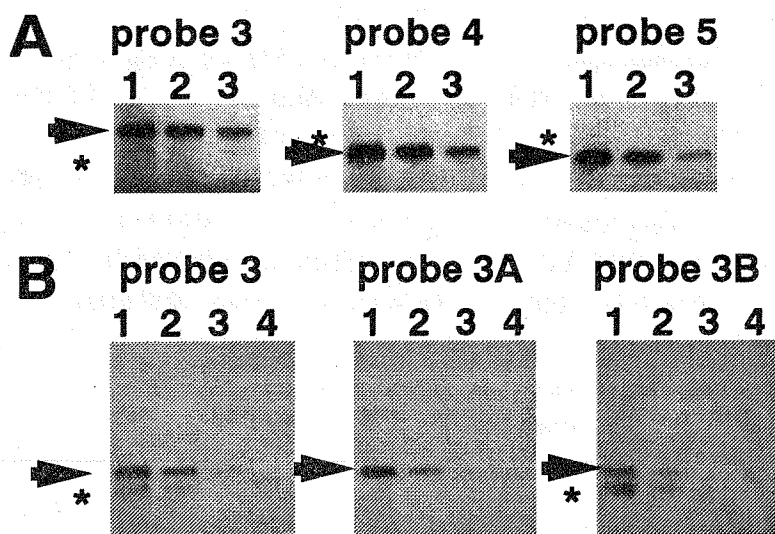


Fig. 4-3. Specificity of the probes for the detection of BNYVV RNAs by Northern blot hybridization. The RNA samples containing five RNAs (RNAs 1 to 5) were obtained from a mixture of isolates S-3, S-4 and D-5. The RNAs were prepared from partially purified particles. The arrowheads indicate the homologous signal and the asterisks indicate the cross-hybridized signal. (A) Each of probes 3, 4 and 5 was hybridized with total RNAs of 20 ng (lane 1), 10 ng (lane 2) and 5 ng (lane 3). (B) Each of probes 3, 3A and 3B was hybridized with total RNAs of 100 ng (lane 1), 10 ng (lane 2) and 1 ng (lane 3).

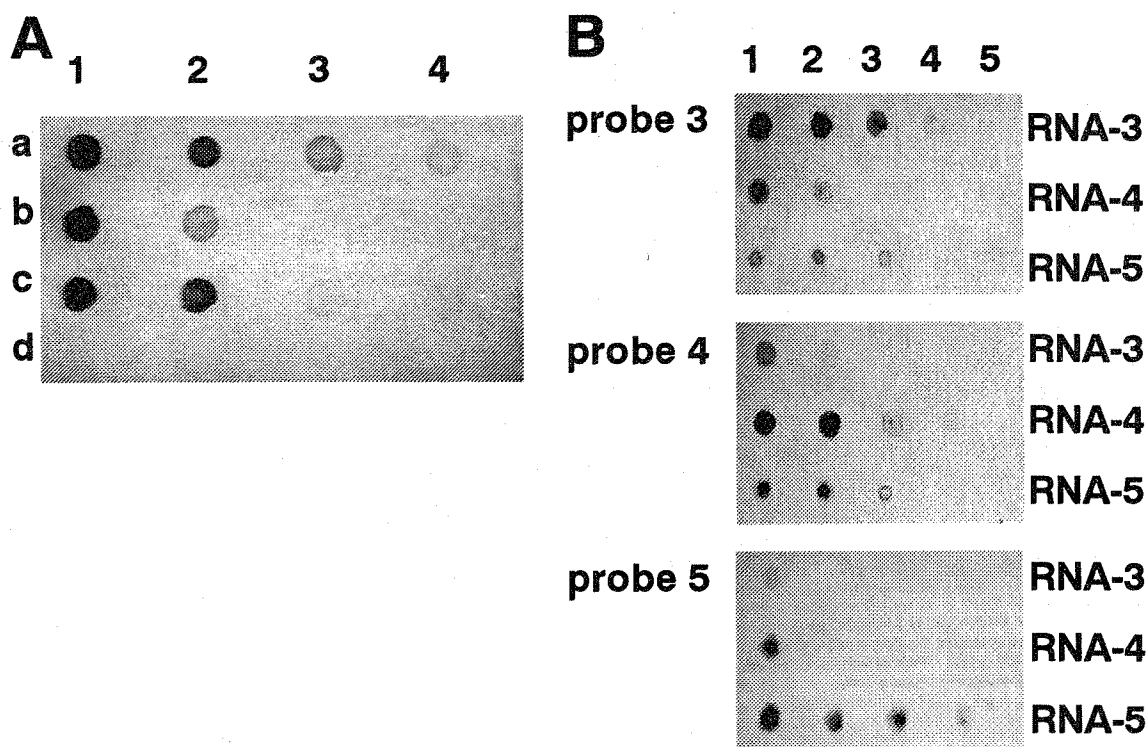


Fig. 4-4. (A) Detection of BNYVV by dot blot hybridization in isolates containing different RNA components. BNYVV isolates S-34 (a), S-3 (b) and S-0 (c), and *Tobacco mosaic virus* (d) were used as samples. The RNA amounts of 10 ng (lane 1), 1 ng (lane 2), 0.1 ng (lane 3) and 0.01 ng (lane 4) were blotted on the membranes and were hybridized with a mixture of four probes (probes 1 to 4). (B) Specificity and sensitivity of dot blot hybridization for the detection of RNAs 3, 4 and 5. RNAs 3, 4 and 5 prepared by eluting from agarose gel were sampled from isolates S-3, S-4 and D-5, respectively. The RNA amounts of 100 ng (lane 1), 10 ng (lane 2), 1 ng (lane 3), 0.1 ng (lane 4) and 0.01 ng (lane 5) were blotted on the membranes and hybridized with probe 3, probe 4 and probe 5.

塩基に高い相同性がみられる (Bouzoubaa *et al.*, 1985; Kiguchi *et al.*, 1996)。そこで、この相同領域を除いたプローブと相同性の高い領域を含むプローブとを作成した。すなわち、pMSC8を*Xba* Iと*Pst* Iで切断して切り出したインサートを*Hap* IIで切断して得られた2つのクローンpMSC8HX (5'側を含む)とpMSC8HP (3'側を含む)をジゴキシゲニン標識し、プローブ3Aと3Bとした (Fig. 4-1)。プローブ3Bは、大きさが約270bpで、RNA-3の3'末端領域を含み、プローブ3Aは3'末端の塩基配列の相同領域を全く含んでいない (Fig. 4-1)。ハイブリダイゼーションの結果、プローブ3AはRNA-3とのみハイブリダイズし、RNA-4、RNA-5とはハイブリダイズしなかった (Fig. 4-3B)。しかし、プローブ3Bは、RNA-3、RNA-4、RNA-5とハイブリダイズした (Fig. 4-3B)。さらに、プローブ3Bでは、RNA-1とRNA-2に相当する部分にも弱いバンドが検出された (Fig. 4-3B)。

2) ドット・プロット・ハイブリダイゼーション

ドット・プロット・ハイブリダイゼーションにより、検出感度を調べた。RNA-1、RNA-2、RNA-3、RNA-4のプローブを混合して用いた。ウイルス RNA を分離株S-34、S-3、S-0からそれぞれ調製し、段階希釈を作ってニトロセルロースフィルターにスポットした。どの分離株のRNAでも、100pg以上のRNAで、シグナルが得られた (Fig. 4-4A)。TMVから調製したRNAや水からは、シグナルは検出されなかった (Fig. 4-4A)。

さらに感度と特異性を調べるため、RNA-3、RNA-4、RNA-5をアガロースゲルから溶出して段階希釈し、ニトロセルロース膜にスポットし、プローブ3、プローブ4、プローブ5を用いてドット・プロット・ハイブリダイゼーションを行った (Fig. 4-4B)。各プローブは、100pg (RNA-5では1ng) 以下のRNAで、特異的なシグナルを示した (Fig. 4-4B)。しかし、1ng (RNA-5では10ng) 以上のRNAを用いると、シグナルは弱いですが、クロス・ハイブリダイゼーションが起こった (Fig. 4-4B)。RNAの検出限界は、10pgであった (Fig. 4-4B)。

3) BNYVの野外分離株からのRNA-3、RNA-4、RNA-5の検出

BNYVVの野外分離株に含まれているRNA-3、RNA-4、RNA-5を検出、同定するため、ハイブリダ

イゼーションを行った (Fig. 4-5A)。全核酸をツルナの葉から抽出してハイブリダイゼーションに用いた。12の野外分離株のRNAは、ツルナの葉に5回の機械的接種の後に得られた葉から調製した。それぞれのプローブで、正常の大きさのRNAに加えていくつかの分離株で小さなRNAのシグナルも見られた (Fig. 4-5A)。これは、変異RNA-3、RNA-4、RNA-5が含まれていたことを示している。また、5つの分離株にRNA-5が含まれていることがわかった (Fig. 4-5A)。

同様にテンサイの根から調製した核酸を用いてノーザン・プロット・ハイブリダイゼーションを行った。その結果、シグナルは、ほとんどあるいは全く得られず、時々、非特異的なシグナルがみられた。ELISAで調べた結果、根でのウイルス量は葉の1/10~1/100であったので、テンサイの根からウイルスを部分純化により濃縮し、RNAを調製した。その結果、強いシグナルが得られ、ウイルス RNAが検出された (Fig. 4-5B)。Polymyxa betaeを用いてテンサイで増殖した分離株からウイルス RNAが検出され、健全の根からはシグナルは得られなかった。

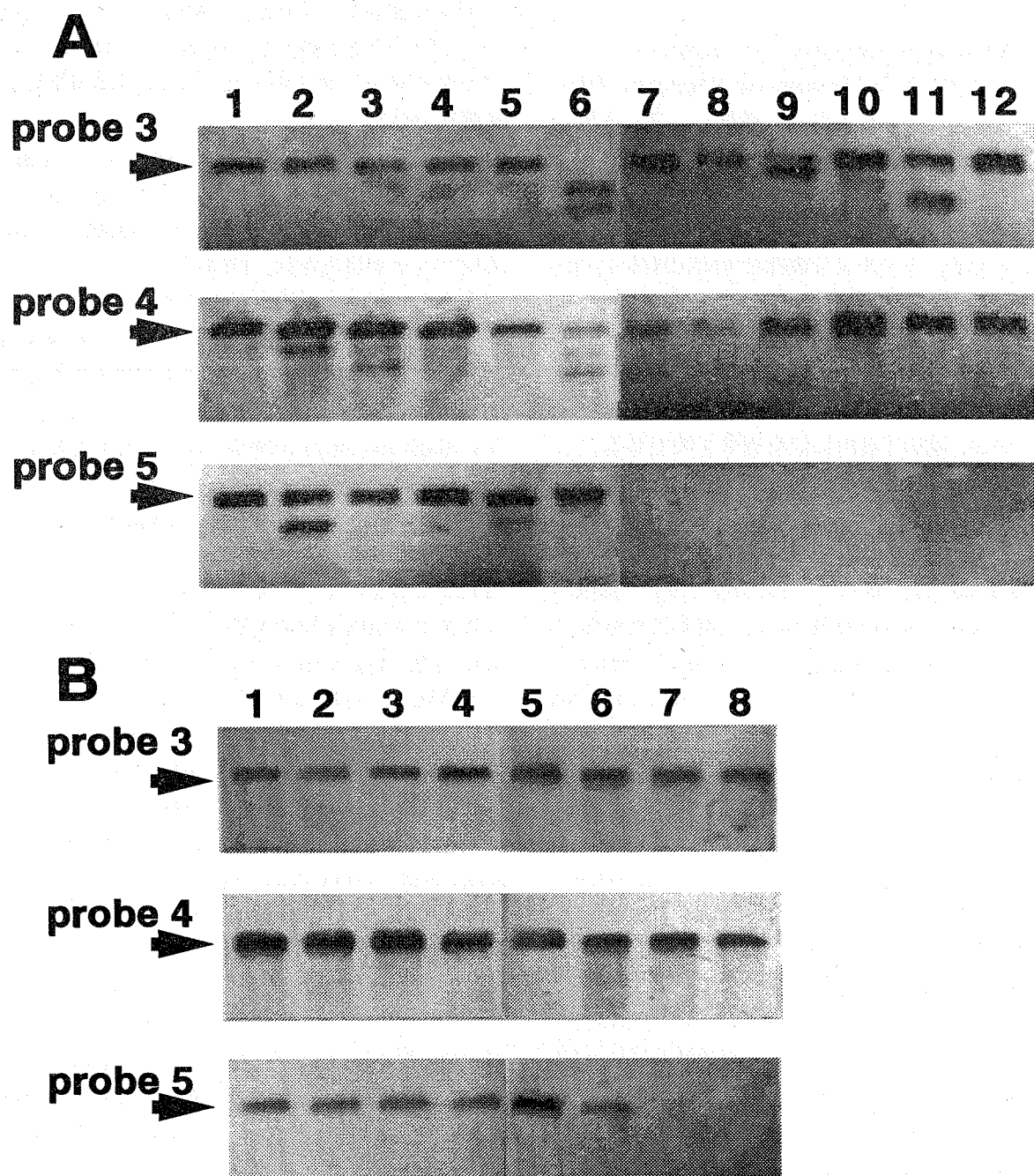


Fig. 4-5. Detection of RNAs 3, 4 and 5 of BNYVV field isolates by Northern blot hybridization. Each of three probes (probe 3, 4 and 5) was used. The arrowheads indicate the positions of individual normal-sized RNAs. (A) Total nucleic acids were extracted from crude extracts of inoculated leaves of *T. expansa* after fifth serial passages. Lanes 1 to 12 indicate different BNYVV isolates. (B) The RNAs were prepared from partially purified preparations of root of sugarbeet seedlings. Detection of RNAs 3, 4 and 5 of BNYVV field isolates by Northern blot hybridization in roots of sugarbeet seedlings inoculated by *P. betae*. Lanes 1 to 8 indicate different BNYVV field isolates.

論議

BNYVV RNAから得られた5種のcDNAクローンをランダムプライム法 (Feinberg and Vogenstein, 1983 ; 1984) によりジゴキシゲニン標識し、ウイルスRNAを検出する方法を検討した。BNYVV RNAは、これらのcDNAプローブを用いてノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより簡便に検出、同定でき、ウイルス分離株のRNAの解析に用いることができた (Fig 4-2B, Fig 4-5A, Fig 4-5B)。非放射性標識プローブは、安全性、安定性、検出時間の短さから、日常の診断に有用である。また、BNYVVの5種類のウイルスRNAを特異的に検出できることから、遺伝子診断には有効な手段である。RNA-3とRNA-5はテンサイの根での病徴発現に強く関わっており (Tamada *et al.*, 1990 ; 1996a), RNA-4は *Polymyxa betae* による効率的な伝搬に必須である (Tamada and Abe, 1989)。検定植物ツルナへ機械的に汁液接種した室内分離株からは、時々これらのRNAの欠失変異が出現する (Tamada *et al.*, 1989 ; Richards and Tamada, 1992)。このように小さいRNA種や変異を検出することはウイルスの遺伝子解析において必要不可欠である。

プローブ3Bは、RNA-3, RNA-4, RNA-5とハイブリダイズし、RNA-1とRNA-2に相当する部分にも弱いバンドが検出された (Fig. 4-5)。このようなクロス・ハイブリダイゼーションは、3'末端領域の約200塩基の塩基配列の相同性 (約70%) によるものと考えらる。Robinson and Romeo (1991) は、*Luteovirus* の検出ではプローブの部位が検出の特異性に影響を及ぼし、外被タンパク質領域をプローブとした場合には血清学的関係と一致したことを報告しており、プローブの部位は特異性・検出感度に重要な因子である。

迅速で簡便なRNAの検出には、一般に、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションよりドット・ブロット・ハイブリダイゼーションの方が簡便で診断に適している (Miller and Martin, 1988)。しかし、本研究ではクロスハイブリダイゼーションが起こり (Fig. 4-4B)、非特異的な反応が生じるため、ドット・ブロット・ハイブリダイゼーションはRNA種の検出に適當ではなかった。BNYVVでは、欠失変異RNAも検出されるので、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションが有用であった。

Unger *et al.* (1988) は、血清型の異なる bluetongue virus の検出法としてドット・ブロット・ハイブリダ

イゼーションとノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションとを比較し、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションを行うことにより非特異反応の影響を避けた。

BNYVVのツルナ感染葉から直接抽出した核酸からハイブリダイゼーションのシグナルが得られたが、テンサイの根から直接調製した核酸からは非特異的バンドが検出され、目的とするバンドはかすかであるか、ほとんど検出されなかった。これは、テンサイの根のウイルス量が少ないのが大きな要因であると考えられるが、ハイブリダイゼーションでの阻害物質も報告されている (Borja and Ponz, 1992)。Singh and Singh (1995) は、阻害物質を除くために検出に適した核酸調製法を検討している。また、Roy *et al.* (1988) は、植物組織の抽出物を塩化リチウム沈澱により部分精製することにより非特異的な反応を抑えている。本研究では、部分純化ウイルスから核酸を調製することにより、検出が可能になった (Fig. 4-5B)。

本研究で得られたドット・ブロット・ハイブリダイゼーションでのウイルスRNAの検出感度は10pgで、日常的な検出には十分な感度であった。この感度は、放射性標識、非放射性標識による植物RNAウイルス、ウイロイドで報告されている感度 (Forster *et al.*, 1985 ; Habili *et al.*, 1987 ; Kummert, 1993 ; Fenby *et al.*, 1995 ; Singh and Singh, 1995 ; Wesley *et al.*, 1996) と同等か、少し劣った。Kummert (1993) は、BNYVVをジゴキシゲニン標識法でドット・ブロット・ハイブリダイゼーションにより検出し、75-200pg ウイルス、0.4-10pg RNAの検出感度を得ている。この感度は、本研究で得られたものと同程度以上である。BNYVVは、*P. betae* によって伝搬された場合、根でのウイルス量は通常少なく、ウイルスは細根や主根の一部に局在するので、ELISAによって根のウイルス量を見積もってからウイルスを濃縮、あるいは部分純化し、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより調べる方がよい。本研究では、1~10ngのRNAで十分な結果が得られた。これは、ウイルスが5%の核酸を含むとした場合、20~200ngウイルスに相当する。この感度は日常的な診断には十分であるが、テンサイの根からウイルスRNAを検出する場合、ウイルスの部分純化を要する手法では、複雑で手間がかかり、多サンプルを検定することができないので、さらに簡便で直接的な手法の開発が必要である。

第2節 RT-PCR法によるウイルスRNAの検出

目的

前節において、BNYVV RNAの検出法として、非放射性的ジゴキシゲニン標識法プローブを用いてハイブリダイゼーションにより検出する方法を開発した。しかし、この方法では、ハイブリダイゼーションには時間がかかること、テンサイの根を用いた場合非特異反応が生じウイルスの部分純化が必要なこと、多くのサンプルを処理することができないことなどいくつかの欠点が生じた。そこで、本節では、多サンプルの検定が可能でより簡便で感度の高い手法として、RT-PCRによる検出法を検討した。BNYVV RNA-3, RNA-4およびRNA-5を検出の対象とした。

材料および方法

1) ウイルス分離株

正常の長さのRNA種を含むBNYVVの野外分離株S (RNA-1+2+3+4+5), 室内分離株S-3 (RNA-1+2+3), S-4 (RNA-1+2+4), D-5 (RNA-1+2+5), RNA-3の欠失変異を含むBNYVV室内分離株S-3c (RNA-1+2+3c), K52-3 (RNA-1+2+3k), 5YS-4 (RNA-1+2+3y), RNA-3の欠失変異を含むBNYVV野外分離株T37 (RNA-1+2+3+3t+4+4t), T41 (RNA-1+2+3+3tt+4), H45 (RNA-1+2+3+3h+4), RNA-4の欠失変異を含むBNYVV室内分離株142 (RNA-1+2+4d), RNA-4の欠失変異を含むBNYVV野外分離株S58 (RNA-1+2+3+4+4t), RNA-5の欠失変異を含むBNYVV野外分離株S43 (RNA-1+2+3+4+5s) およびR83 (RNA-1+2+3+4+5r) を用いた。

2) 核酸の調製

プライマーの検討では、部分純化ウイルスから第5章第1節で述べた方法に従ってTSバッファーを用いる方法によりウイルスRNAを抽出した。

テンサイの根からの核酸の調製法の検討では、約5mgのテンサイ細根から、TSバッファーを用いる方法、市販のキットISOPLANT (ニッポンジーン) を用いる方法および市販のキットSepsGene (三光純薬) を用いる方法を比較した。TSバッファーを用いる方法では、核酸を細根1mgあたり1μlの滅菌水に溶解した (生重に対して希釈なし)。ISOPLANTは、プロトコル通り調製し、核酸を細根1mgあたり10μlの滅菌水に溶解した (生重に対して10倍希

釈)。SepsGeneでは、熱処理は行わなかったが、他はプロトコル通り調製し、核酸を細根1mgあたり10μlの滅菌水に溶解した (生重に対して10倍希釈)。

3) RT-PCR

ファーストストランド合成にはスーパースクリプトII (GIBCO-BRL) を用い、第3章に従ってRT-PCRを行った。プライマーの検討には、RNA-3に対して3A/3E, 3B/3D, 3C/3D, RNA-4に対して4A/4C, 4B/4C, RNA-5に対して5A/5C, 5B/5C, 5A/5D, 5B/5D, 核酸調製法の検討では、RNA-5の728-1035塩基を増幅する5E/5Fのプライマーの組み合わせを用いた (Fig. 2-1) : 3A (5'-TCTCTTTATTTATCACCAAC-3', nt 212-231), 3B (5'-cgaatTCATGGGTGATATATTA-3', RNA-3のnt 445-459の上流にEco RI 認識部位を付加, ミスマッチ塩基は小文字), 3C (5'-TCTTAGCACAAATGG-3', RNA-3のnt 528-542), 3D (5'-GTGATAACTCTAATC-3', RNA-3のnt 1099-1113に相補的), 3E (5'-TTTCACACCCAGTCAGTACA-3', RNA-3のnt 1716-1735に相補的), 4A (5'-CATGTATGCTTGATCAGCTT-3', RNA-4のnt 80-99), 4B (5'-ACAACCTAGTCGTGAACG-3', RNA-4のnt 647-663), 4C (5'-CCACTAATCGTGATA-3', RNA-4のnt 1214-1228に相補的), 5A (5'-TGACGTAAGTGGGGTGTAGG-3', RNA-5のnt 49-68), 5B (5'-ATGAAGATTAAGACTAT-3', RNA-5のnt 635-651), 5C (5'-TCATCCACAATCAT-3', RNA-5のnt 1121~1135に相補的), 5D (5'-CGTCACAAACGATCA-3', RNA-5のnt 1133-1147に相補的), 5E (5'-CCTCCTGTGTCTTCTTGGG-3', RNA-5のnt 728-746), 5F (5'-TCGGACTGCAACATGAAAGC-3', nt 1016-1035に相補的) (Fig. 2-1)。プライマーは3pmol用いた。

4) 土壌からのウイルスの分離と検定

土壌から、捕捉植物を用いる方法でウイルスを分離した (内野ら, 1990; 阿部ら, 1991)。土壌と石英砂とを1:4の割合で均一に混合して排出管付き特製試験管に詰め、テンサイ (スターヒル) の苗 (4週間) を移植し、25°C, 16時間照明のグロースキャビネット内で2週間育てた後の根を検定用サンプルとした。1つの土壌につき3本の苗を用いた。ELISAとの感度の比較では、ウイルス濃度の低い土 (So-4), ウイルス濃度の高い土 (Bi-6), 滅菌土 (健全

土)を用い、上記と同様に土と石英砂とを混合してテンサイ苗を移植し、5日ごとに根をサンプリングし、根を半分ずつに分け、それぞれをELISAとRT-PCRで検定した。

5) 圃場からの土壌の採取とRNA-5の検定

1994年～1995年に北海道内149地点のテンサイ圃場から土壌を採取した。RNA-5の検定には、捕捉植物を用いた土壌検診を行った。前項同様に、土壌にテンサイの苗を移植して2～3週間育て、根からSepaGeneを用いて核酸を調製し、RT-PCRを行った。プライマーは5B/5Dの組み合わせを用いた。

結果

1) プライマーの検討

プライマーの検討に用いたウイルス分離株は、S-3、S-3c、S-4、D-5である。各分離株から抽出したRNAに対して最適なプライマーの組み合わせを見つけるために実験を行った。

RNA-3に対しては、上流プライマー3A、3Bおよび3C、下流プライマー3Dおよび3Eの5種類のプライマーを設定した(Fig. 2-1)。3A/3E、3B/3D、3C/3Dのプライマーの組み合わせで、正常のRNA-3および欠失RNA-3(RNA-3c、725～1087欠失)が増幅された(Fig. 5-1A)。3A/3Eおよび3C/3Dのプライマーでは全長のRNA-3の他に短いバンドが検出されたが、RNA-3cについては、期待される大きさのバンドのみが検出された。3B/3Dでは全長のRNA-3および欠失RNA-3のいずれも期待される大きさのバンドのみが検出された。また、どのプライマーの組み合わせでも、RNA-4(S-4)、RNA-5(D-5)を含む分離株のRNAは増幅されなかった。RNA-3の検出には、これらの3つのプライマーの組み合わせの中では、3B/3Dが最も適していた。

RNA-4に対しては、上流プライマー4Aおよび4B、下流プライマー4Cの3つのプライマーを設定した(Fig. 2-1)。4A/4C、4B/4Cのプライマーの組み合わせで期待されるPCR産物の大きさは、それぞれ1149bp、581bpである。4B/4Cでは、S-4分離株から目的とする大きさのPCR産物が得られたが、蒸留水のみでも非特異的な短いバンドが検出された(Fig. 5-1B)。4A/4Cでは、蒸留水のみではバンドは検出されなかったが、目的以外のDNAが増幅され、目的とするDNAの増幅量は極端に少なく、また、RNA-4を含まない分離株(S-3、D-5)にもバンドが検出

された(Fig. 5-1B)。これらの非特異的なバンドの由来を調べるためRNA-4のcDNAクローンpMSD96をジゴキシゲニン標識プローブとしてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを行ったところ、期待される大きさのシグナルのみが検出された。RNA-4の検出には、プライマー4B/4Cの方が4A/4Cより適していた。

RNA-5に対しては、上流プライマー5Aおよび5B、下流プライマー5Cの3つのプライマーを設定した(Fig. 2-1)。5A/5C、5B/5Cプライマーを用いたところ、いずれのプライマーでも、RNA-5のcDNA(pMSD514)は増幅されたが、他のウイルスRNAは増幅されなかった。そこで、5Cより12塩基下流プライマー5Dを設定した(Fig. 2-1)。5A/5D、5B/5Dプライマーで期待されるPCR産物の大きさは、それぞれ1103bp、516bpである。5A/5Dでは、目的とする大きさの他に短いバンドが検出され、蒸留水のみでもバンドが検出された(Fig. 5-1C)。これは、プライマーの高次構造によるものと考えられた。5B/5Dでは、目的とする大きさのPCR産物のみが検出され、RNA-5を含まない分離株(S-3、S-4)のRNAは増幅されなかった(Fig. 5-1C)。RNA-5の検出には、特異性から見てプライマー5B/5Dの方が5A/5Dより適していた。

2) 検出感度

3B/3Dのプライマーを用いて、S-3分離株の部分純化ウイルスから調製したRNA 1ng、100pg、10pg、1pgおよび100fgについてRT-PCRを行ったところ、1pgのBNYVV RNAに含まれるRNA-3を検出することができた(Fig. 5-2A)。サイクル数を35回から45回にするとバンドは濃くなったが、いずれのサイクル数でも100fgのRNAは検出されなかった(Fig. 5-2A)。

次に、正常のRNA-3と欠失したRNA-3(RNA-3c)とが混在しているときにそれぞれのRNAを検出できるかどうかを調べた(Fig. 5-2B)。プライマーの組み合わせは3B/3Dを用いた。RNAの量は、各分離株のアガロースゲル電気泳動でのバンドの濃さから相対比を計算しRNA-3、RNA-3cの量を算出した。

RNA-3の量を5ng(S-3分離株のRNAを10ng)と一定にし、混合するRNA-3cの量を変えた場合はRNA-3cを0.1ngまで検出することができた(Fig. 5-2B)。

RNA-3cの量を2.5ng(S-3c分離株のRNAを10ng)と一定にし、混合するS-3 RNAの量を変えた場合は

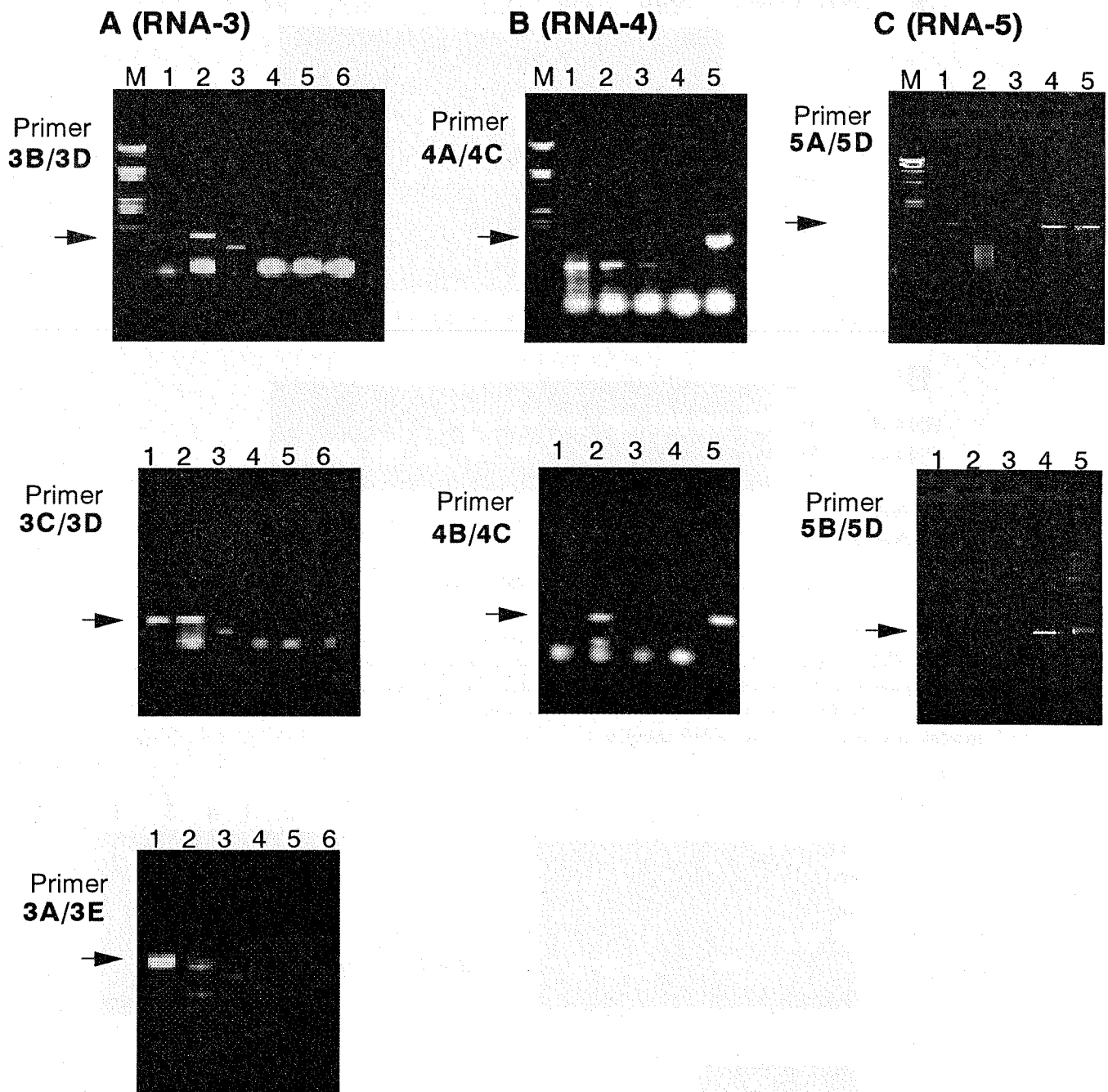


Fig. 5-1. RT-PCR using different combination of primers for RNA-3 (A), RNA-4 (B) and RNA-5 (C). Arrowheads indicate the positions of full length of each RNA species. (A) RNA-3 was detected by RT-PCR using primer combination 3B/3D, 3C/3D and 3A/3E. Lanes are: λ DNA/*Hin* dIII (lane M), RNA-3 cDNA clone pMSC8 (lane 1), S-3 isolate (lane 2), S-3c isolate (lane 3), S-4 isolate (lane 4), D-5 isolate (lane 5) and water control (lane 6), respectively. (B), RNA-4 was detected by RT-PCR using primer combination 4A/4C and 4B/4C. Lanes are: λ DNA/*Hin* dIII (lane M), RNA-4 cDNA clone pMSD96 (lane 1), S-3 isolate (lane 2), S-4 isolate (lane 3), D-5 isolate (lane 4) and water control (lane 5), respectively. (C) RNA-5 was detected by RT-PCR using primer combination 5A/5D and 5B/5D. Lanes are: λ DNA/*Hin* dIII (lane M), water control (lane 1), S-3 isolate (lane 2), S-4 isolate (lane 3), D-5 isolate (lane 4) and RNA-5 cDNA clone pMSD514 (lane 5), respectively.

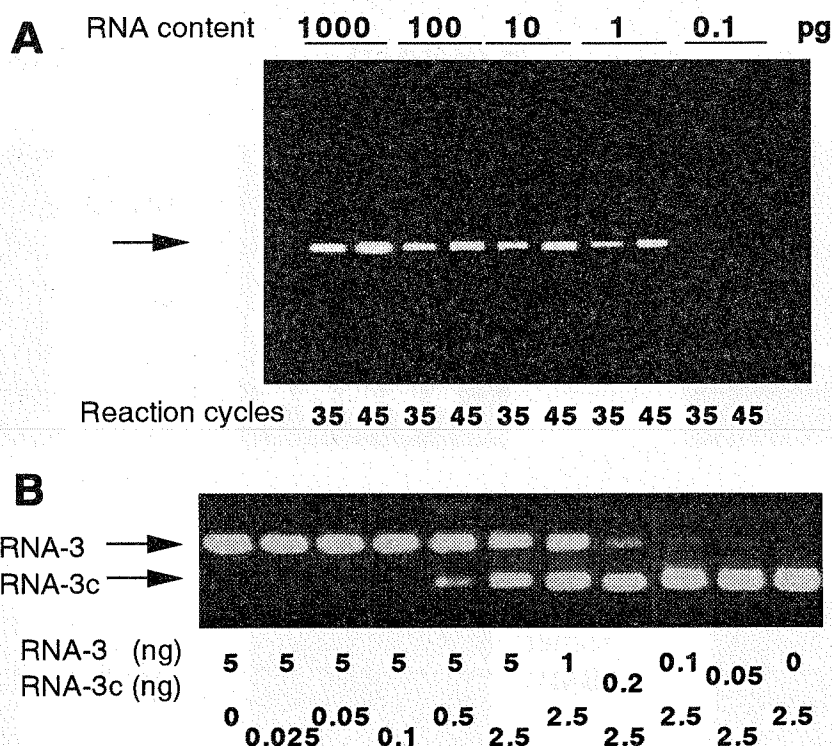


Fig. 5-2. (A) Sensitivity of RT-PCR. Total RNA extracted from partially purified virus of BNYVV S-3 isolate was amplified. RNA content of each lane was shown above. Reaction cycles (35 or 45) are shown below. (B) Detection of normal and deleted RNA-3 (RNA-3c) by RT-PCR. RNA content of each lane was shown below. Arrowheads indicate the positions of each RNA species.

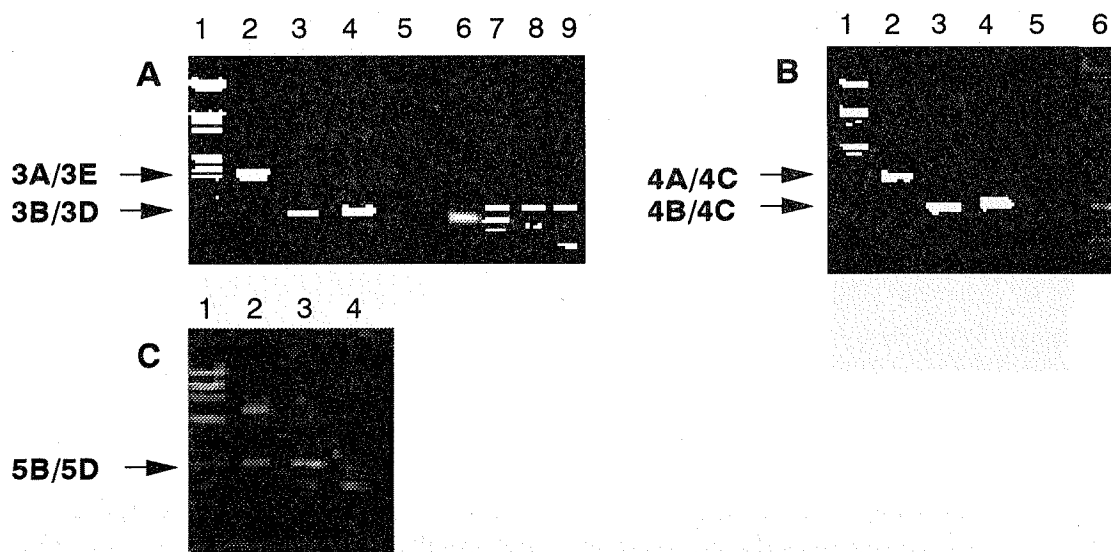


Fig. 5-3. Detection of normal and deleted RNA-3 (A), RNA-4 (B) and RNA-5 (C) from BNYVV field isolates by RT-PCR. Arrowheads indicate the positions of full length of each RNA species detected by each primer. Primer combinations were shown at left side. (A) Normal and deleted RNA-3 was detected by RT-PCR. Lane 1 is λ DNA/*Hin* dIII, lanes 2 and 3 are RNA-3 cDNA clone pMSC8, lanes 4 and 5 are K52-3, lane 6 is isolate 5YS-4, lane 7 is isolate T37, lane 8 is isolate T41 and lane 9 is isolate H45. Primer combination used is 3A/3E (lanes 2 and 4) or 3B/3D (lanes 3, 5, 6, 7, 8 and 9). (B) Normal and deleted RNA-4 was detected by RT-PCR. Lane 1 is λ DNA/*Hin* dIII, lanes 2 and 3 are RNA-4 cDNA clone pMSD96 and lanes 4 and 5 are isolate 142 and lane 6 is isolate S58. Primer combination used is 4A/4C (lanes 2 and 4) or 4B/4C (lanes 3, 5 and 6). (C) Normal and deleted RNA-5 was detected by RT-PCR using primer combination 5A/5D. Lane 1 is λ DNA/*Hin* dIII, lane 2 is RNA-5 cDNA clone pMSD514 and lanes 3 and 4 are isolates S43 and R83, respectively.

RNA-3を0.1ngまで検出することができた (Fig. 5-2B))。

3) 欠失RNAの検出

各種欠失RNAを含む分離株を用いてプライマーの組み合わせの検討を行った。

RNA-3については、5YS-4に含まれている欠失変異RNA-3は3B/3Dのプライマーで増幅された。K52-3の欠失RNA-3は3B/3Dのプライマーでは増幅されず3A/3Eのプライマーで約0.6kbpのバンドが増幅されたので (Fig. 5-3A)，この欠失RNA-3は3B/3Dのプライマーに相当する部分が欠失していると考えられた。分離株T37，T41，H45からは、全長のRNA-3および欠失変異RNA-3が検出された (Fig. 5-3A)。5YS-4，K52-3，T37，T41およびH45に含まれている欠失変異RNAの欠失領域は、5YS-4がnt 732-800，K52-3がnt 381-1267，T37がnt 715-913と712-1068，T41がnt 678-1085，H45がnt 463-1035で、PCR産物から予想される欠失塩基数とほぼ一致した。

RNA-4については4B/4Cのプライマーを用いて欠失変異株を増幅した (Fig. 5-3B)。142は4B/4Cでバンドが検出されず、4A/4Cで約0.5kbのバンドが検出された (Fig. 5-3B)。分離株S58からは全長のRNA-4と欠失変異RNA-4が検出された (Fig. 5-3B)。142，S58の欠失領域は、それぞれnt559-1197，nt725-1195で、PCR産物から予想される欠失塩基数とほぼ一致した。

RNA-5については5B/5Dのプライマーを用いて分離株S43およびR83のRNAを増幅した結果、いずれのプライマーでも全長のRNA-5と欠失変異RNA-5が検出された (Fig. 5-3C)。これら2分離株に含まれる欠失RNA-5の欠失領域は、それぞれ、nt 750-1115，nt 723-1047で、PCR産物から予想される欠失塩基数とほぼ一致した。

4) テンサイの根からのRNAの検出

テンサイの根から核酸を調製する方法を検討した。RNA-5を検出するプライマー (5E/5F) (Fig. 2-1) を用い、S分離株 (RNA-1+2+3+4+5) に感染した根から各方法でRNAを抽出して比較した (Fig. 5-4A)。TSバッファを用いる方法では、生重に対して希釈しない場合はバンドが検出されなかったが、10倍希釈すると期待される大きさのバンドの増幅がみられ、さらに希釈した場合、10⁵倍希釈までバンドが検出された (Fig. 5-4A)。ISOPLANTで

は、10倍希釈ではバンドが検出されなかったが、さらに希釈すると期待される大きさのバンドの増幅がみられ、10⁵倍希釈までバンドが検出された (Fig. 5-4A)。SepaGeneでは、10倍希釈から10⁶倍希釈まで期待される大きさのバンドが検出された (Fig. 5-4A)。テンサイの根からの核酸調製には、3種の核酸調製法の比較では、TSバッファを用いた核酸調製法が簡便であったが、SepaGeneの方が検出感度が高かった。

次に、S分離株に感染した根からSepaGeneにより核酸を調製し、RNA-3，RNA-4，RNA-5の検出を試みた。サンプルは10⁷まで段階希釈して検出感度を調べた。その結果、RNA-3では10⁷倍希釈 (根の絶対量は0.1ng)，RNA-4では10⁵倍希釈 (根の絶対量は10ng)，RNA-5では10⁷倍希釈 (根の絶対量は0.1ng) まで検出可能であった (Fig. 5-4B)。同じ根をELISAで検定した場合の検出限界は10⁶倍希釈 (根の絶対量は200ng) であった。

5) 土壌検診と北海道内におけるRNA-5の分布

土壌に植えた捕捉植物を用いた間接法によるウイルスRNAの検出法を検討した。汚染の激しいBi-6土壌と比較的汚染程度の軽いSo-4土壌を用いて、ELISAとRT-PCRによる土壌検診の感度を比較したところ、Bi-6からは、ELISAでもRT-PCRでも5日後からウイルスが検出された (Table 5-1)。So-4からは、ELISA法では5～15日後にはウイルスが検出されなかったが、RT-PCRではウイルスRNAが検出される個体がみられた (Table 5-1)。このことは、RT-PCRの感度はELISAと同程度以上であることを示している。

捕捉植物からの検出が可能となったので、各地のそう根病発病圃場に存在するRNA-5を検出するため土壌検診を行った。圃場から採取した土壌にテンサイを植え、2週間後にこのテンサイの根からRT-PCRによりウイルスRNAを検出した。その結果、検定した149点の土壌のうち、すべてからRNA-3が検出され、また、76点からは、さらにRNA-5が検出された (Fig. 5-5)。各地のRNA-3，RNA-5には大きさの違いはなかった。RNA-5の検出率は、網走・石狩・胆振・後志支庁管内で比較的高く、十勝・上川支庁管内で低かった (Fig. 5-5)。

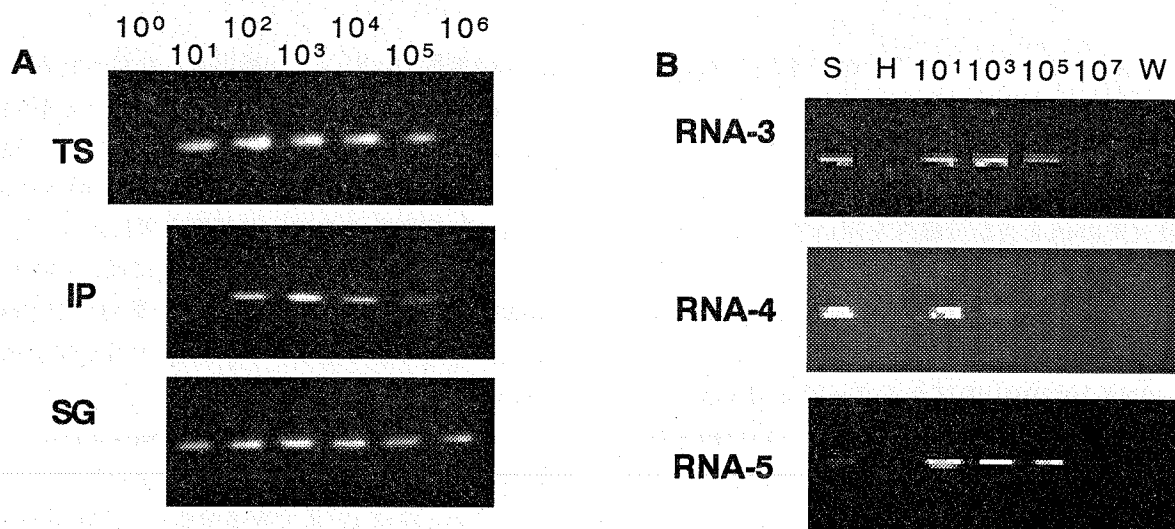


Fig. 5-4. (A) Detection of RNA-5 from root nucleic acid extracted by different methods using primer combination 5E/5F. (TS) TS buffer method, (IP) ISOPLANT, (SG) SepaGene. Lanes are: 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 dilution of total RNA extracted from sugarbeet rootlet infected with S isolate. (B) Sensitivity of detection of RNA-3, RNA-4 and RNA-5 from root nucleic acid extracted using commercial kit (SepaGene). Lanes are: nucleic acid extracted from partially purified virus of S isolate (S), nucleic acid extracted from sugarbeet rootlet inoculated with virus-free *Polymyxa betae* (H), 10^1 , 10^3 , 10^5 , 10^7 dilution of total nucleic acid extracted from sugarbeet rootlets infected with S isolate and water control (W), respectively.

Table 5-1. Detection of BNYVV RNA-3 and RNA-5 from bait plant by ELISA and RT-PCR.

soil	days after transplanting	ELISA values ¹⁾ (virus detection)		RT-PCR	
				RNA-3	RNA-5
So-4	5	0.015	(-)	-	-
		0.047	(-)	+	+
		0.018	(-)	-	-
	10	0.024	(-)	-	-
		0.025	(-)	-	-
		0.030	(-)	+	+
	15	0.042	(-)	-	-
		0.045	(-)	-	-
		0.056	(-)	+	+
	20	0.028	(-)	-	-
		0.037	(-)	-	-
		0.084	(+)	+	+
Bi-6	5	0.201	(+)	+	+
		0.298	(+)	+	+
		0.337	(+)	+	+
virus-free	5	0.015	(-)	-	-
	10	0.020	(-)	-	-
	15	0.015	(-)	-	-
	20	0.040	(-)	-	-

1) absorbance at 405 nm after 60 minutes.

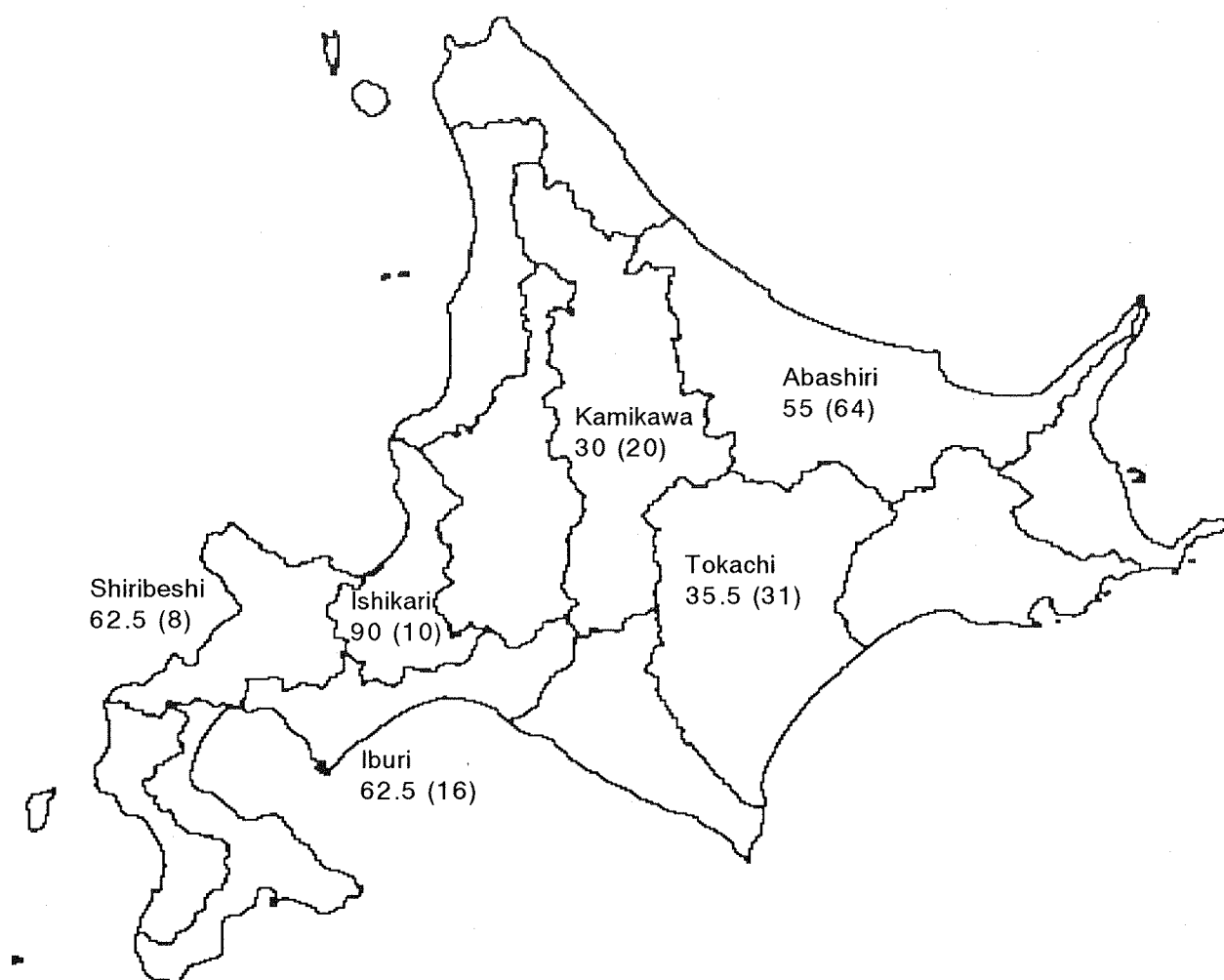


Fig. 5-5. Distribution of BNYVV containing RNA-5 in Hokkaido. RNA-5 was detected by RT-PCR from bait plants on soil. Figures indicate percentage of BNYVV isolates containing RNA-5 (number of isolates tested).

論議

BNYVVの診断に通常用いられているELISA法は、試料中のウイルスRNA分子の組成を識別することができない。前節で述べたジゴキシゲニン標識法による検出法では、テンサイの根からのサンプルは部分純化が必要であった。そこで、簡便化を図るため、RT-PCRによるBNYVV RNAの検出法を検討した。はじめにRNA-3, RNA-4, RNA-5を検出するためのプライマーを設計した。次に、テンサイの根からの核酸の調整法について検討した。その結果、TSバッファー、ISOPLANT, SepaGeneいずれの抽出法でも非特異反応がなく、テンサイの根から調製した全核酸からもウイルスRNAを検出することができ、検出感度もジゴキシゲニン標識法より高かった。土壤にテンサイを移植してウイルスを捕捉する間接法(内野ら, 1990; 阿部ら, 1991)により、ELISAと同等以上の感度で捕捉植物からウイルスRNAを検出することができた(Table 5-1)。この手法により土壤検診を行い、RNA組成を検定することが可能で(Fig. 5-5, Fig. 5-6), そう根病発病圃場から採取した土壤を用いてRNAを検定し、道内のそう根病発病地帯にはRNA-5が広く分布していることが明らかになった(Fig. 5-6)。RT-PCRは簡便で感度の高いBNYVVのRNAの特異的な検出方法として利用できることが示された。

PCRを適正化するための条件では、Kohnen *et al.* (1992) およびFenby *et al.* (1995) によって報告されているように、プライマーは検出の感度、特異性に重要な因子であった(Fig. 5-1)。純化ウイルスを用いてBNYVVのRNA-3, RNA-4, RNA-5を検出するために設計したプライマーのうち、目的とするRNAの増幅効率が極端に低いプライマーがあった(Fig. 5-1A, B, C)。また、期待される大きさとは異なる非特異バンドが検出される場合もあったが、目的のPCR産物との区別は可能であった(Fig. 5-1A, B, C)。しかし、RNA-3の欠失変異RNA(RNA-3c)の検出ではこのような非特異バンドが検出されず(Fig. 5-1A), プライマーの特異性は、目的のRNAの塩基配列にも影響された。5種類のRNA間で相同性の高い領域にファースト・ストランド合成用のプライマーを設定すれば、1サンプルについて1回のファースト・ストランド合成でよいが、この領域に設定したプライマー3EはRNA-3の増幅効率が悪く、ファースト・ストランド合成から増幅するRNA種に対する特異的なプライマーを用いる必要があっ

た(Fig. 5-1A)。このようにプライマーの特異性が異なるのは、RNAの高次構造による影響が大きいと考えられる。

本研究で得られたRT-PCRによるBNYVVのRNAの検出感度は、RNA-3に対するプライマー3B/3Dを用いた場合、1pgであった(Fig. 5-2)。この感度は、Bean yellow mosaic virus RNA 検出の感度60pg (Vunsh *et al.*, 1990) より高く、BNYVVで報告されている感度(Henry *et al.*, 1995; Fenby *et al.*, 1995) とほぼ同じであった。しかし、他の植物RNAウイルスで報告されている非常に高い検出感度(1-10fg) (Wetzel *et al.*, 1991; Kohnen *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 1993) より劣った。本研究では検討しなかったが、感度を高めるためには、PCRの際にジゴキシゲニン標識dNTPなどを取り込ませ、しかもプライマーによって増えたものだけを検出する方法(Holmstrom *et al.*, 1993; Fenby *et al.*, 1995), PCR産物をハイブリダイゼーションで検出する方法(Vunsh *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1991; Hataya *et al.*, 1994) などがある。

テンサイの根からの全核酸抽出液はPCRを阻害する場合がある(Koenig *et al.*, 1995)。そこで、3種の方法についてテンサイの根からの核酸の調製法を検討した。調製法によっては、原液を用いると反応が得られないことがあり、その場合には10倍以上の希釈が必要であった(Fig. 5-3A)。磨碎せずにバッファー中で熱処理する方法(Thompson and Dietzgen, 1995) やアルカリ処理による粗精製法(Sabanadzovic *et al.*, 1996) 等の簡便な調製法が報告されているが、本研究では検討を加えなかった。同じ核酸調製法が異なる植物種には利用できないという場合もある(Ipach *et al.*, 1992)。また、阻害物質を除くためにカラム等で精製する方法もあるが(Korschineck *et al.*, 1991; Vunsh *et al.*, 1991; Kruse *et al.*, 1994), 操作はさらに複雑になる。Koenig *et al.* (1995) が用いたimmunocapture法は核酸調製の必要がなく簡便で、阻害物質の影響を受けず、しかも感度を高めるために有効な方法である(Wetzel *et al.*, 1992; Nolasco *et al.*, 1993; Weekes, 1996; Mumford and Seal, 1997)。今後は、immunocapture-RT-PCRや適切な核酸調製法、検出法等を組み合わせることによって、特異性と感度をさらに高めることが可能と思われるので、さらにこれらの手法についての検討が必要である。