

5 遺伝子増幅法によるウイルス検定

ねらいと成果

遺伝子増幅法（PCR）は、DNA合成酵素を用いて目的とするDNAを百万倍以上の量に増幅する方法である。その反応の開始にはプライマーと呼ばれる短いDNA断片を必要とするが、適当なプライマーを選択することにより、遺伝子の特定の部分だけを増幅できる。この原理を利用して、植物に感染するウイルス・ウイロイドの遺伝子を増幅して、感染の有無を診断することができる。そこで、遺伝子増幅法を用いた高感度の各種ウイルスの検出法について検討した。その結果、カーネーション斑紋ウイルス、ダイズモザイクウイルス、サツマイモ斑紋モザイクウイルス、レタスビッグベイン随伴ウイルス（LBVaV、旧レタスビッグベインウイルス）、ミラフィオリレタスビッグベインウイルス（MLBVV、旧ミラフィオリレタスウイルス）、ヤマノイモモザイクウイルス（JYMV）、キクわい化ウイロイド、カンキツウイロイド類等のウイルス・ウイロイドを迅速に、高感度に検出することができるようになった。

内容

ウイルス検出を逆転写-遺伝子増幅法（RT-PCR）で行うために、それぞれのウイルス遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計した。検出の手順は次のとおりである。

- ①検定する植物からウイルスRNAを抽出・精製する。
- ②ウイルスRNAを鋳型にして逆転写酵素とプライマーを用いて相補DNAを合成する（RT）。
- ③相補

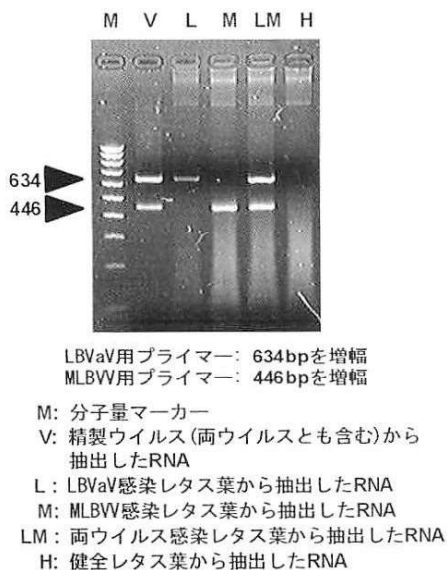


図1 RT-PCRによるLBVaV、MLBVVの同時検出

DNAを鋳型にしてDNA合成酵素を用いてプライマーに挟まれたDNA領域を増幅する（PCR）。④PCR産物を電気泳動して増幅バンドを確認する。

この方法で重要なのは、不純物の少ないウイルスRNAと、特異性の高いプライマーを用いることである。

植物は種類によって多糖類等を多く含むものもあるが、これらを検定する場合も、一、二種の処理を加えることで不純物を容易に除去できるので、多種・多様な植物を検定することができる。また、市販のRNA抽出キットを用いて反応・検出に適した試料を得られれば、検出の簡易化・短縮化が可能になる。

プライマーは、ウイルス遺伝子の塩基配列がわかれば、特異性の高いものを設計することができる。そして、増幅する部分の大きさを調節してプライマーを設計すれば、ある1つの作物に感染している複数のウイルスを1回の操作で同時に検定できる。図1はレタスに感染しているLBVaVとMLBVVを同時に検定したものである。一方、JYMVの検出において、既報のプライマーでは罹病個体からウイルスが検出されなかった。しかし、系統による変異の可能性を考えて、新たなプライマーを設計することで検出できるようになった（図2）。RT-PCRは、ウイルス遺伝子の情報の活用により、変異の大きなウイルス種の検出や同種のウイルスの強毒系統と弱毒系統を区別して検出できる。

今後の対応

上記ウイルスの検定は、普及センター等から要請があれば技術指導を含む検定を部長（生物工学担当）で実施する。

松本 純一（部長（生工））

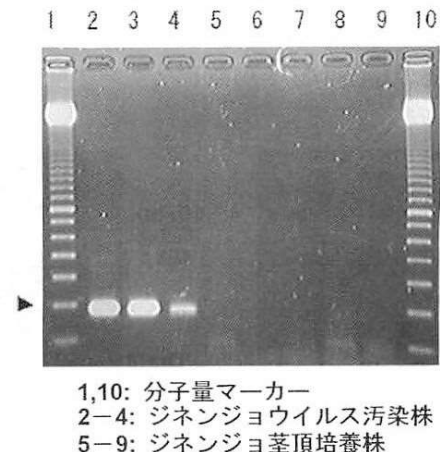


図2 RT-PCRによるJYMVの検出