

## 逆転写-遺伝子増幅法によるレタスビッグベインウイルスと ミラフィオリレタスウイルスの検出

松本純一\*・玉木克知\*・塩飽邦子\*・笹谷孝英\*\*・石川浩一\*\*

### 要 約

レタスビッグベイン病に関連するウイルス、レタスビッグベインウイルス(LBVV)とミラフィオリレタスウイルス(MiLV)について逆転写-遺伝子増幅法(RT-PCR)による検出を検討した。

- 1 LBVV, MiLV それぞれの遺伝子を基に検出用プライマーを作製し, LBVV 用では LBVV 感染レタス試料のみで, MiLV 用では MiLV 感染レタス試料のみで, それぞれ期待されるサイズの DNA 断片が増幅された。
- 2 植物体からの RNA 調製法として, フェノール/クロロホルム抽出後にセルロースパウダーを用いた精製によって RT-PCR に適した試料が得られた。
- 3 同一反応液で MiLV と LBVV を検出するために, 両プライマーを混合して検出を試みたところ, それぞれのウイルスで期待されるサイズの DNA 断片が増幅され, 同時検出が可能であった。
- 4 病土に移植したレタス苗を供試すると, LBVV は病徴発現18日前から, また, MiLV は病徴発現7日前から検出できた。

### Detection of *Lettuce Big-Vein Virus* and *Mirafiori Lettuce Virus* by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Jun-ichi MATSUMOTO, Katsutomo TAMAKI, Kuniko SHIWAKU,  
Takahide SASAYA and Koichi ISHIKAWA

### Summary

The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect *Lettuce big-vein virus* (LBVV) and *Mirafiori lettuce virus* (MiLV), associated with lettuce big-vein disease.

- (1) Specific primers for this method were designed from the sequences of LBVV RNA2 and RNA1, and MiLV RNA3. RT-PCR with the primers enabled the detection of the viruses with a high degree of sensitivity and specificity.
- (2) Purification of RNAs from lettuce leaves with phenol/chloroform extraction and column of cellulose powder were needed for detection of the viruses by RT-PCR.
- (3) The two viruses could be detected simultaneously in a mixture of the viruses, and were distinguishable by the molecular sizes of the PCR products.
- (4) LBVV and MiLV were detected at 18 and 7 days respectively previous to symptom development by RT-PCR when lettuce seedlings were transplanted on infested soil.

キーワード：レタス, ビッグベイン病, レタスビッグベインウイルス,  
ミラフィオリレタスウイルス, 遺伝子診断法

### 緒 言

兵庫県南部の洲本市および三原郡では水稻と野菜の三毛作が行われており, レタスはタマネギと並ぶ基幹作物

となっている。1994年, 淡路島内で栽培されていたレタスにビッグベイン病の発生が確認された。本病は1934年, アメリカで初記載され<sup>6)</sup>, わが国では1978年, 和歌山県での発生が報告された<sup>5)</sup>。本病が発病すると, 葉脈周辺が退色し, 葉縁部の縮れが顕著となる。株の枯死や根の異常は起こらないものの, 生育が遅れ, 球の肥大が悪くなる。また, 結球不良となってしまう。本病は土壤に生

2003年8月29日受理

\* 農林水産技術総合センター部長 (生物工学担当)

\*\* 近畿中国四国農業研究センター

息する、*Olpidium brassicea* が媒介することで土壤伝染される<sup>15)</sup>。また、*O. brassicea* が休眠胞子を作って土壤中に長期間生息することで、土壤伝染性も維持される<sup>9)</sup>ことから難防除病害となっている。

レタスビッグベイン病の病原ウイルスとして Kuwata *et al.*<sup>9)</sup> がその形態を確認した、*Varicosavirus* 属のレタスビッグベインウイルス (*Lettuce big-vein virus*: LBVV)<sup>12)</sup> が報告されていた。しかしながら、最近、ビッグベイン症状を示すレタスより *Ophiovirus* 様のミラフィオリレタスウイルス (*Mirafiori lettuce virus*: MiLV) が分離され<sup>16)</sup>、この MiLV がビッグベイン症状の主因という報告がある<sup>17)</sup>。わが国でも兵庫県から採取したビッグベイン症状を示すレタスから MiLV が分離された<sup>16)</sup>。

これまで、LBVV は宿主範囲が狭い、汁液接種による継代が困難ということから診断法としては圃場における個体の病徴観察を行うほかなかった。ウイルスを持った *O. brassicea* の存在を確認するにはその土壤に対してレタス苗を植えて病徴発現を観察すればよいが、判定に時間がかかる等実用的ではなかった。また、電子顕微鏡観察では、病徴発現前あるいは発症後のレタスからのウイルス検出が困難であった。近年、RNA をゲノムとするウイルスやウイロイドの高感度検出法として逆転写-遺伝子増幅法 (reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) が導入され、塩基配列の明らかになった各種ウイルスやウイロイドの検出・診断に利用されている<sup>9)</sup>。RT-PCR は検出感度が高いことが大きな特長で、その操作も比較的簡易・迅速である。LBVV についてはこれまでウイルスゲノムの塩基配列の報告がなく、遺伝子診断法が適用できなかったが、ウイルスの精製が可能となり、Sasaya *et al.*<sup>16,17)</sup> によってその塩基配列が報告された。一方、MiLV についても Kawazu *et al.*<sup>7)</sup> により外被タンパク質遺伝子の塩基配列が報告された。

そこで、これまで通常的手法では検出が困難であった LBVV と MiLV に対して、より迅速・正確な検出を目的として、RT-PCR の適用を試みた。

## 材料及び方法

### 1 供試材料

兵庫県三原郡西淡町のレタスビッグベイン病多発の圃場より土壤を採取し病土として供試した。また、愛媛県伊予市の圃場より採取して LBVV 単独汚染が確認された土壤 (LBVV 単独病土) および香川県三豊郡豊浜町の圃場より採取して MiLV 単独汚染が確認された土壤 (MiLV 単独病土) を供試した。精製ウイルスは三原郡

南淡町より採取したレタス個体より石川・笹谷の方法<sup>9)</sup> に準じて得たが、ここで供試した試料は、低 BIS 濃度 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>3,10)</sup> により、LBVV、MiLV の両ウイルスが存在することが確認された。ウイルス感染個体は病土、LBVV、MiLV それぞれの単独病土に播種1カ月後のレタス苗を移植して症状を現したものを使用した。対照個体はオートクレーブ滅菌土に移植したレタス苗を使用した。

### 2 RNA 抽出と RT-PCR

精製ウイルスからの RNA 抽出は SDS-フェノール法<sup>12)</sup> により行った。レタス植物体からの RNA 抽出は斉藤の方法を一部改変した方法<sup>18)</sup> により行った。ウイルス感染葉あるいは健全葉 0.2 g に 1.2 ml の磨砕緩衝液 (0.1M Tris-HCl pH7.2, 50mM EDTA, 2.8M NaCl, 40 mg/ml polyvinylpyrrolidone), 120  $\mu$ l の 10% SDS, 1  $\mu$ l の 2-mercaptoethanol を加えて磨砕した。これをフェノール-クロロホルム処理、セルロースパウダー (CF-11) カラムによる洗浄、2-メトキシエタノール処理、CTAB 沈殿、エタノール沈殿により RNA 試料を得た。RNA 試料は diethylpyrocarbonate 処理をした蒸留水 (以下 dH<sub>2</sub>O) に溶解した。

RT-PCR は Gene Amp EZ *rTth* RNA PCR Kit (Applied Biosystems 社) を使用した。1 サンプルにつき、RNA を 1.0  $\mu$ l 供試し、逆転写・DNA 合成酵素として *rTth* DNA polymerase を用いた。反応液組成は RNA を 1.0  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O を 5.5  $\mu$ l, 5 $\times$ EZ buffer を 5.0  $\mu$ l, dNTPs (各 2mM) を 6.0  $\mu$ l, Mn (OAc)<sub>2</sub> (25mM) を 2.5  $\mu$ l, 相補および相同プライマー (各 10  $\mu$ M) を各 2.0  $\mu$ l, *rTth* DNA polymerase (2.5 Unit/ $\mu$ l) を 1.0  $\mu$ l 添加して全量 25  $\mu$ l とした。反応条件は 60°C 30分, 94°C 1分の後, 94°C 15秒, 65°C 30秒のサイクルを 30 回行い, 72°C 7分で反応を終了させた。

### 3 プライマーの検討

LBVV 検出用として、笹谷<sup>16,17)</sup> の設計による LBVV-RNA2 で 3 組, RNA1 で 1 組のプライマーを検討した (図 1)。また、MiLV 検出用として、Kawazu *et al.*<sup>7)</sup> が塩基配列を決定した MiLV-RNA3 に対応する相補的 2 個, 相同的 2 個のプライマーによる 4 組の組合せを設計して検討した (図 2)。

### 4 検出限界の検討

精製ウイルスからの RNA は吸光度を測定後、濃度 10 ng/ $\mu$ l に希釈し、それを dH<sub>2</sub>O で 10 倍ずつ段階希釈した。レタス葉からの RNA は 0.2 g の葉より抽出した試料を 100  $\mu$ l に溶解して原液として、dH<sub>2</sub>O で 10 倍ずつ段階希釈した。

### 5 LBVV と MiLV の単独検出および同時検出

LBVV と MiLV の両ウイルスが混合あるいは単独で感染した試料から抽出した RNA を用いて、それぞれのウイルスが検出できるかについて検討した。また、1つの反応液中に LBVV, MiLV 両ウイルスのプライマーを加えて同様にそれぞれのウイルスが検出できるか検討した。そのために、Sasaya *et al.*<sup>16)</sup> が塩基配列を決定した LBVV-RNA2 に対応する相補的 2 個、相同的 2 個のプライマーによる 2 組の組合せを再設計して使用した (図 3)。

### 6 nested-PCR

病徴発現前の幼苗からの検出ではより高感度の検出を考えて、RT-PCR を行った産物に対してさらに nested-PCR を行った。RT-PCR ではプライマーとして図 2, 3 の LBV-F1 と LBV-R1, MiL-F1 と MiL-R1 の組み合わせを用い、nested-PCR ではより内側に設定した LBV-F2 と LBV-R2, MiL-F2 と MiL-R2 の組み合わせをそれぞれ用いた。反応液組成は 1 サンプルにつき、RT-PCR 産物を 2.0  $\mu$ l, DNA 合成酵素として Amp Taq Gold (Applied Biosystems 社, 5 Unit/ $\mu$ l) を 0.2  $\mu$ l, 滅菌蒸留水を 14.0  $\mu$ l, 10 $\times$ buffer を 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25mM) を 2.5  $\mu$ l, dNTPs (各 2 mM) を 2.5  $\mu$ l, 相補および相同プライマー (各 10  $\mu$ M) を各 0.65  $\mu$ l 添加して全量 25  $\mu$ l とした。反応条件は 95 $^{\circ}$ C 30 秒,

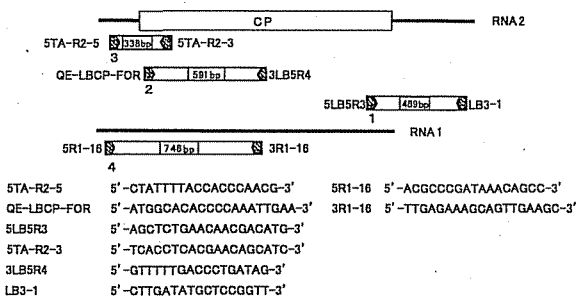


図 1 LBVV 用プライマーの設計

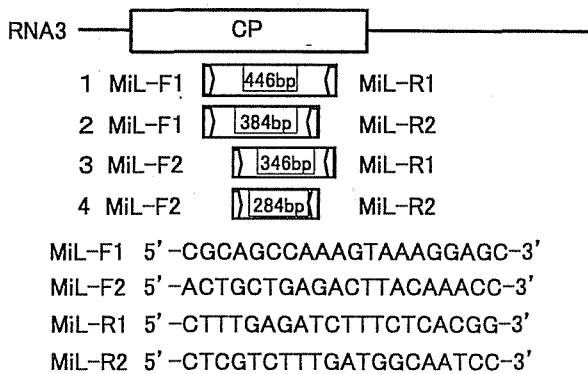


図 2 MiLV 用プライマーの設計

65 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分を 25 回行った。

### 7 幼苗からの検出の検討

西淡町の病土を 12cm ビニールポットに詰めて、本葉 4~5 枚まで育苗した個体を 1 ポットに 3 個体ずつ移植して、18 $^{\circ}$ C, 11 時間日長の条件で人工気象器内で栽培した。移植後 7, 10, 14, 21, 28, 35 日目に上位 2 枚目の葉を採取して 3 個体 (1 ポット) 分を 1 サンプルとした。各サンプルから RNA を抽出してウイルス検定を行った。健全対照として同様に滅菌土を詰めたポットに 3 個体の苗を移植して用いた。また、保毒対照としてビッグベイン症状を現したレタスを用いて、同時にそれぞれから RNA を抽出した。

## 結 果

### 1 プライマーの検討

供試した LBVV 検出用の 4 組のプライマーの組み合わせすべてで期待されるサイズの DNA 断片が増幅され、LBVV が検出された (図 4)。再現性、特異性の面で、469bp を増幅する組み合わせ (5LB5R3-LB3-1) が最適と考えた。また、MiLV 検出用プライマーも供試した 4 組の組み合わせすべてで期待されるサイズの DNA 断片が増幅され、MiLV が検出された (図 5)。

### 2 LBVV の検出限界の検討

精製ウイルスからの RNA では、1pg でも検出が可能であった。一方、感染レタス葉からは原液の 1,000 倍希釈まで検出が可能であり感染レタス葉 2  $\mu$ g からの

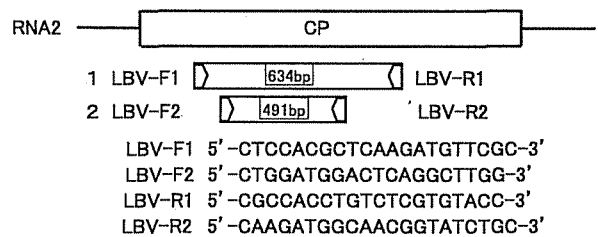
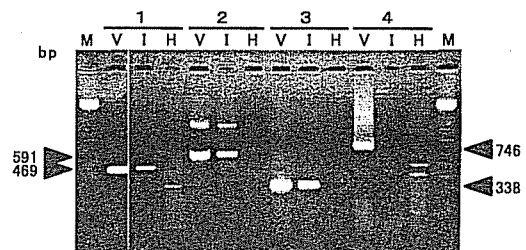


図 3 LBVV 用プライマーの再設計



1: RNA2 に対する組合せ。469bp を増幅  
2: RNA2 に対する組合せ。591bp を増幅  
3: RNA2 に対する組合せ。338bp を増幅  
4: RNA1 に対する組合せ。746bp を増幅  
M: 分子量マーカー  
V: 精製ウイルスから抽出した RNA  
I: 感染レタス葉から抽出した RNA  
H: 健全レタス葉から抽出した RNA

図 4 LBVV 用プライマーの検討結果

LBVVの検出が可能であった(図6)。

### 3 LBVVとMiLVの単独検出および同時検出

単独検出および同時検出のために再設計したLBVV用プライマーについても期待されるサイズのDNA断片が検出され、634bpを増幅するLBV-F1とLBV-R1の組み合わせを使用することとした。このDNA断片との識別を考慮して、MiLV用プライマーは446bpを増幅するMiL-F1とMiL-R1の組み合わせを使用することとした。

LBVV, MiLVそれぞれの単独検出では、LBVV用プライマーを用いた場合は、LBVVを含む試料では増幅バンドが検出され、MiLVのみの試料ではバンドは検出されなかった。MiLV用プライマーを用いた場合は、MiLVを含む試料では増幅バンドが検出され、LBVVのみの試料ではバンドは検出されなかった(図7A)。

同一反応液にLBVV用、MiLV用両プライマーを入れた同時検出では、LBVV単独感染試料ではLBVV由来のバンドが、MiLV単独感染試料ではMiLV由来の

バンドが、また両ウイルス混合感染試料では両ウイルスのバンドを検出することができた(図7B)。また、反応液中の両プライマーの量は相同、相補それぞれ2種の計4種、各1.0 $\mu$ lとしていたが、混合感染の試料では、増幅するサイズの小さなMiLV由来バンドが薄くなる傾向にあった。そこで増幅サイズの大きいLBVV用プライマーについては添加量を変えず、MiLV用プライマーの量を各2.0 $\mu$ lとしたとき、両ウイルス由来のバンドともに濃淡差なく、明瞭に検出された。

### 4 幼苗からの検出

LBVVは、最初は移植14日目の個体で初めてウイルスが検出された。しかし、その際、非特異と考えられるバンドが多数現れたため、アニーリングの温度を上げてLBV-F1とLBV-R1の組み合わせでRT-PCRを行い、その産物を鋳型として、491bpを増幅するLBV-F2とLBV-R2の組み合わせでnested-PCRを行ったところ、移植10日目にはじめてウイルスが検出され、移植14日目でいずれのサンプルでもウイルスが検出された(図8, 表1)。

一方、MiLVは移植21日目にはじめてウイルスが検出され、移植28日目に4サンプル中2サンプルからウイ

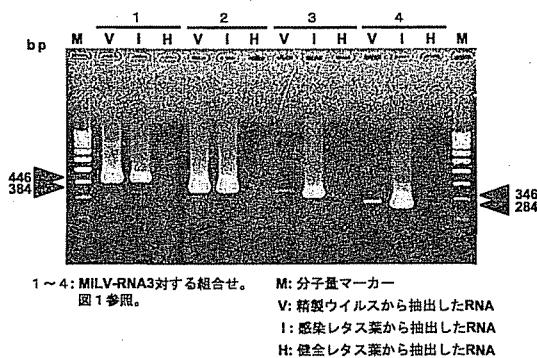


図5 MiLV用プライマーの検討結果

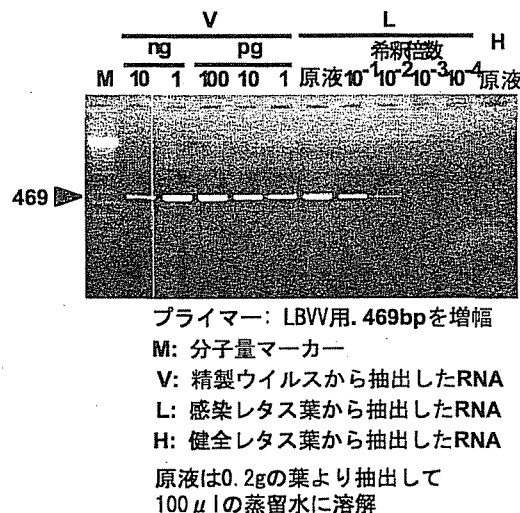


図6 LBVVの検出限界の検討

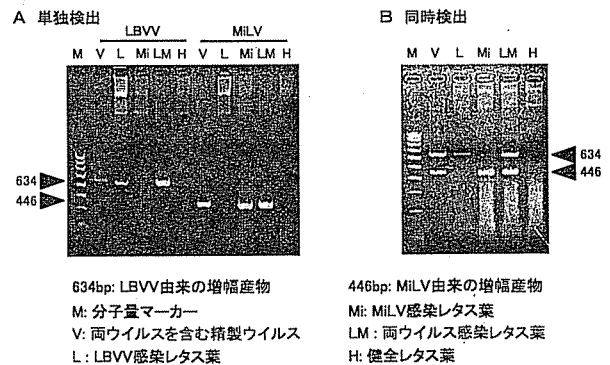


図7 LBVV, MiLVの単独検出および動じ検出

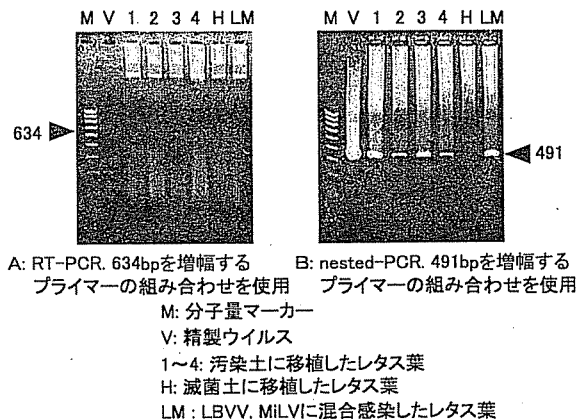
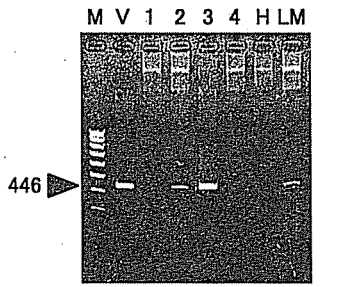


図8 移植14日後の個体からのLBVV検出



RT-PCR. 446bpを増幅する  
プライマーの組み合わせを使用

M: 分子量マーカ  
V: 精製ウイルス  
1~4: 汚染土に移植したレタス葉  
H: 滅菌土に移植したレタス葉  
LM: LBVV, MiLVに混合感染したレタス葉

図9 移植28日後の固体からのMiLV検出

ルスを検出された(図9, 表1)。また, RT-PCRでもバンドが確認され, nested-PCRの結果と一致したことから, MiLVの検出にはRT-PCRで十分であると考えた。しかしながら, MiLVが検出された個体では検出して7日後に病徴が現れ, ビッグベイン症状となった(表1)。

考 察

本研究では, LBVVおよびMiLVについてRT-PCRによる検出を試み, LBVVについてはRNA 1pgでも検出が可能であった。このことから, 電子顕微鏡観察では検出が容易でなく, 植物組織内の濃度が低いと考えられている両ウイルスの検出に適していると考えられる。

1980年代以降, 植物ウイルスの検出には, 血清診断法が汎用されてきた。血清診断法は簡便で非常に鋭敏な方法であるとともに, その特異性については抗体そのものに依存している。このことから, 精製が困難とされてきたウイルスについては適用できなかった。一方, RT-PCRは対象とするウイルスの塩基配列を明らかにする必要はあるが, そのために必要な精製ウイルスの量は少量でよく, プライマー作製も抗体作製より安価に行える。

本研究ではRNA抽出は斉藤の方法を一部改変した方法<sup>10)</sup>により行った。この抽出法はRT-PCRによるキクわい化ウイロイド検出の際に用いられるものである。レタスが同じキク科植物であることから楠ら<sup>9)</sup>が推察したキク抽出液中におけるRT-PCR酵素反応阻害因子の存在を考慮して, この抽出法を用いた。RT-PCRに供試するRNAの抽出に, 同様にセルロースパウダー(CF-11)を用いる植物の例としてはサツマイモやカンキツがあげられる<sup>2)</sup>。元々, 簡便でより高感度なLBVV検出手法としてのRT-PCRを現場適用可能な手法として, また, より大量の試料を扱うためにも, やや煩雑に思わ

表1 RT-PCRによるウイルス検出と移植後日数の関係

移植後日数	7	10	14	21	28	35	
LBVV	RT-PCR	-	-	-	-	nt	nt
	nested-PCR	-	++	+++	+++	nt	nt
MiLV	RT-PCR	nt	nt	-	++	++	++
病徴		-	-	-	-	++	++

+~+++ : 確認されたサンプル数  
- : 確認されたサンプルなし, nt : not tested

れるRNA抽出法を改良する必要がある。近年, 植物の核酸抽出についてはさまざまな方法やキットが開発されており, 特に各種抽出試薬が多数市販されている。これらのRNA専用の核酸抽出キット・試薬を供試して, キク抽出液中におけるRT-PCR酵素反応阻害因子, あるいは多糖類やポリフェノールを除去して, CF-11を用いる場合と同様の検出感度が得られるものを選択するべきであろう。

ビッグベイン症状発現前の幼苗検定において, LBVVはビッグベイン症状発現18日前から, MiLVは同じく7日前からウイルスが検出された。両ウイルスの検出時期にずれが生じる原因は, 相互作用によるものか, あるいはそれぞれのウイルスの特性によるものかは明らかではない。病徴発現前の個体から両ウイルスの検出が可能になったことで, レタス定植前圃場の早期診断を旨とした幼苗移植によるトラップ法確立に一定のめどが立った。しかしながら, 本法をより実用的な手法とするために, さらに早い時期にウイルス検出を行えるよう, LBVVでは可能であるレタス根からの検出(データ省略)の幼苗検定への適用を試みる必要がある。

本研究において同じレタスに感染するが属の異なるLBVV (*Varicosavirus*) とMiLV (*Ophiovirus*) の同時検出が可能となった。同種の植物に感染する異種ウイルスの同時検出は, 実際に病害が発生している現場における実用性が高いと考えられる。レタスに発生が報告されているLBVV, MiLV以外のウイルスについても増幅サイズを考慮してプライマーを設計すれば, 1本のチューブで報告のあるすべての病原ウイルスの検出が可能と考える。今後はレタスだけでなく, 主要作物において, 遺伝子診断法による複数ウイルス・ウイロイドの同時検出が, 病害診断の手法として確立されると考える。

謝辞

本研究を行うに当たり, 助言と試験の便宜をはかっていただいた兵庫県立農林水産技術総合センター農業技術センター病害虫防除部相野公孝主任研究員・前川和正主任研究員, 同農業技術センター経営機械部加藤雅宣主任研究員(元南淡路農業改良普及センター), 同淡路農業技術センター農業部小林尚司主任研究員, 材料の収集な

どご協力いただいた南淡路農業改良普及センター岩田均氏・植田律子氏, あわじ島農業協同組合の関係者の方々に深く感謝します。

#### 引用文献

- (1) Campbell, R. N. and Grogan, R.G. (1963) : Big-vein virus of lettuce and its transmission by *Olpidium brassicae* : *Phytopathology* 53, 252-259
- (2) 花田薫 (2001) : 植物ウイルスの遺伝子診断 : 植物防疫 55, 491-494
- (3) Hirano, H. (1989) : Microsequence analysis of the winged bean seed proteins electroblotted from two-dimensional gel : *J. Protein Chem.* 8, 115-130
- (4) 石川浩一・笹谷孝英 (2001) : ビッグベイン症状のレタスから分離されたチューリップ微斑モザイクウイルス様粒子の特徴 : 日植病報 67, 176 (講要)
- (5) 岩木満朗・中野昭伸・家村浩海・栃原比呂志 (1978) : わが国におけるレタスビッグベイン病の発生とその土壌伝染 : 日植病報 44, 578-584
- (6) Jagger, I. C. and Chandler, N. (1934) : Big vein, a disease of lettuce : *Phytopathology* 24, 1253-1256
- (7) Kawazu, Y., Sasaya, T., Morikawa, T., Sugiyama, K. and Natsuaki, T. (2003) : Nucleotide sequence of the coat protein gene of Mirafiori lettuce virus : *J Gen Plant Pathol* 69, 55-60
- (8) 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
- (9) Kuwata, S., Kubo, S., Yamashita, S. and Doi, Y. (1983) : Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big-vein virus : *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 49, 246-251
- (10) Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> : *Nature* 227, 680-685
- (11) Lot, H., Campbell, R.N., Souche, S., Milne, R. G. and Roggero, P. (2002) : Transmission by *Olpidium brassicae* of Mirafiori lettuce virus and *Lettuce big-vein virus*, and their roles in lettuce big-vein etiology : *Phytopathology* 92, 288-293
- (12) 大木 理 (2000) : 植物ウイルスの新しい分類 : 植物防疫 54, 158-162
- (13) 大村敏博 (1993) : 植物病原性微生物研究法 (脇本哲監修. ソフトサイエンス社) : 199-205
- (14) 夏秋啓子・守川俊幸・夏秋知英・奥田誠一 (2002) : わが国のビッグベイン症状を示すレタスから検出された Mirafiori lettuce virus : 日植病報 68, 309- 312
- (15) Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A. M., Accotto, G.P., Masenga, V. and Milne, R.G. (2000) : An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms : *Arch. Virol.* 145, 2629-2642
- (16) Sasaya, T., Ishikawa, K. and Koganezawa, H. (2001) : Nucleotide sequence of the coat protein gene of *Lettuce big-vein virus* : *J Gen Virol* 82, 1509-1515
- (17) Sasaya, T., Ishikawa, K. and Koganezawa, H. (2002) : The nucleotide sequence of RNA1 of *Lettuce big-vein virus*, genus *Varicosavirus*, reveals its relation to nonsegmented negative-strand RNA viruses : *Virology* 297, 289-297
- (18) 塩飽邦子・山元義久・岩井豊通 (1996) : キクわい化ウイロイド (Chrysanthemum Stunt Viroid) 遺伝子のクローニングと全塩基配列 : 兵庫農技研報 44, 1-4