

人工コントロール RNA を用いたマルチプレックス RT-PCR-MPH による

イチゴウイルスおよびジャガイモウイルス検出系の開発

生物資源科学専攻 植物育種講座 植物病原学 西隼太郎

1. 緒言

一般的に逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) などを用いた植物ウイルスの検出では陽性コントロールとして病原体そのものが使用されることが多いが、ウイルスのゲノム RNA 配列を含む感染性のない転写産物を人工コントロールとして利用することが提唱されている (Hataya, 2009)。本研究では人工コントロール RNA および内部コントロールを利用した主要 3 種イチゴウイルスのマルチプレックス RT-PCR (mRT-PCR)-マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH, Hataya *et al.*, 1993) による検出系を構築した。さらにジャガイモでの自然感染が報告されている 11 種ウイルスおよび 1 種ウイロイドの mRT-PCR 検出系の構築を目指した。

2. 材料および方法

イチゴ主要ウイルス 3 種がそれぞれ単独感染したイチゴ個体から総 RNA を抽出し、混合したうえで mRT-PCR に供試し、次いでゲル解析および MPH を行った。また 3 種ウイルスのゲノム配列を基に、特異的な制限酵素サイトを含む短い配列を挿入した MPH 陽性人工コントロール RNA とプライマー結合領域の内部を完全に非ウイルス配列に組換えた MPH 陰性人工コントロール RNA を作製し、mRT-PCR-MPH を行った。またジャガイモ 11 種ウイルスが単独感染した葉から抽出した RNA およびウイロイドの人工コントロール RNA (Hataya, 2009) を混合し、mRT-PCR に供試した。

3. 結果と考察

- ① イチゴ 3 種ウイルスの mRT-PCR-MPH 系では増幅量が少ない傾向にあった 1 種ウイルスのプライマーを 2 倍量に増やし、比較的増幅量の多かった他 2 種ウイルスのプライマーを 1/2 倍量に減らしたところ 3 種ウイルスおよび内部コントロールである *ndhB* がほぼ均等に増幅された。
- ② 陽性または陰性人工コントロール RNA はウイルス感染植物 RNA と同等な RT-PCR 増幅量があった。また MPH 陽性人工コントロールはウイルスゲノム配列と同程度の MPH 反応値を示したが、予想に反し MPH 陰性人工コントロールからも弱い MPH 反応値が認められた。これは RT-PCR 産物とプローブに含まれるプライマー配列とのハイブリダイゼーションに起因するものだと考えられたため、プローブの両端配列を削ったところ、MPH 反応値のない陰性コントロールとなった。
- ③ 11 種ジャガイモウイルスおよび 1 種ウイロイドの同時検出系は 4 種類ずつ 3 つのグループに分けた系を検討したが、1 種類のウイルスが増幅されなかった。

4. まとめ

複数の標的を同時増幅する mRT-PCR は理想的な病原体の検出法の 1 つであるが、MPH と組み合わせることで、より感度および正確性の高い検出系となることが確かめられた。また検出対象に内部コントロールを加え、陽性または陰性の指標となる人工コントロール RNA を使用することで偽陰性または偽陽性の判別が可能になった。本研究ではイチゴ主要 3 種ウイルスの同時検出系が確立できたのに対し、ジャガイモ 11 種ウイルスおよび 1 種ウイロイドの検出系の構築には至らなかった。今後、更に条件検討を進めることで 12 種標的の同時増幅を可能にする系の構築が望まれる。