

ジャガイモYウイルスの普通系統に対する モノクローナル抗体作製とELISAへの適用

野津あゆみ^{*1} 佐々木 純^{*2} 堀田 治邦^{*1}

ジャガイモYウイルス普通系統 (PVY-O) に対するモノクローナル抗体 (MAb) を作製した。道内で採取したPVY-Oの外被タンパク質 (CP) を大腸菌で発現させてマウスに免疫し、得られた抗血清の力価が高いマウスを選定した。ハイブリドーマ細胞を作出し、培養細胞からPVY-O抗体産生クローンを得た。これをマウス腹腔に接種し、腹水からMAbを得た。MAbはPVY-Oを102,400倍希釈まで検出可能であったが、えそ系統 (PVY-N) に対しても反応した。MAbから酵素標識抗体を作製し、これを用いたPTA (Plate trapped antigen) - ELISA直接法で簡易かつ迅速な検出法を確立した。本法を用いて道内で採取したジャガイモのウイルス症状株からPVY-Oの検出を試みた結果、1検体を除き13検体から検出できた。本抗体とPVY-N抗体を用いて道内で発生したPVYの両系統を検出できることを実証した。

緒 言

ジャガイモのウイルス病は、我が国では12種が報告されているが、北海道で重要とされているのはジャガイモYウイルスえそ系統 (PVY-N)、ジャガイモYウイルス普通系統 (PVY-O)、ジャガイモSウイルス (PVS)、ジャガイモ葉巻ウイルス (PLRV) およびジャガイモXウイルス (PVX) の4ウイルス5種⁹⁾、原々種から原種および採種生産を経て一般栽培に至る種いもの生産体系の中でウイルス検定および防除対策が実施されなければならない。

酵素結合抗体法 (ELISA) は抗原抗体反応に基づくウイルス検出法で、現在多検体の検定に広く用いられているが、高精度な検定のためにはより良質な抗体が必要である。一方で、種いも産地である北海道では検定に多量の抗体が必要であるため、安価で高精度な抗体の供給が求められている。前述のように、北海道で発生するPVYには複数の系統が確認されている^{1, 3, 4)}。このうち最も発生頻度の高いPVY-Nに対しては、より特異性と力価が

高い抗体を得るために大腸菌発現系による抗原を用いたモノクローナル抗体 (MAb) が作製された⁹⁾。本手法はPVY-Nの外被タンパク質 (CP) を大腸菌に発現させることで植物成分の混入がない純度の高い抗原が得られることが特徴であり、抗体はMAbとすることで⁶⁾、特異性の非常に高いPVY-N抗体が得られている。しかし、道内ではPVY-Oも発生しているため、生産現場におけるPVYの検定には、PVY-NとPVY-Oの抗体を揃える必要がある。以上から本報では、PVY-N抗体と同様の手法を用いてPVY-OのMAbを作製し、ELISAへの適用性を検証したので報告する。

試験方法

1 ウイルス抗原の作出

中央農試で保有するPVY-O株 (「中央農試」, および「栗山2」の合計2株) から、RNAを抽出し、RT-PCRによりcDNAを作製後、ポティウイルス科ウイルスを検出するユニバーサルプライマーを用いてCP遺伝子を含む領域を増幅させた。これをT-7ベクターに挿入し、大腸菌JM109を形質転換した。大腸菌培養物から抽出したプラスミドの挿入断片をPCRで増幅し、ダイレクトシーケンスによって塩基配列とそれに基づくアミノ酸配列を決定した。決定した配列と日本DNAデータバンク (DDBJ) に登録されている同ウイルスのアミノ酸塩基配列とを比較し、最も保存性の高い株を抗原作製に供するウイルス株として選定した。選定した株のCP遺伝子領域のそれ

2016年1月27日受理

^{*1} (地独) 北海道立総合研究機構中央農業試験場, 069-1395 夕張郡長沼町

E-mail: notsu-ayumi@hro.or.jp

^{*2} 同上 (現: 同花・野菜技術センター, 073-0026 滝川市)

ぞれの末端に制限酵素サイトを付加したプライマーを用いてPCRを行い、CP領域全長を含む増幅断片を得た。この増幅断片を制限酵素処理し、同酵素で処理したpCold I (TaKaRa社) 発現ベクター (以下、pCold Iベクター) に挿入し、大腸菌に形質転換させた。形質転換したシングルコロニーを培養し、IPTG処理でCP領域にHISタグを付加したタンパク質の発現を誘導した。菌体を培養液ごと凍結融解および超音波破碎してタンパク質を粗抽出し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動でCPを含むタンパク質の発現を確認した。発現タンパク質はHisTrap™ FF crude Kit (GEヘルスケア社) を用いて精製し、Factor XaでHISタグとCPの間を切断し、DEAEカラムでCPの分画を得た。

2 MAbの作製

MAbの作製は定法³⁾に従って行った。作製過程のうち、マウスへの免疫、ハイブリドーマの作出とクローニング、腹水の採取は(株)ホクドーに委託し、各段階の抗体価測定を中央農試で行った。

大腸菌発現系で得られたウイルス抗原としてのCPをマウスに免疫させ、採取した血清の抗体価をELISAで検定し、抗体価が高かったマウスを選定した。このマウスから脾臓細胞を摘出し、骨髄腫細胞と細胞融合させ、増殖能を持つハイブリドーマを作出した。HAT培地でハイブリドーマを培養し、細胞上清のPVY抗原10倍希釈液に対する抗体価を抗マウス-ヤギ抗体を二次抗体に用いたELISA検定で測定して、抗体産生能力の高い細胞を選抜した。選抜は4回繰り返して、抗体産生クローンを絞り込んだ。選抜したクローンをマウス腹腔に接種し、約2週間後に腹水を採取した。腹水をアフェゲルプロテインA MAPS II カラム (Bio Rad社) でγ-グロブリン (IgG) を精製し、MAbを得た。この抗体を1mg/mlから各希釈段階に調整 (100~102,400倍希釈) し、PVY-OおよびPVY-Nに対する力価を検定した。

3 MAbによるELISA法の確立

得られた抗体をアルカリフォスファターゼのラベリングキット-SH (同仁堂社) で標識し、酵素標識抗体 (EC) を作製した。二重抗体サンドイッチ法 (DAS-ELISA) に適応する条件を、IgG抗体、ECの濃度を検討した後、PVY-OまたはPVY-Nのタバコ罹病葉を抗原とし、その希釈段階に対する吸光値から検出感度を検証した。PTA-ELISA直接法については、PVY-O罹病葉の各希釈段階に対する吸光値から検出感度を検証し、抗原の吸着時間、ECの反応時間について検討した。また、このECとPVY-N抗体を混合し、PVY両系統に対する反応を検証した。PVY-N抗体には堀田ら(4)が作製したモノクローナル抗体 (D11-EC) を1,000倍希釈で使用し、同試験でも抗原吸着時間およびECの反応時間を検討した。

4 道内のPVY株に対する反応およびPVY-OとPVY-Nの同時検定

道内のジャガイモから採取したPVY罹病葉、北農研分譲および中央農試保存のPVY株 (罹病タバコ葉) を用いてELISAの適用性を検証した。検定はPTA-ELISA直接法で行った。PVY-O抗体は作製抗体のECを500倍希釈で、PVY-N抗体には堀田ら(4)が作製したモノクローナル抗体 (E11-EC) を1,000倍希釈で使用し、比較抗体としてPVY-O/N/C (No.1053-05, Neogen社) を用いた。

結果

1 PVY-Oウイルス抗原の作出

供試ウイルス株のCPのアミノ酸配列とデータベースの既存配列を比較解析した結果、「中央農試」株に比べ「栗山2」株はPVY-Oの配列のU09509, X68226との相同性がそれぞれ97.4%, 97.8%と高く、この株を抗原作製に用いるウイルス株として選定した (表1)。「栗山2」株のCP領域の増幅断片をpCold I ベクターに挿入してシーケンスにより目的配列の導入を確認し、組換え大腸菌から粗抽出した可溶性タンパク質の分画に、HISタグと結合したCP (His + PVY-O-CP) が大量に発現していることを確認した (図1)。さらにFactor Xaで処理し、HISタグが除去されたCPの分画も確認した。

表1 PVY-O北海道株と既知のPVY外被タンパク質アミノ酸配列との相同性

系統	DB配列	PVY-O株	
		中央農試	栗山2
PVY-O	U09509	96.6	97.4
	X68226	96.6	97.8
PVY-N	D12570	91.0	93.3
	Ki	91.0	93.3

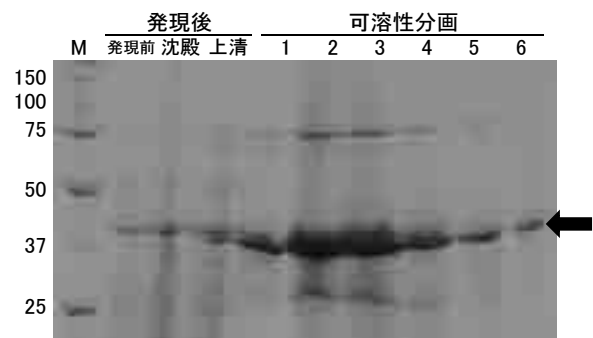


図1 可溶性分画に大量に認められた発現タンパク質 (矢印)

2 MAbの作製

PVY-O-CPをマウス10頭に免疫し、試採血して血清の抗体価を測定した(図2)。抗体価が高まったマウスのうち、PVY-Oに対する抗体価について各希釈段階での低下が緩やかなマウス3、PVY-Nに対する抗体価がPVY-Oに対する抗体価を下回るマウス7、またPVY-Oに対する抗体価は低いもののPVY-Nに反応しなかったマウス9を選抜した。これらのマウスの脾臓細胞から作製したハイブリドーマの培養上清では、健全葉に比べてPVY-Oに対する吸光値が高く、抗体価の上昇が見られた2A8、3F5、4D4を一次スクリーニングで選抜した(表2)。さらに二次スクリーニングで3F5由来の3F5(C3)、3F5(F6)、4D4由来の4D4(E11)、4D4(G3)、4D4(G4)を選定した(表3)。これからさらにクローン選抜を行い、抗体産生クローンとして3F5(F6) A8、4D4(G3) A4、4D4(G4) F7、4D4(G4) H6、4D4(G4) C3を得た。これらの培養上清はPVY-Oに安定した抗体価を示すものの、一部PVY-Nウイルス株にも抗体価が上昇した(表4)。

表2 ハイブリドーマ細胞培養上清の抗体価検定(一次スクリーニング)

ハイブリドーマ細胞名	吸光値(405nm)		
	PVY-O抗原*	PVY-N抗原吸光値	健全葉吸光値
1A4	1.443	1.197	1.336
1C12	0.312	0.254	0.308
1F5	1.119	0.916	1.112
1G5	1.433	1.183	1.434
<u>2A8</u>	0.078	0.006	-0.009
2A10	1.047	0.695	0.842
2F8	1.220	1.047	1.206
2H1	1.041	0.914	1.125
3E6	0.024	0.021	0.066
3E10	0.794	0.679	0.848
<u>3F5</u>	1.863	0.977	0.062
3G7	-0.012	-0.019	-0.008
4A7	0.011	0.006	0.000
<u>4D4</u>	3.425	0.725	-0.002
4E8	0.898	0.742	0.758
4H3	0.006	0.004	0.019
5C8	-0.028	-0.028	0.051
5D3	0.015	0.010	0.054
5G7	0.022	0.051	0.011
5F7	0.777	0.730	0.670

注) 下線のハイブリドーマを選抜した。

*: 各系統の抗原には罹病タバコ葉磨砕液(10倍希釈)を用いた

表3 ハイブリドーマ細胞クローン培養上清の抗体価検定(二次スクリーニング)

クローン	吸光値(405nm)						健全葉
	PVY-O抗原*			PVY-N抗原			
	中央農試	栗山2	Y-7	DK-87	北見農試	栗沢 キタアカリ	
2A8(C1)	0.052	0.024	0.257	0.004	0.006	0.062	0.002
2A8(H1)	0.036	0.024	0.192	0.001	0.003	0.041	0.007
2A8(H2)	0.044	0.046	0.288	0.004	0.003	0.048	0.009
2A8(H11)	0.038	0.032	0.241	0.005	0.012	0.052	0.029
3F5(A5)	2.286	0.471	3.309	0.064	0.195	1.697	0.003
<u>3F5(C3)</u>	0.432	0.105	1.382	0.042	0.084	0.615	0.005
3F5(C4)	1.097	0.501	2.305	0.108	0.275	1.500	0.014
<u>3F5(F6)</u>	1.058	0.331	2.356	0.109	0.266	1.483	0.015
4D4(C8)	2.586	0.573	3.272	0.088	0.338	2.195	-0.002
<u>4D4(E11)</u>	2.442	0.428	3.227	0.038	0.178	1.720	-0.001
<u>4D4(G3)</u>	2.068	0.278	3.189	0.020	0.086	1.152	0.034
4D4(G4)	1.668	0.218	3.197	0.020	0.079	1.047	0.002
Neogen社PVY-O抗体 PAb 間接法	0.158	0.094	0.119	0.009	0.031	0.042	0.004
Neogen社PVY-O抗体 PAb 直接法	0.618	0.056	0.411	0.030	0.059	0.066	0.007
PVY-N抗体 MAb 直接法	0.001	-0.015	3.433	0.434	3.383	3.376	-0.011

注) 下線のクローンを選抜した

*: 各系統のウイルス株には罹病タバコ葉磨砕液(10倍希釈)を用いた

表4 抗体産生クローンの培養上清の力価

選抜クローン	吸光値(405nm)						健全葉
	PVY-O抗原*			PVY-N抗原			
	中央農試	栗山2	Y-7	DK-87	北見農試	栗沢 キタアカリ	
3F5(F6) A8	1.155	0.961	1.356	0.412	1.563	0.884	-0.003
4D4(G3) A4	0.847	0.828	1.096	0.048	0.548	0.316	-0.003
4D4(G4) F7	0.127	0.155	0.168	0.008	0.059	0.036	0.007
4D4(G4) H6	3.407	0.287	2.168	0.575	0.255	0.096	0.003
4D4(G4) C3	3.015	0.125	1.122	0.242	0.059	0.034	0.001
対照) 市販PVY-O抗体 (PAb)	0.350	0.317	0.441	0.090	0.093	0.133	0.018

注) *各系統のウイルス株には罹病タバコ葉磨砕液(10倍希釈)を用いた

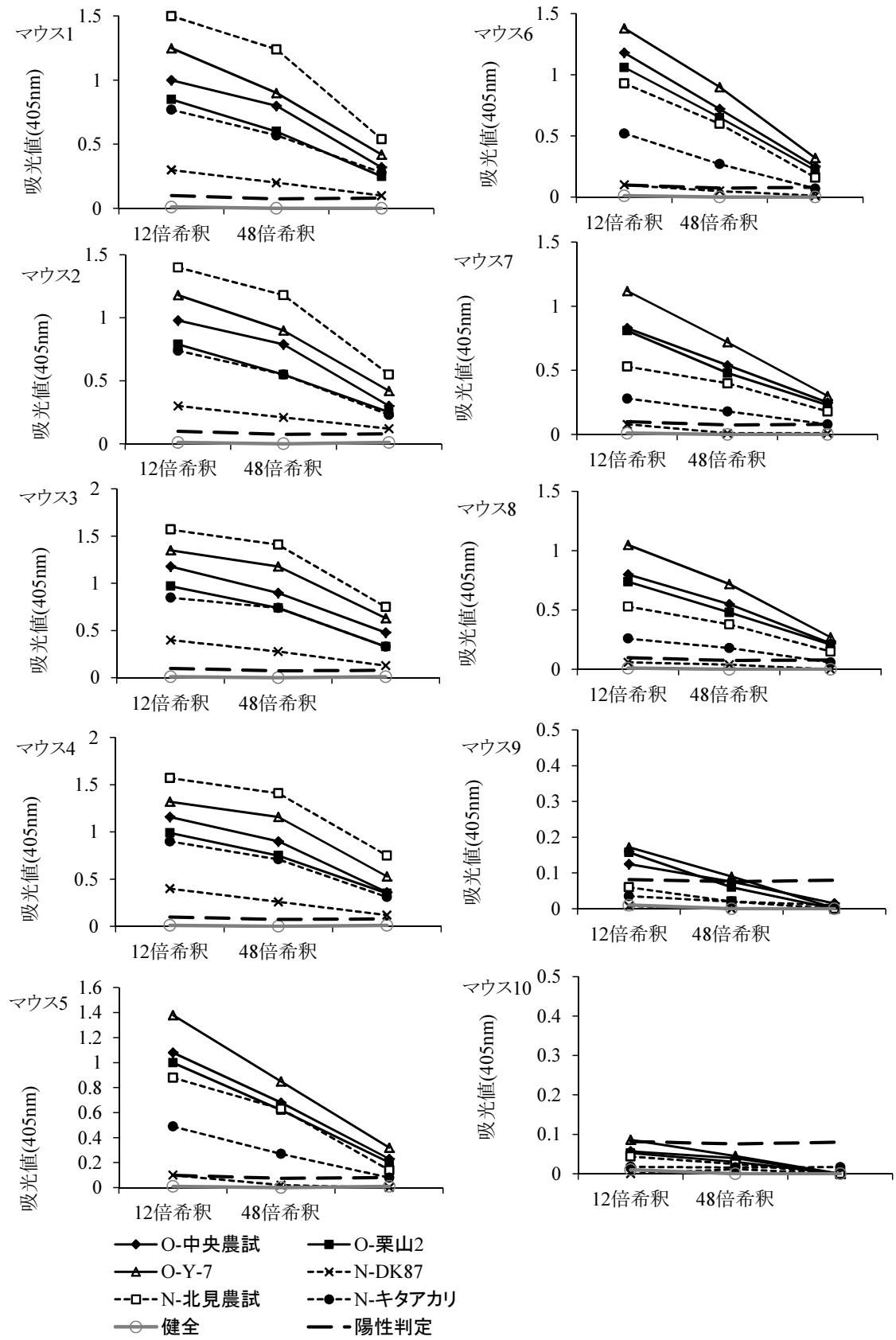


図2 抗原を免疫したマウスから得た血清の吸光値
 注) 凡例のOはPVY-Oウイルス株, NはPVY-Nウイルス株を示す

各クローンを接種したマウスから約10mlの腹水を得た。腹水1mlから0.5~1.0mg/mlのIgGを回収し、MAbを3~4mg得た。これらのPVY-Oに対する力価は高く、市販のPVY-Oに対するポリクローナル抗体 (PAb) の検出限界が400倍希釈までであったのに対して、25,600~102,400倍希釈まで検出することができた (図3)。しかし、PVY-Nに対しても反応がみられ、25,600倍まで検出された (図4)。

3 MAbによるELISA法の確立

1) DAS-ELISA

4D4 (G3) A4 (以下A4) または4D4 (G4) F7 (以下F7)

由来のIgGを一次抗体に、二次抗体にマウス-ヤギ抗体を用いたDAS-ELISAではIgGの1,000倍希釈で市販の抗体の吸光値が0.55だったのに対してA4-IgGで0.87、F7-IgGで0.62と高い力価を示し、3,000倍希釈でもPVY-Oを検出可能であった (表5)。

一次抗体にA4-IgG、二次抗体にA4-ECを用いたDAS-ELISAでは各抗体濃度を段階的に変えて検定したが、市販抗体では100倍希釈の抗原に対する吸光値が1.22だったのに対し、作製抗体どうしの組み合わせでは発色反応に3時間おいても0.18から0.27と低かった (表6)。

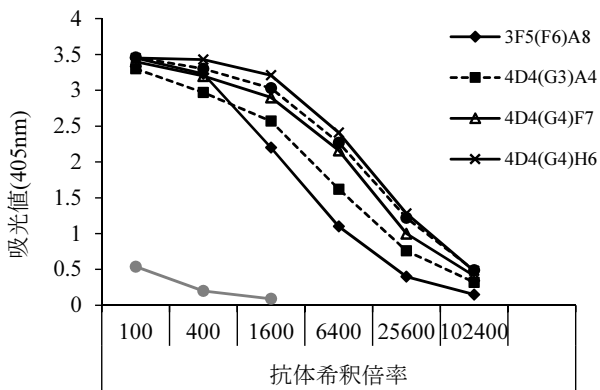


図3 PVY-Oモノクローナル抗体のPVY-Oに対する力価

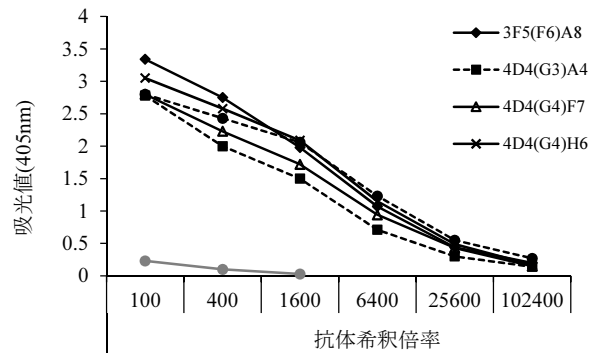


図4 PVY-Oモノクローナル抗体のPVY-Nに対する力価

表5 作製抗体 (IgG) を一次抗体に用いたDAS-ELISAのPVY-O抗原に対する吸光値 (405nm)

抗体	抗原	抗体希釈倍率			
		10	100	1,000	3,000
A4	PVY-O	3.50	2.57	0.87	0.49
	健全葉	0.16	0.03	0.00	0.01
F7	PVY-O	2.52	1.45	0.62	0.17
	健全葉	0.21	0.09	0.01	0.00
PVY-O/C Neogen No.1052-05	PVY-O	n.t.	n.t.	0.55	n.t.
	健全葉	n.t.	n.t.	0.01	n.t.

注) 2次抗体抗マウス-ヤギ抗体MIg5,000倍
*抗原には罹病 (または健全) タバコ葉磨砕液を用いた

表6 作製抗体のIgGとECを各希釈倍率の組合せで用いたDAS-ELISAにおけるPVY-O抗原に対する吸光値 (405nm)

抗原希釈	IgG希釈 EC希釈	×1,000			×3,000			×5,000			×10,000			Neogen社 Pab
		×300	×500	×800	×300	×500	×800	×300	×500	×800	×300	×500	×800	
10		0.46	0.30	0.65	0.30	0.57	0.84	0.40	0.75	0.56	0.55	0.49	0.50	3.50
100		0.20	0.18	0.24	0.18	0.23	0.30	0.19	0.27	0.24	0.20	0.25	0.19	1.22
1,000		0.06	0.07	0.17	0.08	0.10	0.15	0.06	0.13	0.16	0.07	0.15	0.09	0.20
10,000		0.04	0.02	0.02	0.04	0.05	0.08	0.02	0.04	0.07	0.02	0.08	0.01	0.06
100,000		0.01	0.01	0.00	0.02	0.03	0.05	0.00	0.03	0.06	0.01	0.04	0.00	0.04
1,000,000		0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.03	0.00	0.03	0.04	0.01
健全		0.01	0.02	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01

注) 下線部を陽性と判定, 発色反応3時間

2) PTA-ELISA

PTA-ELISA直接法では、抗原の吸着に2時間、EC (500倍希釈) を2時間反応させたところ、F7-ECでは罹病葉の1,000倍希釈まで2.13と高い吸光値を示し、A4-ECでは10,000倍希釈で0.38と目視でも判定が可能であった(表7)。A4-EC (500倍希釈) を用いて抗原の反応時間とECの反応時間を検討したところ、抗原の反応時間は15分以上で十分な吸光値が得られ (表8), ECの反応時間も15分以上で十分な吸光値を得た (表9)。A4-EC抗体を用いたPTA-ELISA直接法 (抗原吸着60分, 抗体反応30分) でサンプルの各希釈段階に対する反応を検証したところ、10,000倍希釈までPVY-Oが検出可能であった(図5)。また、A4-ECとD5-ECの混合液を用いるとPVYの両系統とも10,000倍希釈まで検出された (図6)。EC混合液を用いた反応は抗原吸着時間が30-60分, ECの反応が60分で、十分な吸光値が得られた (図7)。

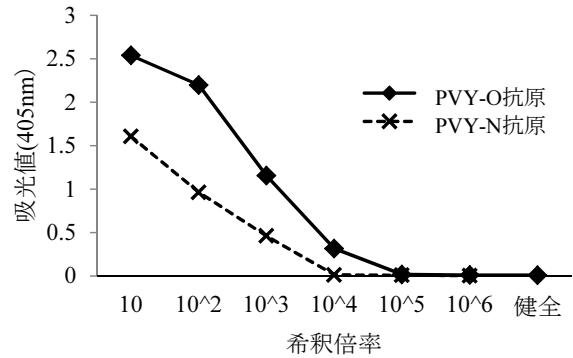


図5 抗原吸着60分-抗体反応30分条件でのPTA-ELISA直接法による検出感度

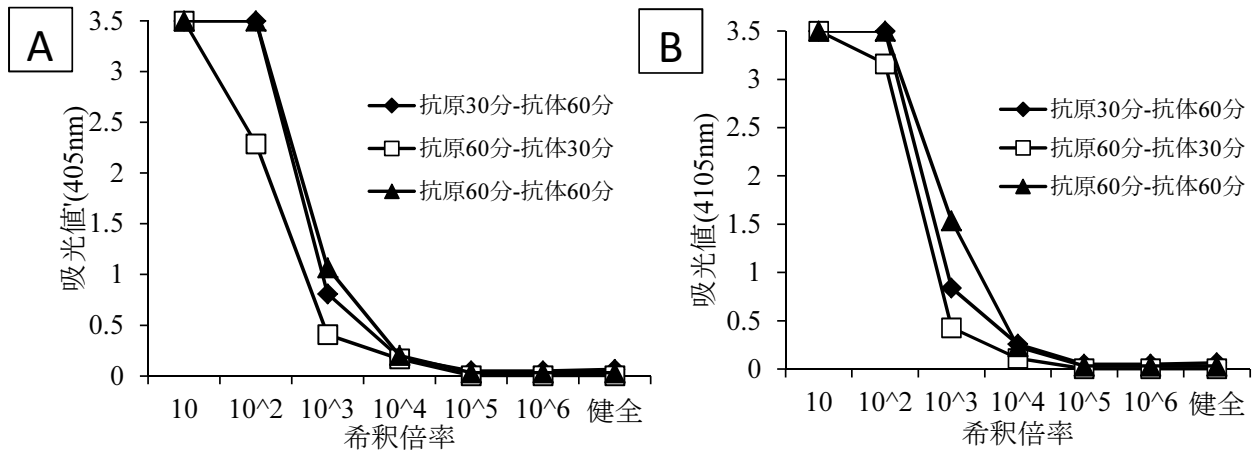


図6 抗原吸着60分-抗体反応60分条件でのPTA-ELISA直接法による検出感度

注) A : PVY-O抗原, B : PVY-N抗原

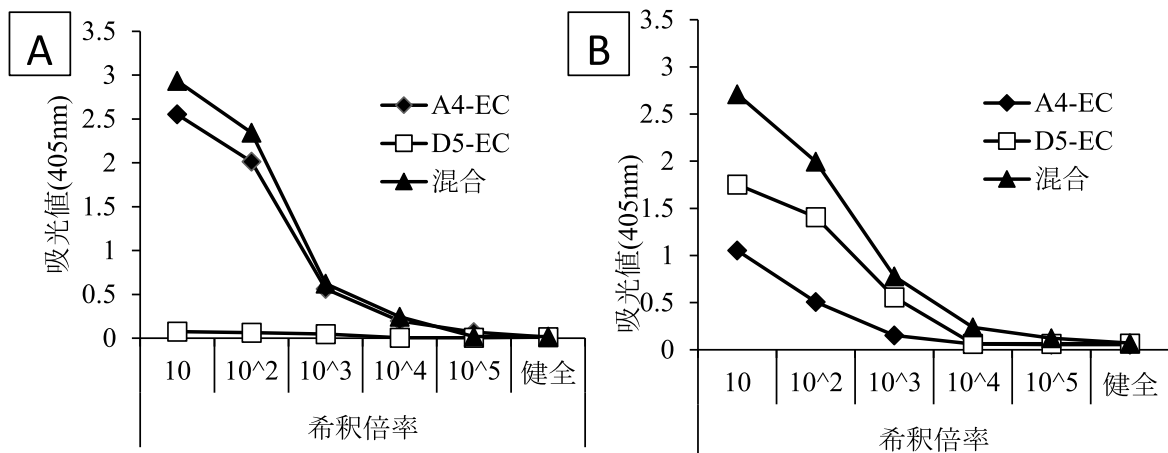


図7 コンジュゲート混合液によるPTA-ELISA直接法の反応時間と検出感度

注) A : PVY-O抗原, B : PVY-N抗原

表7 モノクローナル抗体を用いたPTA-ELISA直接法での異なる希釈倍率のPVY-O抗原に対する吸光値 (405nm)

抗体	×10	×100	×1000	×10000	×100000	×1000000	健全葉
F7-EC	3.5	3.27	2.1295	0.182	0.038	0.016	0.004
A4-EC	3.5	3.5	3.234	0.3775	0.053	0.015	-0.0015

注) 抗体は500倍希釈, 抗原吸着時間120分, 抗体反応時間120分, 発色反応60分

表8 モノクローナル抗体 (A4-EC) を用いたPTA-ELISA直接法での異なる抗原吸着時間における吸光値 (405nm)

抗原	抗原吸着時間			
	15分	30分	60分	120分
PVY-O	3.5<	3.5<	3.5<	3.5<
健全葉	-0.01	-0.01	-0.01	0.00

注) 抗原10倍希釈, 抗体は500倍希釈, 抗体反応時間120分, 発色反応60分

表9 作製抗体を用いたPTA-ELISA直接法での異なる抗体反応時間における吸光値 (405nm)

抗原	抗体反応時間			
	15分	30分	60分	120分
PVY-O	3.29	3.5<	3.5<	3.5<
健全葉	0.01	0.04	0.02	0.05

注) 抗原10倍希釈, 抗体は500倍希釈, 抗原吸着時間120分, 発色反応60分

表10 道内の圃場から採取したウイルス株に対する作製抗体の適用性 (PTA-ELISA直接法)

ウイルス	検定サンプル	No.	供試抗体			
			F7-EC (抗PVY-O)	E11-EC (抗PVY-N)	F7-EC+E11-EC 抗体混合	Neogen社 (抗PVY-O, N) DAS-ELISA
PVY-O	道内採取 ばれいしょ葉	1	<u>0.61</u>	0.03	<u>0.66</u>	<u>1.81</u>
		2	<u>0.27</u>	0.01	<u>0.30</u>	<u>2.27</u>
		3	<u>0.28</u>	0.02	<u>0.43</u>	<u>0.53</u>
		4	<u>0.43</u>	0.03	<u>1.00</u>	0.02
		5	<u>0.94</u>	0.04	<u>2.02</u>	<u>0.81</u>
		6	0.06	0.02	0.13	<u>3.50</u>
		7	<u>0.86</u>	0.03	<u>1.07</u>	<u>3.17</u>
		8	<u>0.64</u>	0.03	<u>0.81</u>	<u>0.54</u>
		9	<u>0.96</u>	<u>0.51</u>	<u>2.73</u>	<u>3.26</u>
		10	<u>1.44</u>	0.07	<u>2.49</u>	n.t.
	接種タバコ葉	1	<u>1.67</u>	0.09	<u>2.35</u>	<u>2.67</u>
		2	<u>1.16</u>	0.02	<u>0.90</u>	0.09
		3	<u>1.93</u>	0.03	<u>1.55</u>	<u>3.37</u>
		4	<u>1.53</u>	0.18	<u>1.84</u>	<u>2.96</u>
PVY-N	道内採取 ばれいしょ葉	1	<u>0.45</u>	<u>0.64</u>	<u>1.11</u>	<u>2.83</u>
		2	0.06	<u>0.23</u>	<u>0.22</u>	0.01
		3	0.11	<u>0.18</u>	<u>0.24</u>	<u>2.75</u>
		4	<u>0.21</u>	<u>3.29</u>	<u>3.50</u>	<u>1.86</u>
		5	<u>0.85</u>	<u>0.54</u>	<u>0.46</u>	<u>0.59</u>
		6	0.11	<u>3.14</u>	<u>3.44</u>	n.t.
	接種タバコ葉		0.03	<u>0.64</u>	<u>1.11</u>	<u>2.10</u>
PVY-N+PVS+PVX	ばれいしょ葉	1	<u>0.54</u>	<u>0.63</u>	<u>1.13</u>	n.t.
PVS	ばれいしょ葉	2	0.02	0.02	0.05	n.t.
PVS	接種タバコ葉	3	0.02	0.02	0.02	n.t.
PLRV	ばれいしょ葉	4	0.03	0.03	0.09	n.t.
健全葉	ばれいしょ葉		0.03	0.04	0.04	0.02

注1) 数字は吸光値 (405nm) で, 下線を引いたものは陽性と判定した

注2) n.t.: 未試験

4 道内のPVY株に対する反応およびPVY-OとPVY-Nの同時検定

F7-ECまたはF7-EC+E11-ECを用いたPTA-ELISAにより, PVY-Oでは供試した14サンプルのうち13サンプル

で検出された。一方, PVY-NはF7-EC+E11-ECでは供試したすべてのPVY-N保毒サンプルから検出することができたのに対し, F7-ECでは3サンプルの検出にとどまった (表10)。

考 察

本研究で作製したMAbは、PVY-Oに対して感度が高く、実用的な検出に適用できる。しかし、一部のPVY-Nに対しても反応し高い吸光値を示すことが確認された。抗原タンパクの作製に供試したPVY-O株のアミノ酸配列はデータベースのPVY-Oとの相同性が、CP全体では97%程度と高かったが、アミノ酸の変異がN末端に近い部分で多く見られていた。堀田ら⁴⁾が用いたPVY-N株と本報のPVY-O株でCPのアミノ酸配列を比較すると、PVY-Oの変異でN末端におけるPVY-Nとの相同性が高まっていた(データ省略)。PVY両系統間や株間のCPのアミノ酸配列の違いはN末端付近に多く見られるとされており^{5, 7)}、このことが作製したPVY-O抗体がPVY-N株にも反応した一因であると考えられた。

本研究で作製した抗体のIgGとECを組み合わせて用い、DAS-ELISAへの適応を検討したが、検出感度は低下した。大腸菌発現タンパク質を用いて作製された抗体ではDAS-ELISAでの検定ができない例が報告されており²⁾、この原因として抗体タンパク質の立体構造などの影響が考えられ、二次抗体反応時に用いる緩衝液の高pH下などでは本来のウイルス粒子の抗体結合部を認識していない可能性が示唆されている。

今回作製した抗体は、PTA-ELISA直接法の方が高感度で各反応時間が短く、迅速な検定が可能であり、実用的であると考えられた。本法ではPVY-Nについても同時に検出してしまう株があり、特異性はやや劣るという点があるが、PVY-N抗体のECと併用あるいは混合して検定を行うことで、両系統に対して検出可能になる。ジャガイモのウイルス病診断では、種いも検査時の抜き取り株の判断のように、迅速な判断が求められることが想定される。現在までPVYに対するELISAはPVY-OおよびPVY-Nのそれぞれに対して個別に実施してきたが、PVY両系統の抗体から作製したECを混合して用いることで、PVYのELISAを効率的に実施できる。加えて、PTA-ELISA直接法は簡便で検定にかかる時間も短く、農業協同組合や農業改良普及センターにおいても導入しやすいと考えられる。

引用文献

- 1) Chikh Ali, M., Karasev, A. V., Furutani, N., Taniguchi, M., Kano, Y., Sato, M., Natsuaki, T., Maoka, T. Occurrence of Potato virus Y strain PVY^{NTN} in foundation seed potatoes in Japan, and screening for symptoms in Japanese potato cultivars. *Plant Pathology*. 62, 1157-1165 (2013)
- 2) Folwarcza, J., Plchova, H., Moravec, T.,

Hoffmeisterova, H., Dedic, P., Cerovska, N. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of Potato virus Y. *Folia Microbiol.* 53(5), 438-442 (2008)

- 3) 萩田孝志, 大島一里, 井上アリセ和子, 四方英四郎. 北海道におけるジャガイモYウイルス (PVY) の発生とモノクローナル抗体による病原ウイルスの検出. *日植病報*, 56, 425 (1990)
- 4) 堀田治邦, 佐々木 純, 竹内 徹. ジャガイモYウイルスえそ系統に対するモノクローナル抗体作製とELISAによる検出. *道総研農試集報*. 98, 65-75 (2014)
- 5) Kuwata, S. Production and selection of a monoclonal antibody specific to a Japanese necrotic strain of Potato virus Y. *明治大学農学部研究報告*. 129, 1-10 (2001)
- 6) 大島一里, Inoue, A. K., 石川 陽, 四方英四郎, 萩田孝志. ジャガイモYウイルス普通系統およびえそ系統に特異的なモノクローナル抗体の作製とその診断への利用. *日植病報*. 56, 508-514 (1990)
- 7) 大島一里, 畑谷達児, 佐野輝男, Inoue, A. K., 四方英四郎. ジャガイモYウイルス普通系統およびえそ系統の外被タンパク質のアミノ酸配列と生物学的, 血清学的比較. *日植病報*. 57, 615-622 (1991)
- 8) 岡田雅人, 宮崎 香編. タンパク質実験ノート (上) 抽出・分離と組換えタンパク質の発現. 羊土社, 東京, 2008, P.217
- 9) 佐藤仁敏, 畑谷達児, 岩崎真人. RT-PCRによるジャガイモ休眠塊茎からの4種ウイルスの検出. *北日本病虫研報*. 51, 87-92 (2000)

Production of Monoclonal Antibodies to Recombinant Coat Protein of *Potato virus Y* Ordinary Strain and Their Effectiveness for Virus Detection by Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Ayumi NOTSU^{*1}, Jun SASAKI^{*2} and Harukuni HORITA^{*3}

Summary

Monoclonal antibodies (MAbs) to the ordinary strain of *Potato virus Y* (PVY-O) were produced. The coat protein gene of PVY-O was cloned into the expression vector pCold I. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* to express the coat protein. The purified coat protein was used for mouse immunization. Hybridoma cells were generated from mice which showed high titer of antibodies to PVY-O. The antibody-producing clones established from the cultured cells was inoculated into mice to obtain MAbs. The MAbs detected PVY-O with high sensitivity but reacted against several isolates of the necrotic strain. With these MAbs we established the direct plate trapped antigen ELISA, a simple and rapid detection method. By this method, PVY-O was detected in 12 out of 13 potato samples collected in Hokkaido prefecture. We also demonstrated that all the PVY isolates can be detected by using the MAbs and with PVY-N antibody MAb D5.

^{*1} Hokkaido Research Organization, Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan

E-mail: notsu-ayumi@hro.or.jp

^{*2} ditto. (Present; Hokkaido Research Organization, Ornamental Plants and Vegetables Research Center, Takikawa, Hokkaido, 073-0026 Japan)