平成２２年度成績概要書

研究課題コード：　129201（重点研究）

１．研究成果

１）研究成果名：エライザ法によるナガイモえそモザイク病の診断
（予算課題名：地域特産作物の安定生産を阻害する種苗伝染性ウイルスの検査技術の開発）
２）キーワード：エライザ法、抗体、診断、ながいも、ヤマノイモえそモザイクウイルス
３）成果の要約：ヤマノイモえそモザイクウイルスの外被タンパク質を大腸菌発現系で作製し、家兎に免疫して抗体を得た。同抗体のエライザ法はサンプルを-15℃以下で６時間以上凍結させ、通常の磨砕バッファーに１％スキムミルク、２％Tween20を加えて使用することで、罹病葉の1.8×10^2倍希釈までウイルスを検出できる。

２．研究機関名

１）担当機関・部・グループ・担当者名：中央農試・病虫部・予察診断G・堀田治邦
２）共同研究機関（協力機関）：十勝農業協同組合連合会　農産部農産化学研究所
（網走農業改良普及センター清里支所、網走支所）

３．研究期間：平成20～22年度　（2008～2010年度）

４．研究概要

１）研究の背景　ながいもは栄養繁殖性の作物で、ヤマノイモえそモザイクウイルス(CYNMV)の発生が問題である。ウイルスの診断法としてエライザ法があるが、これに使用する抗体は今まで作製されていない。
２）研究の目的　CYNMVの抗体作製とエライザ法（DAS-ELISA)による検定法を確立する。

５．研究方法

１）CYNMV抗体の作製
・ねらい　抗原であるCYNMVの外被タンパク質（CP）を大腸菌内でを人工的に発現させ、これを家兎に免疫して抗体を作製する。
・試験項目等　（１)用いるウイルス株のCP遺伝子解析、（２)CP遺伝子の大腸菌発現ベクターへの組み込み、（３)CPの大量発現、（４)家兎への免疫と抗体価の検査
２）エライザ法の改良と実証
・ねらい　抗体をエライザ法の検定に適用させるため、サンプルの調整および検定法を定め、一般ほ場で発生したサンプルを用いて実証する。
・試験項目等　（１)磨砕用バッファーの改良、（２)サンプル凍結の検討、（３)作製抗体のエライザ法での評価、（４)一般ほ場サンプルを用いたエライザ法の実証

６．研究の成果

１）大腸菌発現系のpMALベクターおよびpCold Ｉベクターを用いて、CYNMV-CPを可溶性分画に発現させた。これを精製し、高純度の抗原（外被タンパク質）を作製した（図１）。
２）大腸菌で発現させたCYNMV-CPを家兎に免疫し、３種の抗体を得た。
３）通常の磨砕用バッファー（PBS-Tween＋PVP）に１％スキムミルク、２％Tween20を添加したバッファー（ながいもバッファー）を使用し、さらに-15℃以下で６時間以上凍結させた罹病葉を供試して検定すると吸光値の顕著な上昇が見られた(図２)。
４）３種の抗体のうち、２抗体（pMAL抗体、pColdR１抗体）がエライザ法に適用でき、1.8×10^2倍希釈まで検出できた(図３)。
５）以上の結果をまとめて、ヤマノイモえそモザイクウイルスのエライザ検定法を図４に示す。
６）現地ほ場での発病は７月下旬から見られ、エライザ検定で発病株を判定できた。延べ30株のうち、５株を陽性と判定した。検定葉は下位葉が望ましい。
７）一般ほ場から診断を依頼されたサンプル31点のうち、13点をエライザ法で陽性と診断した。

＊用語解説
・エライザ法・・・プレート上で抗原抗体反応を利用して発色させ、検定する方法。
・外被タンパク質・・・ウイルス粒子の外側を覆うタンパク質で、抗体を作製する場合は、同タンパク質が抗原として認識される。
・大腸菌発現ベクター・・・大腸菌内で外来遺伝子からタンパク質を作製できる環状遺伝子。

＜具体的データ＞

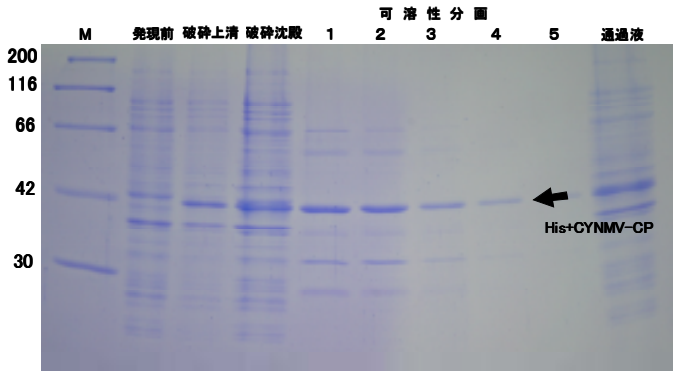

図１　発現誘導菌体(pColdベクター使用)より抽出・精製したウイルス外被タンパク質（矢印）

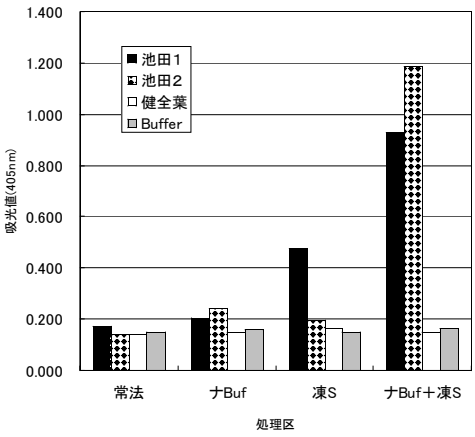

図２　磨砕バッファーとサンプル凍結によるエライザ法の改良
注）ナBuf;ながいもバッファー使用、凍S;サンプル凍結処理

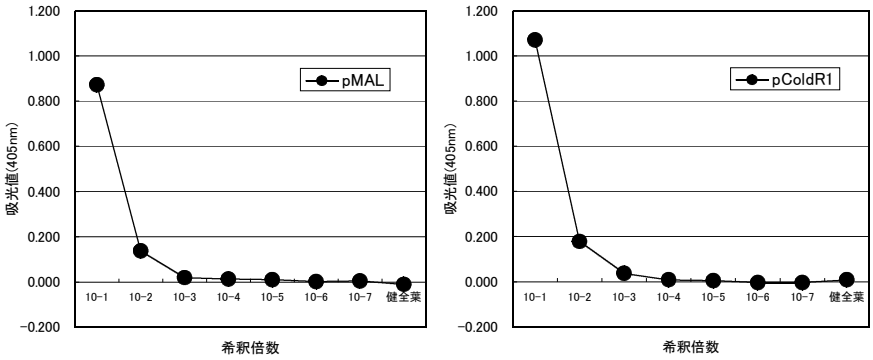

図３　作製抗体(pMAL抗体、pColdR1抗体)の罹病葉希釈によるエライザ法での検出限界

①	ながいも**下位葉**からサンプルを採取
②	サンプル(0.1g)を-15℃以下で6時間以上**凍結**
③	コーティング液を各ウエルに200μl分注。37℃3時間静置
④	PBS-Tで5回洗浄
⑤	**ながいもバッファー**(注1)で試料を**磨砕**(注2)。各ウエルに200μl分注
⑥	マイクロプレートを4℃で一晩静置
⑦	PBS-Tで5回洗浄
⑧	コンジュゲート液を各ウエルに200μl分注。37℃3時間静置
⑨	PBS-Tで5回洗浄
⑩	基質溶液を250μl分注。1時間後に吸光値(405nm)を測定

注1
通常の磨砕液(PBS-T＋PVP)に1%スキムミルク、2%ツイーン20を添加

注2
乳鉢に**石英砂**を入れ、試料0.1g当たり0.9mlのながいもバッファーで磨砕。これを2mlのサンプルチューブに移す。0.9mlで乳鉢を洗浄し、この液も移す(**18倍希釈**)。4,000rpmで5分遠心分離。

図４　ヤマノイモえそモザイクウイルスのエライザ法による検定マニュアル

７．成果の活用策

１）成果の活用面と留意点

（１）作製した抗体はエライザ法によるながいものウイルス診断が実施できる機関（農業団体、普及センター等）で広く活用できる。

（２）抗体は道総研中央農業試験場における「エライザ検定用抗体キット等の管理および提供要領」に基づき、配布可能である。

２）残された問題とその対応