

平成26年度 成績概要書

課題コード（研究区分）：4104-699221（受託（民間）研究）、4104-692466（受託（民間）研究）

1. 研究課題名と成果の要点

- 1) 研究成果名：ジャガイモYウイルス普通系統（PVY-0）に対する特異抗体の作製と利用法
（研究課題名：ばれいしょの病原ウイルスに対する特異抗体の作製と高感度検定法の確立
ばれいしょに発生する重要ウイルスの病原性解明と検出技術の実用化）
- 2) キーワード：ばれいしょ、ウイルス病、PVY-0、モノクローナル抗体、ELISA 法
- 3) 成果の要約：ばれいしょで最も重要な病原ウイルスであるジャガイモYウイルス（PVY）について、普通系統に対するモノクローナル抗体を作製した。抗体は各種 ELISA 法に使用可能で、簡易 ELISA による迅速な検定系を確立した。本抗体と開発済みの PVY-N 抗体により道内で発生する PVY の両系統を検出可能となった。

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 研究主任 野津あゆみ
- 2) 共同研究機関（協力機関）：なし

3. 研究期間：平成22～26年度（2010～2014年度）

4. 研究概要

1) 研究の背景

ウイルス病の検定には ELISA 法が最も広く用いられているが、その検定には高品質の抗体が必要である。ばれいしょで最も問題となる PVY では、市販されている国内外の抗体は一部非特異反応が見られたり、高価格であるなどの問題点がある。これまで PVY えそ系統（PVY-N）については、すでに中央農試で特異性の高い抗体を作製済みであるが、PVY の検定に当たっては普通系統（PVY-0）の抗体を揃える必要がある。

2) 研究の目的

PVY-N で確立した手法を用いて、PVY-0 に特異性の高い抗体を作製する。また、これを利用した ELISA 検定技術を開発する。

5. 研究内容

1) 大腸菌発現系によるウイルス抗原の作製

- ・ねらい：大腸菌発現系を利用して、抗原タンパク質を得る。
- ・試験項目等：抗原となる外被タンパク質（CP）領域遺伝子の増幅、大腸菌への組み込み、CP の発現・精製

2) ウイルス抗原を用いたモノクローナル抗体の作製

- ・ねらい：特異性の高いモノクローナル抗体を作出する。
- ・試験項目等：抗原をマウスに免疫、ハイブリドーマ細胞の選定、クローニング、マウス腹水からモノクローナル抗体を精製

3) モノクローナル抗体による ELISA 法の確立と実用性の検討

- ・ねらい：モノクローナル抗体を用いた ELISA 法を確立する。
- ・試験項目等：酵素標識抗体の作製とキットによる検出系の確立、簡易 ELISA の開発、現地罹病葉からの検出

6. 成果概要

1) 道内で採取した PVY-0 株の CP 領域を組み込んだ大腸菌クローンを作製し、培養菌体から純度の高い PVY-0 抗原タンパク質を作製した。

2) 抗原タンパク質をマウスに免疫し抗血清を得た。十分な力価が得られた個体から作出したハイブリドーマ細胞を培養し、5 クローンを選抜した。この抗体産生クローンをマウス腹腔に接種して得られた腹水からモノクローナル抗体を得た。この抗体は PVY-0 に対して 102,400 倍希釈まで高感度に検出することができた。PVY-N に対しても 25,600 倍まで反応した。

3) 作製したモノクローナル抗体から酵素標識抗体（EC）を作製し、これを用いた簡易で迅速な検出系（簡易 ELISA）を確立した（図1、2）。この系では、DAS-ELISA で1日半かかる検定を3時間半で行うことができる。簡易 ELISA によって道内採取ウイルス株の検出を試みた結果、PVY-0 については1検体を除き13検体を検出することができた。PVY-N の抗体と混合して検定に用いることで PVY の両系統を同時に検出することができた（表1）。

4) 本抗体により、種ばれいしょ生産現場での PVY-0 の迅速な診断が可能であり、既に開発済みの PVY-N の抗体の EC と併せて検定することで、道内で問題とされる PVY の両系統を検出することが可能となった。

【用語説明】

ELISA 法：プレート上で抗原抗体反応を利用して発色させ、病原ウイルス等を検出する方法。比較的簡便で精度が高いため広く利用されている。

モノクローナル抗体：単一の抗体産生細胞が作る、単一の抗体で、一般に抗原に対する特異性が高い。ELISA 法の検出精度は、抗体の良否にかかるところが大きい。

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、抗体が抗原として認識する。

<具体的データ>

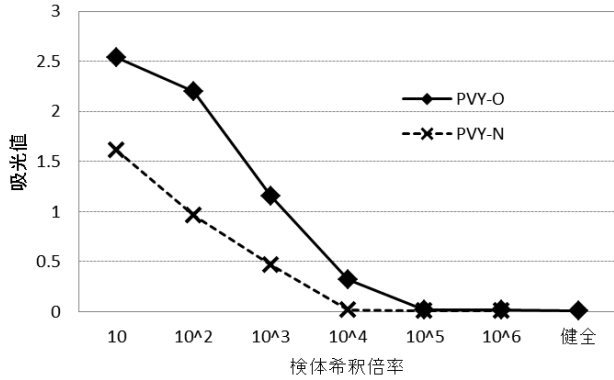


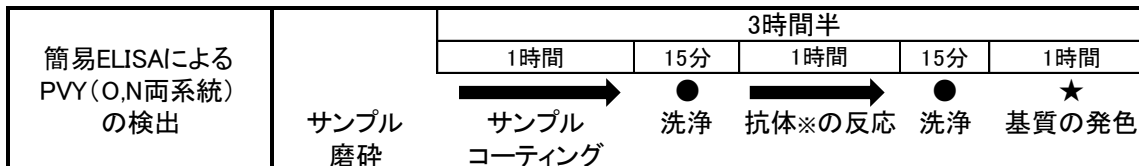
図1. 作製抗体 (抗PVY-O)を用いた簡易ELISA法によるPVY検出感度

表1. 簡易ELISAによるPVY道内採取株の検出

ウイルス系統	サンプル No.	F7抗体EC※ (抗PVY-O)	E11抗体EC (抗PVY-N) ※※	F7抗体EC + E11抗体EC 抗体混合	参考)市販抗体 (抗PVY-O,N) DAS-ELISA	検定サンプル
PVY-O	1	0.61	0.03	0.66	1.81	道内採取 ばれいしょ葉
	2	0.27	0.01	0.30	2.27	
	3	0.28	0.02	0.43	0.53	
	4	0.43	0.03	1.00	0.02	
	5	0.94	0.04	2.02	0.81	
	6	0.06	0.02	0.13	3.50	
	7	0.86	0.03	1.07	3.17	
	8	0.64	0.03	0.81	0.54	
	9	0.96	0.51	2.73	3.26	
	10	1.44	0.07	2.49	n.t.※※※	
	11	1.67	0.09	2.35	2.67	接種タバコ葉
	12	1.16	0.02	0.90	0.09	
	13	1.93	0.03	1.55	3.37	
	14	1.53	0.18	1.84	2.96	
PVY-N	15	0.45	0.64	1.11	2.83	道内採取 ばれいしょ葉
	16	0.06	0.23	0.22	0.01	
	17	0.11	0.18	0.24	2.75	
	18	0.21	3.29	3.50	1.86	
	19	0.85	0.54	0.46	0.59	
	20	0.11	3.14	3.44	n.t.	
	21	0.03	0.64	1.11	2.10	接種タバコ葉
PVY-N+PVS+PVX	22	0.54	0.63	1.13	n.t.	ばれいしょ葉
PVS(ジャガイモウイルスS)	23	0.02	0.02	0.05	n.t.	ばれいしょ葉
PVS(ジャガイモウイルスS)	24	0.02	0.02	0.02	n.t.	接種タバコ葉
PLRV(ジャガイモ葉巻ウイルス)	25	0.03	0.03	0.09	n.t.	ばれいしょ葉
健全葉	26	0.03	0.04	0.04	0.02	ばれいしょ葉

網掛けを陽性と判定。

※EC:酵素標識抗体 ※※平成20年指導参考で作製したPVY-N特異抗体 ※※※n.t.:未供試



※抗体はPVY-O抗体、PVY-N抗体の酵素標識抗体をそれぞれ500倍と1000倍になるよう混合

系統識別を同時に行う際には、抗体それぞれを上記の濃度で使用する

図2. 作製抗体を用いた簡易ELISAによるPVY検定手順

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ELISA法による診断が実施できる機関(農協、普及センター等)で広く活用できる。
- (2) 本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」に基づき配布する。
- (3) 本抗体はPVY-Nの一部ウイルス株に反応する。

2) 残された問題とその対応 なし

8. 研究成果の発表等 なし