

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^{*1, 2}

堀田 治邦^{*3} 佐々木 純^{*4} 竹内 徹^{*5}

ジャガイモYウイルスえそ系統 (PVY-N) の外被タンパク質 (CP) を大腸菌で発現させ、これに対するモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、ELISA法への適用を検討した。RT-PCRによって増幅させたCP遺伝子をpMAL-c2X発現ベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換後、タンパク質を発現させてPVY-NのCPを得た。これをマウスに免疫し、PVY-Nタバコ罹病葉 (以下、罹病葉) を用いて血清の抗体価を測定後、マウスを選定し、ハイブリドーマを作製した。限界希釈して得たクローンについて罹病葉を抗原としたスクリーニングを行い、PVY-Nに広く反応するMAbを得た。MAb D5を用いて直接吸着法 (PTA-ELISA)、ELISA法の二重抗体サンドイッチ法 (DAS-ELISA)、三重抗体サンドイッチ法 (TAS-ELISA) に用いたところ、いずれのELISAにも適用でき、DAS-ELISAおよびTAS-ELISAでは罹病葉の 10^4 希釈、PTA-ELISAでは 10^5 希釈まで反応が認められた。また、MAb D5は抗原吸着を 37°C で1時間、標識抗体を 37°C で1時間反応させる直接法PTA-ELISAにも適用でき、その感度は罹病葉の 10^4 希釈までであった。MAb D5株はすべてのPVY-Nウイルス株を検出したが、一部のPVY-Oウイルス株にも反応した。

緒 言

栄養繁殖性である馬鈴しょの栽培において、ウイルス病の発生は最も問題で、健全種いもの生産は対策の第一歩である。戦後まもなく植物防疫法に基づく無病種いもの増殖・供給体制が整備され、茎頂培養技術の確立によってウイルスフリー種いものが普及している。北海道で近年問題となっているウイルスはジャガイモYウイルス (*Potato virus Y*, 以下、PVY)、ジャガイモ葉巻ウイルス、ジャガイモSウイルス、ジャガモXウイルスの4種である¹⁾。この中でPVYは多くのアブラムシが媒介に關

与し、伝搬効率が高いことや生育後期の感染が多く、原々種~採種種いもの生産において抜き取りが難しいため、最も発生が多いウイルスである。PVYはいくつかの系統があるが、北海道ではえそ系統 (以下、PVY-N (=PVY-T)) が発生の大多数を占めている^{4, 11, 15)}。PVY-Nは多くの品種において病徴が不明瞭で、病株の抜き取りをさらに困難にしているのが現状である⁴⁾。

ウイルスの診断法として、血清学的手法を用いた酵素結合抗体法 (以下、ELISA) は1970年代後半に開発され²⁾、簡便な手法のため、現在では広く普及している。しかし、ELISAの精度向上のためにはより良質の抗体が求められている。一般的な抗体作製法 (ポリクローナル抗体; 以下、PAb) は、感染植物の大量増殖や高額設備 (超遠心分離機など)、高度特殊技術を利用してウイルス粒子を精製し、これを小動物に免疫して作製している。この方法でも精製不良による植物成分の混入で非特異反応が生じることや、小動物の抗体作製能力に差があることなどで、抗体のロットごとで品質が異なり、良質な抗体を安定供給できない問題点が指摘されている。より精度の高い抗体を得るため、モノクローナル抗体 (以下、MAb) の作製技術が開発され⁶⁾、マウスで獲得免疫を司るB細胞に免疫させ、これを腫瘍細胞 (ミエローマ) と細胞融合させて増殖能を持たせた融合細胞 (ハイブリドーマ) を作製し、その細胞から抗体産生細胞を選抜するこ

2013年10月31日受理

*1 本研究は農林水産省高度化事業「ジャガイモ病害虫の簡易検出・高精度診断技術の開発」の課題で実施した。

*2 本報の一部は2008年日本植物病理学会本大会で発表した。

*3 (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 (現: 同道南農業試験場, 041-1201 北斗市本町)

E-mail: horita-harukuni@hro.or.jp

*4 同上 (現: 同北見農業試験場, 099-1496 常呂郡訓子府町)

*5 同上 (現: 同中央農業試験場, 069-1395 夕張郡長沼町)

とで良質な単一の抗体が得られる。

近年、大腸菌プラスミドに特定遺伝子を組み込み、形質転換させて人工的に特定のタンパク質を発現させる技術が開発され、広い分野で活用されるようになった¹³⁾。植物ウイルスの抗体作製においてもこの手法を用いて抗体を作製する事例が報告されている^{3, 8, 9, 16)}。

本報告では、PVY-N系統を対象とし、*in vitro*で大腸菌に外被タンパク質 (CP) を大量に発現させ、これを抗原としてMAbを作製した結果を報告する。さらに各種ELISAに作製したMAbを適用し、評価を行った結果も報告する。

試験方法

1 PVY-N-CPの大腸菌による発現

PVY-N-CP領域遺伝子の塩基配列を決定した。ウイルス株は中央農試保存のPVY-N (DK-87株; 栗沢町「男爵薯」分離株, KK-03株; 栗沢町「キタアカリ」分離株, Ki株; 北見農試産塊茎由来株) を供試した。各ウイルス株について、フェノール法にてRNAを抽出し、PVYのCP遺伝子をコードする領域に特異的なプライマーを用いてCP領域の全長を増幅した。このPCR産物をダイレクトシーケンスで塩基配列を決定した。これらのアミノ酸配列を日本DNAデータバンク (DDBJ) に登録されているPVY-N-CP配列と比較し、最も保存性が高い株を選定した。

末端に制限酵素サイト (*EcoR* I および *BamH* I) を付加したプライマーによるRT-PCRでCP遺伝子全長を含む

領域を増幅し、この断片を同じ制限酵素サイトで切断したpMAL-c2X発現ベクター (New England Biolabs社) に挿入し、大腸菌に形質転換させた。SOB平板培地で生育した大腸菌コロニーを釣菌し、CP遺伝子が挿入された菌株を選定した。

選定した菌株を用いて発現ベクターのマニュアルに従ってタンパク質の発現を行った。すなわち、10mlのLB培地 (50 μ l/mlのアンピシリン加用) で一昼夜培養した菌体をLB培地100ml (500mlフラスコ) に1 ml加えて2時間培養した。その後、タンパク質の発現を誘導するため、0.5%イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を300 μ l添加し、さらに2時間培養した。

培養後、菌体を集菌し、1日-30°Cで凍結後、菌体を超音波破碎装置で破碎した。遠心上清をタンパク電気泳動によってMBP2+PVY-N-CPの発現を確認後、アフィニティーカラム (アミロース) に吸着させ、洗浄後、マルトース含有バッファーを加えて、カラムから遊離させ、MBP2+PVY-N-CPを精製した。

この一部試料をFactor Xa酵素でMBP2とPVY-N-CPの結合を切断し、電気泳動で切断を確認後、PVY-N-CPをDEAE-セファロースカラムで分離した。

2 MAbの作製

大腸菌発現タンパク質のマウスにおける免疫試験の詳細を表1に示す。MAbの作製手順は常法⁶⁾に従い、マウス (BALB/c) への免疫~腹水の採取は(株)ホクドーに委託した。マウスの血清およびハイブリドーマ各段階

表1 抗原投与試験区一覧

項目	処理区			
	A	B	C	D
アジュバント	ゲルブアジュバント*	ゲルブアジュバント	通常**	通常
抗原	MBP2+PVY-N-CP***	PVY-N-CP	MBP2+PVY-N-CP	PVY-N-CP
頭数	5頭	5頭	5頭	5頭
投与量	10 μ g	10 μ g	50 μ g	50 μ g
投与場所	腹腔内	腹腔内	背部皮下	背部皮下
投与間隔	1週間おき3回	1週間おき3回	2週間おき3回	2週間おき3回
採血	0week, 3week	0week, 3week	0week, 5week	0week, 5week

* 免疫活性物質GMDP (グリコペプチド)、脾臓細胞活性化剤「シメチジン」などを含むアジュバント溶液タイプで水と抗原を加えるだけなので、エマルジョンの必要なし

** 初回は Freund 完全アジュバント (熱殺菌の *Mycobacteria* を加えたオイルエマルジョン)、2回以降は Freund 不完全アジュバント (オイルエマルジョン) を使用

*** MBP2: マルトース結合タンパク質, PVY-N-CP: PVY-N系統外被タンパク質

の培養上清における抗体価測定は中央農試で実施した。マウスへの免疫に当たって、アジュバントは1回目に Freund完全アジュバント、2回目以降は Freund不完全アジュバントを用いる処理区（以下、通常法）およびゲルプアジュバント処理区（以下、ゲルプ法）、発現タンパク質はMBP2+PVY-N-CPおよびPVY-N-CP処理区とし、この組み合わせによる4処理区を設けた。3回免疫後、部分採血を行い、ELISAの直接吸着法（PTA-ELISA）で抗体価を測定した。高い抗体価を持つマウス3頭を選び、追加免疫を実施した。その後、部分採血を行って、PTA-ELISAで抗体価を測定し、マウス2頭を選定した。

選定したマウスから脾臓細胞を摘出してミエローマと細胞融合し、ハイブリドーマを作製した⁶⁾。さらにハイブリドーマの選択（HAT選択）、抗体産生細胞のクローニング（2回実施）を行った。各段階の培養上清に対してPVY-Nタバコ罹病葉を抗原としたPTA-ELISAで抗体価を測定した。抗体価の高い細胞6株を保存し、このうち最もPVY-Nに抗体価が高かったD5株をマウス腹腔内へ接種し、抗体が浮遊する腹水を採取した。腹水からアフィゲルプロテインA MAPS II カラム（Bio-Rad社）で γ -グロブリン（IgG）を精製し、抗体を得た。

対照としてポリクローナル抗体（PAb）も作製し、MAbと比較した。家兎への免疫はPVY-N-CPを用い、（株）ホクドーの協力を得て実施した。3回免疫後、部分採血を行い、抗体価を測定するとともに追加免疫を2回実施し、その後、全採血を行って抗血清を得た。アフィゲルプロテインAカラムでIgGを精製し、抗体を得た。

3 MAbを用いたELISA

1) MAbの各種ELISAに対する適用とその精度

MAbを各種ELISAへ供試するため、エンザイムコンジュゲート（EC）を作製した。グルタルアルデヒド法を用いてアルカリフォスファターゼをMAbに標識した。PAbに対しても同様にECを作製した。

MAbを用いてPTA-ELISA、二重抗体サンドイッチ法ELISA（DAS-ELISA）および三重抗体サンドイッチ法ELISA（TAS-ELISA）に適用する条件を検討した。PTA-ELISAは3手法、DAS-ELISAは3手法、TAS-ELISAは1手法の計7手法（表4参照）についてELISAの最適条件を検討した。

各エライザ法の精度を検証するためにPVY-Nタバコ罹病葉を磨砕用バッファーで10, 100, 1,000, 10,000, 100,000, 1,000,000倍に希釈し、タバコ健全葉を対照（同倍率で希釈）として抗体価を測定した。

2) 直接法PTA-ELISAによる検定

PVY-N罹病葉の磨砕液を直接プレートに吸着し、ECと結合させ、基質を加えて発色させるELISA（直接法

PTA-ELISA）について検討した。PVY-Nのタバコ罹病葉を37°Cで吸着させ、15分、30分、60分の処理時間を設けた。ECは37°Cで15分、30分、60分の処理時間と希釈倍数も組合せ、検出条件を検討した。対照としてタバコ健全葉を用いた。各葉は10倍量の磨砕液で磨砕した。

最適な検出条件下で、直接法PTA-ELISAの精度を求めた。抗原はPVY-Nタバコ罹病葉を磨砕液で10, 100, 1,000, 10,000, 100,000, 1,000,000倍に希釈し、タバコ健全葉を対照（同倍率で希釈）とした。

3) 市販抗体との比較

作製したMAbと市販のPVY抗体4種についてその検出精度を比較した。市販抗体はすべてDAS-ELISAに適用する抗体であるため、作製MAbもDAS-ELISAで比較した。抗原はPVY-Nタバコ罹病葉を磨砕液で10, 100, 1,000, 10,000, 100,000, 1,000,000倍に希釈し、タバコ健全葉を対照（同倍率で希釈）として検定した。

4) PVY系統に対する反応

PVY-N 作製抗体（コーティング：PAb抗体、EC：MAb抗体）を用いて、中央農試保存のPVY-N 4株、PVY-O 3株（いずれもタバコ罹病葉）に対する反応を試験した。対照として市販および分譲のPVY用5抗体（PVY-N用2, PVY-O用1, 全系統検出用2）を用いた。検定はDAS-ELISAで行った。

5) 一般圃場サンプル等におけるELISAの検証

一般圃場から採取および中央農試保存株の馬鈴しょ葉の計16サンプルを用いて、DAS-ELISA（コーティング：PAb, EC：MAb）で検定を実施した。対照として馬鈴しょ健全葉を用いた。各葉は10倍量の磨砕液で磨砕した。対照抗体として日本植物防疫協会製およびSEDIAG社製抗体を用いた。

結 果

1 PVY-N-CPの大腸菌による発現

PVY供試株の選定に当たって、DK-87, KK-03, KiのCP遺伝子領域のアミノ酸配列とDDBJの既存の配列と比較解析した結果、Ki株の配列の保存性が高かった。

Ki株のCP遺伝子を大腸菌プラスミドにクローニングし、この遺伝子領域をpMAL-c2X発現ベクターのマルトース結合タンパク質遺伝子領域の下流に導入し、大腸菌に形質転換させ、目的配列の挿入をPCRで確認後、CP遺伝子が挿入された発現ベクターを持つ大腸菌クローンを得た。

このクローン株を用いてIPTGでタンパク質発現誘導を行い、タンパク質を破碎・抽出し、マルトースのアフィニティーカラムで精製し、MBP2+PVY-N-CPを得た。

さらにMBP2+PVY-N-CPにFactor Xaを処理し、DEAE-セファロースカラムでNaCl濃度の200mMでMBP2を、

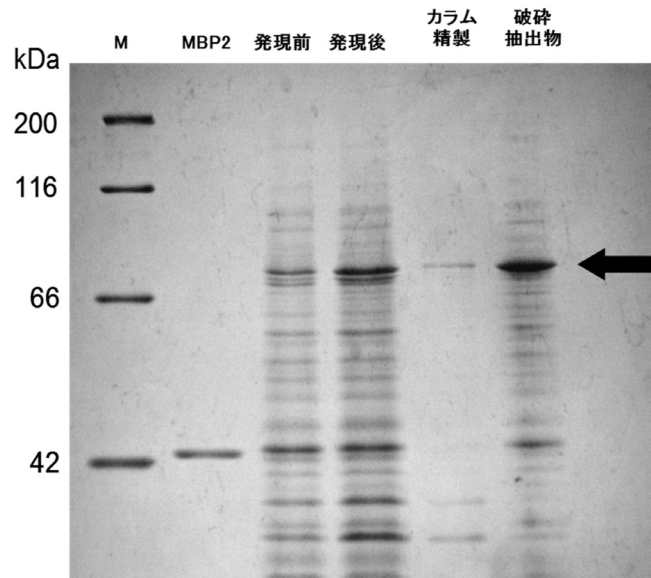


図1 発現誘導菌体より抽出およびカラム精製したMBP2+PVY-N-CP融合タンパク質の電気泳動
 注) M: タンパク質分子マーカー, MBP2: マルトース合タンパク質, 発現前: 発現誘導前の菌体抽出物, 発現後: 発現誘導後の菌体抽出物, カラム精製: アフィニティーカラム精製液, 破碎抽出物: 破碎処理後溶液, 矢印: MBP2+PVY-N-CP

500mMでPVY-N-CPを分画した(図1)。

2 MAbの作製

1) 免疫マウスの抗体価測定

通常法およびゲルブ法のアジュバントで抗原を3回免疫したマウスの抗体価は全頭で上昇した。通常法でマウス5頭のうち3頭が死亡したが、これらはすべてMBP2+PVY-N-CPを免疫したマウスだった。PVY-N-CPを免疫させると抗体価の上昇が高い傾向であった。PVY-Nに対し6400倍希釈でも抗体価が高いマウスおよび100倍希釈に比べ6400倍希釈で抗体価の低下が緩慢なマウスを選んだ結果、通常法からM6およびM10, ゲルブ法からM10を選定し、通常法のマウスには1回の追加免疫(PVY-N-CP), ゲルブ法では2回の追加免疫(1回目PVY-N-CP, 2回目MBP2+PVY-N-CP)を実施した。

2) 選定マウスの最終ブーストにおける抗体価

最終免疫後、各マウスの抗体価を測定し、通常法マウスでは2頭とも追加免疫を実施しても抗体価の上昇は認められなかった。一方、ゲルブ法では2回の追加免疫後も抗体価は顕著に上昇した。通常法M10マウスは血清の6400倍希釈でPVY-Oに対する反応がかなり低下するのに比べ、PVY-Nに対しては低下が緩やかであった。通常法M6およびゲルブ法M10のマウスは6400倍希釈でPVYの両系統に対し、吸光値の低下は同一の反応であっ

た。以上から、通常法M10マウスおよびゲルブ法M10マウスを選抜した(図2)。

3) ハイブリドーマ細胞のスクリーニング

通常法M10マウスから10細胞塊, ゲルブ法M10マウスから9細胞塊のハイブリドーマを供試し、PVYの両系統に対する抗体価を調査したところ、細胞番号の4E2および9G7で高い抗体価の上昇が見られた(表2)。このうち、4E2細胞上清はPVY-Nのみに特異的な反応が認められた。9G7細胞上清は両系統に反応した。

4) ハイブリドーマ細胞のクローニング

4E2および9G7細胞を限界希釈して一次クローニングを行った結果、4E2細胞由来の6細胞がPVY-Nのみに反応が認められた。抗体価の高かった4E2(C2)および4E2(C3)を選抜し、二次クローニングに供試した。

二次スクリーニングで4E2(C2)および4E2(C3)細胞由来の全クローンでPVY-Nのみに抗体価の上昇が認められた(表3)。この結果、クローン細胞が確立したと判断し、抗体価の高い5細胞(4E2(C2)E3, 4E2(C2)E9, 4E2(C3)D5, 4E2(C3)E11および4E2(C3)G5)を保存した。このうち、4E2(C3)D5細胞を3頭のマウス腹腔へ接種し、腹水を採取して、ELISA試験へ供試した。

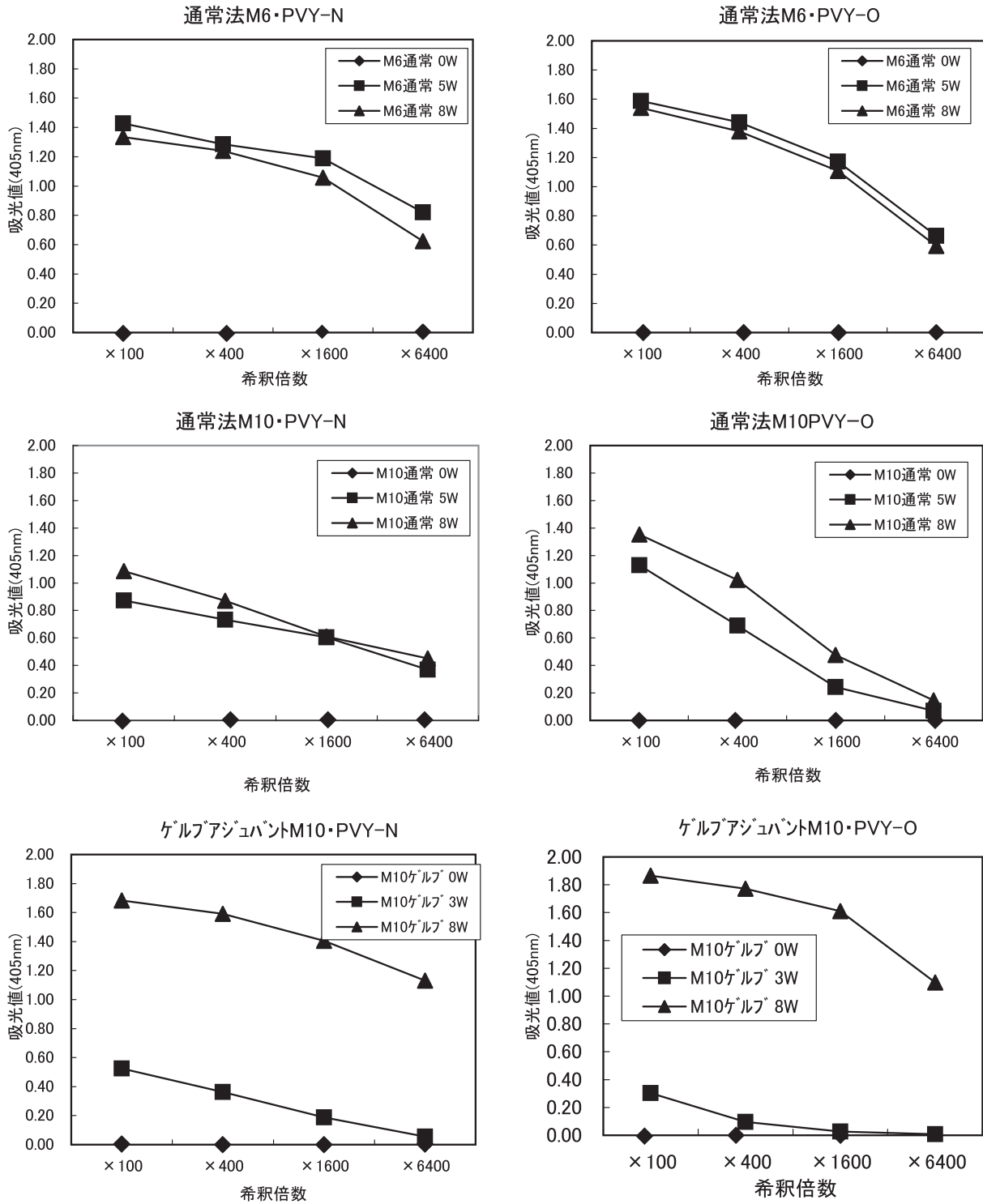


図2 追加免疫後マウス最終ブーストのPVY各系統に対する抗体価の比較

表2 ハイブリドーマ細胞のPVY抗体産生の一次スクリーニング

ハイブリドーマ No.	細胞名	PVY-N抗原*				PVY-O抗原			
		上清液希釈倍数				上清液希釈倍数			
		×100	×400	×1600	×6400	×100	×400	×1600	×6400
通常法M10マウス由来ハイブリドーマ									
1	1C2	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.001	-0.002	-0.002
2	1E2	-0.001	0.004	0.001	0.001	-0.004	-0.001	-0.002	-0.003
3	2B2	0.008	0.006	0.003	0.006	0.001	0.004	0.001	0.000
4	2C11	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.000	0.005	0.000
5	3B3	0.003	-0.002	-0.001	0.000	-0.003	-0.003	-0.003	0.000
6	3B11	0.005	0.005	0.006	0.005	0.002	0.002	0.002	0.001
7	4E2	0.360	0.268	0.108	0.017	-0.001	-0.001	0.000	0.000
8	4G10	0.004	0.007	0.000	-0.001	-0.002	-0.003	-0.004	-0.002
9	5E9	0.004	0.004	0.004	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001
10	5F3	0.002	0.007	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.001
ゲルブアジュバント法M10マウス由来ハイブリドーマ									
1	6E5	0.001	-0.001	0.000	-0.001	-0.003	-0.003	-0.002	-0.002
2	7E5	0.010	0.006	0.007	0.006	0.006	0.004	0.002	0.004
3	7F6	0.000	-0.001	0.004	0.001	0.000	-0.002	0.001	0.001
4	7F11	0.001	0.001	0.009	0.027	0.000	-0.001	0.001	0.001
5	9C4	0.005	0.035	0.010	0.001	0.002	0.007	-0.002	0.005
6	9G7	0.074	0.011	0.003	0.002	0.413	0.108	0.013	0.005
7	10D7	0.008	0.003	0.003	0.009	0.012	0.005	0.001	0.006
8	10D10	0.006	-0.002	0.000	0.003	0.021	0.004	0.004	0.002
9	10F9	-0.002	0.005	0.004	0.007	0.001	-0.001	0.001	0.000

*各系統のタバコ罹病葉磨砕液 (10倍希釈) を用いた

表3 2次スクリーニングしたハイブリドーマ細胞クローンのPVYに対する抗体価測定

2次選抜 クローン	PVY-N抗原*				PVY-O抗原				健全葉			
	上清液希釈倍数				上清液希釈倍数				上清液希釈倍数			
	×100	×400	×1600	×6400	×100	×400	×1600	×6400	×100	×400	×1600	×6400
4E2(C2)E3	0.145	0.130	0.093	0.050	0.011	0.003	0.004	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001
4E2(C2)E9	0.141	0.109	0.067	0.027	0.008	0.001	0.005	-0.002	0.002	0.001	0.003	0.003
4E2(C3)E10	0.141	0.107	0.057	0.025	0.007	0.001	0.004	-0.001	0.001	0.001	0.006	0.003
4E2(C3)D5	0.166	0.147	0.108	0.061	0.008	0.003	0.003	-0.001	0.001	0.002	0.003	0.009
4E2(C3)E11	0.158	0.135	0.100	0.049	0.006	0.000	0.003	-0.001	0.001	0.001	0.003	0.003
4E2(C3)G5	0.153	0.125	0.088	0.040	0.006	-0.001	0.001	-0.002	0.001	0.001	0.002	0.002

*各系統のタバコ罹病葉磨砕液 (11倍希釈) を用いた

3 MAbを用いたELISA

1) 作製MAbの各種ELISAにおける適用性

作製したMAbおよびPAbをアフィゲルプロテインAカラムで精製した結果, MAbは1 mg/ml, PAbは3.5mg/ml濃度の抗体 (IgG) が得られた。これを1 mg/mlに調製した溶液を用いて酵素標識を行い, ECを作製した。PVY-N罹病葉の10倍希釈液を用いて, 各ELISA法に用いるコーティング濃度, EC濃度を設定し (表4), いずれのELISAにおいても良好な発色が認められ, 適用性は高かった。特にMAbのECの最適使用濃度は10,000倍希釈と高かった。

各ELISAにおいてPVY-N罹病葉 (抗原) の希釈段階における反応は, PTA-ELISAでいずれも 10^5 希釈まで, DAS-ELISAではいずれも 10^4 希釈まで, TAS-ELISAでは

10^4 希釈まで反応が認められ, 抗原の $10^4 \sim 10^5$ 希釈まで検出可能で, バッファ値はほとんど0に近い数値であった (図3)。DAS-ELISAのPAb抗体同士の組み合わせではバッファ値が高くなる現象が認められた (データ省略)。

2) 直接法PTA-ELISAによる検定

37°C条件下で抗原を吸着させたところ, 30分および60分で吸光値は発色が肉眼で観察される程度まで上昇した。ECの反応は60分程度必要と考えられた。さらに吸着30分-EC60分および吸着60分-EC60分の組み合わせで検出精度を検討したところ, 10^4 倍希釈まで反応が認められた (図4)。吸着60分-EC60分の組合せで吸光値が高い傾向であった。健全葉の吸光値は0に近い値に留まった。所要時間はプレートの洗浄時間を含めて3時間半程度であった。

3) 市販抗体との比較

作製したPAbおよびMAbの単独あるいは組合せてPVY-N罹病葉の 10^4 希釈まで検出できた。一方、日本植物防疫協会製の抗体（以下、日植防抗体）は 10^3 希釈まで検出できたものの、健全葉に対して吸光値の上昇が見られた。SEDIAG社PVY抗体は 10^5 倍希釈まで、検出可能と考えられたが、健全葉の吸光値は作製抗体（Poly-Mono）よりやや高かった。Neogen社のPVYn抗体は 10^4 倍希釈まで、検出可能と考えられたが、健全葉の吸光値は日植防抗体に次いで高かった。PVYocn抗体は健全葉の吸光値が最も低かったが、検出精度は 10^3 倍希釈と低かった（データ省略）。

4) MAbのPVY系統に対する反応

作製したMAbはPVY-Nのすべてのウイルス株を検出したが、PVY-Oの2株に陽性反応が認められた（表5）。

旧ベーリンガー抗体も作製MAbと同じ反応を示した。Neogen-n抗体は全てのPVY-Oウイルス株に反応しなかったが、PVY-NのKi株で陰性であった。Neogen-ocn抗体と日植防抗体はPVY全体で反応が認められた。日植防抗体では健全葉の吸光値が高かった。北大分譲抗体（PVY-O系統の特異抗体）(10) はPVY-Oで吸光値が高いが、PVY-N系統でも若干吸光値が上昇した。

5) 一般圃場サンプル等におけるELISAの検証

17サンプルのうち、6サンプルで陽性反応が確認され、日植防抗体およびSEDIAG社抗体と同じ陽性反応が認められた（表6）。作製MAbおよびSEDIAG社抗体は陰性サンプルの吸光値がほぼ0に近かった。日植防抗体では陰性サンプルの吸光値が上昇し、0.32~0.6程度認められた。

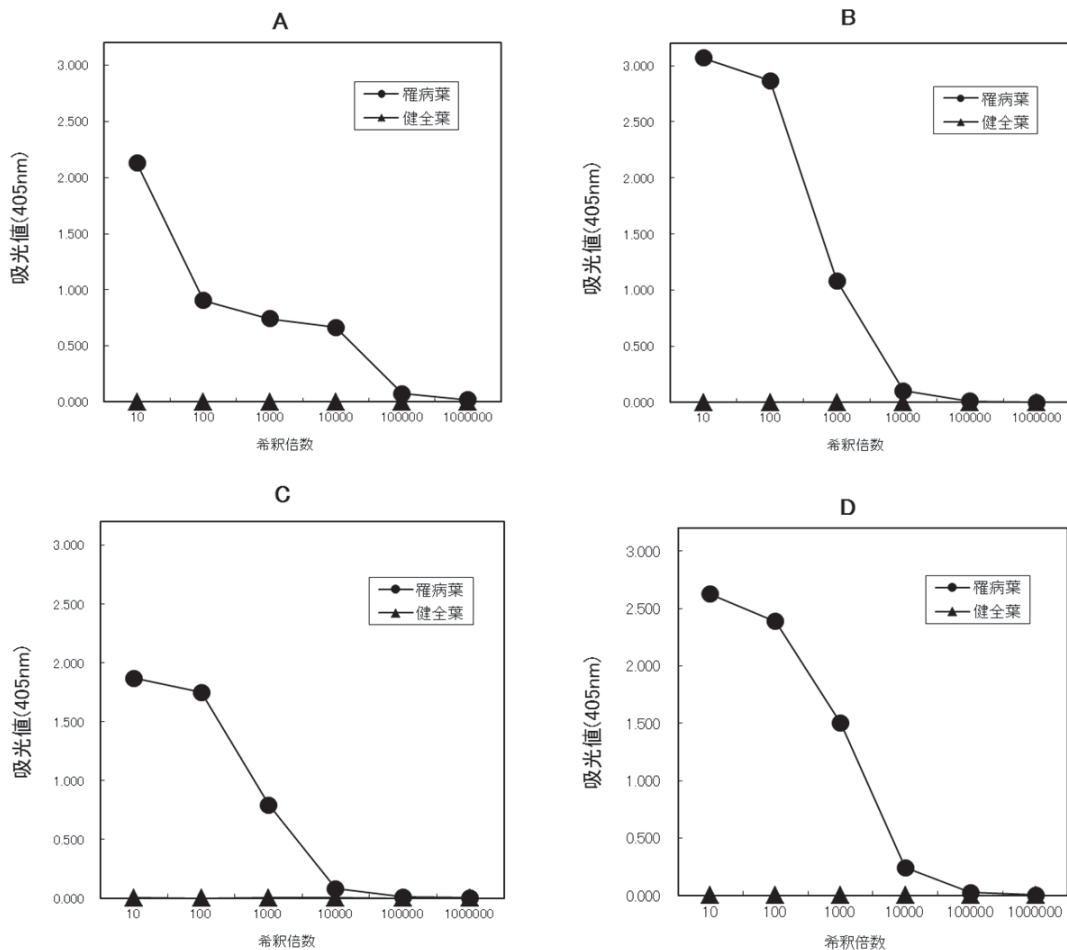


図3 PVY-N抗原の希釈濃度における各種ELISAにおける反応

注) A:PTA-ELISA, B:TAS-ELISA, C:DAS-ELISA（トラッピング抗体，標識抗体とも作製MAb），
D:DAS-ELISA（トラッピング抗体は作製PAb，標識抗体とも作製MAb）

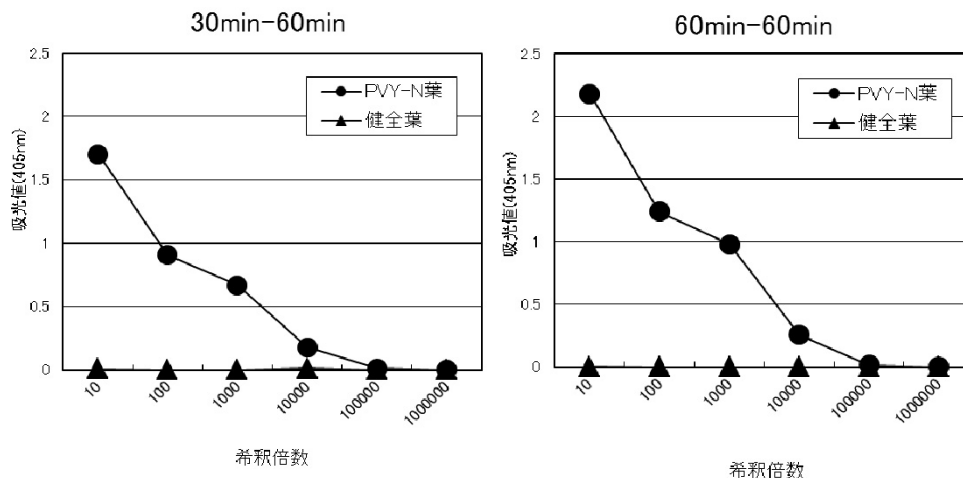


図4 直接法 PTA-ELISAによるPVY-N抗原希釈濃度に対する反応

表4 実験に供試したエライザ法の条件一覧

No.	ELISA*	1st step		2nd step	3rd step		4th step	
1	PTA			抗原	Mono	0.2 μg	MIg EC***	×4000
2				抗原	Mono EC	×1000		
3				抗原	Poly	2 μg	RIg EC	×4000
4	DAS	Mono**	0.1 μg	抗原	Mono EC	×10000		
5		Poly	2 μg	抗原	Mono EC	×10000		
6		Poly	2 μg	抗原	Poly EC	×1000		
7	TAS	Poly	0.2 μg	抗原	Mono	0.02 μg	MIg EC	×5000

* PTA: Plate trapped antigen ELISA, DAS: Double-antibody sandwich ELISA, TAS: Triple-antibody sandwich ELISA
 ** Mono: モノクローナル抗体, Poly: ポリクローナル抗体, EC: エンザイムコンジュゲート
 *** MIg: anti-mouse Ig, RIg: anti-rabbit Ig

表5 各種PVY抗体のPVY系統に対するELISA

ウイルス株	PVY-N						PVY-OCN			PVY-O		
	中央D5		旧ベーリンガー		Neogen-n		Neogen-ocn	日植防	北大分譲			
PVY-N DK-78	1.346	+	0.133	+	0.258	+	0.299	+	1.735	+	0.020	±
PVY-N キタアカリ	1.181	+	0.038	+	0.009	-	1.737	+	2.379	+	0.153	+
PVY-N ki	2.691	+	0.302	+	2.140	+	1.210	+	2.681	+	0.043	±
PVY-O 中央農試	-0.003	-	0.006	-	0.005	-	2.171	+	2.362	+	0.450	+
PVY-O Y-7	1.233	+	0.044	+	0.001	-	1.523	+	2.062	+	0.119	+
PVY-O Y109	0.986	+	0.044	+	-0.001	-	0.988	+	1.390	+	0.091	+
PVY-O 栗山2	0.004	-	0.002	-	0.001	-	0.610	+	1.131	+	0.033	±
Negative	0.002	-	0.007	-	-0.013	-	0.001	-	0.157	-	0.009	-
Blank	(0.091)		(0.093)		(0.127)		(0.125)		(0.118)		(0.102)	

* +; 陽性, -; 陰性, ±; 判定できず

表6 一般圃場から採取したPVY-N系統サンプルにおける3種抗体の反応

No.	場 所	サンプル名	品 種	吸光値 (405nm)		
				作製抗体 (Poly-Mono)*	日植防抗体	SEDIAG社抗体
1	訓子府町		トヨシロ	2.93	2.98	3.28
2	共和町	S1	男爵薯	0.01	0.55	0.00
3	共和町	S2	男爵薯	3.16	3.05	2.61
4	共和町	S3	男爵薯	0.01	0.60	0.00
5	共和町	S4	男爵薯	0.00	0.51	0.00
6	共和町	S5	男爵薯	2.98	2.67	1.28
7	共和町	S6	男爵薯	3.23	3.15	3.05
8	中標津町		アスタルテ	0.00	0.50	0.00
9	長沼町	①	男爵薯	2.69	1.98	1.06
10	長沼町	②	男爵薯	0.00	0.36	0.00
11	長沼町	③	男爵薯	2.68	1.83	1.51
12	長沼町	①	メイクイーン	0.00	0.41	0.00
13	長沼町	②	メイクイーン	0.00	0.47	0.00
14	長沼町	③	メイクイーン	0.00	0.41	0.00
15	中標津町		不明	0.01	0.48	0.00
16	保存系統	PVX	馬鈴薯継代株	0.00	0.52	0.00
17	健全馬鈴しょ葉			0.00	0.32	0.00

* トラッピング抗体はポリクローナル抗体、標識抗体はモノクローナル抗体

考 察

ELISA法による検出精度は用いる抗体の品質に依存している。PAbはウイルス抗原を家兎に免疫し、採血するだけで、容易に抗血清が作製できる。しかし、家兎はさまざまな植物由来の物質に対して抗体を作製しており、抗原として用いるウイルスの精製段階で除去できなかった植物由来物質に対して抗体が作製された場合、検定時における非特異反応の原因となる。この問題を解決するために、大腸菌発現系で抗原タンパク質を作製すると、植物成分の関与を排除できる。本試験では大腸菌発現タンパク質を用いてPAbを作製した場合でも、健全葉に対する非特異反応が見られず、その有効性が高いことが示された。しかし、このPAbはBuffer液に対してやや反応が高く認められた。MAbでは健全葉やBuffer液に対しても非特異反応がほとんどなく、抗原希釈に対しても10,000倍希釈まで反応する良質な抗体が作製できた。MAbはその産生するハイブリドーマ細胞を半永久的に保存可能であり、これから作製される抗体のロットは同一の品質を保つことができ、継続的な検定を行う場合、大きな利点となる(5)。大腸菌発現タンパク質～MAbのステップが最も確実に良質な抗体を作製する方法と考えられる。

作製したMAbは各種ELISA法に適用したところ、PTA-ELISA、DAS-ELISA、TAS-ELISAのいずれにも使用可能であった。大腸菌発現タンパク質を用いて作製された抗体ではPTA-ELISAで可能であるが、DAS-ELISA

では検定できない場合が報告されている^{3, 7, 9)}。Ohshimaら¹¹⁾はハイブリドーマを4種の異なる方法でスクリーニングした結果、ELISAの適用性が異なる10グループに分かれることを報告している。このうち、Luteovirus 3種ではPTA-ELISAで検出、DAS-ELISAで未検出のものが7割以上を占めたものの、Plant Reovirus 2種では同様の反応のものが全く得られないなど、ウイルスの種類によっても異なった。これらは抗原決定基となるウイルスタンパク質の4次構造や粒子の表面構造などが大きく影響していると考察されている。PVYでも大腸菌発現タンパク質を用いてPAbを作製し、DAS-ELISAに適用できないものが得られており^{3, 9)}、必ずしもDAS-ELISAで利用可能な抗体が得られるとは限らない。ジャガイモでは複数のウイルスを同時に検定するが、PVY以外のウイルス抗体はDAS-ELISAで検定するものが多いため、PVY抗体もDAS-ELISAで検出できるものが望まれる。作製したMAbは他のウイルスを含む実用的な検定にも効率的に利用できる。

PVYでは複数のウイルス系統が知られている。本試験では北海道で優占するN系統に対してMAbの作製に取り組んだが、O系統の2ウイルス株に反応が認められた。比較に用いたN系統およびO系統用の抗体でもN系統とO系統を明確に区別する抗体はなかった。PVYの系統を判別するために本MAbを用いることはできないと考えられるが、北海道で発生したPVY-Nウイルス株をすべて検出することから、実用的な問題はないと考えられる。しかし、近年PVY-NTN系統の発生が北海道で確認され

ており¹⁾、その発生分布を調査する必要があるが、血清型はPVY-Nと同一で、検出に当たっては本MAbの利用が可能である(私信、不破)。

MABを用いた直接法PTA-ELISAはDAS-ELISA法に比べてエンザイムコンジュゲート濃度を1000倍(DAS-ELISAでは10,000倍)にすることで、同等以上の精度が得られた。37°C条件下のコーティングに1時間、エンザイムコンジュゲート反応に1時間を要し、洗浄・発色時間を含めて、最短で3時間半程度で検定が可能である。この結果を反映して本MABを用いたELISAキットおよびイムノクロマトキットが開発され、市販された。

本試験で作製したMABはジャガイモ育種、種いも生産で通常行われているウイルス検定(DAS-ELISA)や緊急的な診断が要求される場面(試験場、普及センター、農業団体)でも直接法PTA-ELISAを用いて即日の診断が可能など、ユーザーのさまざまな用途に応じて活用できる。

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) Clark, F. and Adams, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483 (1977)
- 3) Folwarczal, 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, 438-442 (2008)
- 4) 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)
- 5) Halk, K. and De Boer, S. Monoclonal Antibodies in Plant-Disease Research. *Ann. Rev. Phytopath.* 23, 321-350 (1985)
- 6) 岩崎辰夫, 安東民衛, 市川かおる, 保井孝太郎. 単クローン抗体 ハイブリドーマとELISA. 講談社サイエンティフィック, 東京, 1983. 187p
- 7) Jelkmann, W. and Keimkonrad, R. Immuno-capture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. *J. Phytopathol.* 145, 499-503 (1997)
- 8) Kubota, K., Usugi, T., Tsuda, S. Production of antiserum and immunodetection of cucurbit chlorotic yellows virus, a novel whitefly-transmitted crinivirus. *J. Gen. Plant Pathol.* 77, 116-120 (2011)
- 9) 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)
- 10) 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応用. *日植病報.* 56, 508-514 (1990)
- 11) 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)
- 12) Ohshima, K. Harjosudarmo, J., Ishikawa, Y., Shikata, E. Relationship between hybridoma screening procedures and the characteristics of monoclonal antibodies for use in direct double antibody sandwich ELISA for the detection of plant viruses. *Ann. Phytopathol. Soc Japan* 56, 569-576 (1990)
- 13) 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. 217p
- 14) 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)
- 15) 鈴木 敦, 三浦政直, 田中啓二, 帯田則義, 田中智. 道央におけるジャガイモYウイルスの発生について. *日植病報.* 57, 120-121 (1991)
- 16) 上田重文, 石井貴明, 花田 薫, 岩波 徹. 大腸菌発現タンパク質抗血清を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出. *九病虫研会報.* 49, 41-44 (2003)

Production of Monoclonal Antibodies to Recombinant Coat Protein of *Potato virus Y* and their Effectiveness for Virus Detection by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Harukuni HORITA^{*1}, Jun SASAKI^{*2} and Toru TAKEUCHI^{*3}

Summary

Potato virus Y necrotic strain (PVY-N) is distributed worldwide and causes the most economically important virus diseases of potato in Hokkaido. The coat protein gene was RT-PCR-amplified from total RNA extracted from infected potato leaves and the amplified fragment was cloned and completely sequenced. The fragment was subsequently subcloned into the pMAL-c2X expression vector. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 and express the coat protein. The coat protein was purified by affinity chromatography and used for mouse immunization. Two BALB/c mice that showed the highest titer of antibodies to PVY-N in the test bleeding were selected for the fusion with myeloma cells. The resulting hybridomas were screened later by plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A monoclonal antibody (MAb) D5 from PVY-N specificity group were selected for ascites production after two limiting dilution clonings for the selection of a single cell line. The MAb D5 can be used for the detection of the PVY-N strain by indirect or direct plate trapped antigen ELISA, double antigen sandwich ELISA, and triple antigen sandwich ELISA. The MAb D5 was found to react not only all the PVY-N isolates, but several PVY ordinaly strain (PVY-O) isolates.

*1 Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan (present: Hokkaido Research Orgnization Dohnan Agricultural Experiment Station, Hokuto, Hokkaido, 041-1201 Japan)
E-mail: horita-harukuni@hro.or.jp

*2 ditto. (present: Hokkaido Research Orgnization kitami Agricultural Experiment Station, Kunneppu, Hokkaido, 099-1496 Japan)

*3 ditto. (present: Hokkaido Research Orgnization Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan)