

# ヤマノイモえそモザイクウイルスの大腸菌発現外被タンパク質に対する抗体作製とDAS-ELISAによる検出<sup>\*1</sup>

堀田 治邦<sup>\*2</sup> 佐々木 純<sup>\*2</sup> 竹内 徹<sup>\*3</sup>

ヤマノイモえそモザイクウイルス (CYNMV) の外被タンパク質 (CP) を大腸菌で発現させ、これに対する抗体を作製し、DAS-ELISA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、またはpCold I 発現ベクターにクローニングし、大腸菌でCYNMV-CPを発現させた。これを家兎に免疫して抗血清を得た。それぞれの発現ベクター由来の抗血清から抗体を精製し、DAS-ELISAへの適用性を試みた。磨砕バッファーとしてPBSTバッファーに1%スキムミルクおよび2% Tween20を添加し、検定葉の凍結 (-15°C以下, 6時間以上) を組合せることで、吸光値が上昇し、実用的な検定が可能となった。この方法で作製抗体の検出限界を評価したところ、pMAL抗体、pColdR1抗体ともに罹病葉の $1.8 \times 10^2$ 倍希釈まで検出された。一般ほ場から採取したCYNMVサンプルを用いてDAS-ELISAを行ったところ、高率に陽性株が検出され、抗体の有効性が実証された。

## 緒言

ナガイモは栄養繁殖性の作物で、種いもで増殖するため、病害を保毒した種いも供給は大きな問題となる<sup>24</sup>。ヤマノイモえそモザイクウイルス (Chinese yam necrotic mosaic virus, 以下, CYNMV) はナガイモに発生する重要なウイルスで<sup>5</sup>、北海道でもその被害の把握や防除対策に取り組みされてきた<sup>14, 15, 16</sup>。CYNMVの検定はウイルスフリーの種いも生産上重要であるが、大規模検定に用いられている酵素抗体結合法 (以下, ELISA)<sup>2</sup> による検定は確立していない。これはCYNMVに対する品質の高い抗体作製が難しいことにある。Shirako and Ehara<sup>21</sup> はCYNMV抗体を罹病葉から精製したウイルス粒子をもとに作製しているが、非特異反応が高く、ウエスタンブロット法による検出の報告のみに留まっている。

その後、Kondo and Fujita<sup>11</sup> によってCYNMVの全塩基配列が解読され、外被タンパク質 (以下, CP) をコードする領域の塩基配列から大腸菌発現系で人工的にCP

を作製し、これを免疫させて抗体を作製する方法が可能となった。この方法では非特異反応の原因となるナガイモ葉の粘稠な糖タンパク質<sup>21</sup> の混入がなく、非特異反応の少ない抗体の作製が期待できる。

以上のことから、本報告ではCYNMVの二重抗体サンドイッチ法ELISA (DAS-ELISA) に適用できる良質な抗体の作製を目的に、CYNMVのCPを大腸菌で発現させて、これを抗原として抗体を作製した結果を報告する。また、抗体をDAS-ELISAに適用するに当たって、磨砕用バッファーの改良と一般ほ場サンプルを用いた検定の実証についても報告する。

なお、試験を実施するに当たって、(地独) 青森県産業技術センターが保有する特許「ヤマノイモえそモザイクウイルスの精製法及びその遺伝子」(特許第3038433号) の許諾を受け、その遺伝子情報を参考に実施した。

## 試験方法

### 1 CYNMV-CPの大腸菌による発現

CP領域の遺伝子塩基配列を決定するために帯広株 (十勝農協連より分譲) を供試した。罹病葉からウイルスRNAをフェノール法で抽出し、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<sup>6</sup> を用いてCPを含む遺伝子領域を増幅させた。これをクローニング後、CPの外側の保存性が高い配列を利用してプライマーを設計し、CPを含む領域をPCR法で増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定

2021年11月1日受理

\*1 本報の一部は2011年日本植物病理学会本大会で発表した。

\*2 (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: 同花・野菜技術センター, 073-0026 滝川市)

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

\*3 同上 (現: 農研機構, 099-1496 つくば市)

した。これらのアミノ酸配列をデータベースの青森株と比較した。

CPの大腸菌における発現はpMAL-c2X発現ベクター (New England Biolabs社, 以下, pMALベクター) およびpCold I 発現ベクター (タカラバイオ(株), 以下, pColdベクター) を用いた。実施手順はそれぞれの発現ベクターのマニュアルに従った。すなわち, CP遺伝子領域のそれぞれの末端に制限酵素サイト (pMALベクター; EcoR I およびBamH I, pColdベクター; Kpn I およびHindIII) を付加したプライマーでPCRを行い, 増幅断片を同様の制限酵素で処理した。これを各ベクターに挿入し, 大腸菌BL21に形質転換させた。得られたクローンについて目的配列の挿入を確認した。

pMALベクターを形質転換した大腸菌は, 10mlのLB培地 (50  $\mu$ 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1ml加え, 37°Cで2時間培養した。その後, CPの発現を誘導する0.5%イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド (IPTG) を0.3mMとなるよう添加し, さらに37°Cで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。遠心上清をポリアクリルアミドゲル電気泳動によってMBP2+CYNMV-CPの発現を確認後, アミロースレジン (New England Biolabs社) を充填したアフィニティーカラムに吸着させ, 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+CYNMV-CPを精製した。

pColdベクターでも同様の手順で進めたが, IPTGの添加前に15°Cで30分静置し, IPTGは0.5mMとなるよう添加して15°Cで24時間培養した。また, 菌体破碎後はHis+CYNMV-CPの発現をポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認後, HisTrapTM FF crude Kit (アマシャムバイオサイエンス(株)) で精製した。

## 2 大腸菌発現タンパク質に対する抗体の作製

抗原のCYNMV-CPを家兎に免疫し, ポリクローナル抗体の作製を行った。免疫および採血は(株)ホクドーに

委託して実施し, 詳細は表1に示す。pMALベクター由来のCPでは5回免疫して全採血を行った。pColdベクター由来のCPでは9回免疫して全採血を行った。なお, 免疫の中途段階や全採血前に試採血を行い, 抗体価を測定した。測定は直接吸着法ELISA (PTA-ELISA) で実施し, コーティングバッファーは炭酸ナトリウムバッファー (pH9.6) を用いた。

また, pColdベクター由来タンパク質の7, 8, 9回免疫後の試採血サンプルの抗体価測定ではイチゴマイルドイエローエッジウイルス用に改良したイチゴバッファー (佐々木, 未発表, PBSTに2% PVP, 1% スキムミルク, 2% Tween20, 0.13% 亜硫酸ナトリウム, 0.02% アジ化ナトリウムを添加) の2% Tween20を抜いたバッファーで罹病葉を磨砕して実施した。罹病葉は凍結したものを用いた。

全採血した血清はアフィゲルプロテインA (バイオラッド(株)) カラムで $\gamma$ -グロブリンのIgG抗体を精製した。また, 一部の $\gamma$ -グロブリン(1mg/ml)にアルカリフォスファターゼを酵素標識し, エンザイムコンジュゲート (EC) を作製した。

## 3 抗体のDAS-ELISAへの適用

### 1) 磨砕用バッファーの検討

ELISAでは非特異反応の抑制や吸光値の上昇を目的に磨砕バッファーに添加剤を使用することが知られており<sup>1)</sup>, CYNMV抗体を用いたDAS-ELISAで吸光値の上昇もたらず最適な磨砕バッファー (ナガイモバッファー) を検討した。抗体はpMALベクター由来の抗体 (以下, pMAL抗体) を用いた。コーティング液は $\gamma$ -グロブリン (2mg/ml) をPBS-Tweenバッファー (PBST) で1000倍に希釈, ECはPBSTで500倍液とした。コーティングに3時間, 試料は一昼夜で反応, ECは3時間, 発色に1時間で検定した。罹病葉は帯広株の凍結サンプルを用い, 磨砕は0.1gの検定葉に0.9mlのバッファーを加え, さらに石英砂を少量加えて磨砕した。その後, 0.9mlのバッファーを加えて2倍量に希釈した。

表1 CYNMV-CPの家兎免疫法

抗原	CYNMV-CP (pMALベクター由来)	CYNMV-CP (pColdベクター由来)
アジュバント	FCA, FIA	FCA, FIA
頭数	1頭	2頭
投与量	200 $\mu$ g	200 $\mu$ g
投与場所	背部皮下, 大腿部筋肉	背部皮下, 大腿部筋肉
投与間隔	2週間おき5回	約2週間おき9回

注) アジュバントの初回は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

磨砕バッファーへの添加剤はPBSTバッファー（以下、PBST）に1%スキムミルク、2%ポリビニルピロリドン（PVP）、2%亜硫酸ナトリウム、2%TritonX100を加えて検討し、吸光値の上昇効果が得られたものは最適な濃度についても検討した。また、複数の添加剤を組合せて、吸光値の上昇効果も検討した。

#### 2) 検定葉の凍結による吸光値の上昇効果

検定葉の凍結が吸光値の上昇に与える影響について検討した。罹病葉（帯広株）および健全葉を $-80^{\circ}\text{C}$ （超低温フリーザー）、 $-30^{\circ}\text{C}$ （低温フリーザー）、 $-15^{\circ}\text{C}$ （冷蔵庫の冷凍庫）および $5^{\circ}\text{C}$ （冷蔵庫冷蔵室）にそれぞれ24時間、6時間保存した。0時間（未凍結）を対照として供試した。DAS-ELISAはナガイモバッファーを用い、磨砕用バッファーの検討と同様の方法で実施した。さらに凍結時間について検討し、罹病葉（池田1, 池田2株）を未凍結、 $-30^{\circ}\text{C}$ 凍結の6, 24, 48, 72時間で比較した。

#### 3) ナガイモバッファーと罹病葉の凍結の組合せによる効果の検証

ナガイモバッファーおよびサンプル凍結の単独処理とその組合せによるDAS-ELISAの吸光値に与える影響について検証した。用いたバッファーはPBST+2%PVPとナガイモバッファー、サンプル処理は $5^{\circ}\text{C}$ の1日冷蔵と $-30^{\circ}\text{C}$ の1日凍結で、これらを組み合わせた4処理区を設け、DAS-ELISAを実施した。罹病葉は2サンプル（池田1, 池田2株）を供試し、健全葉（帯広株）も同様に供試した。抗体はpMAL抗体を用い、 $\gamma$ -グロブリンは $2\mu\text{g/ml}$ 、ECは500倍で使用した。

#### 4) 作製抗体の評価

各血清からプロテインAを用いて $\gamma$ -グロブリン（ $2\text{mg/ml}$ ）を精製し、それぞれのECも前記の方法で作製した。pMAL抗体、pColdベクター由来の2抗体（以下、pColdR1抗体およびpColdR2抗体）のDAS-ELISAにおける最適な $\gamma$ -グロブリン濃度とECの希釈倍数を決定した。この条件下で、罹病葉（帯広株）の磨砕液を健全葉磨砕液で希釈し、 $1.8 \times 10^1 \sim 1.8 \times 10^7$ 倍までの10倍の段階希釈液に対してDAS-ELISAを行い、各抗体の検出限界を求めた。

#### 4 一般圃場サンプルを用いたDAS-ELISAの検証

2008～2009年にナガイモ栽培ほ場（池田町）で、自家増殖種いも区とウイルスフリー種いも区からそれぞれ10株ずつ選定し、経時的にCYNMVのDAS-ELISAを実施した。20年は4回（7月9日、8月22日、9月27日および10月18日）、21年は3回（7月21日、8月25日および9月29日）

調査した。調査葉はそれぞれの株から上位葉、中位葉および下位葉を採取した。抗体はpColdR1抗体を用い、 $\gamma$ -グロブリン濃度は $2\mu\text{g/ml}$ 、ECは500倍希釈で使用した。

## 結 果

### 1 CYNMV-CPの大腸菌による発現

CYNMV帯広株のCP領域のアミノ酸配列とデータベースのQ76IA3およびQ76IA6配列（いずれもCYNMV青森株）と比較解析した結果、それぞれ99.3%および99.0%の高い相同性が確認された。

pMALベクターにCYNMV-CP遺伝子を挿入して大腸菌に形質転換させたところ、マルトース結合タンパク質下流にCP配列が挿入された大腸菌クローンを得た。同じくpColdベクターでもヒスチジンタグ下流にCP配列が挿入された大腸菌クローンを得た。

それぞれの大腸菌クローンを大量培養してCYNMV-CPを発現させたところ、pMALベクターを有するクローンでは $12.6\text{mg}$ のMBP2+CYNMV-CPのタンパク質を得た。pColdベクターを有するクローンでは $30\text{mg}$ のHis+CYNMV-CPを得た（図1）。

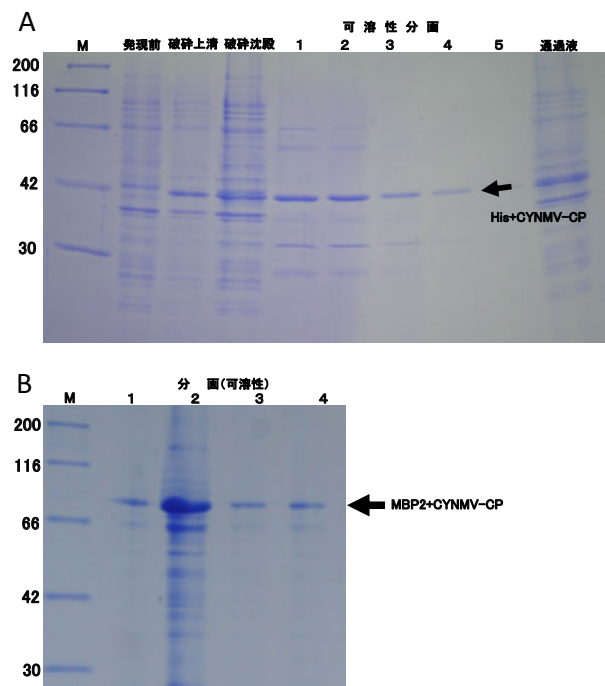


図1 発現誘導菌体より精製した融合タンパク質

A: pCold I ベクター由来のHis+CYNMV-CP

B: pMAL-c2Xベクター由来のMBP2+CYNMV-CP

## 2 大腸菌発現タンパク質に対する抗体の作製

MBP2+CYNMV-CPを5回免疫させた家兎から採血した血清でPTA-ELISAを行ったところ、1時間の発色では抗体価の上昇は認められなかった。これを常温で1日放置したところ発色が肉眼でも確認された（データ省略）。しかし、健全葉でも吸光値の数値が高く、罹病葉との差は認められたものの、実用的ではないと考えられた。

His+CYNMV-CPを2回および3回免疫させた2頭の家兎から採血した血清でもPTA-ELISAを行ったところ、いずれも1時間の発色では抗体価の上昇は認められなかった。7, 8, 9回免疫後の試採血サンプルの抗体価はイチゴバッファーを用いることで、吸光値の上昇が見られ、PBSTに添加した試薬が吸光値の上昇に関与すると考えられた（データ省略）。

## 3 抗体のDAS-ELISAへの適用

### 1) 磨砕用バッファーの検討

PBSTバッファーに1%スキムミルク、2%PVP、2%亜硫酸ナトリウムをそれぞれ単独で加えたところ、1%スキムミルクを添加した場合に顕著な吸光値の上昇が認められた。さらにスキムミルクの添加濃度を0.5%, 1%, 1.5%, 2%で試験したところ、1%の添加量で吸光値が上昇し、それ以上添加しても、吸光値は上昇しないことから、最適な添加量は1%と考えられた（図2）。

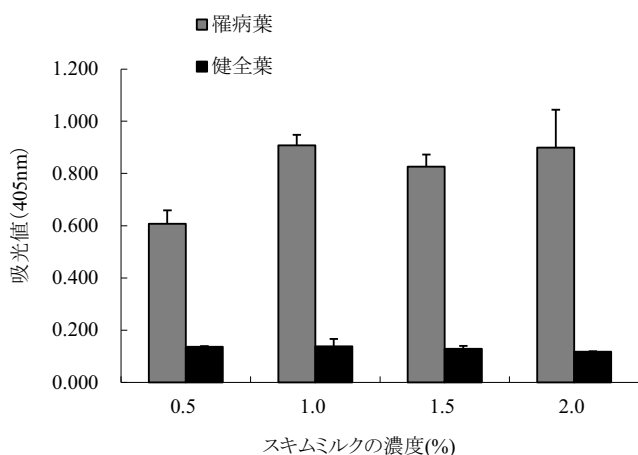


図2 磨砕バッファー (PBST+2%PVP) へのスキムミルク添加量と吸光値に与える影響

PBST+1%スキムミルクバッファーにさらに2%PVP, 2%Tween20, 2%亜硫酸ナトリウム, 2%TritonX100をそれぞれ単独で加えたところ、2%Tween20の添加で吸光値の上昇効果が認められた。Tween20の添加濃度 (%) を0, 1, 2, 3, 4, 5%で検討したところ、2%の添加量で吸光値が上昇し、それ以上添加しても、吸光値は上昇しないことから、最適な添加量は2%であった（図3）。

PBST+1%スキムミルク+2%Tween20バッファーに2%PVP, 2%亜硫酸ナトリウム, 2%TritonX100をそれぞれ単独で加えたところ、2%PVPは無添加と同等の吸光値が得られ、添加による影響はなかった。しかし、2%亜硫酸ナトリウムまたは2%TritonX100を添加した場合は吸光値が低下した。

ナガイモ葉のCYNMVを検定する場合はPBSTバッファーに1%スキムミルク, 2%Tween20, 2%PVPを加えたバッファー (ナガイモバッファー) が最適である。

### 2) 検定葉の凍結による吸光値の上昇効果

検定葉 (罹病葉) の凍結温度を試験した結果、-15℃以下の温度で凍結させると吸光値の上昇効果が見られ、6時間凍結および24時間凍結ともに同様の結果が得られた（データ省略）。吸光値の上昇は6時間凍結が優った。-30℃で凍結時間について検討したところ、6時間以上の凍結で吸光値の上昇が見られた（図4）。

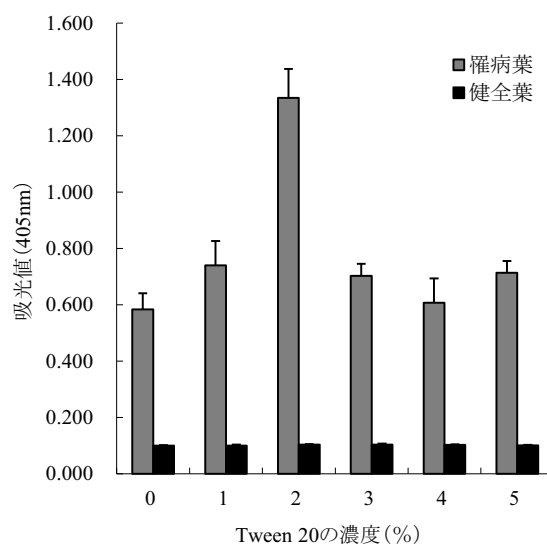


図3 磨砕バッファー (PBST+2%PVP+1%スキムミルク) へのTween20添加量と吸光値に与える影響

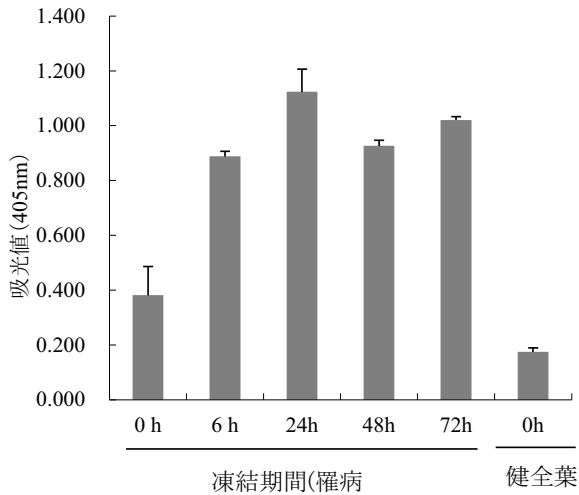


図4 CYNMV 罹病葉の凍結時間が吸光値に与える影響

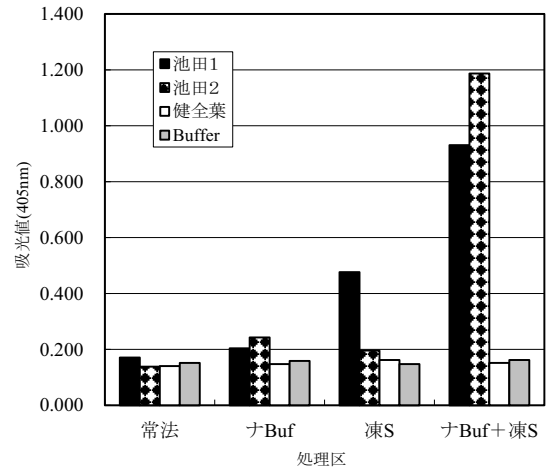


図5 DAS-ELISAにおけるナガイモバッファーとサンプル凍結が吸光値に及ぼす影響

常法: PBST+2% PVP, ナBuf: ナガイモバッファー, 凍S: サンプル凍結

3) ナガイモバッファーと罹病葉の凍結の組合せによる効果の検証

PBST+PVPバッファーと5℃, 1日冷蔵の組合せでは健全葉に比較し, ほとんど差のない吸光値で, 罹病葉からの検出はできなかった。ナガイモバッファーと5℃・1日冷蔵, PBST+PVPバッファーと-30℃・1日凍結の組み合わせでは健全葉に比較し, わずかに罹病葉の吸光値が上昇した程度で検出精度としては低かった。PBST+PVPバッファーと-30℃・1日凍結のうち, 池田1の罹病葉では比較的高い値が得られ, 凍結処理は吸光値の上昇効果が高いと考えられた。ナガイモバッファーと-30℃・1日凍結の組合せでは吸光値の顕著な上昇が認められ, 実用的な検定が実施できると考えられた (図5)。なお, ナガイモバッファーそのものの吸光値はPBST+PVPバッファーに比べ, わずかに高くなる傾向が認められた。健

全葉の吸光値はナガイモバッファーを用いた場合PBST+PVPバッファーに比べ, わずかに低くなる傾向が認められた。

4) 作製抗体の評価

各抗体の①γ-グロブリンのコーティング濃度と②ECの希釈倍数は, pMAL抗体で①2 μg/ml②500倍, pColdR1抗体で①2 μg/ml②500倍, pColdR2抗体で①2 μg/ml②300倍が最適条件であった。DAS-ELISAで各抗体の検出限界を試験したところ, その希釈倍数はpMAL抗体で $1.8 \times 10^2$ 倍, pColdR1抗体で $1.8 \times 10^2$ 倍, pColdR2抗体で $1.8 \times 10^1$ 倍であった (図6)。pColdR2抗体は $1.8 \times 10^1$ 倍と検出限界は劣り, 実用的ではないと考えられた。CYNMVのDAS-ELISAに有効な抗体としてpMAL抗体, pColdR1抗体の2種が得られた。

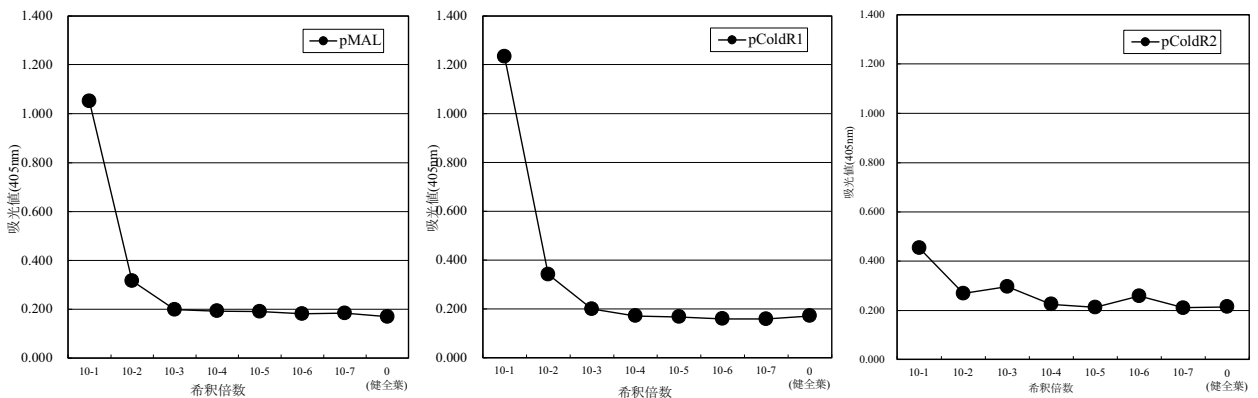


図6 抗原の希釈倍数と各抗体のDAS-ELISAの反応

## 4 一般圃場サンプルを用いたDAS-ELISAの検証

自家増殖種いも区では2008年に1株、2009年に4株の感染を検出した(表2, 表3)。ウイルスフリー種いも区ではDAS-ELISAで陽性となった株は認められなかった。感染株の7月時点での検出状況を見ると陽性、陰性に加え、弱陽性(健全株との吸光値に差はあるが、2倍未満の数値)と判断されるサンプルが認められることと、陽性とモザイク症状の発生も一致しないことから、この時期の検定で感染の有無を判断するのは難しいと考えられた。感染株の8月および9月のサンプルではどの部位の葉を検定しても陽性と判定でき、モザイク症状も認められたことから、この時期のサンプルであればDAS-ELISAでCYNMV感染の有無を確実に判定できる。

## 考 察

CYNMVの抗体は1986年にShirako and Ehara<sup>21)</sup>によって作製されたが、その適用はウエスタンブロット法による診断に有効と報告している。抗体のDAS-ELISAへの適用については言及していないが、非特異反応が高いことが示されており、このことが要因であるかもしれない。この非特異反応の高さはナガイモ感染葉からウイルスを精製する場合に粘稠な糖タンパク質が混入することが原因であると言及しており、抗体を健全葉で吸収させるなどして、力価を高める必要があると考察している。

Kondo and Fujita<sup>11)</sup>は1993年にCYNMVの全塩基配列を特定し、ポティウイルス科マクルラウイルス属であると明らかにしたことによって、CYNMVに対してポティウイルス科ウイルスの検出プライマー<sup>6)</sup>が利用でき、CP領域を含む遺伝子の増幅が容易にできるようになった。

表2 現地ほ場サンプルにおけるCYNMVのDAS-ELISA (2008年)

採取株 番号	自家増殖区									ウイルスフリー種いも区											
	7月9日			8月22日			9月27日			7月9日			8月22日			9月27日			10月18日		
	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉
1	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-
2	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-
3	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-
4	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-
5	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-
6	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-
7	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*
8	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	-	-	-	-	-	*	*	*
9	*	*	(+)	+	+	+	+	+	+	*	*	*	-	-	-	-	-	-	*	*	*
10	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	-	-	-	-	-	*	*	-

注) +; 陽性, -; 陰性, ( ); 症状がなく陽性, \*; 葉採取できず,  ; はモザイク症状あり

表3 現地ほ場サンプルにおけるCYNMVのDAS-ELISA (2009年)

採取株 番号	自家増殖区									ウイルスフリー種いも区											
	7月21日			8月25日			9月29日			7月21日			8月25日			9月29日					
	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉	上葉	中葉	下葉			
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	±	+	+	+	+	+	+	+	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	(±)	(±)	±	+	+	+	+	+	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注) +; 陽性, ±; 弱陽性, -; 陰性, ( ); 症状がなく陽性, \*; 葉採取できず,  ; はモザイク症状あり

加えて、CPを大腸菌で大量発現させて、植物体を經由しないで精製したCPを抗原として用いることができる。その結果、CYNMVの抗体はDAS-ELISAで健全葉の吸光値が非特異反応によって上昇することはなく、ナガイモ葉の糖タンパク質に対する非特異反応の問題は回避されたと考えられる。

大腸菌発現タンパク質を用いて抗血清を作製する方法はさまざまな属のウイルスで報告されている<sup>9, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 22, 23</sup>。特に篩部に局在するウイルスでは罹病葉からウイルスを純化するには大量の罹病葉が必要で、ウイルス粒子の収量性に問題があることが多い<sup>12</sup>が、大腸菌発現タンパク質を用いることでこの問題が回避されている。また、CPの発現には2種のベクターを検討したが、いずれも可溶性の画分にCP結合タンパク質を溶出できたことから、精製も容易であった。ウイルスによっては発現タンパク質が不溶性となる場合があり、この場合はさらに尿素で変性させてカラムなどで回収する必要がある。CYNMVと同属のLarge cardamom chirk virusではpET28aベクターによる大腸菌発現でCPを作製しているが、不溶性であり、上記の手法でCPを回収している<sup>23</sup>。本試験で用いたベクター2種では水溶性の結合タンパク質として発現されたことから、この点で問題がなく、植物ウイルスに用いる大腸菌発現ベクターとして広く有効であると考えられる。

植物ウイルスのELISAで非特異反応の抑制などを目的にさまざまな添加剤が用いられている<sup>1, 7, 8, 10</sup>。主に磨砕パフアーに添加する場合と、サンプルを前処理する場合は報告されている。本試験で添加剤として有効だったスキムミルクとTween20はPepper mild mottle virusを土壌から検出するDAS-ELISAでも有効であることが報告されている<sup>10</sup>。筆者らによるとTween20はウイルスの抽出を効率化できる効果を、スキムミルクは特異的にウイルスを抽出できる効果をもたらしていることを考察しており、CYNMVに対しても同様の効果が発揮されていると推察される。ナガイモに感染するヤマノイモモザイクウイルス (YMV) のDAS-ELISAでは添加剤を用いなくても検定が可能であることから<sup>3</sup>、添加剤の必要性はCYNMVのDAS-ELISAで特有のものであることがわかる。

さらにサンプルの凍結がCYNMVのDAS-ELISAの吸光値を向上させたが、凍結処理の効果は他に例を見ない。他のウイルスにおけるDAS-ELISAと同様の効果をもたらすのか興味深い。

また、CYNMVにはCP遺伝子の違いにより異なるグループの存在が明らかにされている<sup>4</sup>。これは自生株から得られた系統で、ナガイモ栽培株からは見つからないものの、この系統が北海道の一般栽培で今後発生す

ることも想定される。その場合、今回作製した抗体が同系統に反応するかどうかは明らかにする必要がある。

謝辞 本研究の現地試験等を実施するに当たり、十勝農協連柴田浩之氏に多大なる協力をいただいた。ここに深く感謝の意を表する。

## 引用文献

- 1) Clark, M. F. Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19, 83-106 (1981)
- 2) Clark, M. 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) 藤 晋一, 中前 均. ヤマノイモモザイクウイルスのELISAとRT-PCRによる検出. *日植病報.* 65, 207-210 (1999)
- 4) 藤 晋一, 枝 澄子, 古屋廣光, 内藤秀樹. 自生ヤマノイモおよびジネンジョ×ナガイモ交配種から得られたヤマノイモえそモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子の多様性. *日植病報.* 70, 264 (2004)
- 5) 福本文良, 栃原比呂志. ヤマノイモえそモザイクウイルス. *日植病報.* 44, 1-5 (1978)
- 6) Gibbs, A. and Mackenzie, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 63, 9-16; Erratum, *J. Virol. Methods* 65, 317 (1997)
- 7) 堀田治邦, 西脇由恵, 山名利一. 北海道のスターチスから分離された2種ウイルス. *北農.* 86, 302-306 (2019)
- 8) 堀田治邦, 鈴木孝子, 小倉玲奈. ELISAによるコムギ根からのコムギ縞萎縮ウイルスの検出. *日植病報.* 81, 91 (2015)
- 9) 井出洋一, 黒木健児, 田代暢哉, 真籠 洋, 吉川信幸, 大島一里. カンキツに発生するリンゴステムグループウイルスの大腸菌発現外被タンパク質に対する抗血清の作製と酵素結合抗体法による診断への利用. *日植病報.* 70, 123-127 (2004)
- 10) Ikegashira, Y., Ohki, T., Ichiki, T., Higashi, T., Hagiwara, K., Omura, T., Honda, Y., Tsuda, S. An immunological system for the detection of Pepper mild mottle virus in soil from green pepper fields. *Plant dis.* 88, 650-656 (2004)
- 11) Kondo, T. and Fujita T. Complete nucleotide sequence and construction of an infectious clone of Chinese yam necrotic mosaic virus suggest that

- macluraviruses have the smallest genome among members of the family *Potyviridae*. Arch. Virol. 157, 2299-2307 (2012)
- 12) 久保田健嗣. ウリ類退緑黄化ウイルス抗血清の開発と診断方法. 植物防疫. 64, 814-817 (2010)
  - 13) 黒田智久, 鈴木一実. ソラメウイルトウイルス2の22-kDa外被タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製とその性状. 日植病報. 69, 403-406 (2003)
  - 14) 楠目俊三, 近藤浩一, 齊藤美奈子, 玉田哲男. 北海道におけるヤマノイモえそモザイクウイルスの発生状況とイムブロットング法による検定. 日植病報. 56, 139 (1990)
  - 15) 小野寺鶴将, 田縁勝洋, 鳥越昌隆. 北海道十勝地方のナガイモにおけるヤマノイモえそモザイクウイルスの感染時期およびこれに関与するアブラムシの寄生消長について. 北日本病虫研報. 61, 197-200 (2010)
  - 16) 小野寺鶴将, 田縁勝洋, 鳥越昌隆. 北海道十勝地方のナガイモほ場における採種体系とヤマノイモえそモザイク病の発生程度. 北日本病虫研報. 63, 74-77 (2012)
  - 17) 佐々木純, 増田 税, 竹内 徹. 大腸菌で発現した外被蛋白質より作成した抗体によるユリモットルウイルス (LMoV) の検出. 日植病報. 69, 339-340 (2003)
  - 18) 佐々木純, 竹内 徹, 古田和義. イチゴマイルドイエローエッジウイルス (SMYEV) の大腸菌発現外被タンパク質に対する抗血清の作製とエライザ法による診断への利用. 日植病報. 74, 219 (2008)
  - 19) 佐々木純, 榎館 拓, 鎌田貴之, 堀田治邦. ネギ萎縮ウイルスの抗体作製とエライザ法による検出. 北日本病害虫研報. 62, 209 (2011)
  - 20) 佐々木純, 堀田治邦. 花ユリから分離されたユリモットルウイルスの検出法. 北日本病害虫研報. 63, 249 (2012)
  - 21) Shirako, Y. and Ehara Y. Rapid diagnosis of Chinese yam necrotic mosaic virus infection by Electro-blot immunoassay. Ann. Phytopathol. Soc Japan 52, 453-459 (1986)
  - 22) 上田重文, 石井貴明, 花田 薫. 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)
  - 23) Vijayanandraj, S., Yogita, M., Das, A., Ghosh, A., Mandai, B. Highly efficient immunodiagnosis of Large cardamom chirke virus using the polyclonal antiserum against Escherichia coli expressed recombinant coat protein. Indian J. Virol. 24, 227-234 (2013)
  - 24) 油本武義, 谷口達雄. ナガイモえそモザイク病の発生経過と被害に関する観察. 日植病報. 50, 117 (1984)



# Immunodetection of Chinese yam necrotic mosaic virus by DAS-ELISA using antibodies produced against coat protein expressed in *Escherichia coli*

Harukuni HORITA\*<sup>1</sup>, Jun SASAKI\*<sup>1</sup> and Toru TAKEUCHI\*<sup>2</sup>

## Summary

Chinese yam necrotic mosaic virus (CYNMV) causes the most economically important virus diseases of Chinese yam in Hokkaido. The coat protein gene was RT-PCR-amplified from total RNA extracted from infected Chinese yam leaves and the amplified coat protein encoded fragment was cloned and completely sequenced. The fragment was subsequently subcloned into the pMAL-c2X or pColdI expression vector. The recombinant plasmids were transformed *Escherichia coli* BL21 and express the coat protein and used for rabbit immunization. Antisera obtained from rabbit after injection with MBP2+CYNMV-CP protein or His+CYNMV-CP protein responded immune toward the CYNMV in DAS-ELISA. The absorption value (405nm) was increased by adding 1% skim milk (w/v) and 2% Tween20 (v/v) to PBST used as a maceration buffer. Furthermore, a remarkable increase in the absorption value was observed in the combination of freezing the sample for 6 hours or more. Improved DAS-ELISA detected strongly CYNMV in crude leaf extract and showed minimal background reaction with the healthy leaf extract. DAS-ELISA was validated with high accuracy in detecting CYNMV in field samples.

\*<sup>1</sup> Hokkaido Research Organization, Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan (Present: Hokkaido Research Organization, Flower and Vegetables Research Center, Takikawa, Hokkaido, 073-0026 Japan)

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

\*<sup>2</sup> ditto. (Present: , Tsukuba, Ibaraki, 099-1496 Japan)