９）コムギ縞萎縮ウイルスの検出技術
（コムギ縞萎縮病ウイルスの検出技術の確立）

北海道立中央農業試験場　農産工学部　遺伝子工学科
北海道大学大学院　農学研究科

１．試験のねらい

コムギ縞萎縮ウイルスWheat yellow mosaic virus (WYMV)は，コムギの根に寄生する土壌菌*Polymyxa graminis*によって媒介される土壌伝染性のウイルスである。本州以南では古くから知られているが，北海道では平成3年に道央の3市町で初めて発生が確認された。その後の発生拡大は見られなかったが，平成7年に育成された現在の主力品種「ホクシン」がコムギ縞萎縮病に弱いことが判明し，「ホクシン」の作付増加に伴い，コムギ縞萎縮ウイルスの分布の拡大と被害が危惧されている。そこで，道内における発生実態調査とその対策となる抵抗性品種の育成のために，ウイルスの検出技術を確立することとした。

ウイルスの検出には，抗原抗体反応を利用したエライザ法が実用的であるが，エライザ法にはウイルスを抗原とした抗体を作成しなければならない。抗体の作成には，抗原となるウイルス粒子のタンパク質が多量に必要である。しかし，コムギ縞萎縮ウイルスでは，他のウイルスと異なり，ウイルス粒子の大量純化が困難であったため，遺伝子工学的手法の利用を試みた。

２．試験の方法

（１）ウイルス遺伝子の単離

伊達市のコムギ縞萎縮病発生圃場における「ホクシン」の病葉から，コムギ縞萎縮ウイルスのRNAを抽出し，RT-PCR法によって外被タンパク質(CP)遺伝子を単離した。

（２）大腸菌におけるタンパク質の発現

単離したウイルスの外被タンパク質(CP)遺伝子を，ベクターを用いて大腸菌に組み込み，大腸菌でウイルスのタンパク質を発現させた。

（３）抗体の作成とエライザ法による検出

得られた抗原をウサギに免疫して，抗血清(抗体)を作成し，エライザ法によって病葉からのウイルスの検出を行った。

３．試験の結果

（１）ウイルス遺伝子の単離

コムギ縞萎縮ウイルスの外被タンパク質(CP)遺伝子を単離し，全塩基配列を決定した。

（２）大腸菌におけるタンパク質の発現

外被タンパク質(CP)遺伝子を大腸菌に組み込み，コムギ縞萎縮ウイルスの外被タンパク質(CP)を大量に発現させることができた(図2)。大量発現したタンパク質をカラムで精製して，抗血清(抗体)作成のための抗原を得た。

（３）抗体の作成とエライザ法による検出

エライザ法によって，病葉の10,000倍希釈液からもウイルスを検出でき(図3)，作成した抗体の有効性が確認された。

エライザ法によって，コムギ縞萎縮病発生圃場の小麦からウイルスの検出を行った結果，最上位展開葉では吸光値が低下し(図4)，葉身の先端で吸光値が高まった。したがって，エライザ法による検出は，小麦の最上位展開葉の1枚下の葉の先端を検定用サンプルとするとよい。

【用語解説】

エライザ法：簡便で，精度が高いウイルス検定法として，広く利用されている。吸光値が高いほどウイルス濃度が高くなる。

RT-PCR法：RNA遺伝子を単離するための遺伝子増幅法。

外被タンパク質(CP)：ウイルスのもつタンパク質で，抗原抗体反応の抗原となる。CPはコート・プロテインの略。

ベクター：遺伝子の運び屋。大腸菌に遺伝子を組み込むのに使われる。

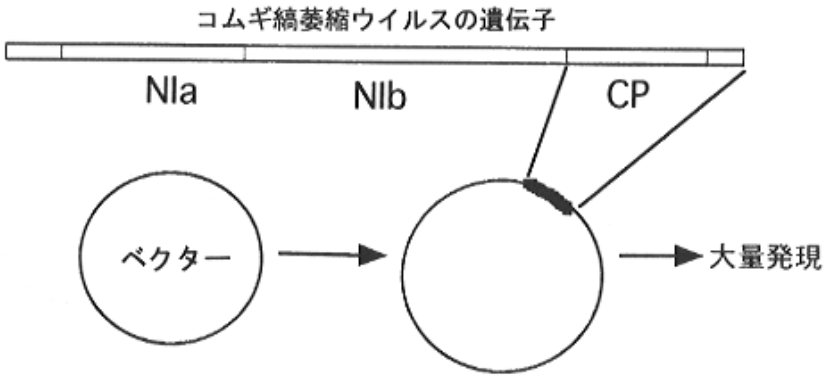

図1　コムギ縞萎縮ウイルスの外被タンパク質(CP)遺伝子の単離と大腸菌での体量発現

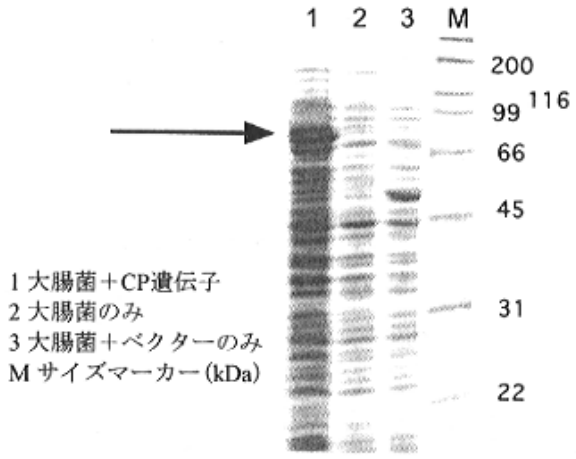

図2　大腸菌で発現させたウイルス外被タンパク質

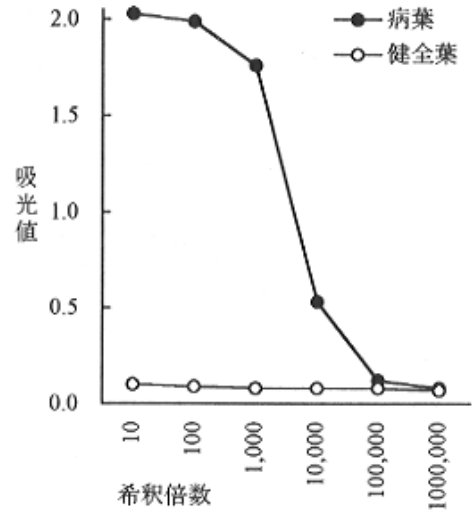

図3　エライザによるウイルスの検出感度

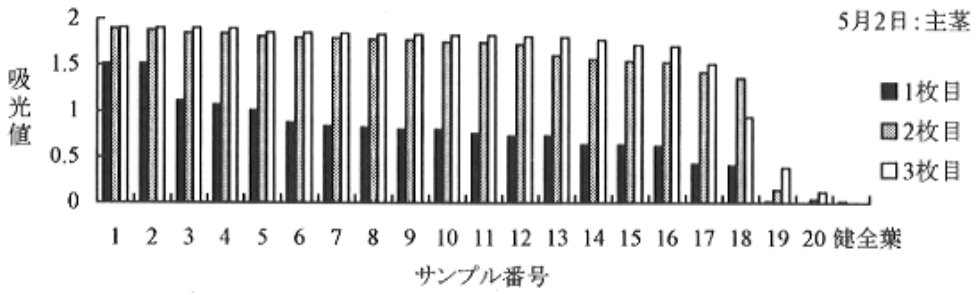

図4　エライザによるコムギの検定葉位(n枚目：最上位展開葉からの枚数)

目次へ戻る