

Jour. Agri. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku, 46 (1), 48-52 (2001)
東農大農学集報, 46 (1), 48-52 (2001)

フィリピン産パパイヤ輪点ウイルスの 性質と検出法

夏秋 啓子*・N.B. BAJET*

(平成12年11月30日受付 / 平成13年3月15日受理)

要約: フィリピンのルソン島バタンガスで採集した輪紋症状を示すパパイヤ (*Carica papaya*) からウイルスの1分離株 (PRSV-P-B) を得た。このウイルスを各種植物へ汁液接種したところ、全身感染したパパイヤ、ズッキーニ (*Cucurbita pepo*)、メロン (*Cucumis melo*)、シロウリ (*Cucumis melo* var. *conomon*)、ニホンカボチャ (*Cucurbita moschata*)、およびキュウリ (*Cucumis sativus*) と局所感染した *C. amaranticolor* の7種に感染した。電子顕微鏡観察ではパパイヤ病株や汁液接種したズッキーニに幅12 nm、長さ700~800 nm のひも状ウイルス粒子と細胞質封入体の破片とが認められた。PRSV-P-B は ELISA でパパイヤ輪点ウイルス抗血清 (ATCC) と陽性反応を、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス抗血清 (ATCC) および真岡哲夫博士より分譲を受けたパパイヤ奇形葉モザイクウイルス (PLDMV) の抗血清とは陰性反応を示した。ウイルス外被タンパク質の分子量は約36Kであった。以上の性質から、フィリピンのパパイヤから分離された PRSV-P-B はパパイヤ輪点ウイルスと同定、確認された。PRSV-P-B に対する抗血清を作製し、健全ズッキーニ葉汁で吸収してから ELISA に用いた。PRSV-P-B は新鮮あるいは乾燥したパパイヤあるいはズッキーニ病葉から ELISA, DIBA, そして TIBA によって検出された。さらに、PRSV-P-B は渡辺ら (1998) による PRSV 特異的合成プライマーを利用した RT-PCR によって増幅された。PLDMV (真岡哲夫博士から分譲) は同プライマーで増幅されなかったため、RT-PCR は PRSV と PLDMV の迅速な類別に有効と考えられた。

キーワード: パパイヤ輪点ウイルス, 抗血清, 特異的合成プライマー, パパイヤ奇形葉モザイクウイルス

緒言

パパイヤ輪点ウイルス (*Papaya ringspot virus*; PRSV) は *Potyvirus* 属に属するウイルスで1949年に Jensen により初めて報告されて以来、世界各地のパパイヤ (*Carica papaya*) の重要ウイルス病原とされている (ZURCHER, 1996)。フィリピンではパパイヤの生産が盛んであるが、1980年代初頭から本ウイルスの発生が知られており、台湾産 PRSV 抗血清を利用した検出例もある (BAJET ら, 1994)。また、わが国でも沖縄県のパパイヤで本ウイルスの発生が報告されている (MAOKA ら, 1995)。

本研究では、フィリピン産 PRSV 分離株の性状を調べ、抗血清を作製するとともに、本ウイルスの簡易な検出法として血清学的手法による検出を試みた。さらに、渡辺ら (1998) による PRSV に特異的な合成プライマーを用いて逆転写 PCR (reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) を行い、PRSV と類似した性質を持ち、わが国で与那覇 (1987) によって発生が報告されているパパイヤ奇形葉モザイクウイルス (Papaya leaf distortion mosaic virus, PLDMV) との判別が可能であることも明らかにしたので報告する。なお、本研究の一部は、1998

年の日本植物病理学会で口頭発表 (西方ら, 1998) した。フィリピン産およびタイ産のパパイヤ病株は農林水産省の特別許可農林水産省指令9横植53号と同9横植657号を得て輸入した。

実験材料と方法

ウイルスの分離と宿主域

フィリピンで採集した輪紋症状を示すパパイヤから得たウイルス分離株中、バタンガス地方由来株を PRSV-P-B として供試した。フィリピンで採集しパパイヤに感染性を有し PRSV と血清学的に関係のある分離株 (PRSV-P-1)、タイで採集した PRSV 株 (PRSV-T-1)、PLDMV (農林水産省真岡哲夫博士から分譲) も供試した。*C. amaranticolor* をウイルスの局所病斑宿主とし、ズッキーニ (*Cucurbita pepo*) を増殖宿主とした。

汁液接種は0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を、感染葉の5倍量 (w/v) 加えて行い、試験植物は人工気象機で育成した。

電子顕微鏡観察

透過型電子顕微鏡 (日本電子 JEM-100CX) を用い、2%

* 東京農業大学国際食料情報学部国際農業開発学科

** フィリピン大学ロスバニオス校植物病理学科

のりんタングステン酸によるダイレクトネガティブ染色法 (土居ら, 1969) で行った。

酵素結合抗体法

酵素結合抗体法 (Enzyme linked immuno-sorbent assay, ELISA) によるウイルスの検出は, Koenig (1981) の方法をもとに, 間接 ELISA で行った。本研究で作製した抗血清 (As-PRSV-P-B) に加えて, American Type Culture Collection (ATCC, USA) による PRSV 抗血清 (As-PRSV-ATCC) およびズッキーニ黄斑モザイクウイルス (*Zucchini yellow mosaic virus*) 抗血清 (As-ZYMV-ATCC), 農林水産省真岡哲夫博士から分譲のパパイヤ奇形葉モザイクウイルス抗血清 (As-PLDMV) を用いた。

外被タンパク質の分子量測定

ウイルス外被タンパク質の分子量測定は, Laemmli (1970) に準じて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) によって行った。ゲル濃度は 12.5% とし, 分子量スタンダードには SDS-PAGE Molecular Weight Standard (Broad range) (Bio Rad Laboratories, USA) を用いた。SDS-PAGE により感染植物から分離したウイルス外被タンパク質は, セミドライブロットイング (日本エイドー社) によりゲルからニトロセルロース膜に転写 (定電流 180 mA, 30 分) してウェスタンブロットイング法により血清学的検出をおこなった。

DIBA および TIBA

ニトロセルロース膜 (Trans-Blot Transfer Medium, 0.45 μ m, Bio Rad Laboratories, USA) に植物汁液を滴下するドットプロット法 (dot immuno-blotting assay, DIBA) (Hibi ら, 1985), および検査植物の茎の切断面をニトロセルロース膜に付着させるティッシュプロット法 (tissue immuno-blotting assay, TIBA) (Lin ら, 1990) を行った。なお, DIBA については, 乾燥感染葉を用いた場合と, 汁液を付着させたニトロセルロース膜をブロッキング後, 風乾し, これらを室温あるいは -20°C で保存した場合について, 検出可能性を検討した。

ウイルスの濃縮と抗血清の作製

汁液接種で全身感染したズッキーニ葉に, 0.01 M エチレンジアミン 4 酢酸 2 水素 2 ナトリウム 2 水和物 (EDTA) および 0.1% 亜硫酸ナトリウムを添加した 0.5 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を 2 倍量 (w/v) 加えて磨砕し, クロロホルムおよび四塩化炭素で清澄化した。高速遠心分離後, ポリエチレングリコール (8%) でウイルス分画を沈澱させた。この懸濁液に 2% のトリトン X を加えて, さらに高速遠心分離した後, 20% しょ糖クッション法による超遠心分離を行ってウイルス濃縮液を得た。

毎回約 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度のウイルス濃縮液 $100\mu\text{l}$ を $900\mu\text{l}$ の生理食塩水と混合し, 合計 4 回の静脈注射を行った後, 耳動脈から真空採血管によって抗血清 (As-PRSV-P-B) を約 16ml 得た。

PRSV 特異的プライマーによる PRSV-P-B の検出

渡辺ら (1998) による 2 種類の PRSV 特異的プライマー (PRSV-1R; 23 mer, PRSV-2F; 21 mer) を用いたウイルス核酸の増幅は, オリゴ dT アダプタープライマーによる逆転写に引き続き, cDNA 合成キット (RNA LA PCR キット, TaKaRa) によって行った。PCR 反応条件は 92°C で 30 秒の変性, 55°C で 30 秒のアニーリング, 72°C で 90 秒の伸長で 35 サイクルとし, サーマルサイクラー (PTC 100, MJ Research Inc.) を用いた。

結果と考察

宿主域と病徴

フィリピンのルソン島バタンガスで葉に輪紋を生じたパパイヤを採集した (図 1)。パパイヤ病葉から *C. amaranticolor* に接種して得られた初期の局所病斑をズッキーニに接種して増殖したウイルス分離株 (PRSV-P-B) を, 各種の植物に汁液接種をして宿主域を調査した。その結果, 3 科 7 種の植物に感染が認められた。すなわち, 葉数が 2~3 枚の実生のパパイヤに接種したところ, 接種 2 週間後から上葉にモザイク症状が観察され, 徐々に葉に奇形が現れた。輪紋が観察されることもあり, 生育が不良で草丈も健全株と比較して低かった (図 2)。ズッキーニ (*Cucurbita pepo*) では, 接種 2 週間後からモザイク症状が認められ, 次第にモザイクは鮮明となり, 奇形葉を生じることもあった (図 3)。メロン (*Cucumis melo*), シロウリ (*Cucumis melo* var. *conomon*), ニホンカボチャ (*Cucurbita moschata*) は上葉にモザイクを生じた。キュウリ (*Cucumis sativus*) では上葉にモザイク症状が認められたが軽微であった。*C. amaranticolor* では接種葉に退緑斑点を生じ, 次第に壊疽化したが, 上葉には病徴は観察されなかった。なお, タバコ属植物 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*) およびジュウロクササゲ (*Vigna sesquipedalis*) には感染が認められなかった。これらはいずれも電子顕微鏡観察と ELISA によってウイルス感染の有無を確認した。

ウイルス粒子の観察

パパイヤ病株, あるいは, 汁液接種によって得られたモザイク症状を示すズッキーニおよび輪紋症状と奇形を示すパパイヤを電子顕微鏡で観察したところ, いずれにも幅 12 nm, 長さ 700~800 nm のひも状ウイルス粒子と層板状の細胞質内封入体の破片が観察され, *Potyvirus* 属ウイルスの特色が認められた。

血清学的検出

次に ELISA による病原ウイルスの検出を行った。汁液接種によって得られたズッキーニの感染葉について, パパイヤ輪点ウイルス抗血清 (As-PRSV-ATCC) を用いた間接 ELISA を行ったところ, 陽性反応を示した。しかし, As-PLDMV および As-ZYMV-ATCC に対しては陰性であった。また, 汁液接種したズッキーニ中のウイルスの外被タンパク質の分子量はウェスタンブロットイング法で約

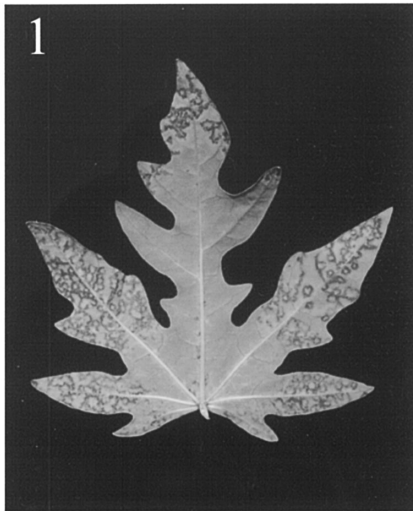


図1 フィリピンで採集されたパパイヤ (*Carica papaya*) の輪紋症状

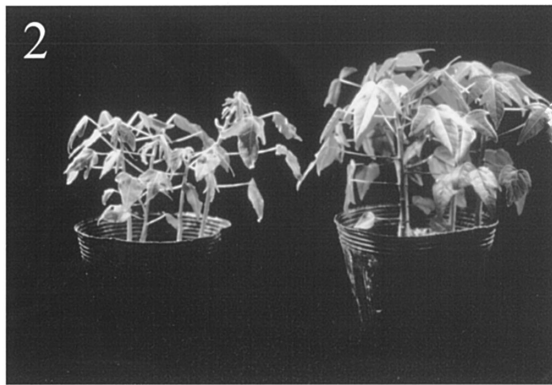


図2 PRSV-P-B を接種した実生パパイヤのモザイク症状。接種株 (左)、健全株 (右)。生育が不良で草丈も低くなる



図3 PRSV-P-B を接種したズッキーニのモザイク症状

36 K であった。

ウイルス濃縮で得られた濃縮液の紫外部吸収は 260 nm で最大、240 nm で極小を示し、ウイルス収量は 2.2 mg/100 g 生葉と計算された。電子顕微鏡観察では、濃縮液には依然として多くの夾雑物が認められ精製は不十分であったが、多数のウイルス粒子を含んでいたため、抗血清作製に利用した。

作製された抗血清 (As-PRSV-P-B) の非特異的成分を健

全ズッキーニ粗汁液で吸収した後、間接 ELISA で PRSV-P-B 感染パパイヤ葉からのウイルス検出について、その最適希釈濃度を検討した。少なくとも 500 倍から 10,000 倍までで対照とした健全パパイヤ葉と比較して 2 倍以上の吸光度が測定された。しかし、500 倍未満では非特異的の反応が認められ、5,000 倍以上では吸光度が低く不適當であった。そこで、以下の実験には 1,000 倍希釈で利用することとした。

ウイルスのより簡易な検出を目的として DIBA および TIBA によるウイルスの検出を試みた。すなわち、PRSV-P-B を接種して得られたパパイヤあるいはズッキーニの感染葉について As-PRSV-ATCC あるいは As-PRSV-P-B を用いて行った TIBA および DIBA とともに、いずれの試料でも同様に明瞭な陽性反応が認められた (図 4, 5)。なお、葉を使った TIBA では葉汁の緑色が陽性反応を示す紫色に重なるため、茎を使って TIBA を行う方が判定が容易であった。さらに乾燥感染葉を用いた DIBA は生葉と同様な反応を示した。また、汁液を付着させたニトロセルロース膜を室温あるいは -20°C で保存してから行った DIBA でも、少なくとも 1 ヶ月後までは、通常の DIBA と同じ反応が認められ、検出が可能であった。したがって、PRSV についても、TIBA あるいは DIBA によって、圃場診断、あるいは試料汁液を付着させたニトロセルロース膜の保存や郵送による診断が可能であると考えられた。

RT-PCR による検出

PRSV と PLDMV はパパイヤでは識別できない類似の病徴を示し、通常、接種試験か血清学的検出によって類別される。迅速な診断には汁液接種試験よりも ELISA、DIBA など血清学的手法が適しているが、PLDMV 抗血清は希少であり、その供給は限定される。そこで、渡辺ら (1998) による PRSV に特異的な 1 組の合成プライマーを用いた RT-PCR による PRSV の検出を試みた。この 1 組のプライマーは PRSV 外被タンパク質遺伝子内に位置する配列で、増幅される PCR 産物は 449 塩基である。RT-PCR の結果、本合成プライマーによっても、フィリピン産 PRSV が増幅され、かつ、PLDMV は増幅しなかったため、PRSV と PLDMV との類別も可能であることが示された (図 6)。なお、タイで採集したモザイク症状を示すパパイヤ葉も本プライマーで増幅され、PRSV の感染が示唆された。

以上より、フィリピンで採集した輪点を示すパパイヤ葉から分離したウイルスは、粒子の形状、宿主域、血清反応、ウイルス外被タンパク質の分子量などから、パパイヤ輪点ウイルス (PRSV) であると確認するとともに、抗血清を作製した。従来、フィリピンでの PRSV の血清試験はアメリカ産あるいは台湾産の抗血清を利用した実験が主であった (BAJET, 1994) が、今回、フィリピン産 PRSV の分離株を得て、その性状を明らかにすると共に対応する抗血清を作製した。また、ELISA に加えて、DIBA や TIBA による検出が可能で圃場診断や発生調査に利用できることを示した。さらに、PRSV 特異的の合成プライマーを利用した

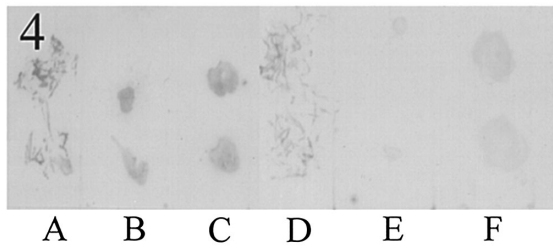


図 4 TIBA (As-PRSV-P-B) によるウイルスの検出。ウイルス感染ズッキーニの葉 (A) と茎断面 (B, C), および健全ズッキーニの葉 (D) と茎断面 (E, F)。ウイルス感染株では紫色の発色があるが、健全株では汁液の痕跡以外の発色が見られない

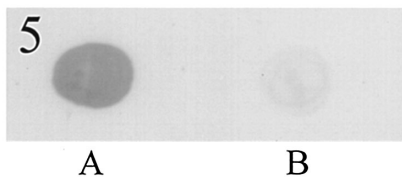


図 5 DIBA (As-PRSV-ATCC) によるウイルスの検出。ウイルス感染ズッキーニ葉汁 (A) と健全ズッキーニ葉汁 (B)

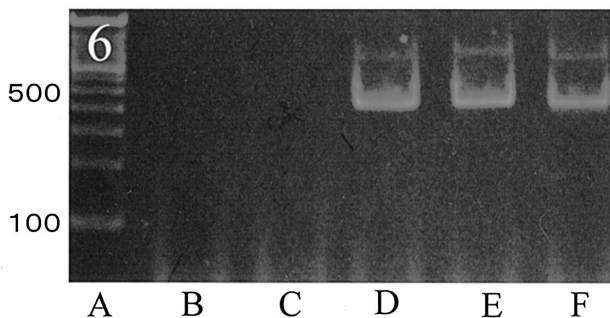


図 6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動による PRSV 特異的プライマーによる PCR 産物の検出。レーン A : 100b DNA ラダー, レーン B : 健全パパイヤ, レーン C : PLDMV, レーン D : PRSV-P-B, レーン E : フィリピンで分離した PRSV-P-1, レーン F : タイで分離した PRSV (PRSV-T-1)。レーン D, E, F に PCR 産物が観察される

RT-PCR によりフィリピン産 PRSV を容易に増幅できることから、RT-PCR による検出が可能であることがわかった。この方法では、パパイヤに発生し病徴では識別できない PLDMV との迅速な類別も容易であった。

謝辞：本研究は東京農業大学大学院高度化推進費によって実施し、遂行にあたっては、本研究室所属学生（当時）の柳瀬美幾、鈴木亜希子さんらにはウイルスの宿主域調査、増殖および純化について、同じく西方三恵、浮田香予子さんらには各地のウイルスの分離、性状の解明および PCR 検出について、それぞれ多大な協力を頂いた。ここに記して感謝の意を表する。また、貴重な PLDMV および PLDMV 抗血清を快く分譲して頂き、試料の収集にもご協力下さった眞岡哲夫博士に篤く感謝する。

引用文献

- 1) ZURCHER, E.J. (eds.) (1996) Plant Viruses Online : Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version : 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- 2) BAJET, N.B., EUSEBIO, A.A., VILLEGAS, L.C., ALCANTARA, B., TALENS, A.D., NATSUAKI, K.T., TOMARU, K., and AMEMIYA, Y. (1994) Serological studies of papaya ringspot virus. *In* Proceedings of the symposium on host plant resistance and control of tropical crop diseases and pests. 31-47.
- 3) MAOKA, T., KAWANO, S., and Usugi, T. (1995) Occurrence of the P strain of papaya ringspot virus in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61 : 34-37.
- 4) 渡辺知子・小林孝弘・竹之内久美子・夏秋知英・奥田誠一 (1998) ユウガオから見出されたパパイヤリングスポットウイルス. *日植病報* 64 : 597. (講演要旨)
- 5) 与那覇哲義 (1987) パパイヤのウイルス病 *植物防疫* 41 : 578-582.
- 6) 西方三恵, TALENS, A.D., BAJET, N.B., 夏秋啓子, 都丸敬一 (1998) 東南アジアにおけるパパイヤのウイルス病の血清診断. *日植病報* 64 : 420. (講演要旨)
- 7) 土居養二・鳥山重光・與良 清・明日山秀文 (1969) ダイレクトネガティブ染色法による感染植物組織からのウイルス粒子の検出. *日植病報* 35 : 180-187.
- 8) KOENIG, R. (1981) Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55 : 53-62.
- 9) LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-683.
- 10) HIBI, T., and SAITO, Y. (1985) A dot immunobinding assay for detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol.* 66 : 1191-1194.
- 11) LIN, N.S., HSU, Y.H. and HSU, H.T. (1990) Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80 : 824-828.

Characterization and detection methods of *Papaya ringspot virus* from the Philippines

By

Keiko T. NATSUAKI* and N.B. BAJET*

(Received November 30, 2000/Accepted March 15, 2001)

Summary : An isolate of virus (PRSV-P-B) from papaya (*Carica papaya*) showing ringspots on leaves collected at Batangus, Luzon, the Philippines was characterized. The virus was manually inoculated and showed to be infectious to 7 species of plants in 3 families including papaya, zucchini (*Cucurbita pepo*), two types of melons (*Cucumis melo*, *Cucumis melo* var. *conomon*), pumpkin (*Cucurbita moschata*), and cucumber (*Cucumis sativus*), as systemic hosts, and *Chenopodium amaranticolor* as a local lesion host. Filamentous virus particles of 700~800 nm length and 12 nm width and debris of inclusion bodies were observed in diseased papaya or manually inoculated zucchini under electron microscope. PRSV-P-B was positively reacted with antiserum to *Papaya ringspot virus* (ATCC) but showed negative reactions with antisera to *Zucchini yellow mosaic virus* (ATCC) and Papaya leaf distortion mosaic virus (Gift from Dr. T. Maoka) in ELISA. Molecular weight of coat protein was approximately 36K. Based upon these results, the virus (PRSV-P-B) obtained from papaya plant collected in the Philippines was identified as *Papaya ringspot virus*. Serum against PRSV-P-B was produced and used for ELISA after absorption with healthy sap of zucchini. PRSV-P-B was detected by ELISA, DIBA and TIBA with fresh or dried leaves of infected papaya or zucchini. PRSV-P-B was also detected by RT-PCR using the synthetic primers designed by Watanabe et al. (1998) which was specific for PRSV. As RNA of PLDMV (Gift from Dr. T. Maoka) was not amplified by RT-PCR with specific primers for PRSV, it was shown that RT-PCR was useful to distinguish PRSV from PLDMV rapidly.

Key Words : *Papaya ringspot virus*, antiserum, specific primers, Papaya leaf distortion mosaic virus

* Department of International Agricultural Development, Faculty of International Agriculture and Food Studies, Tokyo University of Agriculture

** Department of Plant Pathology, University of the Philippines Los Banos