

Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)法によるトマト感染葉からのタバコモザイクウイルスとトマトモザイクウイルスの検出の試み

渡辺貴弘*・古河 衛*・福田明美**

An Assay for Detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* from their Infected Tomato Leaves by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

Takahiro WATANABE, Mamoru FURUKAWA, and Akemi FUKUDA

トマト葉に感染したタバコモザイクウイルス(*Tobacco mosaic virus*, TMV)とトマトモザイクウイルス(*Tomato mosaic virus*, ToMV)を検出するための RT-LAMP 法を試みた。各ウイルスで保存性が高い塩基配列の領域を検索し、設計した 4 種類のプライマーを用いることで TMV 単独感染葉、ToMV 単独感染葉、TMV と ToMV 混合感染葉から、TMV、ToMV を検出した。

キーワード： トマト、*Tobacco mosaic virus*、*Tomato mosaic virus*、RT-LAMP

・緒言

2005年の福井県におけるトマトの作付面積は94haであり、園芸品目として主要な位置を占めている。そのため、高品質性・安定生産が求められている。一方で、ウイルスを中心とした病害による品質低下等が生じている。トマトにモザイク症状を発生させるウイルスは、タバコモザイクウイルス(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、トマトモザイクウイルス(*Tomato mosaic virus*, ToMV)、キュウリモザイクウイルス、ジャガイモXウイルス、ジャガイモYウイ

ルス、トマトアスパーマイウイルス⁶⁾があるが、本県では主に TMV、ToMV が発生している¹⁾。TMV、ToMV に罹病すると葉にモザイク症状を呈したり、生育不良による着果数の減少と果実の肥大不良による減収、および果実の着色不整などによる品質低下が起こる⁸⁾。

ウイルス病に対する有効な薬剤がないため、一度発病すると直接、減収や品質低下につながる。そのため、早期に感染の有無を判定し、感染植物を除去することで被害の拡大を防ぐ必要がある。

植物ウイルスの病害診断では、抗血清を用いた ELISA 法や判別植物を利用した検定手段があるが、いずれも同定に時間がかかっており、現在では、高精度で迅速な PCR 法による遺伝子診断法が主流となっている。PCR 法は DNA を増幅するものであり、3つの温度反応からなる。

* 福井県農業試験場 生産環境部 病理昆虫グループ

** 現 福井農林総合事務所 農業経営支援部

すなわち、2本鎖DNAを1本鎖に変性する反応、1本鎖DNAとプライマーを結合する反応、耐熱性ポリメラーゼを使用して結合したプライマーからDNAを合成する反応である。これらの反応にはサーマルサイクラーなどの特別な装置が必要となり、生産現場での利用は難しい状況である。近年、上記の装置を必要とせず、しかも迅速・簡便な遺伝子診断法であるLAMP法が登場した。LAMP法はNotomiら⁷⁾によって報告された手法であり、PCR法と同じDNAを増幅する技術である。PCR法と異なるところは、60~65の一定温度で反応が進むこと、4種類のプライマーを使用すること、反応結果を目視で確認できることなどである。したがって、LAMP法は、遺伝子診断法の中では比較的安易にできることから生産現場にも対応可能な技術と考えられる。

近年では、LAMP法を用いたウイルス検出法がトマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)²⁾、キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV)⁴⁾、シンビジウムモザイクウイルス (*Cymbidium mosaic virus*, CyMV)³⁾、トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)⁵⁾、メロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus*, MYSV)¹⁾などで報告されていることから、本県で主として発生が認められているTMV、ToMVについても検出が可能と考えられる。そこで、今回は生産現場に普及させる目的でTMVとToMVを対象とし、逆転写反応とLAMP法を組み合わせたRT-LAMP法による検出方法を検討した。その際、検出コストと労力を考慮し、1回で両ウイルスが検出できるようにRT-LAMP法を試みた。

・ 試験方法

1. 供試ウイルスおよび植物

本試験に供試したウイルスは、当試験場内で-80で保存していたTMV-OM (農業生物資源研究所大橋祐子博士より分譲)、ToMV-T (MAFF104034)を用いた。これらを本葉2葉期のトマト (品種:大型福寿)にカーボランダム法で接種し、TMVの単独感染、ToMVの単独感染、TMVとToMVの混合感染した合計3種類のウイルス感染トマトを得た。また、negative controlとしてウイルス無接種のトマト健全葉を用いた。

栽培圃場から採集したトマト罹病株でもRT-LAMP法で検出可能かどうかを検討するために当試験場のトマト栽培圃場からウイルス病様の症状を呈したトマトを採取した。その際、竹内ら⁹⁾が考案したプライマーを使用してTMV (No.1)、ToMV (No.2, No.3)と診断した計3株のトマトを選抜して用いた。

2. プライマー設計

DDBJのデータベースに登録されているTMV-Fujian (AF395127)、TMV-Rakkyo (D63809)、TMV-L (X02144)、ToMV-Chinese (AJ132845)、ToMV-K1 (AJ243571)、ToMV-Camellia (AJ417701)、ToMV-K2 (Z92909)の全塩基配列からClustal Xを使用してアライメントした。その後、1回でTMVおよびToMVを検出するために、それぞれのウイルスで保存性が高い塩基配列の領域を検索し、4種類のプライマー (F3, B3, FIP, BIP)を設計した (第1表)。

3. RNA抽出

上述のように汁液接種して得られたモザイク症状を呈するトマト葉0.1gからRNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社)で全RNAを抽出した。

4. RT-LAMP法

RT-LAMP法はLoopamp[®] RNA増幅試薬キット (栄研化学)を使用した。また、目視による判定をより明確にするために、Loopamp[®] 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学)を使用し紫外線照射下で発光が認められるものを陽性にするようにした (第2表)。

RT-LAMP法の反応条件は、63で60分とした。その後、紫外線を照射し、蛍光の有無を確認した。

・ 結果および考察

TMV単独感染葉、ToMV単独感染葉、TMVとToMV混合感染葉から上記の抽出キットを使用して得られた全RNAとTMV・ToMV検出用プライマーを混合してRT-LAMP反応、紫外線照射を行った。その結果、TMV単独感染葉、ToMV単独感染葉、TMVとToMV混合感染葉では発光が認められたが、健全葉では発光が認められなかった (第1図)。

また、今回設計したプライマーの有効性を調べるために栽培圃場から採集したトマト罹病株 (No.1:TMV, No.2およびNo.3:ToMV)でのRT-LAMP法を検討した。その結果、No.1, No.2およびNo.3からは、発光が認められ、健全葉では発光が認められなかった (第2図)。

本試験では、プライマーを設計し、TMV, ToMVが検出できるかどうかを調べたものである。

しかし、実際の農業場面ではTMV, ToMVに感染した場合にいろんな罹病段階のトマトが想定される。どの程度の罹病段階からウイルスが検出可能であるかを明らかにするために、実際のトマト上でのウイルス濃度とRT-LAMP法でのウイルス検出の関係を調べる必要がある。さらに、TMV, ToMVは葉以外にも病徴を示すこと

から葉以外の部位（果実や茎など）でも TMV, ToMV を検出できるかどうかを調べる必要がある。また、単独感染、混合感染の場合でも、ウイルス分離株によっては、ゲノム RNA の塩基の違いにより増幅が認められない場合も想定される。したがって、今後は、上記の条件を満たしたプライマーの設計、反応条件等を検討していく必要がある。

以上のようにまだ、改良する点がいくつかあるが、今回の試験ではモザイク症状を呈するトマト葉については検出できると考えられる。したがって、葉害や生理障害等で TMV または ToMV と判断がしにくいときに本技術が活かされると思われる。

なお、本試験は特別電源所在県地域科学技術振興事業「主要園芸作物に感染するウイルス群の遺伝子診断技術の確立」の一環として行った。

引用文献

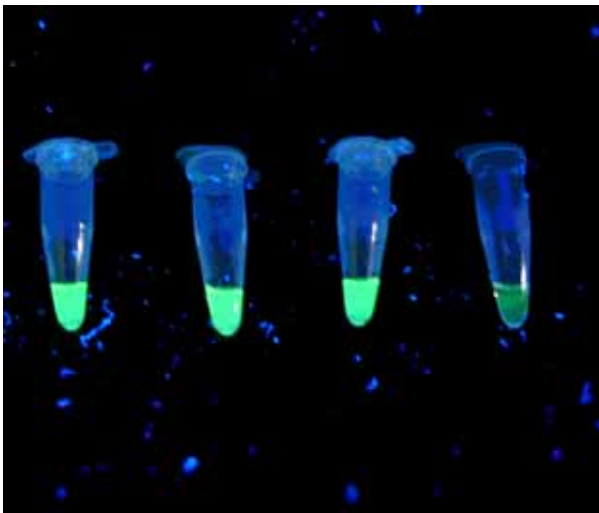
- 1) 福田明美・駒野雅保・本多範行(2001).ミディトマトに発生した *Tobacco Mosaic Virus* の諸性質.福井農試研究報告 38:47~57
- 2) 福田至朗・穴井尚子・加藤政司・吉村幸江・深谷雅博・矢部和則・大矢俊夫・神戸美智雄(2005).簡易な鋳型調製による loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出.関西病虫研報 47:37~41
- 3) 福田至朗・加藤晋朗・吉田桂子・水上優子・石田 朗・上田淳一・神戸美智雄・石本佳之(2003).Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)法によるシンビジウムモザイクウイルス(CyMV)の検出.日植病報 69:411~414
- 4) 福田至朗・新美喜久・大石一史・吉村幸江・穴井尚子・堀田真紀子・深谷雅博・加藤俊博・大矢俊夫・神戸美智雄(2005).2種のウイルスとキクスタントウイロイドを検出する reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)法の開発.関西病虫研報 47:31~36
- 5) 松浦昌平・重本直樹(2005) RT-LAMP 法による数種農作物からのトマト黄化えそウイルスの検出. 日植病報 71:235(講要)
- 6) 日本植物病理学会(2000).トマト 日本植物病名目録(初版).日本植物防疫協会. p250~254
- 7) Notomi,T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N.Amino and T. Hase (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28,No.12 : 63
- 8) 植物ウイルス研究所学友会(1984).野菜のウイルス病.養賢堂.p2~18
- 9) 竹内繁治・浜田博幸・川田洋一・曳地康史(2002).RT-PCRを利用したトバモウイルスの病原型の識別とピーマンにおける分布調査.日植病報 68:100(講要)
- 10) 竹内良彦・福田至朗・大矢俊夫(2006).RT-LAMP法によるメロン黄化えそウイルス(MYSV)の検出.愛知農総試研報 38.57~63

第1表 TMV および ToMV を検出するためのプライマー配列

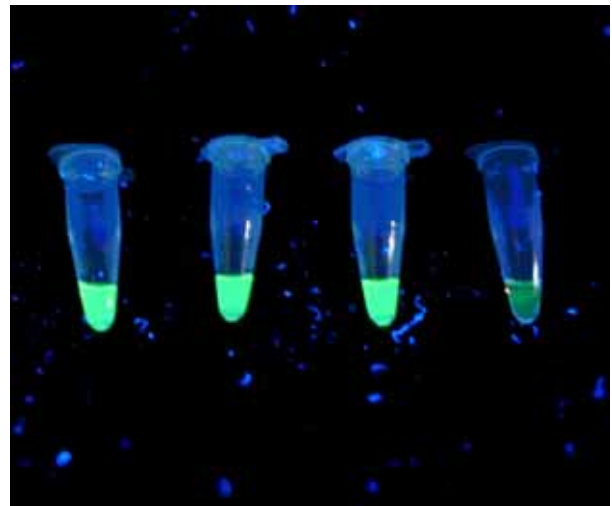
名前	プライマー配列
F3	5'- GTACTTCTGCGGGAGGTA -3'
B3	5'- GGGCGGTTTTATGAACCT -3'
FIP	5'- GATGTGTTTAGCACCAAGTTTCGA -CGTGATTCATCACGATAGAGG -3'
BIP	5'- TTGGAGGAGTTCAGAAGATCCC -GTCAATTGTGTGTAATACGC -3'

第2表 反応液 (25 μ l)

2 × Reaction	Mix (RM)	12.5 μ l
Primer : FIP	40 pmol	1.0 μ l
Primer : BIP	40 pmol	1.0 μ l
Primer : F3	5 pmol	1.0 μ l
Primer : B3	5 pmol	1.0 μ l
Enzyme (EM)		1.0 μ l
蛍光・目視検出試薬 (FD)		1.0 μ l
Distilled Water (DW)		4.5 μ l
RNA 抽出液		2.0 μ l



第1図 抽出キットを使用した TMV , ToMV の RT-LAMP 反応結果 (左から TMV 単独感染葉 , ToMV 単独感染葉 , TMV と ToMV 混合感染葉 , 健全葉)



第2図 トマト栽培圃場から採取したトマトの RT-LAMP 反応結果 (左から No.1(TMV 単独感染葉) , No.2(ToMV 単独感染葉) , No.3(TMV と ToMV 混合感染葉) , 健全葉)

An assay for detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* from their infected tomato leaves by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)

Takahiro WATANABE, Mamoru FURUKAWA, and Akemi FUKUDA

Summary

Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) was carried out for the detection of *Tobacco mosaic virus*(TMV) and *Tomato mosaic virus*(ToMV) from their infected tomato leaves. The LAMP primers targeting to almost reserved sequence of TMV and ToMV were designed. Using them, TMV and ToMV were detected from TMV or ToMV infected tomato leaf tissues,or from the leaves co-infected with TMV and ToM

