

## タバコモザイクウイルス-トウガラシ系 (TMV-P) の cDNA クローニングと遺伝子診断

後藤英世・\*花田 薫・\*\*藤澤一郎 (大分県農業技術センター・\*九州農業試験場・\*\*農業研究センター)

Hideyo GOTO, Kaoru HANADA and Ichiro FUJISAWA: cDNA Cloning  
and Gene Diagnosis of Tobacco Mosaic Virus Pepper Strain

大分県のピーマン産地では、ウイルスによるモザイク病が発生しており、この病原ウイルスとしてタバコモザイクウイルス-トウガラシ系(TMV-P)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、ソラマメウイルストウモロコシウイルス (BBWV) 及びひも状ウイルスが分離されている<sup>2)</sup>。この中で TMV-P の発生が最も多く、被害も大きいので、TMV-P の cDNA クローニングと、TMV-P の cDNA プロブを用いた遺伝子診断法について検討した。

### 1. 試験方法

#### 1) TMV-P の cDNA クローニング

純化した TMV-P から RNA を調製した後、ランダムプライマーを用いて逆転写して、cDNA を合成した。cDNA を pUC18 の Hinc II 部位に挿入し、大腸菌 JM109 株を形質転換し、得られたクローンからプラスミドを抽出した。制限酵素 Pst I で切断した後、アガロースゲルで電気泳動し、泳動ゲルをナイロン膜に転写した。TMV-P-RNA をプロブにしてサザンハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするクローンの cDNA 両末端部の塩基配列を検討した。

#### 2) cDNA プロブを用いた遺伝子診断

診断には光増強発光法を利用した Amasham の ECL 遺伝子検出システムを使用した。すなわち、TMV-P 接種10日後のピーマン葉(品種:京ゆたか)に SDS 及びフェノールを含む緩衝液を加えて磨砕し、遠心分離を行った。上澄みの核酸抽出液を、100°C で5分間熱変性し、10倍ごとに段階希釈してナイロン膜にスポットした。ウイルス cDNA にパーオキシダーゼで標識したプロブを、スポットしたナイロン膜と12時間ハイブリダイズさせた。基質としてルミノールを滴下し、発光をフィルムに検出した。対照にピーマンの健全葉及び TMV-P-RNA を同様にスポットした。

### 2. 結果及び考察

#### 1) TMV-P の cDNA クローニング

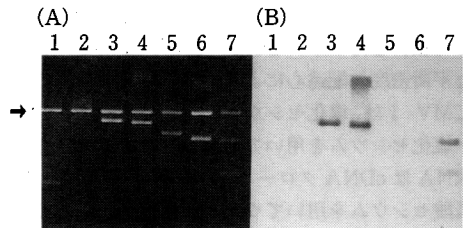
形質転換を行った大腸菌からプラスミドを抽出し、制限酵素 Pst I で切断後のアガロースゲル電気泳動像と、TMV-P-RNA プロブによるサザンハイブリダイゼーションの結果を第1図に示した。クローン P 3, P 4 及び P 7 は TMV-P-RNA とハイブリダイズし、TMV-P 由来の cDNA であることが確認されたが、クローン P 1, P 2, P 5 及び P 6 はハイブリダイズしなかった。クローン P 4 (2.0kb) と P 7 (2.7kb) の cDNA 末端の塩基配列を解析し、ペパーマイルドモットルウイルス (PMMV) の配列<sup>1)</sup>と比較したところ、P 4 は99.4%、P 7 は93.5%一致しており、いずれも高い相同性が認められた。P 4 は PMMV の126K 蛋白質の一部に相当する cDNA を、P 7 は183k, 30k 及び外被蛋白質の一部に相当する cDNA を含んでいた。

#### 2) cDNA プロブを用いた遺伝子診断

TMV-P-RNA の cDNA プロブを用いた診断結果を第2図に示した。TMV-P 感染ピーマン葉からは800倍または8,000倍希釈までウイルスが検出され、対照の健全葉の反応は見られず、TMV-P-RNA の cDNA プロブを用いて、ピーマン葉からの TMV-P の検出が可能であった。また、クローン P 7 の cDNA を Pst I で切断して得られた1.7kb と1.0kb の cDNA をそれぞれプロブとして検出感度の比較を行ったが、明らかな差は認められなかった。なお、ELISA 法では供試した TMV-P 感染葉は200万倍希釈まで検出されたのに対し、遺伝子診断法は8,000倍希釈までしか検出されなかった。遺伝子診断法の検出感度が低かったのは、ピーマン葉の成分が影響していることも考えられ検討が必要である。

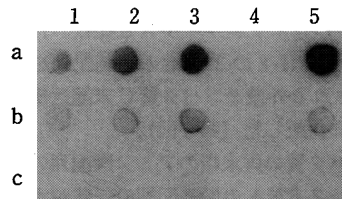
### 引用文献

- 1) E. Alonso, I. Garcia-Luque, A. de la Cruz, B. Wicke, M. J. Avila-Rincon, M. T. Serra, C. Castresana and J. R. Diaz-Ruiz: J. Gen. Virology 72, 2875-2884, 1991.
- 2) 後藤英世, 花田 薫, 板井 隆, 佐藤俊次, 藤澤一郎: 九病虫研会報 39, 48-51, 1993.



第1図 TMV-P-RNA の cDNA を挿入した pUC18 を Pst I で切断後のアガロースゲル電気泳動像(A)と、TMV-P-RNA プロブによるサザンハイブリダイゼーションパターン(B)

注) (A)と(B)の1-7:クローン P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7  
→:プラスミドベクター pUC18



第2図 TMV-P-RNA の cDNA プロブによるピーマンからの TMV-P の検出

注) 1, 2, 3: TMV-P 感染ピーマン葉。  
4: ピーマン健全葉。 5: 純化した TMV-P の RNA。  
a, b, c: ピーマン葉はそれぞれ生葉量の80倍, 800倍, 8,000倍希釈液を2μlずつ、TMV-P の RNA は50ng, 5ng, 500pg ずつスポットした。