

## DNA ウイルスであるカリモウイルス科ウイルスの エピソーマルウイルス遺伝子配列の検出方法について

小暮 愛子・今村 友哉<sup>1)</sup>・大石 盛伝<sup>2)</sup>・藤原 裕治<sup>1)</sup>

横浜植物防疫所業務部

A Method for Detecting Episomal Viral Gene Sequences of *Caulimoviridae* Viruses, a DNA Virus Aiko Kogure, Yuya Imamura<sup>1)</sup>, Moritsugu Oishi<sup>2)</sup>, and Yuji Fujiwara<sup>1)</sup> Yokohama Plant Protection Station Kitanaka-Dori 5-57, Naka-ku, Yokohama, 231-0003, Japan <sup>1)</sup> Research Division, Yokohama Plant Protection Station <sup>2)</sup> Tokyo Substation, Yokohama Plant Protection Station

**Abstract:** The whole or part of the genomes of several virus species in the family *Caulimoviridae* have been integrated into the genomes of the host plant, becoming endogenous viral genes. PCR cannot distinguish whether the detected sequences are derived from episomal viral genes or endogenous viral genes, so confirmation by the RCA method is required. If RCA fails, other techniques are needed. It has been reported that if RNA in the replication process of caulimoviruses is detected by RT-PCR after DNase treatment, it can be confirmed that the RNA detected is derived from episomal viral genes (Diaz-Lara *et al.*, 2020). In this study, we applied this method using the blueberry red ringspot virus and the strawberry vein banding virus and confirmed that the combination of DNase treatment and RT-PCR was effective as a method to distinguish whether the gene sequences detected by PCR were derived from episomal viral genes or endogenous viral genes.

**Key Words:** Endogenous, *Caulimoviridae*, DNase, RT-PCR, Episomal

### 緒 言

植物防疫所が実施する隔離栽培検査で検定を行っているウイルスの多くはRNAをゲノムに持つが、DNAをゲノムに持つウイルスも検定を行っている。DNAウイルスであるカリモウイルス科ウイルスの一部の種では、そのゲノムあるいは断片が宿主植物のゲノムの中に組み込まれ、植物内在性ウイルス遺伝子となっている事例が報告されている（Bhat *et al.*, 2016; Staginnus and Richert-Pöggeler, 2006）。例えば、隔離栽培検査対象植物のキイチゴ属植物を宿主とする rubus yellow net virus (RYNV) が、植物内在性ウイルス遺伝子になっている事例が知られている（Diaz-Lara *et al.*, 2020）。隔離栽培検査等で実施している polymerase chain reaction (PCR) 検定は、検出した配列がエピソーマルウイルス（細胞内に粒子として完全な形で存在するウイルス）遺伝子由来か、植物内在性ウイルス遺伝子由来かを識別することはできず、識別するためには、rolling circle amplification

(RCA) 法により増殖したDNAゲノムを制限酵素処理し、電気泳動パターンからウイルスを想定する検定が必要とされている（Diaz-Lara *et al.*, 2020）。植物防疫所においては、隔離栽培検査を実施した無病徴のキイチゴ属苗木のPCR検定において、RYNVの配列が検出された際には、汁液接種検定及びRCA法による検定結果を総合的に検討した上で植物内在性ウイルス遺伝子由来と判断した事例がある。

しかし、横浜植物防疫所つくばほ場で実施した米国産ブルーベリー苗木の隔離栽培検査では、カリモウイルス科の1種である blueberry red ringspot virus (BRRV) の特徴的な病徴が確認され、PCR検定で陽性となったことから、BRRVの遺伝子が植物内在性ウイルス遺伝子になっているとの報告はないが、確認のためRCA法を実施した結果、特定の制限酵素により切断された断片の電気泳動パターンが得られなかった。このため、今後、植物内在性ウイルス遺伝子になっているとの報告やその疑い等があるウイルスの検定時には、RCA法以外の検定方法が必要

<sup>1)</sup>横浜植物防疫所調査研究部

<sup>2)</sup>横浜植物防疫所東京支所

となる可能性が示唆された。

カリモウイルス科ウイルスのゲノムは環状2本鎖DNAで、複製の過程でゲノム全長に対応する1本鎖RNAに転写されることから、DNA分解酵素処理後、reverse transcription-PCR (RT-PCR)により当該RNAを検出することで、当該RNAがエピソーマルウイルス遺伝子由来であることを確認できると報告されている (Diaz-Lara *et al.*, 2020)。

そこで、つくばほ場で管理しているカリモウイルス科ウイルス感染植物の葉の核酸抽出液をDNA分解酵素処理し、複製過程のエピソーマルウイルス遺伝子由来RNAを標的としたRT-PCR検定で検出が可能か試みたので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 供試試料

カリモウイルス科ウイルス感染植物として、植物内在性ウイルス遺伝子になっているとの報告はないが、横浜植物防疫所つくばほ場で保管している国内産のBRRV感染ブルーベリー凍結葉及び横浜植物防疫所つくばほ場で管理しているstrawberry vein banding virus (SVBV) 感染イチゴ苗を供試した。

### 2. 核酸抽出

核酸抽出は、各供試植物の葉柄を用いて、PVP-カリウムSDS法 (Dellaporta *et al.*, 1983) の抽出バッファーに3.3%ポリビニルピロリドン (PVP) M.W.40Kを添加)で行い、抽出核酸を50 $\mu$ lのRNase Free水に溶解し、核酸抽出液として試験に供した。

### 3. DNA分解酵素処理

DNA分解酵素処理には、タカラバイオ株式会社のRecombinant DNase Iを使用し、製品の説明書に準拠して次とおり処理を行った。反応液組成は、「2.」で得られた核酸抽出液20 $\mu$ l、10 $\times$ DNase I Buffer 5.0 $\mu$ l、Recombinant DNase I (RNase-free) 2.0 $\mu$ l、RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l、RNase Free水22.5 $\mu$ l (トータル50 $\mu$ l)とした。37 $^{\circ}$ Cで60分間加温し、DNase

Iを反応させた後、0.5M EDTAを2.5 $\mu$ l加えて80 $^{\circ}$ Cで2分間処理し、DNase Iを失活させた。反応液を新しい1.5mlチューブに移し、RNase Free水47.5 $\mu$ l、3M酢酸ナトリウム10 $\mu$ l、99%エタノール250 $\mu$ lを加えて激しく振とうし、-80 $^{\circ}$ Cで20分間静置した。12,000rpm (13,000 $\times$ g)で4 $^{\circ}$ C、10分間遠心後、上清を取り除き、70%エタノール1.0mlを加えて激しく振とうして沈殿を洗浄した。次に、12,000rpm (13,000 $\times$ g)で4 $^{\circ}$ C、5分間遠心し、上清を取り除いて乾燥させた後、RNase Free水20 $\mu$ lを加え、この溶液をPCRの鋳型とした。

### 4. RT-PCRによるウイルスRNAの検出

逆転写反応は、逆転写酵素M-MLV, RNaseH+ (富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて行った。DNA分解酵素処理溶液2.0 $\mu$ lにランダムヘキサマー (50ng/ $\mu$ l) (タカラバイオ株式会社)1.0 $\mu$ l及びRNase Free水7.0 $\mu$ lを加え、70 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた後、氷上で1分間静置した。その後、5 $\times$ Reaction Buffer 4.0 $\mu$ l、RNase inhibitor (40U/ $\mu$ l) (タカラバイオ株式会社)1.0 $\mu$ l、dNTPミックス (各2.5mM) (タカラバイオ株式会社)4.0 $\mu$ l、逆転写酵素M-MLV, RNaseH+1.0 $\mu$ lを加え、25 $^{\circ}$ C 15分、37 $^{\circ}$ C 50分、70 $^{\circ}$ C 15分反応させた。

PCRはAmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて付属のマニュアルに準拠してPCR反応液を調整した。反応組成は、RNase Free水7 $\mu$ l、25 $\mu$ M Forwardプライマー0.5 $\mu$ l、25 $\mu$ M Reverseプライマー0.5 $\mu$ l、Ampli Taq Gold 360 Master Mix 10 $\mu$ l、鋳型溶液2.0 $\mu$ l (トータル20 $\mu$ l)とした。反応条件は、90 $^{\circ}$ C 10分間の後、95 $^{\circ}$ C 30秒、55 $^{\circ}$ C 60秒、72 $^{\circ}$ C 60秒 (増幅産物長が1,000bp以上の場合は90秒)を40サイクル行い、72 $^{\circ}$ C 7分後、4 $^{\circ}$ Cで維持した。増幅産物は、GelRed Nucleic Acid Gel Stain (コスモ・バイオ株式会社)を0.1 $\mu$ l/mlの割合で加えた1.5%アガロースゲルにて電気泳動した。各ウイルス検出用のプライマーセットは、Table 1に記載した。

### 5. DNA分解酵素処理効果の確認

上記「3.」のDNA分解酵素処理によって核酸抽出液中のDNAが完全に分解されていることを確認するため、当該核酸

Table 1. List of primers tested in this study

Virus / Target	Primer	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
BRRV	BR-RT1	GTTGATGATATTATTATATTTTCAG	602	Isogai <i>et al.</i> (2009)
	BR-RT2	GTTCCGAAGAAGACTGATATTGAG		
	BR-RT3	CATGGAATGGACTTCCTATG	259	Isogai <i>et al.</i> (2009)
SVBV	SVBV F	GCTGAATTCATGGTAAGCAGAAGAGAAAGAC	1,439	Hanzliková Vašková <i>et al.</i> (2006)
	SVBV R	AAAGGTACCTCCAGATCTTCTGAGTC		
	2255F2	CCGAAGACAACCTAATTGAAGAATGGG	446	Miyagi Prefectural Agriculture and Horticulture Research Center (2008)*
2700R	CGAGTACTTCCATCCCAACAAAGGG			
Plant Endogenous DNA	Gd1	ACGGAGAGTTTGATCCTG	about 1,500	Andersen <i>et al.</i> (1998)
	Berg54	AAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTC		

\* <https://www.pref.miyagi.jp/documents/20202/69942.pdf> (in japanese)

抽出液を鋳型として、逆転写反応を実施することなく、Table 1 に示した各ウイルスを対象としたプライマーセット及び植物内在性 DNA を対象としたプライマーセットを用いて上記「4.」に準じて PCR 及び電気泳動を実施した。

## 結 果

### 1. RT-PCR によるウイルス RNA の検出

BRRV 及び SVBV 各感染葉から得られた核酸抽出液を DNA 分解酵素処理した後、各ウイルスを対象とした RT-PCR を実施した結果、各ウイルスを対象とした各 2 種類のプライマーセットの両方で、目的サイズの増幅産物が検出された (Table 2, Fig. 1, Fig. 2)。

### 2. DNA 分解酵素処理効果の確認

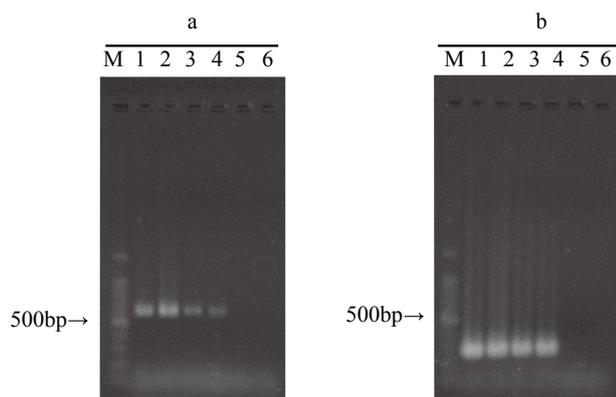
BRRV 及び SVBV 各感染葉から得られた核酸抽出液を DNA 分解酵素処理した溶液で、植物由来の DNA が分解されていることを確認するため、植物内在性 DNA を対象としてプライマー

セット Gd1/Berg54 (増幅産物長約 1,500bp) を用いて PCR を実施したところ、目的サイズの増幅産物は検出されなかった (データ省略)。

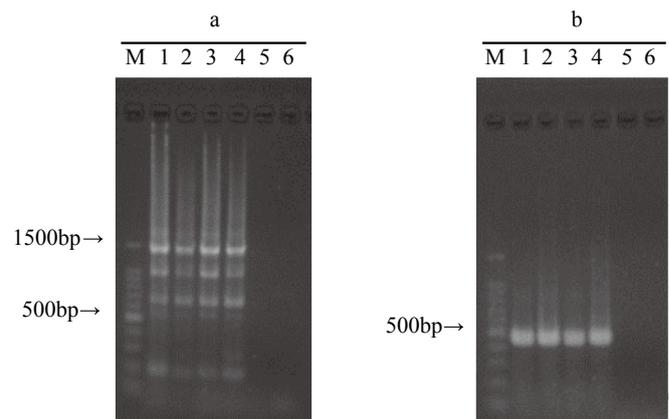
さらに、BRRV 及び SVBV 各感染葉から得られた核酸抽出液を DNA 分解酵素処理した溶液中の各ウイルスの DNA が分解されていることを確認するため、DNA 分解酵素処理後の溶液を鋳型として、逆転写反応を実施することなく PCR を実施した。その結果、BRRV を対象とした PCR においては、プライマーセット BR-RT1/BR-RT2 (増幅産物長 602bp) では目的サイズの増幅産物が検出されなかった。一方、プライマーセット BR-RT2/BR-RT3 (増幅産物長 259bp) では、予想に反して目的サイズの増幅産物が検出された (Table 2, Fig. 3)。同様に、SVBV を対象とした PCR においては、プライマーセット SVBV F/SVBV R (増幅産物長 1,439bp) では目的サイズの増幅産物が検出されなかった。一方、プライマーセット 2255F2/2700R (増幅産物長 446bp) では、予想に反して目的サイズの増幅産物が検出された (Table 2, Fig. 4)。DNA 分解酵素処理時間を 2 倍長くしても、また、DNA 分解酵素処理に供する核酸抽出液を

**Table 2.** Comparison of the results of the RT-PCR or PCR method after DNase treatment

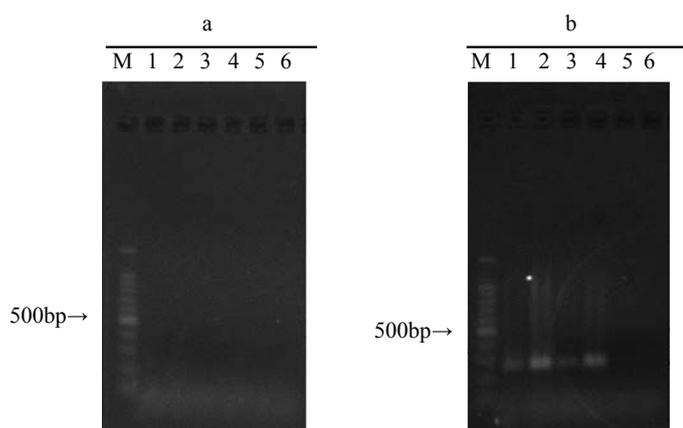
Virus / Target	Primer set	Product size (bp)	DNase & RT-PCR	DNase & PCR	Effectiveness of DNase
BRRV	BR-RT1/BR-RT2	602	+	—	Effective
	BR-RT2/BR-RT3	259	+	+	Not effective
Plant Endogenous DNA	Gd1/Berg54	about 1,500	No test	—	Effective
SVBV	SVBV F/SVBV R	1,439	+	—	Effective
	2255F2/2700R	446	+	+	Not effective
Plant Endogenous DNA	Gd1/Berg54	about 1,500	No test	—	Effective



**Fig. 1** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified with BRRV specific primer sets from DNase treated extracts of blueberry leaves  
a: Primer set BR-RT1/BR-RT2 (Product size 602bp),  
b: Primer set BR-RT2/BR-RT3 (Product size 259bp)  
M: 100bp ladder marker (Takara Bio Inc.), 1,2,3,4: BRRV infected blueberry leaves, 5: healthy blueberry leaves, 6 : No template control

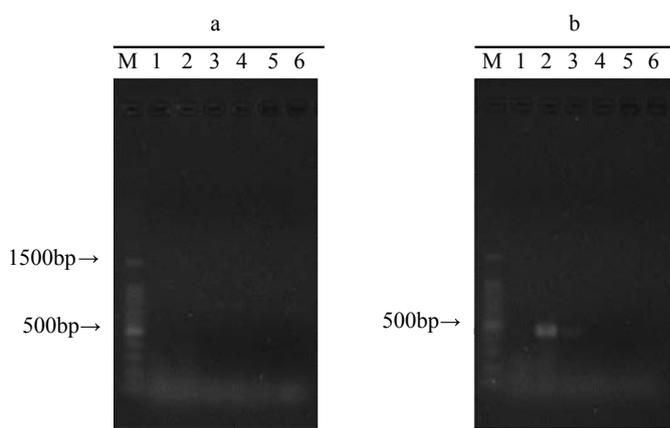


**Fig. 2** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified with SVBV specific primer sets from DNase treated extracts of strawberry leaves  
a: Primer set SVBV F/SVBV R (Product size 1,439bp),  
b: Primer set 2255F2/2700R (Product size 446bp)  
M: 100bp ladder marker (Takara Bio Inc.), 1,2,3,4: SVBV infected strawberry leaves, 5: healthy strawberry leaves, 6 : No template control



**Fig. 3** Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with BRRV specific primer sets from DNase treated extracts of blueberry leaves

a: primer set BR-RT1/BR-RT2 (Product size 602 bp),  
 b: primer set BR-RT2/BR-RT3 (Product size 259 bp)  
 M: 100bp ladder marker (Takara Bio Inc.), 1,2,3,4: BRRV infected blueberry leaves, 5: healthy blueberry leaves, 6 : No template control



**Fig. 4** Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with SVBV specific primer sets from DNase treated extracts of strawberry leaves

a: Primer set SVBV F/SVBV R (Product size 1,439bp),  
 b: Primer set 2255F2/2700R (Product size 446bp)  
 M: 100bp ladder marker (Takara Bio Inc.), 1,2,3,4: SVBV infected strawberry leaves, 5: healthy strawberry leaves, 6 : No template control

100倍希釈しても、結果は変わらなかった（データ省略）。

## 考 察

BRRV 及び SVBV 各感染葉から得られた核酸抽出液を DNA 分解酵素処理した溶液を鋳型として、植物内在性 DNA を対象として実施した PCR では、目的サイズの増幅産物は検出されなかったことから、DNA 分解酵素処理の効果が認められた。さらに各ウイルスを対象としたプライマーセットのうち、より長い増幅産物長が得られるプライマーセット（BR-RT1/BR-RT2（増幅産物長 602bp）及び SVBV F/SVBV R（増幅産物長 1,439bp））を用いた RT-PCR では、目的サイズの増幅産物が検出され、逆転写反応を行わず実施した PCR では、増幅産物が検出されなかったことから、当該プライマーを用いた RT-PCR での増幅産物は複製途中のウイルス由来 RNA と考えられる。

一方、各ウイルスを対象としたプライマーセットのうち、より短い増幅産物長が得られるプライマーセット（BR-RT2/BR-RT3（増幅産物長 259bp）及び 2255F2/2700R（増幅産物長 446bp））を用いた場合は、RT-PCR によるウイルス RNA の検出だけでなく、逆転写反応を行わず実施した PCR でも増幅産物が検出されたことから、当該プライマーを用いた場合には本検出方法の適用は困難であることが明らかとなった。この原

因として、DNA 分解酵素処理した核酸抽出液中のウイルスの DNA が完全に分解されなかったことが考えられる。本試験で用いた DNA 分解酵素は、DNA をランダムに分解するが、どの程度の長さで分解するかについては、具体的な数値の情報は得られなかったものの、使用するプライマーセットの増幅産物長が短い場合は、PCR で増幅される領域が DNA 分解酵素で完全には分解されずに、一部の配列が PCR の鋳型となって検出される可能性が考えられた（Fig. 5）。これらの結果を踏まえて、本検出方法を用いる際には使用するプライマーセットの選定が重要であり、また、正確な判定のためには DNA 分解酵素処理した核酸抽出液を鋳型とした PCR で増幅産物が検出されないことを確認したうえで RT-PCR 検定を行うことが必要である（Fig. 6）。

以上のことから、DNA 分解酵素処理と RT-PCR を組み合わせた方法は、使用するプライマーセットの増幅産物長に注意が必要であるものの、複製過程でゲノム DNA の全長がそれに対応する 1 本鎖 RNA に転写される一部のカリモウイルス科ウイルスの検定において、検出された遺伝子配列がエピソードウイルス遺伝子由来か植物内在性ウイルス遺伝子由来かを識別する方法として有効であり、隔離栽培検査において RCA 法を補完する方法として利用することで、より精度の高い検査が可能になると考えられた。

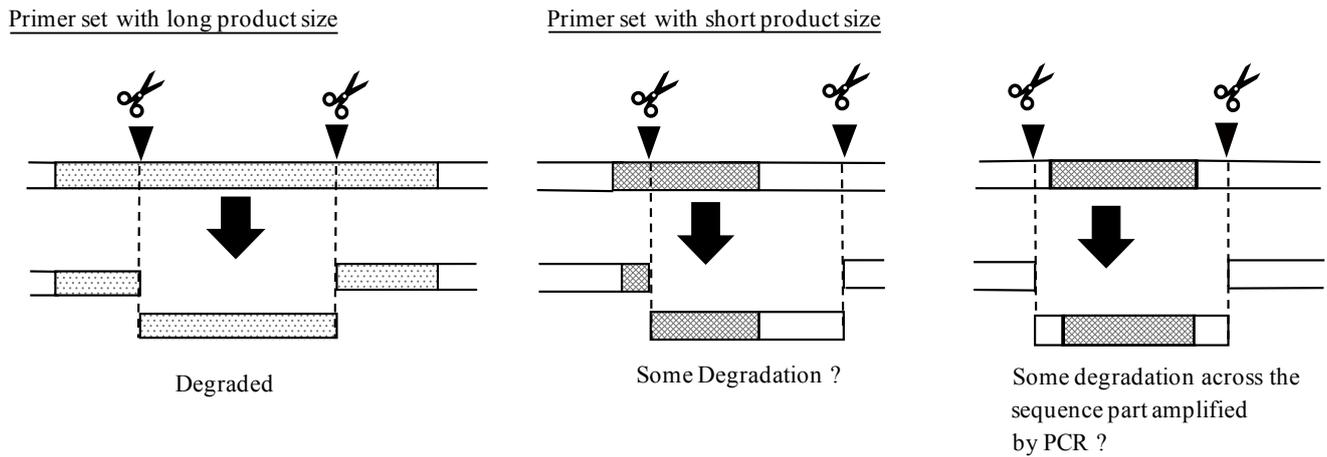


Fig. 5 Discussion about differences in primer sets and degradation by DNase

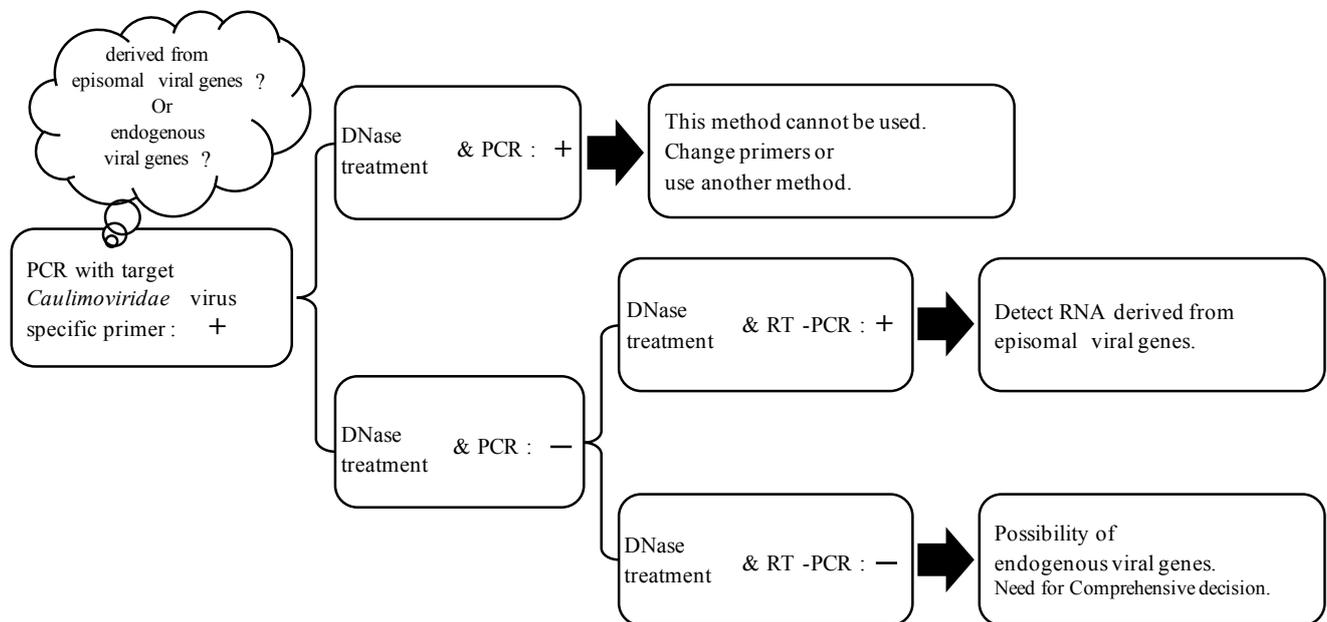


Fig. 6 The flow chart of the method for detecting episomal viral gene sequences

謝 辞

本試験で使用した BRRV 感染ブルーベリー凍結葉は、過去に国立大学法人岩手大学農学部の磯貝雅道教授より分譲いただいた BRRV 感染苗木から採取し、保管していたものである。苗木を分譲いただいた磯貝教授に心よりお礼申し上げます。

引用文献

Andersen, M. T., R. E. Beever, A. C. Gilman, L. W. Liefting, E. Balmori, D. L. Beck, P. W. Sutherland, G. T. Bryan, R. C. Gardner and R. L. S. Forster (1998) Detection of phormium yellow leaf phytoplasma in New Zealand flax (*Phormium tenax*) using nested PCRs. *Plant Pathol.* **47**(2): 188-196.

Bhat, A. I., T. Hohn and R. Selvarajan (2016) Badnaviruses: the current global scenario. *Viruses.* **8**(6): 177.

Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-21.

Diaz-Lara, A., N. J. Mosier, K. Stevens, K. E. Keller and R. R. Martin (2020) Evidence of *Rubus* yellow net virus integration into the red raspberry genome. *Cytogenet. Genome Res.* **160**(6): 329-334.

Hanzliková Vašková, D., J. Špak and K. Petřík (2006) Variability in sequence of Strawberry vein banding virus. *Biol. Plantarum.* **50**: 660-666.

Isogai M., K. Ishii, S. Umemoto, M. Watanabe and N. Yoshikawa (2009) First report of blueberry red ringspot disease caused by Blueberry red ringspot virus in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **75**: 140-143.

- 宮城県農業・園芸総合研究所 (2008). イチゴ基核苗の主要4種ウイルスの遺伝子診断法. (オンライン), 入手先 (<https://www.pref.miyagi.jp/documents/20202/69942.pdf>), (参照 2023-05-10).
- Staginnus C. and K. R. Richert-Pöggeler (2006) Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. *Trends Plant Sci.* **11**(10): 485-491.