

ブドウに感染する3種ウイルスを同時検出するマルチプレックスRT-PCR法の開発と植物内在性mRNA塩基配列由来の人工陽性コントロールDNAの作出

高橋 智之・橋本 俊祐¹⁾・井上 豊

神戸植物防疫所業務部

Development of a Multiplex RT-PCR to Simultaneously Detect Three Grapevine Viruses and Preparation of Artificial Positive Control DNA Derived from a Plant Internal mRNA Sequence. Tomoyuki Takahashi, Shunsuke Hashimoto¹⁾ and Yutaka Inoue (Kobe Plant Protection Station, 703 Befu, Ikawadani, Nishi-Ku, Kobe 651-2115 Japan. ¹⁾Chugoku Shikoku Regional Agricultural Administration Office). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 57: 51-55 (2022).

Abstract: A multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (mRT-PCR) assay was developed to detect grapevine Pinot gris virus, grapevine red globe virus and grapevine rupestris vein feathering virus, in combination with a plant internal RNA control. Primers for this assay were selected from published reports and one to three fragments specific for the viruses were amplified from 21 infected samples by mRT-PCR. The detection limit of this assay was up to 5⁻³-5⁻⁶ extract dilutions, depending on the virus.

Furthermore, artificial positive controls for each virus were developed using a plant internal RNA sequence. Primers to amplify the artificial positive controls comprise a virus-specific site at the 5' end and a specific site of plant internal gene at the 3' end. With these primers, PCR was performed using complementary DNA (cDNA) from the plant messenger RNA as a template. The PCR products, including virus specific sites at the 5' and 3' ends, were mixed and used as an artificial positive control. Consequently, appropriate-sized fragments corresponding to each of the viruses were obtained in the mRT-PCR assay.

Key Words: Virus, Detection, Multiplex RT-PCR, Grapevine, Artificial Positive Control

緒 言

我が国の植物検疫制度では、ブドウ (*Vitis* spp.) 等、隔離対象となる果樹類の苗木が輸入される場合、輸入後に一定期間の隔離栽培を実施し、輸入港の検査では発見が困難なウイルス病などを対象とした検査を行っている。日本に輸入されるブドウ苗木は米国産やフランスやイタリアなどのヨーロッパ諸国産が多く、これらの地域には grapevine Pinot gris virus (GPGV) など日本では蔓延していないウイルスが発生している。これらのウイルスは隔離検疫においても検出頻度が高く、国内への侵入、蔓延が危惧されている。

一方、近年では国内で栽培されたブドウを使用して醸造された日本ワインの生産が増加傾向にあり、輸入ブドウ苗木の需要

が高まっていることから、大量の輸入ブドウ苗木を効率的に低コストで検査する手法の確立が求められている。

そこで本研究では、ブドウの隔離検疫の省力化及び低コスト化のため、主にヨーロッパ諸国に発生しているものの、これまで日本国内に蔓延しているとの報告がない3種のウイルス、GPGV、grapevine red globe virus (GRGV) 及び grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV) と、核酸抽出及び逆転写反応の成否を確認するための植物由来のメッセンジャー RNA (mRNA) を同時検出するマルチプレックス RT-PCR (mRT-PCR) を開発した。

また、PCR 検査では検査の成否を確認するための陽性コントロールが欠かせないが、日本未発生のウイルス等については入手が困難でその利用が難しい。そこで、ブドウの核酸抽出液

¹⁾ 中国四国農政局

を利用し、各ウイルス検出用プライマーに相同及び相補的な配列を5'末端に、植物の内在性配列を増幅するプライマーに相同および相補的な配列を3'末端にもつプライマーを作製し、このプライマーによる増幅産物を簡易な人工陽性コントロールとして使用することでPCR検査の信頼性の向上を試みた。

材料及び方法

1. 供試試料

隔離検疫中に、GPGV、GRGV及びGRVfV（すべて+鎖ssRNAウイルス）に単独または重複感染していることが確認されたブドウの葉柄（計21株）から抽出した核酸を材料とした。また、陰性コントロールとしてウイルスに感染していないブドウ6品種6株から採取した葉柄を材料とした。なお、試験は隔離検査の一環として、隔離検疫期間中に行われた。

2. 核酸抽出

核酸抽出は、CTAB法（Li et al., 2008）を以下のとおり変更して行った。2.0ml容チューブに葉柄50mg、CTAB緩衝液1ml（2%CTAB、2%PVP-40、100mM Tris-HCl（pH 8.0）、1.4M NaCl、20mM EDTA、0.2% 2-mercaptoethanol）、マルチビーズを加え、TyssueLyser（QIAGEN）を用いて30Hzで1分間磨砕した。65℃で15分間加熱後、遠心分離（15,000rpm、5分、4℃）を行った。続いて、クロロホルム650μlの入った新しい1.5ml容チューブに上清650μlを移し、激しく振とう後、遠心分離（15,000rpm、5分、4℃）を行った。イソプロパノール400μlの入った新しいチューブに上層400μlを移し、転倒混和後、遠心分離（15,000rpm、5分、4℃）を行った。液体を捨て、沈殿に70%エタノール800μlを加えて遠心分離（15,000rpm、10分、4℃）後、液体を捨てて乾燥し、沈殿を50μlの蒸留水で溶解した。最後に、NanoDrop One（Thermo Fisher Scientific）を用いて吸光度から核酸濃度を測定し、RNA量が70～100ng/μlとなるよう、蒸留水で希釈し、これを核酸抽出液とした。陰性コントロールは非感染6株の核酸抽出液を等量ずつ混和して作製した。

3. プライマー選定及び反応条件の設定

供試した各ウイルスの種特異的プライマーを選定した（Table1）。なお、GRVfVについては増幅効率が低かったことから、DNA Data Bank of Japan（DDBJ）に登録されている塩基

配列データを基にフォワードプライマーの塩基配列の一部を変更して使用した。さらに、植物組織から核酸が抽出されたことを確認するために、植物のNADH dehydrogenase subunit 5（Nad5）をコードする領域に対応するmRNAを検出するプライマーも選定した。

9μlの逆転写反応液（Rever Tra ace-α-（東洋紡））に1μlの核酸抽出液を加え、逆転写反応を行った。反応液の組成は1×RT Buffer、各1.0mMのdNTP、1.25μMのRandom Primer(9mer)、0.625μMのOligo(dT)20、5ユニットのRNase Inhibitor、0.5μlのReverTra Aceとし、反応条件は付属のマニュアルに従って行った。

mRT-PCR反応はTaKaRa EX Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を用いて付属のマニュアルに従ってPCR反応液を調整した。各プライマーをTable1記載の終濃度となるよう加えたPCR反応液9μlに、鋳型となる逆転写産物1μlを加えた。反応条件は94℃2分の後、94℃30秒、57℃30秒、72℃30秒で35サイクル行い、72℃7分の後、4℃で維持した。増幅産物は、2%アガロースゲルにて電気泳動後、SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain（Thermo Fisher Scientific）で染色した。

4. mRT-PCRの検証

各ウイルス感染株を前述の反応条件によりmRT-PCRに供試した。なお、ブドウの隔離検疫におけるPCR検定では検体数が多い場合、最大5検体を1まとめにして検査を行うケースがあること、様々な品種由来のPCR阻害物質の影響や非特異的反応の有無を確認する必要があることから、各ウイルス感染株の核酸抽出液を陰性コントロールの核酸抽出液で5倍に希釈して供試した。

5. 抽出核酸の段階希釈による検出感度の調査

各ウイルスの単独感染株から1検体を選定し、各核酸抽出液を等量ずつ混和した。これを陰性コントロールの核酸抽出液により希釈し、5¹から5⁶倍の希釈系列を作製し、各ウイルスの検出の可否を確認した。

6. PCR産物の段階希釈による検出限界の調査

各ウイルスのPCR産物を電気泳動後、アガロースゲルから標的サイズの増幅断片を切り出し、illustra GFX PCR Purification Kit（GEヘルスケア）を用いて精製した。NanoDrop Oneを用

Table 1 Primers for multiplex RT-PCR used in this study

Target	Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size	Final concentration	Reference
GPGV	DetF	TGG TCT GCA GCC AGG GGA CA	588bp	0.2μM	Morelli et al., (2014)
	DetR	TCA CGA CCG GCA GGG AAG GA		0.2μM	
GRGV	RG-CF-F1	GAA TTC GCT GTC GGC CAC TC	453bp	0.4μM	Beuve et al., (2015)
	RG-CF-R1	AGT GAG AGG AGA GAT TCC ATC		0.4μM	
GRVfV	GVFV C105 F1-modified	CCT GTC GCT TCC TTC TCA TCT C	328bp	0.6μM	This Study
	GVFV C105 R2	CAT CTT CCA TGC CCA TTT CTT G		0.6μM	
Nad5	Nad5-F	GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT	181bp	0.02μM	Menzel et al., (2002)
	Nad5-R	CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA		0.02μM	

いて吸光度から核酸濃度を測定し、各ウイルス由来の PCR 産物が等濃度となるよう混和した。これを蒸留水により希釈し、各ウイルス由来の PCR 産物の濃度が 10fg/μl から 100zg/μl となる希釈系列を作製し、PCR 反応液に 1μl 添加した。なお、ブドウ由来の PCR 反応阻害物質の影響を考慮するため、陰性コントロールの逆転写反応産物を 1μl 添加した。

7. 植物内在性 mRNA 由来の人工陽性コントロールの作出

DNA 断片の両端にウイルス検出用プライマーと相同または相補的な配列（ウイルスプライマー結合領域）を持ち、mRT-PCR における各ウイルスの増幅断片とほぼ同じ大きさとなる植物内在性 mRNA 配列由来の人工陽性コントロールの作出を行った。Primer-BLAST (NCBI) によりブドウの NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) に対応する mRNA の部分配列を検出するプライマーセットを 3 種類設計し、さら

にこれらの 5' 末端に各ウイルス検出用プライマー配列をそれぞれつなげたアダプタープライマーを作製した (Table2)。アダプタープライマーを用いて、陰性コントロールの cDNA を鋳型とした PCR を行い、両端にウイルスプライマー領域を持つ DNA 断片をそれぞれ作製し、この PCR 産物を人工陽性コントロールとした (Fig.1)。なお、プライマーの終濃度は 0.6μM、アニーリング温度は 60℃ とし、その他の PCR 反応条件は mRT-PCR と同様とした。

作製した各人工陽性コントロール溶液は、濃度がほぼ均一になるよう、GPGV が 4、GRGV が 1、GRVFV が 2 の割合で混和後、蒸留水で 10⁷ から 10⁹ 倍に希釈したものを PCR 反応液に 1μl 加え、mPCR に供試した。なお、ブドウ由来の PCR 反応阻害の影響がないか確認するため、および Nad5 の鋳型とするために、PCR 反応液に陰性コントロールの逆転写産物を 1μl 添加した。

Table 2 Primers for amplification of artificial positive controls used in this study

Target for positive control	Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size
GPGV	Vitis NADH548F & GPGV DetF Vitis NADH548R & GPGV DetR	TGG TCT GCA GCC AGG GGA CAA GTA GAG TCG AGG GTG CAA C TCA CGA CCG GCA GGG AAG GAA ATC TCC CAC TGG CTA CCT G	588bp
GRGV	Vitis NADH412F & GRGV F Vitis NADH412R & GRGV R	GAA TTC GCT GTC GGC CAC TCG GAG TTG TGA AGG GAC ATG C AGT GAG AGG AGA GAT TCC ATC TCT CCC TTA CCT CCT CTG CT	453bp
GRVFV	Vitis NADH278F & GRVFV C105F-m Vitis NADH278R & GRVFV C105R	CCT GTC GCT TCC TTC TCA TCT CTA CAG GTG AGG GAG GTG AGA CAT CTT CCA TGC CCA TTT CTT GTA TCA TGA TGC GGA GGT GGG	322bp

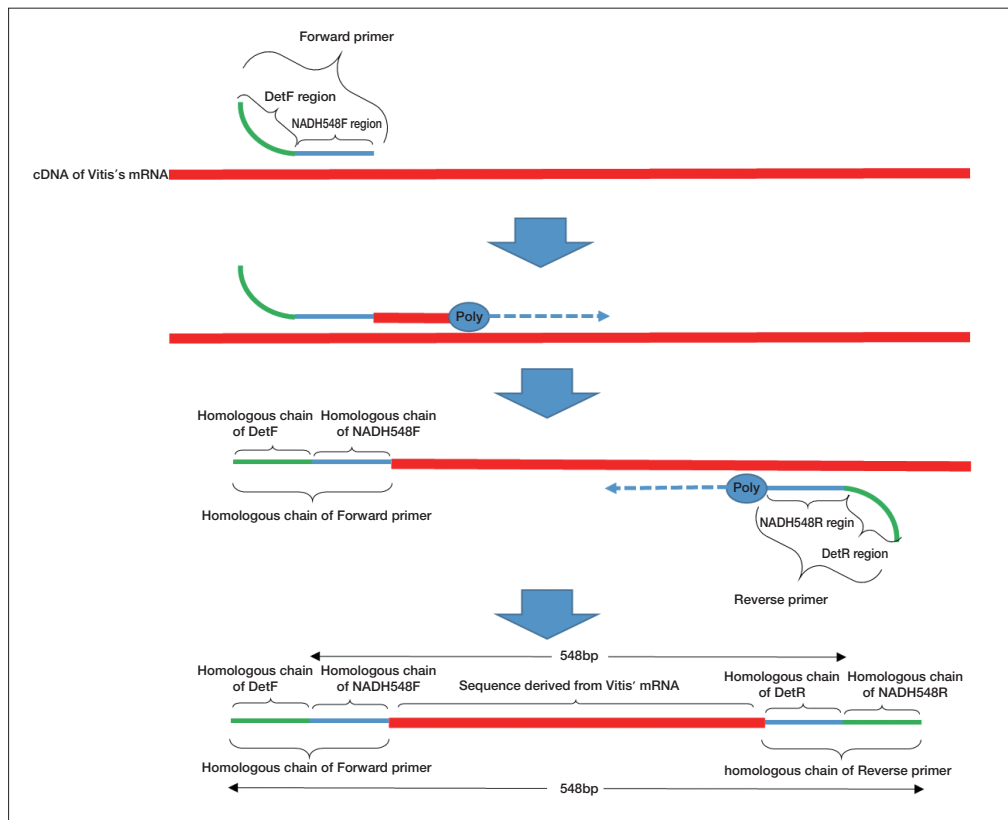


Fig.1 The principle of preparation of artificial positive control (example GPGV)

“Poly” indicates DNA polymerase

結果及び考察

1. mRT-PCR の検討

a. 検出の確認

対象としたウイルスの感染が確認されている21株すべてから、それぞれ予定長(181bp~588bp)の増幅断片が得られ、重複感染についても同時検出が可能であった(Fig.2)。また、一部の検体では若干の非特異的反応が見られたものの、各ウイルス由来の増幅産物とは異なるサイズであり、識別が可能であった。以上の結果から、当該mRT-PCR法は、ブドウの様々な品種において使用可能であると考えられた。

b. 抽出核酸の段階希釈による検出限界の調査

5³倍希釈区まではすべてのウイルスが検出された。また、GPGVについては5⁶倍までのすべての希釈区、GRGVについては5⁴倍希釈区まで検出することができた(Fig.3)。

c. PCR産物の段階希釈による検出限界の調査

各ウイルス由来のPCR産物が100agの試験区において、すべての予定長の増幅断片が得られた。さらに、GRVfV由来のPCR産物においては10agでも増幅断片が確認された(Fig.4)。なお、GRVfV由来のPCR産物10agは、DNA1bpの分子量を660とす

ると、約28コピーに相当する。

d. 隔離栽培検査への導入について

当該検出法は、抽出核酸の段階希釈およびPCR産物の段階希釈による検出限界調査において十分な検出感度を有すること、非特異反応やPCR阻害の影響も少ないことが示唆されたことから、ブドウにおける隔離栽培検査に活用可能であると考えられた。また、多品種、多検体の検査における省力化、低コスト化に寄与できると考えられた。

2. 人工陽性コントロールの検討

a. 検出の確認

ブドウの核酸抽出液を鋳型として人工陽性コントロール用の各プライマーセットを用いたPCRの結果、それぞれ予定長の増幅断片が得られたことから(Fig.5)、この増幅産物を人工陽性コントロールとした。

各人工陽性コントロール溶液を混合し、段階希釈したものをマルチプレックスPCRに供試した結果、10⁸及び10⁹倍希釈区において、すべての予定長の増幅断片が得られ、陽性コントロールとしての機能を有することが確認された(Fig.6)。なお、10⁷倍希釈区においてはNad5の増幅断片は得られなかったことか



Fig.2 Agarose gel electrophoresis of multiplex RT-PCR products amplified from naturally infected grapevine samples. Lane M: 100bp DNA ladder, N: healthy grapevine, W: Distilled Water, 1-9: GPGV, 10: GRGV, 11-14: GRVfV, 15-18: co-infection (GPGV and GRVfV), 19-20: co-infection (GPGV and GRGV), and 21: triple infection (GPGV, GRGV and GRVfV)

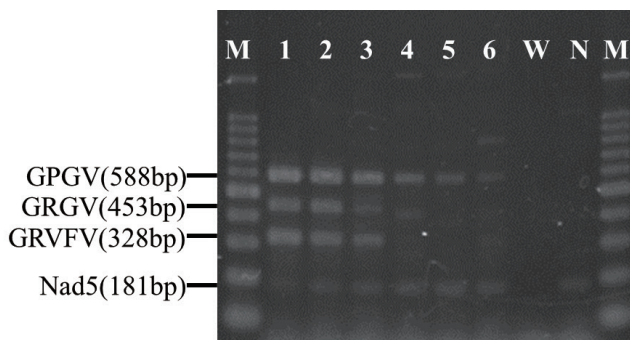


Fig.3 Detection of extract dilutions of infected samples by multiplex RT-PCR. Lane M: 100bp DNA ladder, N: healthy grapevine, W: Distilled Water. Lanes 1-6: mixtures of nucleic acid extracts containing GPGV, GRGV, GRVfV serially diluted by healthy grapevine extract, 5⁻¹, 5⁻², 5⁻³, 5⁻⁴, 5⁻⁵ and 5⁻⁶, respectively

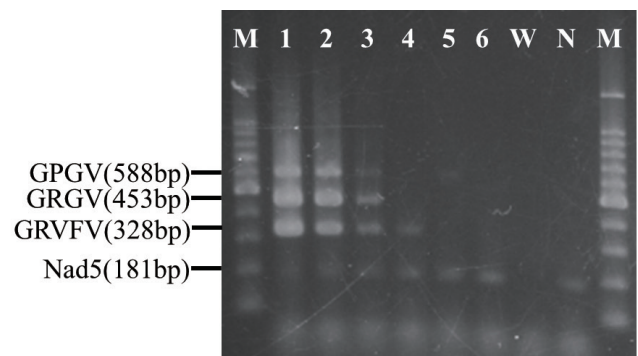


Fig.4 Detection of a tenfold dilution series of PCR product by multiplex RT-PCR. Lane M: 100bp DNA ladder, N: healthy grapevine, W: Distilled Water. Lanes 1-6: mixed purified PCR products of three viruses serially diluted by healthy grapevine extract, 10fg, 1fg, 100ag(10⁻¹fg), 10ag(10⁻²fg), 1ag(10⁻³fg), 100zg(10⁻⁴fg), respectively.

ら、人工陽性コントロールの過剰な添加は Nad5 の増幅を阻害すると考えられた。

b. 隔離栽培検査への導入について

本手法による人工陽性コントロールは、植物ゲノム由来の配列を含むため、コンタミネーションが疑われる場合でも、シーケンシングや制限酵素処理により、ウイルス由来の配列と容

易に識別が可能である。さらに、検定する植物の核酸を利用し、プライマーの設計のみで RT-PCR 反応により簡易に作製でき、ブドウ以外の植物にも応用が可能であることから、隔離栽培検査をはじめとする陽性コントロールの入手が難しい検定において PCR 反応の簡易な増幅確認として活用が期待できる。

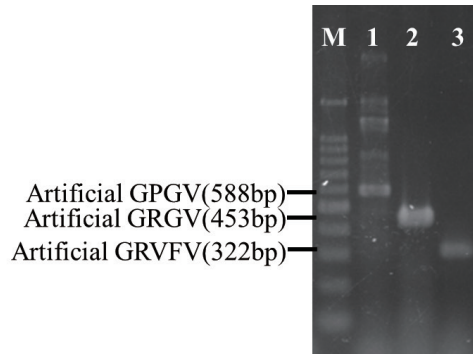


Fig.5 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR to confirm the amplification of artificial positive controls. Lane M: 100bp DNA ladder, Lanes 1: Amplicon of Vitis NADH548F & GPGV DetF/ Vitis NADH548R & GPGV DetR, 2: Vitis NADH412F & GRGV F/ Vitis NADH412R & GRGV R/ Vitis NADH278F & GRVfV C105F-m/ Vitis NADH278R & GRVfV C105R

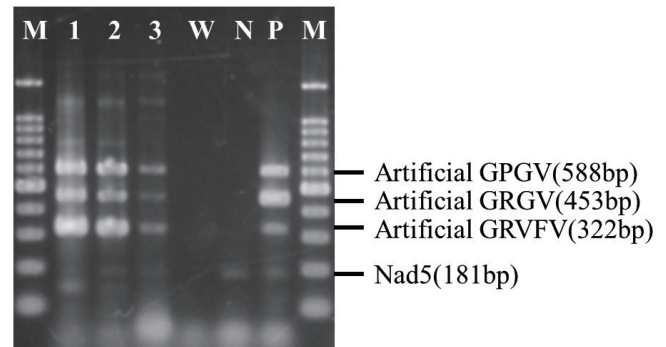


Fig.6 Agarose gel electrophoresis of multiplex RT-PCR for artificial positive controls. Lane M: 100bp DNA ladder, N: healthy grapevine, W: Distilled Water, P: positive grapevine infected by three viruses. Lanes 1-3: mixtures of three artificial positive controls serially diluted by distilled water, 10^{-7} , 10^{-8} and 10^{-9} , respectively

引用文献

- Beuve, M., T. Candresse, M. Tannières, O. Lemaire (2015) First Report of Grapevine redglobe virus (GRGV) in Grapevine in France. *Plant Dis.* **99**(3): 422.
- 粕壁隆一郎・筒井康貴・藤原裕治 (2017) 隔離検査を行ったタイ産カンキツから検出された Citrus chlorotic dwarf-associated virus に関する調査. 植防研報 **53**: 63-68.
- Li, R., R. Mock, Q. Huang, J. Abad, J. Hartung and G. Kinard (2008) A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *J. Virol Methods* **154**: 48-55.
- Menzel, W., W. Jelkmann, E. Maiss (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* **99**: 81-92.

- Morelli, M., A. de Moraes Catarino, L. Susca, P. Saldarelli, V. Gualandri, G. P. Martelli (2014) First report of grapevine pinot gris virus from table grapes in southern Italy. *J. Plant Pathol.* **96**(2): 431-439.
- Nakaune, R., M. Nakano (2006) Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *J. Virol. Methods* **134**: 244-249.
- Rwahnih, M. Al., S. daubert, D. Golino, A. Rowhani (2009) Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Viology* **387**: 395-401.
- Valassina, M., A. M. Cuppone, M. G. Cusi, P. E. Valensin, Rapid detection of different RNA respiratory virus species by multiplex RT-PCR: application to clinical specimens. *Clin. diagn. virol.* **8**(3): 227-232.