

煮沸法によるキクスタントウイロイド (CSVd) RNAの抽出

大石一史*・奥村義秀・森岡公一

愛知県農業総合試験場 480-1193 愛知県愛知郡長久手町

Extraction of CSVd-RNA by Boiling for Dot Blot Hybridization

Kazushi Ohishi*, Yoshihide Okumura and Koichi Morioka

Aichiken Agricultural Research Center, Nagakute, Aichigun, Aichi 480-1193

Summary

A new and simple boiling method for extracting chrysanthemum stunt viroid (CSVd) RNA is described. Fresh leaves of CSVd-infected chrysanthemum were homogenized in an equal volume of CTAB buffer then centrifuged. The supernatant was boiled for three min then centrifuged again. Transparent supernatant of boiled sample was collected. CSVd-RNA was then purified by the following procedures: the supernatant (300 μ l) was added to 1/10 volume of 3M sodium acetate and an equal volume of isopropyl alcohol, transferred gently to a microcentrifuge tube containing 400 μ l 2M LiCl, incubated at room temperature for 10 min and centrifuged. Northern blot hybridization analysis showed that the extracted CSVd-RNA survived although it was partially broken by boiling. This was confirmed by RT-PCR amplifying about 350 base pairs cDNA, showing the full length of CSVd. Dot blot hybridization analysis indicated that the boiling extraction method has a higher detection sensitivity than the guanidine thiocyanate/phenol extraction method. It is also concluded that boiling is a safe method that does not require toxic reagents such as phenol and chloroform.

キーワード：ドットプロットハイブリダイゼーション, キク, キクスタントウイロイド, 煮沸

緒言

キクスタントウイロイド (Chrysanthemum Stunt Viroid: CSVd) によって引き起こされるキクわい化病は、大沢ら (1977) が我が国で初めて本病の発生を示唆し、花田ら (1982) がキクから CSVd を分離して以来、各地で被害が報告されている (天野, 1988; 森山ら, 1996; 杉浦ら, 1998; 山本ら, 2001)。本病の典型的な症状は植物体のわい化であり、切り花、ポットマムともに著しい品質の低下を招く。

CSVd は汁液で伝染するため、保毒株がある場合、鋏や鎌あるいは手指を通じて健全株に感染し、また種子伝染する可能性も報告されており (大石ら, 2001)、防除対策を立てなければ被害が増大することになる。CSVd による被害を回避するには、わい化株を抜き捨てる、保毒株を無毒化する (山下ら, 1997b; 塩飽ら, 1999)、健全株を選んで親株にする方法が有効である。わい化株を除去する方法は、発病直前の無病徴株を見過ごす確率が高く完全ではない。無毒化する方法は、長期間に及ぶ温度処

理と茎頂培養が必要であり多大な労力と時間を要する。品種の変遷が激しい多くのキク品種では無毒化する時間的な余裕がないという事情を考慮すると、健全株を選定して親株に用いる方法が最も実用的であると考えられる。

CSVd の診断は、バイオアッセイ (大沢ら, 1977)、RNA の電気泳動、ドットプロットハイブリダイゼーション (塩飽ら, 1996)、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (楠ら, 1993)、RT-PCR/ハイブリダイゼーションなどの方法がある。健全株を選定するには多検体を扱う必要があり、労力、費用および検出精度からみて、ドットプロットハイブリダイゼーション (山下ら, 1997a) が適していると考えられる。ドットプロットハイブリダイゼーションに用いる RNA の抽出は、多検体を扱うことを前提としてフェノール抽出を 1 回行うのが一般的な方法 (塩飽ら, 1996) であるが、キク葉からの抽出では夾雑物が多く、十分な検出精度が得られない場合もある。さらに精製するためにフェノール抽出を繰り返すと RNA の収量が低下する。そこで、CSVd-RNA の収量が多く夾雑物が少ない抽出方法を検討したところ、キク葉の磨砕液を煮沸することが有効な手段であることが分かったので報告する。

2002年7月3日 受付。2002年10月31日 受理。
本研究の骨子は園芸学会平成12年度秋季大会で発表した。

*Corresponding author. E-mail: k-ohishi@agri-rc.pref.aichi.jp

材料および方法

植物材料

わい化症状を呈した品種‘レミダス’を保毒株として用いた。この株から抽出した CSVd-RNA の塩基配列はイギリス株 (Gross ら, 1982, GenBank アクセション番号 M19506) と 1 塩基のみ異なっていた (イギリス株の 254 番目のアデニンがウラシルに置換)。RT-PCR/ハイブリダイゼーションでも CSVd が検出されなかった‘レミダス’をフリー株として用いた。いずれの株も 18℃以上を保ち、光中断 4 時間の長日処理を継続した。

煮沸法による CSVd-RNA の抽出

500 mg のキク成熟葉を 500 μ l の CTAB バッファー (渡辺, 1989; 1% CTAB, 0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) で磨砕し、4℃で 5 分間遠心した。上清 500 μ l をマイクロチューブに入れ、沸騰中の湯に 3 分間浸漬、あるいはサーマルサイクラーを用い 99℃で 3 分間インキュベートした。氷冷後 4℃で 5 分間遠心し、上清 300 μ l に 1/10 容量の酢酸ナトリウム (pH 5.2) と等量のイソプロパノールを加え混合し、マイクロチューブ内の 400 μ l の 2 M 塩化リチウムに室温で 10 分間重層した。4℃で 30 分間遠心して沈殿を得た。

対照として、グアニジンチオシアネート/フェノール法 (以下 GTC/フェノール法) で RNA を抽出した。キク成熟葉を 5 倍量のグアニジンチオシアネートバッファー (渡辺, 1989) で磨砕し、5 分間遠心して、上清 600 μ l に 1/10 容量の酢酸ナトリウム (pH 5.2) と等量のフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を加えて激しく混合し、4℃で 5 分間遠心した。上清 400 μ l に 1,000 μ l のエタノールを混合して、4℃で 20 分間遠心した。沈殿を 400 μ l の滅菌蒸留水に溶解し、100 μ l の 10 M 塩化リチウムを混合し 30 分間氷冷した後、4℃で 20 分間遠心して RNA を抽出した。あるいは、煮沸法における煮沸の過程をフェノール抽出に変えて、煮沸法と同様の手順で RNA を抽出した。

いずれの方法においても、得られた沈殿 (RNA) を 70% エタノールで洗浄して、乾燥し、5~40 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。

煮沸法で抽出した CSVd-RNA の RT-PCR

保毒株‘レミダス’の葉から煮沸法で抽出した RNA 水溶液を 10~10⁵ まで滅菌蒸留水で希釈し、2.5 μ l をテンプレートとして ReverTra Dash (東洋紡製) を用い RT-PCR を行った。逆転写反応は 42℃で 20 分間一本鎖 cDNA の合成反応を行い、99℃で 5 分間処理し逆転写酵素を失活させた。PCR は 98℃・1 分間の後、98℃・20 秒、58℃・2 秒、74℃・30 秒のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 74℃・5 分の伸長反応を行った。RT-PCR に用いたプライマーは、forward: 5'-AAACAGGGTTTTTCACCC-TTCC-3' (イギリス株 168~188 番目の塩基に相同)、re-

verse: 5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3' (イギリス株 148~167 番目の塩基に相補) であり、CSVd-RNA の全長 354b を増幅する。RT-PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線を照射して検出した。

ノーザンブロット

煮沸法および GTC/フェノール法で抽出した RNA 沈殿物を材料として渡辺 (1989) の方法により変性し、電気泳動した後、ナイロンメンブレンにノーザンブロットした。ドットブロット

抽出した RNA を 40 μ l の滅菌蒸留水に溶解し、3 μ l をナイロンメンブレンにドットし、10 分間風乾した後、312 nm の紫外線を 2 分間照射して、RNA をナイロンメンブレンに固定した。

ハイブリダイゼーション

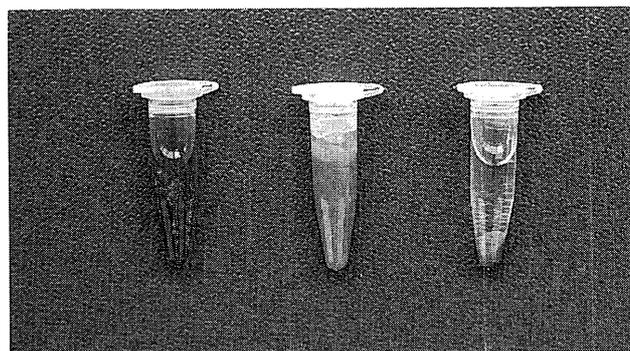
CSVd をクローニングしたプラスミドをテンプレートとし、PCR (プライマーは RT-PCR に用いたものと同じ) でジゴケシゲニン (DIG) 標識した DNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄後、抗 DIG アルカリ性フォスファターゼ標識抗体を処理し、CSPD (Tropix 社製) を反応基質に用いて、化学発光を X 線フィルムに感光させた。基本的な手順は、DIG 標識試薬の説明書および Pallás ら (1998) の方法に従った。RNA の抽出方法の違いとドットブロットハイブリダイゼーションによる CSVd の検出

保毒株‘レミダス’を用い、CTAB バッファーで磨砕後、煮沸法およびフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (以下フェノール抽出) で抽出した CSVd-RNA を検出した。すなわち、磨砕液を遠心分離した上清、煮沸後に遠心分離した上清、エタノール沈殿あるいはイソプロパノール沈殿して得た RNA の水溶液、磨砕液を遠心分離後フェノール抽出した上清およびイソプロパノール沈殿して得た RNA の水溶液をドットブロットしハイブリダイゼーションを行った。

結果および考察

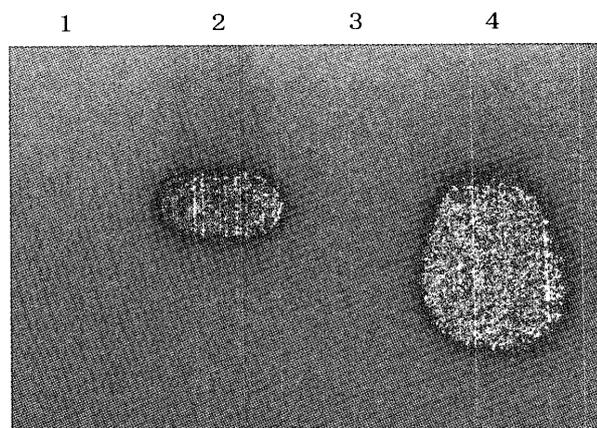
煮沸法による CSVd-RNA の抽出と検出

キク葉の磨砕、上清液を煮沸すると、乳だく状になった。これはタンパクが凝固したものと考えられるが、遠心分離するとわずかに着色した透明な上清と沈殿物に分離した (第 1 図)。上清に含まれる RNA をイソプロパノールで沈殿させ、塩化リチウム重層、遠心する方法で分画し、ノーザン分析したところ、フリー株のサンプルからは CSVd のシグナルは全く認められなかったが、保毒株からは GTC/フェノール法で抽出した CSVd に近傍の位置およびやや低分子側に強いシグナルが認められた (第 2 図)。これは煮沸によって CSVd-RNA の一部が分解したものの一部は分解せずに抽出された結果と考えられる。



第1図 キク葉磨砕液の煮沸処理

左:磨砕液 中:煮沸した磨砕液
右:煮沸した磨砕液を遠心分離して得た上清



第2図 抽出した CSVd-RNA のノーザンプロットハイブリダイゼーション

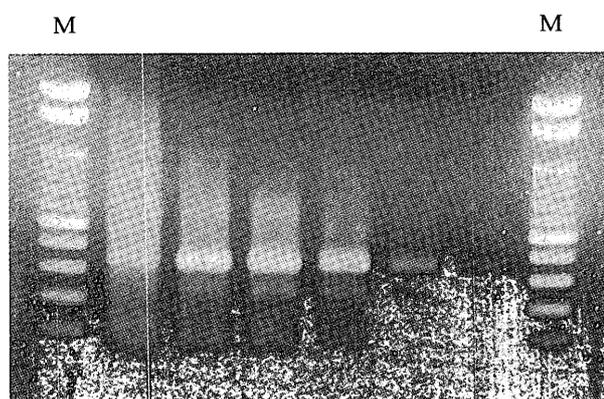
レーン1, 3:フリー株;2, 4:保毒株
レーン1, 2:GTC/フェノール法による抽出
レーン3, 4:煮沸法による抽出

煮沸法で抽出した CSVd-RNA の RT-PCR

煮沸法で抽出した RNA をテンプレートに CSVd-RNA の全長を増幅するプライマーで RT-PCR した結果を第3図に示した。抽出原液ではスミアな泳動像となったが、 10^{-1} ~ 10^{-4} までの希釈液では期待されるサイズの明瞭なバンドが認められた。このバンドは CSVd のプローブとハイブリダイズしたので、この RT-PCR 産物は CSVd に由来すると判断した(データ略)。このことは、煮沸しても CSVd-RNA の一部は分解されずに残存することを示しており、ノーザン分析の結果を裏付けるものである。

RNA の抽出方法の違いとドットプロットハイブリダイゼーションによる CSVd の検出

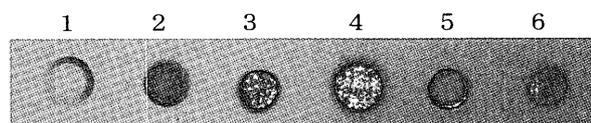
キク葉を CTAB バッファーで磨砕後、煮沸法およびフェノール抽出で精製し CSVd-RNA を検出した。保毒株の葉の磨砕液の遠心上清では、シグナルがドーナツ状であった(第4図)。これは、抽出物に不純物が多く RNA のナイロンメンブレンへの結合を阻害したことを示すもの



第3図 煮沸法で抽出した RNA による RT-PCR 産物

M:100 bp ラダーマーカー(最下段が 100bp)

レーン:左より原液, 原液を蒸留水で 10, 100, 1,000, 10,000, 100,000 倍希釈し RT-PCR した増幅産物



第4図 CSVd-RNA の抽出過程における抽出物のドットプロットハイブリダイゼーション

1:保毒株の葉の磨砕液を遠心した上清
2:1を煮沸して遠心した上清
3:2をエタノール沈殿で精製
4:2をイソプロパノール沈殿で精製
5:1をフェノール抽出した上清
6:5をイソプロパノール沈殿で精製

であると考えられた。煮沸して遠心分離した上清では、ややドーナツ状となったが、ドットした部分にもシグナルが認められ、磨砕液を遠心分離しただけの上清と比較すると、RNA のナイロンメンブレンへの結合を阻害する不純物がかなり除去されたことがうかがわれた。この不純物は主に多糖類と考えられ、煮沸して凝固したタンパクが遠心分離される過程で沈殿すると推定されるが、詳細は今後の課題である。煮沸して遠心分離した上清をエタノールあるいはイソプロパノール沈殿して精製すると、ハイブリダイゼーションのシグナルは非常に強くなった。エタノール沈殿とイソプロパノール沈殿を比べると、後者の方のシグナルがやや強くなった。

フェノール抽出した上清では、磨砕液の遠心上清と同程度にドーナツ状の感光像となった。このことは、フェノール抽出では RNA のナイロンメンブレンへの結合を阻害する物質を十分に除去しないことを示している。この上清をイソプロパノール沈殿して精製すると、ハイブリダイゼーションのシグナルは強くなった。しかし、煮沸法におけるイソプロパノール沈殿と比較すると明らかにシグナルは弱かった。この結果は、煮沸の方がフェノール抽出より効率よく CSVd-RNA を抽出しているこ

とを示し、煮沸法の方がフェノール抽出よりドットプロットハイブリダイゼーションによる CSVd の検出感度が高いといえることができる。

なお、煮沸法はフェノールやクロロフォルムなどの劇物を使用しない点で、安全な抽出方法であるといえることができる。

摘 要

CSVd の感染の有無をドットプロットハイブリダイゼーションで診断するため、RNA の抽出法を改良した。

1. キク成熟葉を等量の CTAB バッファーで磨砕し、上清を煮沸して遠心分離し、上清に酢酸ナトリウムとイソプロパノールを加え、2M の塩化リチウムに重層、遠心する方法で CSVd-RNA を抽出した。この煮沸法は、フェノールなどの劇物を必要としない安全な抽出法である。

2. ノーザン分析では、煮沸法で抽出された CSVd-RNA の一部は分解されて低分子化したが、一部は分解されずに残存していた。この結果は、煮沸法で抽出された CSVd-RNA を用いた RT-PCR で期待されるサイズの DNA が得られたことから確かめられた。

3. CSVd を保毒したキク葉を CTAB バッファーで磨砕し、煮沸法およびフェノール抽出で精製した RNA をドットプロットハイブリダイゼーションで検出したところ、煮沸法はフェノール抽出よりかなり強いシグナルが得られ、CSVd の検出感度が高いことが分かった。

引用文献

- 天野正之. 1988. キクスタントウイルス (CSV) の汚染状況の調査. p. 40-44. 病原性低分子 RNA の機能解明. 研究成果. 211. 農林水産技術会議. 東京.
- Gross, H. J., G. Krupp, H. Domdy, M. Raba, P. Jank, C. Lossow, H. Alberty, K. Ramm and H. L. Sanger. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus excoertis and chrysanthemum stunt viroid in Europe. *European J. Biochem.* 121: 249-257.
- 花田 薫・栃原比呂志・橋本純治・沖村 誠・川田穰一. 1982. わが国のキクから分離されたキク矮化ウイルス. *日植病報* 48: 131.
- 楠 幹生・寺尾文宏・寺内英貴・十河和博. 1993. 逆転写-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) によるキク矮化ウイルスの検出. *関西病虫研報*. 35: 7-12.
- 森山美穂・杉浦広幸・蒲田洋次・花田 薫. 1996. 熊本県のキクから検出されたキクわい化ウイルス. *九病虫研会報*. 42: 45-47.
- 大石一史・奥村義秀・森岡公一. 2001. キクにおけるキクスタントウイルスの種子伝染. *園学雑*. 70(別 2): 192.
- 大沢高志・森田 偉・森 喜作. 1977. キクウイルス病の防除に関する研究 2. 指標品種への接木接種によるウイルスの検定. *日植病報* 43: 372-373.
- Pallás, V., P. Más and J. A. Sánchez-Navarro. 1998. Detection of Plant RNA Viruses by Nonisotopic Dot-Blot Hybridization. p. 461-468. In: G. D. Foster and S. C. Taylor (eds). *Methods in Molecular Biology*, vol. 81: *Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance*. Human Press Inc., Totowa NJ.
- 塩飽邦子・岩井豊通・山本義久. 1996. ドットプロットハイブリダイゼーションによるキクわい化ウイルス (Chrysanthemum stunt viroid) の検定. *関西病虫研報*. 38: 1-6.
- 塩飽邦子・岩井豊通・藤野守弘・渡辺和彦. 1999. 低温処理および茎頂培養によるキクわい化ウイルスの除去. *兵庫農技研報*. 47: 68-71.
- 杉浦広幸・花田 薫. 1998. 新潟県の大輪ギクに発生したキクわい化ウイルスによる病害. *園学雑*. 67: 432-438.
- 渡辺 格. 1989. クローニングとシーケンシング. p. 17, 50-59, 257. 農村文化社. 東京.
- 山本英樹・木口忠彦・大屋俊英. 2001. 秋田県におけるキクわい化病の発生状況. *北日本病虫研報*. 52: 82-84.
- 山下祐子・平田行正・畑谷達児・佐野輝男・福井博一・四方英四郎. 1997a. スプレーギクのウイルスフリー苗生産に関する研究 (第 1 報) 各種ウイルス検定法の検討. *園学雑*. 66(別 1): 524-525.
- 山下祐子・平田行正・畑谷達児・佐野輝男・福井博一・四方英四郎. 1997b. スプレーギクのウイルスフリー苗生産に関する研究 (第 2 報) キクわい化病無毒化の検討. *園学雑*. 66(別 1): 526-527.