

### 17. ウェスタンブロッティング法の改良によるパパイヤからのウイルスタンパクの検出

〔要約〕ウェスタンブロッティング法を改良し、これまで不可能であった、パパイヤ感染葉から直接病原ウイルスタンパクをビジュアルに検出する方法を確立した。

国際農林水産業研究センター 沖縄支所 作物保護研究室			連絡先	09808 (2) 2306	
部会名	国際農業	専門	診断予防	対象	果樹類
				分類	国際

〔背景・ねらい〕

パパイヤのウイルス病は果実に病斑を生じ商品価値を著しく損なうため、沖縄以南の熱帯アジア地域をはじめ世界中で大きな問題になっている。近年アメリカで病原ウイルス遺伝子を導入したパパイヤが作製され、世界初の抵抗性品種として注目されたが、この組換えパパイヤが、アジアのウイルス株には抵抗性を持たないことが明らかになった。この原因として、アジア地域における病原ウイルスの多様性、特に抵抗性に関与しているウイルス外被タンパク質 (CP) の分子量の変異が予想され、これらを明らかにするために、感染パパイヤや組換えパパイヤからウイルス CP をビジュアルに検出する方法が必要となった。ところが、タンパク質を検出する血清診断法として広く用いられているウェスタンブロッティング法では、パパイヤから CP を検出することはできず、これまでは病原ウイルスを他の植物に接種して、その感染葉から CP の検出を行っていた。しかしこの方法では、ごく少数の試料しか取り扱えず、ウイルスの増殖に長期間を要し、温室設備も必要なため、開発途上国などでは研究を行えないという欠点があった。

そこで本研究では、これまで不可能であった、パパイヤ感染葉から直接ウイルス CP をビジュアルに検出する方法を確立し、設備のない途上国でも実施可能な方法を確立した。

〔成果の内容・特徴〕

1. ウェスタンブロッティングの従来法では、パパイヤ感染葉からパパイヤ奇形葉モザイクウイルス (PLDMV) を検出することはできなかった (図1 lane P)。パパイヤ輪点ウイルスパパイヤ系統 (PRSV-P) も同様に検出不可能であった。
2. この原因として、パパイヤに多量に含まれるタンパク分解酵素のパパインが、試料調整時にウイルスタンパクを分解して反応を陰性にしたと考えられた。そこで、パパインの酵素活性を阻害する方法を種々検討した結果、Actinomyces由来のタンパク分解酵素阻害剤、アンチパインを磨砕緩衝液に添加することによって、ウイルスタンパクの強いシグナルが検出できることが判明した (図1 lane P+A)。アンチパインの添加濃度は0.1~1 mg/mlが適当であった (図2)。
3. 本法 (図3) によりパパイヤウイルス病の2種の病原ウイルス (PLDMV, PRSV-P) CP をパパイヤ感染葉から直接検出することができるようになった。検出に要する期間は従来の3週間から2日間へと大幅に短縮され、多量のサンプルを検定することも可能になった。

〔成果の活用面・留意点〕

1. 本法は既に沖縄県農業試験場等で、実用的な検出法として利用されている。また、温室等の設備がない開発途上国でも、短期間・多量・簡便に検出ができる。
2. 組換えパパイヤからの CP タンパクの検出が可能になり、現在抵抗性パパイヤが作出されていない熱帯アジア地域でも、ウイルス抵抗性組換えパパイヤ作出の研究が推進される。
3. アンチパインの添加濃度が低いと、ウイルス CP が分解されるので、実験の目的 (検出・分子量測定) に応じて、添加濃度を調整する必要がある。

〔具体的データ〕

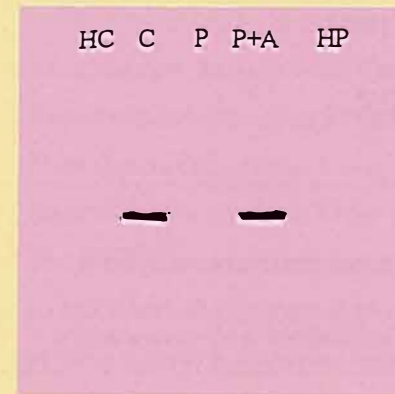


図1 アンチパインを用いたウェスタンブロッティング法によるパパイヤ感染葉からの PLDMV の検出  
HC, 健全ツノニガウリ; C, 感染ツノニガウリ; P, 感染パパイヤ; P+A, 感染パパイヤ+2.0mg/mlアンチパイン; HP, 健全パパイヤ

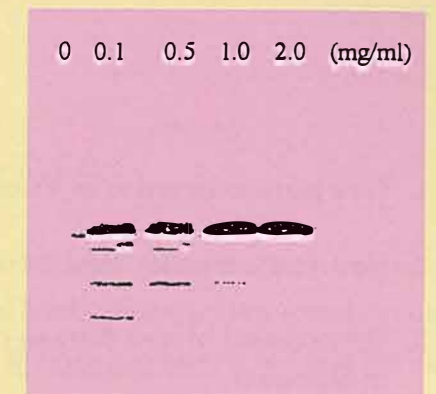


図2 アンチパインの添加濃度 (パパイヤ感染葉からの PLDMV の検出)

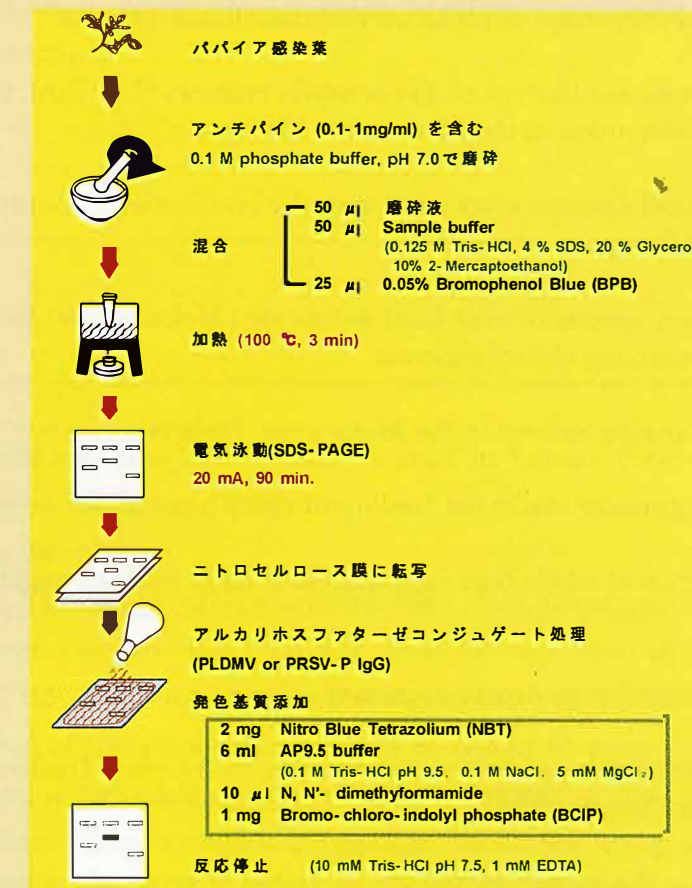


図3 パパイヤ感染葉からのウェスタンブロッティングによる2種ウイルスの検出法

〔その他〕

研究課題名: 熱帯・亜熱帯地域に発生するウイルス性病害の生態解明と制御技術の開発

予算区分: 経常

研究期間: 平成7~11年度

研究担当者: 眞岡哲夫・野田千代一

発表論文等:

- 1) 眞岡哲夫・宇杉富雄・野田千代一 (1996). パパイヤ感染葉からの Potyvirus 検出のための Western blotting 法の改良, 日植病報 62: 639.
- 2) 眞岡哲夫 (1996). 東南アジアのパパイヤに発生するウイルス病, 日本植物病理学会九州部会第21回シンポジウム講演集: 1-20.