

[成果情報名]レタスビッグベイン病の媒介菌 *Olpidium virulentus* に特異的な抗体の作製法

[要約]レタスビッグベイン病の病原ウイルスを媒介する *Olpidium virulentus* の休眠胞子は、感染レタス根から酵素処理等を通じて高純度かつ大量に精製できる。この休眠胞子を抗原として作製した抗体は、本菌を種特異的に認識できる。

[キーワード]レタスビッグベイン病、媒介菌、*Olpidium virulentus*、休眠胞子、抗体

[担当]環境保全型農業システム・環境保全型野菜生産

[代表連絡先]電話 084-923-4100

[研究所名]近畿中国四国農業研究センター・水田作研究領域

[分類]研究成果情報

[背景・ねらい]

瀬戸内地域の冬春レタス産地で深刻な被害を及ぼしている土壌伝染性ウイルス病害のレタスビッグベイン病は、土壌生息菌 *Olpidium virulentus* が病原のレタスビッグベインミラフィオリウイルスを媒介することにより発症する。しかし、人工培養できない絶対寄生菌である本菌は、宿主内や環境中での動態を把握することは困難である。そこで、血清学的手法により媒介菌を簡易に検出することを目指して、レタス根から媒介菌休眠胞子を精製し、これに対する抗体を作製する。

[成果の内容・特徴]

- 1．酵素処理した休眠胞子感染レタス根から、2度の密度勾配遠心分離を通じて、感染能力を有する休眠胞子を高純度かつ大量に精製できる（図1）。
- 2．精製した *O. virulentus* の休眠胞子をウサギに接種して作製した抗体とアルカリフォスファターゼ標識二次抗体を用いる直接免疫染色法では、近縁の *O. brassicae* と *O. bornovanus* の休眠胞子には反応せず、*O. virulentus* とのみ反応し、紫色を呈する（図2）。
- 3．同抗体を用いる間接エライザでは、コーティングする精製休眠胞子濃度が 200 個/100 μ l 以上で検出が可能となる（図3）。
- 4．同抗体を用いるウェスタンブロットでは、*O. virulentus* の休眠胞子の 30.5 kDa と 29.0 kDa のタンパク質に特異的に反応する（図4）。

[成果の活用面・留意点]

- 1．感染能力を有する精製休眠胞子を用いて、*O. virulentus* の宿主への感染動態やウイルス媒介能などの研究ができる。
- 2．病原ウイルスの検出法に合わせ、媒介菌の休眠胞子を特異的に認識する抗体を用いることにより、レタスビッグベイン病の発病リスクをよりの確に評価できる可能性がある。
- 3．今回確立した休眠胞子の精製法は、*O. brassicae* と *O. bornovanus* にも適用できる。

[具体的データ]

1. レタス生根(40g)の酵素処理(2%セルラーゼオノヅカRS、0.1%ペクトリアーゼY-23、50 mM酢酸緩衝液(pH 4.5) 400 ml)

↓ 30℃、12時間振盪

2. ろ過:二重ガーゼ→100 μmふるい→45 μmふるい

↓ 4時間静置、2回

3. パーコール不連続密度勾配遠心分離

↓ 28,000 × g、30分間

4. オムニパーク不連続密度勾配超遠心分離

↓ 113,000 × g、9時間

5. 休眠孢子画分回収(収量: 2.5×10^5 個/g生根)

↓

6. ウサギに免疫接種(約50日間で6回接種、 2.5×10^6 個を5回、最後に 5.0×10^6 個を1回)



図1 休眠孢子精製と抗体作製のプロトコールおよび大量精製された休眠孢子 (Bar: 50 μm)

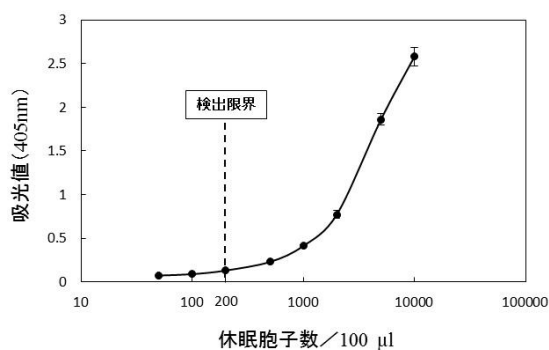


図3 間接エライザでの休眠孢子的検出
休眠孢子0個での吸光値の2倍(約0.130)以上を陽性とする。
Error bar: 3反復の標準誤差

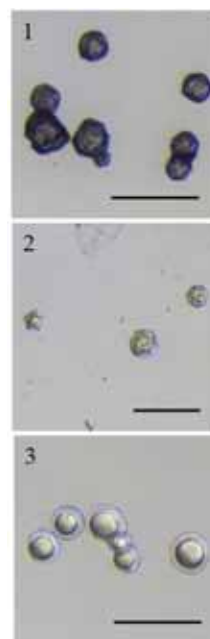


図2 *Olpidium* 属菌休眠孢子的直接免疫染色
1: *O. virulentus*、2: *O. brassicae* (非媒介菌)、
3: *O. bornovanus* (非媒介菌)、Bar: 50 μm

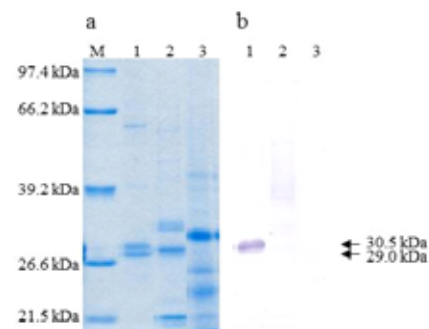


図4 破碎した *Olpidium* 属菌休眠孢子的のタンパク質のSDS-PAGE (a) およびウェスタンブロット (b)
1: *O. virulentus*、2: *O. brassicae*、
3: *O. bornovanus*、M: 分子量マーカー

(野見山孝司)

[その他]

中課題名: 土壌病虫害診断と耕種的防除技術開発による野菜の環境保全型生産システムの構築

中課題番号: 153a.2

予算区分: 交付金

研究期間: 2008 ~ 2012 年度

研究担当者: 野見山孝司、関口博之、富岡啓介、大崎秀樹、笹谷孝英(九農研)、
宮川久義、竹原利明、石川浩一

発表論文等: Nomiya K. et al. (2013) J. Gen. Plant Pathol. 79(1):64-68