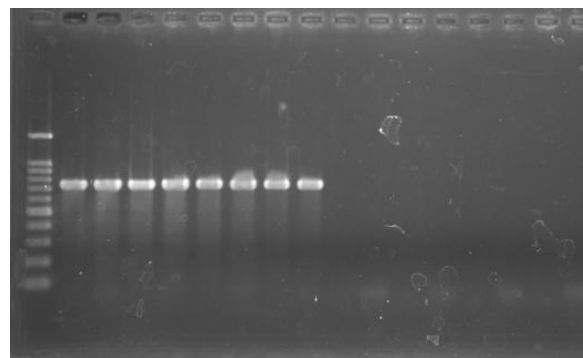
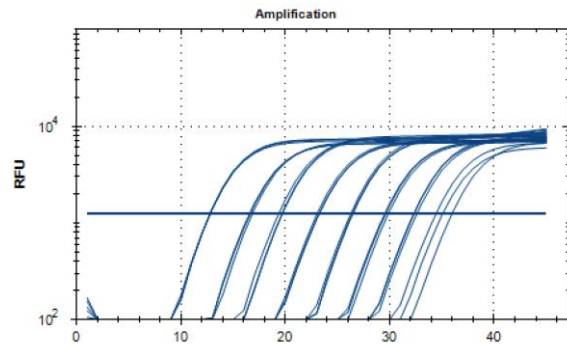


コムギ縮萎ウイルス遺伝子診断 作業手順書

2025 年9月

Ver.1.00



改訂履歴

版数	発行日	改訂内容	担当者
第 1.00 版	2025 年9月	新規作成	愛知県農業総合試験場

目次

1	はじめに	3
2	検出手法の選択	4
3	サンプル調製(全検出手法共通)の手順	5
3.1	必要な消耗品及び機器	5
3.2	調製方法	6
4	リアルタイム RT-PCR 法による検出の手順	8
4.1	リアルタイム RT-PCR 法とは	8
4.2	必要な消耗品及び機器	8
4.3	リアルタイム RT-PCR 試薬の準備	9
4.4	リアルタイム RT-PCR 法の反応条件	10
4.5	リアルタイム RT-PCR による定量	11
5	RT-LAMP 法による検出の手順	12
5.1	LAMP 法とは	12
5.2	RT-LAMP 法に必要な資材、試薬	12
5.3	RT-LAMP 試薬の準備	13
5.4	RT-LAMP 法の反応条件	14
6	コンベンショナル RT-PCR 法の手順	15
6.1	コンベンショナル RT-PCR 法とは	15
6.2	コンベンショナル RT-PCR 試薬の準備	15
6.3	コンベンショナル RT-PCR 条件	16
6.4	電気泳動及び染色	16
7	よくある質問	17
8	引用文献	17
9	免責事項	17
10	問い合わせ先	18

Ⅰ はじめに

コムギ縞萎縮ウイルス (*Wheat yellow mosaic virus*: WYMV) は、*Potyvirus* 科 *Bymovirus* 属のコムギに感染する植物ウイルスです。WYMV に感染したコムギは萎縮や葉の黄化等の症状を呈し (図 1 及び図 2)、収量が低下します。WYMV は、土壤中に存在するネコブカビ類 *Polymyxa graminis* によって媒介されます。*P. graminis* は耐久性のある休眠胞子で長期間土壤中に残存するため、一度 WYMV に汚染された場合は、抵抗性品種の作付がほぼ唯一の防除対策となります。そのため、コムギの育種では、積極的に WYMV 抵抗性の付与が行われています。

コムギ育種過程の個体が抵抗性を有するかは、WYMV の汚染圃場において感染するかで判定しています。これまで、その判定は主に WYMV に感染した際の症状による目視で行われてきましたが、病徴が寒害や湿害などによる生育障害、他のウイルス病にも似るため、目視での正確な判定は困難です。また、WYMV に対する抗体は市販されていないため、抗原抗体反応 (ELISA 法) による判定も一般には実施できません。そのため、感染の有無を正確に判定するには、遺伝子診断手法が必要です。

本書では、主にコムギの品種育成のような大量の検定が必要な場合における WYMV を検出する遺伝子診断手法について、①蛍光プローブを用いたリアルタイム Reverse Transcription (RT-) PCR 法 (以下、「リアルタイム RT-PCR 法」と言う。)、②専用の装置が不要の RT-LAMP 法、③電気泳動をして陽性判定を確認するコンベンショナル RT-PCR 法の作業手順をまとめました。なお、WYMV はコムギ品種への感染性が異なる I ~ III 型が存在し、地域によって発生している病原型が異なりますが、本手法はすべての病原型に対応しています。

本マニュアルは一般社団法人全国米麦改良協会「国内産麦の研究開発支援事業」の支援を受けて作成しました。



図 1 コムギ健全株 (左) と WYMV に感染し萎縮した株 (右)



図 2 WYMV 感染によるコムギ葉の黄化症状

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 藤郷氏提供

2 検出手法の選択

本マニュアルでは、

- ① リアルタイム RT-PCR 法
- ② RT-LAMP 法
- ③ コンベンショナル RT-PCR 法 について記載しています。

以下のフローチャートを参考にして、所有機器や判定までの作業時間等を考慮して検出手法を選択してください。なお、かかるコストは用いる試薬や容量によって多少異なります。

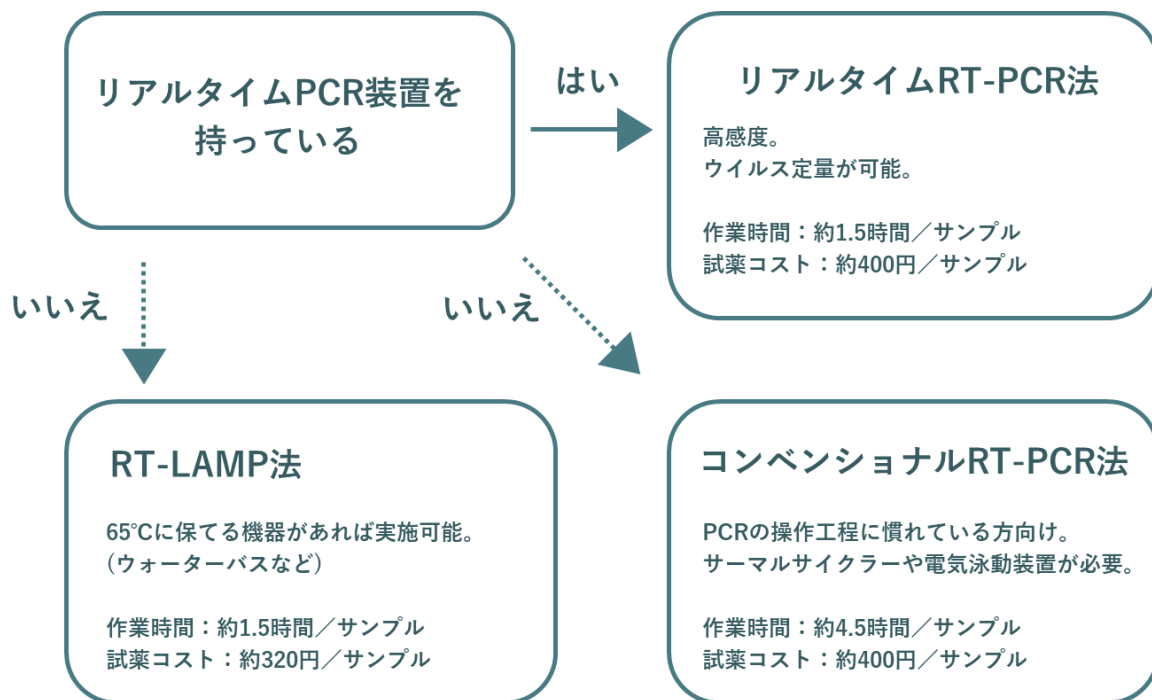


図 3 コムギ縞萎縮ウイルス検出手法の選択にかかるフローチャート

3 サンプル調製(全検出手法共通)の手順

3.1 必要な消耗品及び機器

- ・ハサミ及びピンセット
- ・マイクロピペット(100~1000 μ L 容量、2~20 μ L 容量)
- ・吸い込み口の先端を切ったマイクロチップ(20 μ L 容量以上のもの)
- ・マイクロチューブ(1.5mL 容量)
- ・(チューブ粉碎機を所有している場合) 2mL セーフロックチューブ(Eppendorf(株))、
5mm 径_ジルコニアビーズ
- ・0.5% 次亜塩素酸ナトリウム
- ・70% エタノール
- ・チューブ試料破碎装置(ここでは Tissue Lyser II (株)QIAGEN) (現在は「TissueLyser III」として販売:2024 年 11 月 6 日現在)を用いています。)
- ・(チューブ試料破碎装置を所有していない場合) 乳鉢(直径 9cm 程度)、乳棒
- ・100mM Tris-HCl (pH 8.0)
- ・(可能であれば) 液体窒素

3.2 調製方法

	① ハサミやピンセットを 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液 ↓ 70%エタノール の順番で消毒し、よく拭きます。
	② 検定したい葉を90mg前後にカットします(図 1)。複数葉をまとめて検定する場合は、向きを揃えて、それぞれの葉の基部に近い部分(茎に近い方)からカットします。 ③ カット幅が大きいと十分に破碎できないことがあるため、3mm幅程度にカットします(左写真)。カットした葉は計量し、重さを記録します。 続けて別のサンプルをカットする場合は、前のサンプルのウイルスを持ち越さないようにハサミやピンセットを①で示した順番で消毒し、よく拭きます。
	④-1 (チューブ試料破碎装置を所有していない場合) カット葉を乳鉢に入れ、カット葉の重さに対し9倍量(w/v)のTris-HCl(pH 8.0)を入れ、乳棒を用いて破碎し10倍希釈粗汁液を作製します。
	④-2 (チューブ試料破碎装置を所有している場合) ジルコニアビーズ(5mm)を入れた2mLセーフロックチューブにカット葉を入れます。液体窒素が入った容器にチューブごと入れることにより、瞬間凍結した後、チューブ試料破碎装置で2,500rpm、30sec実施します。液体窒素がない場合は、一度冷凍庫で十分凍結してから破碎します。

	⑤ 破碎後のチューブに、9 倍量 (w/v) の Tris-HCl(pH 8.0)を入れ攪拌した後、葉が左図程度に破碎されているかどうかを確認します。破碎されていない葉が目立つ場合は、さらに 2,500rpm、30sec を追加で実施します。
	⑥ 吸い込み口の先端を切ったチップを用いて破碎液 10μL を 1.5mL マイクロチューブに移します。そこに 990μL Tris-HClを加えて、1000 倍希釈破碎液を作成します。以降の検出実験は、これを鋳型として用います。 以上で粗汁液を鋳型にする場合のサンプル調製は終了です。

大量検定を想定した簡易な診断手法として、粗汁液を鋳型にする方法を記載していますが、より正確に診断したい場合は、RNA 抽出が必要です。

RNeasy Plant Mini Kit (株)QIAGEN) や NucleoSpin® RNA Plant Kit (タカラバイオ(株)) など、市販されている RNA 抽出キットの説明書に従って抽出してください。

4 リアルタイム RT-PCR 法による検出の手順

4.1 リアルタイム RT-PCR 法とは

PCR 法は、指数関数的に DNA を増幅しターゲット遺伝子を検出する技術です。熱耐性 DNA ポリメラーゼ及び標的遺伝子特異的プライマーを用い、熱変性→アニーリング→伸長の反応ステップを繰り返し行うことでターゲット遺伝子を増幅させます。検出対象の WYMV は、RNA であるため、RNA から DNA にする必要があります。それを逆転写反応 (Reverse Transcription) と呼ぶため、RT-PCR 法と呼ばれます。加えて、リアルタイム RT-PCR 法は、PCR 法による遺伝子増幅産物の量を蛍光で測定していく手法です。専用のリアルタイム PCR 装置が必要ですが、ターゲット遺伝子の量を定量的に検出することができます。

ここでは、リアルタイム RT-PCR 法の中でも蛍光プローブを用いた検出手法を紹介します。なお、検出試薬は、One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (タカラバイオ 株) を用いて、リアルタイム PCR 装置は、CFX96 (バイオ・ラッドラボラトリーズ株) を用いました。

4.2 必要な消耗品及び機器

- ・マイクロピペット (100~1000 μ L 容量、20~200 μ L 容量、2~20 μ L 容量、0.1~2 μ L 容量)
- ・マイクロピペットチップ
- ・マイクロチューブ (1.5mL 容量)
- ・WYMV 検出プライマー
- ・WYMV 検出蛍光プローブ (ここでは、IDT株で合成。)
- ・リアルタイム RT-PCR 試薬 (ここでは One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix を使用。)
- ・リアルタイム PCR 装置 (ここでは CFX96 を使用)

4.3 リアルタイム RT-PCR 試薬の準備

使用するプライマー及びプローブの配列を表 1 に示します。あらかじめ、プライマーは 10 μ M、プローブは 5 μ M に調製します。

表 1 リアルタイム RT-PCR 法で使用するプライマー及びプローブ

プライマー名	5' – 3'	調製濃度
WF(Forward primer)	GCCGCGTACGCTTTTGACT	10 μ M
WR(Reverse primer)	TTCGATGTCCTGTGGGTTCA	10 μ M
WT(蛍光プローブ)	FAM-CTTTGTCCC/ZEN/CCGCCCGTGG-BHQ I	5 μ M

続いて、使用するリアルタイムPCR装置に適合したチューブに表 2 に示した組成で試薬を調製します。

表 2 リアルタイム RT-PCR 検出のための試薬組成

試薬	1 サンプルあたり
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2 $\times$)	12.5 μ L
5 μ M_Foward primer	1.0 μ L
5 μ M_Reverse primer	1.0 μ L
5 μ M_プローブ	1.0 μ L
滅菌水	8.5 μ L
サンプル(鋳型)	1.0 μ L
Total	25.0 μ L

4.4 リアルタイム RT-PCR 法の反応条件

リアルタイムPCR装置で測定波長を「FAM」に設定して

52℃ (逆転写) 5分※¹、

↓

95℃ (逆転写酵素の失活) 10秒

↓

95℃ (DNAの熱変性) 5秒

↓

60℃ (アニール／伸長) 30 秒 (蛍光検出)

40 サイクル実施します。

増幅が確認されたサンプルを陽性と判定します。

※¹ 逆転写反応温度及びPCRの熱変性温度及び時間は使用する試薬に合わせます。

※² アニール・伸長温度は60℃で実施します。

出力されたデータをグラフにしたものが、
図 4 です。陽性サンプルの場合、相対蛍光
単位 (RFU) がサイクル数に従って増加しま
す。

ウイルス量が多いサンプルほど増幅の立
ち上がりが早くなります。

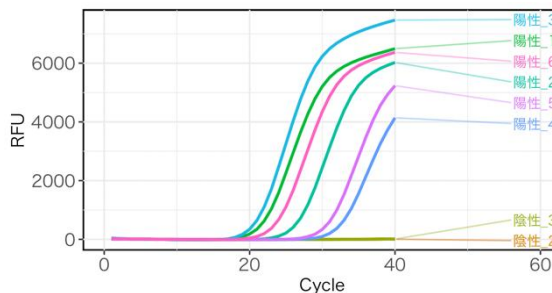


図 4 リアルタイムRT-PCR法の
増幅曲線

4.5 リアルタイム RT-PCR による定量

リアルタイムPCRでは理論上、1サイクルごとに2倍増幅されます。そのため、サンプル間でウイルス存在量の差を定量することができます。例えば、サンプル①のCt値(ある一定の蛍光強度に達したサイクル)が20、サンプル②のCt値が25だった場合、サンプル①と②の間では、ウイルス量が約 $2^5=32$ 倍の差があると推定できます。

ウイルスの絶対量(コピー数)を算出したい場合は、検量線を作成します。検量線作成には、本検出のターゲット領域をクローニングしたプラスミドなど、存在量(コピー数)が既知のサンプルを用意し、10倍段階で希釈したものを準備します。それらをリアルタイムPCRにかけると、図5のように、コピー数に応じて一定の蛍光値に達したサイクル数(Ct値)が変わります。この結果から、縦軸をCt値、横軸をコピー数として検量線を作成します(図6)。この検量線に検出したいサンプルのCt値をあてはめることで、存在するコピー数を算出することができます。ただし、WYMVはRNAウイルスであり、RNAからDNAを生成する逆転写反応の効率も影響するため、あくまでここでの算出値は推定値となります。

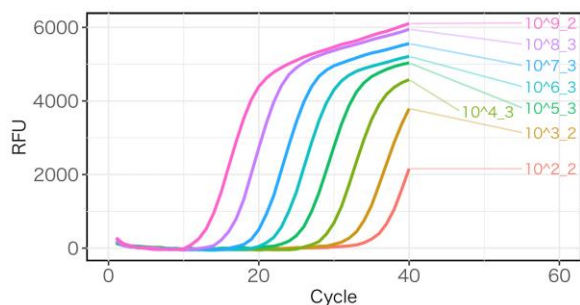


図5 コピー数既知の鋳型としたリアルタイムRT-PCR結果(増幅曲線)

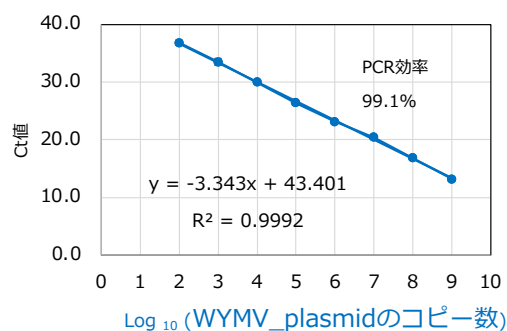


図6 コピー数及び図5のCt値から作成した検量線

5 RT-LAMP 法による検出の手順

5.1 LAMP 法とは

Loop-mediated isothermal amplification法 (LAMP法) は、標的のDNA領域を等温条件下で増幅するために、Notomi et al., (2000)によって最初に開発された核酸増幅法です。

PCR法では、加温・冷却のステップが必要なのに対して、LAMP法は60～68℃、1時間維持するだけでDNAを大量に増幅することができます。またLAMP法で使用される酵素は、反応阻害物質に対する耐性が高いという利点があるため(Kaneko et al., 2007)、粗抽出の核酸サンプルであっても比較的安定した検出が可能とされています。さらに、増幅の有無を可視化する試薬とセットで検出キットが販売されていますので、それを利用すれば、増幅産物を確認する電気泳動の手間も省略可能です。以上から、簡易かつ最小の操作で感染の有無の判定が可能であるため、PCR装置などの温度制御機器がなく、検定したいサンプル数が多い場合に有用な手法であると言えます。

なお、LAMP試薬は数社から販売されていますが、ここでは(株)ニッポンジーンのLAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)による方法を紹介します。また、WYMVはRNAウイルスであるため、RNAからDNAにするAMV Transcriptaseを加えてください。その他、終濃度5mMとなるように ジチオトレイトール (DTT) も必ず加えてください。DTTを加えないと偽陽性が多くなり、正確な判定ができません。

5.2 RT-LAMP 法に必要な資材、試薬

- ・LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye) (株)ニッポンジーン)
- ・WYMV検出_LAMPプライマー
- ・AMV Reverse Transcriptase (プロメガ(株))
- ・1M (±)-ジチオトレイトール (DTT) (富士フイルム和光純薬(株))：滅菌水で100mMに希釈して使用。
- ・ヒートブロック または ウォーターバスなど65℃を維持できる機器

5.3 RT-LAMP 試薬の準備

RT-LAMP法によりWYMVを検出するには表 3に記載した5種類のプライマー (WYMV_F3、_B3、_FIP、_BIP、_Bloop) を用意する必要があります。それぞれ別々にプライマーを発注し、あらかじめ100 μ Mに調製します。

続いて、各プライマーを表 4のと通りの組成で各プライマーを混合してWYMV_LAMPプライマーミックスを作成してください。

表 3 WYMVを検出するためのLAMPプライマー配列と調製濃度

プライマー名	5' – 3'	調製濃度
WYMV_F3	CCAAAAGAGTTTTTGTGGGC	100 μ M
WYMV_B3	GCCATAACAGAAGGGAAGTT	100 μ M
WYMV_FIP	GAAACAGTCTGTTGGCGTACG	100 μ M
	TCCAAAAAGCACTCCATGTTC	
WYMV_BIP	ATGCTGTGTCTTCGCGCTATAA	100 μ M
	GTTGCTACACACGACCA	
WYMV_Bloop	TGCACGATGGCAATGTCTTTAC	100 μ M

表 4 WYMVを検出するためのLAMPプライマーミックス

プライマー名	5' – 3'	混合量
100 μ M_WYMV_F3	CCAAAAGAGTTTTTGTGGGC	5 μ L
100 μ M_WYMV_B3	GCCATAACAGAAGGGAAGTT	5 μ L
100 μ M_WYMV_FIP	GAAACAGTCTGTTGGCGTACG	40 μ L
	TCCAAAAAGCACTCCATGTTC	
100 μ M_WYMV_BIP	ATGCTGTGTCTTCGCGCTATAA	40 μ L
	GTTGCTACACACGACCA	
100 μ M_WYMV_Bloop	TGCACGATGGCAATGTCTTTAC	20 μ L
滅菌水	–	290 μ L
	Total	400 μ L

続いて、表 5に記載した組成で、RT-LAMP法の反応試薬を調製します。

表 5 RT-LAMP 法の試薬組成

試薬	1サンプルあたり
2× LAMP MASTER	12.5 μ L
25 × Visible Dye	1.0 μ L
WYMV_LAMPプライマーミックス（上記で調製済のもの）	4.0 μ L
100mM DTT	1.25 μ L
AMV transcriptase	0.25 μ L
滅菌水	5.0 μ L
サンプル調製で示した鋳型	1.0 μ L
total	25.0 μ L

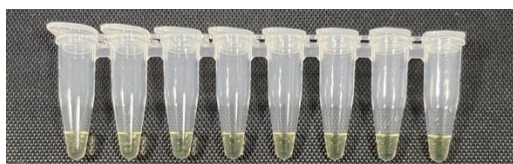
5.4 RT-LAMP 法の反応条件

65℃、50 分間(LAMP 反応)

↓

80℃、5 分間（反応停止；PCR装置を所有している場合）

PCR装置がない場合は、65℃、50分経過後、すぐにウォーターバスから取り出して目視判定を行ってください。



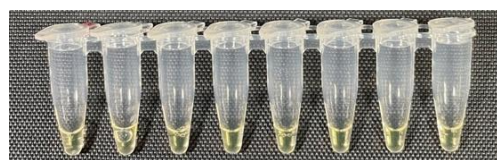
▼ 65℃で 50 分後



陽性サンプルは、発色する。



▼ 65℃で50分後



陰性の場合は、発色しない。

図 7 LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)を用いたときの反応結果

6 コンベンショナル RT-PCR 法の手順

6.1 コンベンショナル RT-PCR 法とは

コンベンショナルRT-PCR法は、一般的なPCR装置（サーマルサイクラー）を用いて遺伝子増幅を実施した後、アガロースゲル電気泳動及びDNA染色を実施して、陽性・陰性判定を行う方法です。

本マニュアルでは、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2（タカラバイオ㈱）を用いた方法を紹介します。

6.2 コンベンショナル RT-PCR 試薬の準備

使用するプライマーの配列を表 6に示します。あらかじめ5 μ Mに調製します。

表 6 コンベンショナル RT-PCR 法で用いるプライマー

プライマー名	5' – 3'	調製濃度
WYMV-F	CCCGCATCACAGCTGATC	5 μ M
WYMV-R	ATTGCCTCGAGAATGTTGCT	5 μ M

続いて、表 7に示した組成でRT-PCR試薬を調製します。

プライマーの終濃度は200nMとします。

表 7 コンベンショナル RT-PCR 法の反応試薬組成

PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2	サンプルあたり
2 × one-step Buffer	12.5 μ L
WYMV-Fプライマー (5 μ M)	1 μ L
WYMV-Rプライマー (5 μ M)	1 μ L
PrimeScript 1 step Enzyme Mix	1 μ L
滅菌水	8.5 μ L
サンプル (鋳型)	1 μ L
Total	25 μ L

6.3 コンベンショナル RT-PCR 条件

サーマルサイクラーを用いて、以下の反応条件に設定してください。

52℃ (逆転写) 30分※1、

↓

94℃ (逆転写酵素の失活) 5分

↓

95℃ (DNAの熱変性) 30秒

↓

55℃ (アニール) 30秒

↓

72℃ (伸長) 45 秒

35 サイクル実施します。

↓

(すぐに電気泳動できない場合は) 4℃で保存

※1 逆転写反応温度及びPCRの熱変性温度及び時間は使用する試薬に合わせます。

6.4 電気泳動及び染色

コンベンショナルRT-PCR法の終了後、反応液 4 μ l とローディングダイの混合液を、2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド等でDNAを染色して、結果を確認します。WYMVが陽性であれば、約 750 bp のバンドが確認できます(図 8)。

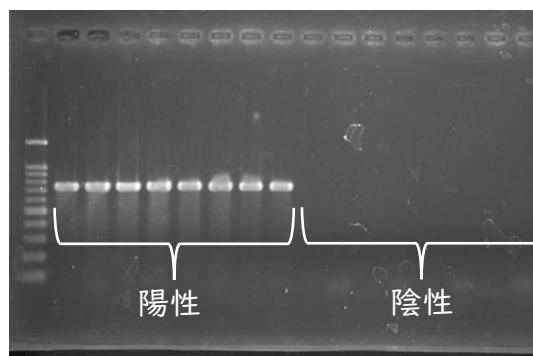


図 8 電気泳動結果

7 よくある質問

Q1:どの手法が最も検出感度がよいか？

A1:リアルタイム RT-PCR 法は RT-LAMP 法、コンベンショナル RT-PCR 法と比較して、約 10 倍程度検出感度が良い結果が得られています。

Q2:本書以外の試薬メーカーの検出試薬、検出機器でも実施可能か。

A2:基本的にはどのメーカーのものでも実施可能であると思われます。ただし、リアルタイム PCR では検出機器と検出試薬の組み合わせで、検出感度が前後することが報告されています(農研機構、2023)。本書以外の検定試薬を用いる場合は検定前に、濃度既知の希釈系列を作成して、検出感度を調べておくことをおすすめします。また、リアルタイム PCR 装置によっては、ROX 補正が必要な場合があります。機器や試薬の説明書に従って実施してください。

Q3:コムギ葉を採取してからの検定までの保管方法及び保管可能期間は？

A3:検定作業が採取後 7 日以内に実施可能なら、冷蔵(4℃)で保管し、それ以降になる場合は、冷凍(-80℃が望ましい)保管してください。一度葉を冷凍すると、正確に計量することが難しくなるため、冷凍する前に葉を計量し、マイクロチューブに入れた状態で冷凍保管することをおすすめします。

8 引用文献

Liu et al.(2013) Virology Journal 10:173.

Notomi et al.(2000) Nucleic Acids Res. 28:E63.

Kaneko et al.(2007) J Biochem Biophys Methods. 70(3):499-501.

大木健広・眞岡哲夫(2014)北日本病虫研報 65:24-27

農研機構(2023)リアルタイム PCR によるサツマイモ基腐病菌の検出・同定技術標準作業手順書(<https://sop.naro.go.jp/document/detail/87>) 2024 年 11 月 3 日アクセス)

9 免責事項

本書に従っても実施ができなかった場合や得られた結果が誤診だった場合でも、一切責任を負いません。

10 問い合わせ先

愛知県農業総合試験場 環境基盤研究部 生物工学研究室

〒480-1193

愛知県長久手市岩作三ヶ峯 1-1

nososi@pref.aichi.lg.jp