

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3200624号
(P3200624)

(45)発行日 平成13年8月20日(2001.8.20)

(24)登録日 平成13年6月22日(2001.6.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C 1 2 Q 1/70		C 1 2 Q 1/70
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	Z N A A
C 1 2 R 1:92)		

請求項の数1(全 4 頁)

(21)出願番号 特願平9-154946

(22)出願日 平成9年6月12日(1997.6.12)

(65)公開番号 特開平11-200

(43)公開日 平成11年1月6日(1999.1.6)

審査請求日 平成9年6月12日(1997.6.12)

(73)特許権者 591075364
農林水産省北海道農業試験場長
北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地

(72)発明者 寺見 文宏
北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地 農林
水産省北海道農業試験場内

(74)代理人 100063565
弁理士 小橋 信淳

審査官 坂崎 恵美子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルスの遺伝子型の識別方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の配列群から選ばれる配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、キュウリモザイクウイルス感染組織より抽出したRNAから、キュウリモザイクウイルスRNAの塩基配列と相補な配

列及び相同な配列の二本鎖のDNAを合成し、該DNAを電気泳動分析することによりキュウリモザイクウイルスの種類を視覚検出することを特徴とするキュウリモザイクウイルスの遺伝子型の識別方法。

- (1) 5' - A G Y C C T T C C G A A G A A A Y C T A G G A G A - 3'
- (2) 5' - C G A G T C A T G G A C A A A T C T G A A T C A A - 3'
- (3) 5' - A C A T C T A T T A C C C T G A A A C C G C C T G - 3'

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ウイルス、特にキュウリモザイクウイルスを、オリゴヌクレオチドを用いてその種類を識別するウイルスの遺伝子型の識別方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】CMV(キュウリモザイクウイルス)

は、単子葉草本植物から双子葉木本植物までの極めて広い宿主範囲を持つRNA型植物ウイルスであり、多くの農作物に感染してモザイク病を引き起こす重要病原ウイルスである。CMVは、他の全ての植物ウイルスと同じく、有効な防除薬剤がないため、その防除対策確立のために抵抗性品種育成を目的とした遺伝子源の探索、弱毒

ウイルスの開発等が積極的に進められている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし最近になり、CMVには外被タンパク質の遺伝子型が異なる2種類の系統群（I型およびII型）が存在し、両者が相互に混合感染して複合ウイルス病害を引き起こす可能性も考慮する必要が生じてきた。そのため、両者の有無を明確に判定できる検定技術の確立なしには、CMVの効果的な防除及び抵抗性作物の効率的な開発が困難な状況にある。

【0004】本発明は上述の事情に対処するものであって、CMVの効果的な防除及び抵抗性作物の効率的な開発をするために、CMV系統群の種類を簡単且つ適正に識別する方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために本発明は、下記の配列群から選ばれる配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ウイルス感染組織より抽出したRNAから、ウイルスRNAの塩基配列と相補な配列及び相同な配列の二本鎖のDNAを合成し、該DNAを電気泳動分析することによりウイルスの種類を視覚検出することを特徴とする。

(1) 5' - AGYCCTTCCGAAGAAAYCTAGGAGA - 3'

(2) 5' - CGAGTCATGGACAAATCTGAATCAA - 3'

(3) 5' - ACATCTATTACCCTGAAACCGCCTG - 3'

【0006】

【作用】本発明における方法の基礎として、本出願人は、EMBL/GenBank/DDBJ DNAデータベースにおいて公開されている9種類のCMV分離株の外被タンパク質遺伝子の塩基配列（登録番号：J02059, D00385, D00462, D00463, D10539, D10538, D12499, L15336, S57834）を詳細に解析した。そして全ての分離株で不変の塩基配列部分（CMV共通配列）と、I型あるいはII型の系統群内ではほぼ不変であるが、それぞれの系統群間では大きく異なる塩基配列部分（系統群特異的配列）を見いだした。

【0007】そしてCMV系統群の種類を識別するために、まず、上述したCMV共通配列に相補的なオリゴヌクレオチド、すなわち、5' - AGYCCTTCCGAAGAAAYCTAGGAGA - 3' の配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、両系統群のCMVのゲノムRNAに対するcDNAを調製する。次に、得られたcDNAに、系統群特異的配列からなるオリゴヌクレオチド、すなわち、5' - CGAGTCATGGACAAATCTGAATCAA - 3' , 5' - ACATCTATTACCCTGAAACCGCCTG - 3' の配列からなるオリゴヌクレオチドを加えて、DNA複

製酵素による複製反応を行うと、それぞれの系統に特異的なDNA断片が合成される。そして得られたDNA断片を電気泳動分析することにより、CMVの種類を判別することが可能になる。

【0008】

【実施例】以下、本発明の実施例を具体的に説明する。

【0009】まず、準備段階としてオリゴヌクレオチドの合成を行う。詳細には、図1に示すCMV共通配列に相補的な25塩基のオリゴヌクレオチド（C3E2C）、同じく図1に示す系統群I及び系統群IIの各々の特異的配列からなる25塩基のオリゴヌクレオチド（YR3S7, PR3S4）を、市販のDNA/RNA合成機（パーキンエルマー社392型DNA/RNA合成装置）を用いて、シアノエチル・フォスフォアミダイト法により、アデニンフォスフォアミダイト、グアニンフォスフォアミダイト、シトシンフォスフォアミダイト及びチミンフォスフォアミダイトをそれぞれ配列に従ってカップリングさせることにより合成する。ここで図中の塩基配列中の「Y」は、その部分の塩基のみTとCを混合してオリゴヌクレオチドを合成することを意味するものである。

【0010】次にCMV感染試料よりRNAの抽出を行う。詳細には、25℃, 100, 000ルクスの照度で16時間照明した環境制御室で育苗したタバコ（品種サムソン）の葉に、系統群IのCMV分離株であるCMV-Y及び系統群IIのCMV分離株であるCMV-Pのそれぞれを、単独あるいは混合して塗末接種する。（但し、タバコの葉は完全に展開しているものとする）そして育苗と同一条件に4日間保った後、ウイルス接種葉を切り取り、予め-80℃で30分間予冷しておいた乳鉢に、切除した前記タバコ葉約1gと液体窒素10mlを加え、タバコ葉が粉末状になるまで乳棒で磨砕し、これに市販のRNA抽出試薬「Isogen」（日本ジーン社製）を10ml加えて、シャーベット状態になるように混和する。

【0011】上述のシャーベット状物を室温20℃～25℃に30分間静置した後、遠心分離（22,500g, 10分間）によって得られた液体に、クロロホルムを2ml加え、30秒間激しく攪拌後、再び遠心分離（22,500g, 10分間）して水相を回収する。得られた水相に8mlのイソピルアルコールを加えて攪拌した後、室温20℃～25℃に15分間静置する。そしてこれを遠心分離（22,500g, 10分間）して得られた沈殿に、70%エチルアルコールを加えて遠心分離（22,500g, 10分間）する操作を2回繰り返した後、室温20℃～25℃の室温で30分間沈殿を乾燥する。そして乾燥した沈殿を市販のDEPC処理水（ナカライテスク社）100μlに溶解してRNAを抽出する。

【0012】次にcDNAの合成と二本鎖DNAの合成

を行う。詳細には、3 μ lのRNA液に市販のDEPC処理水(ナカライテスク社)を5 μ lと、5 μ Mの濃度に調整したオリゴヌクレオチドC3E2Cを1 μ lを混合し、65 $^{\circ}$ Cで10分間静置した後、0 $^{\circ}$ Cに急冷する。これに200 mMジチオスレイトールを1 μ lと市販のcDNA合成反応液(ファルマシア社製First-Strand cDNA Synthesis Kit)を5 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cに1時間静置してcDNAの合成を行う。そして合成反応を終了した反応液から過剰のヌクレオチドを除くため、市販のスピンカラムによるゲルろ過を行う。具体的には、1,500 g 1分間の遠心処理を予め施した市販のスピンカラム(ファルマシア社製MicroSpin Column S-200)のゲル担体上面に、反応液を添加した後、1,500 g 2分間の遠心処理を実施し、スピンカラムを通過したる液を回収する。そして得られたる液に1/10容の3 M酢酸ナトリウム液及び2.5倍容のエチルアルコールを加えて-80 $^{\circ}$ Cに15分間静置する。これを遠心分離(22,500 g, 10分間)して得られた沈殿に、70%エチルアルコールを加えて遠心分離(22,500 g, 10分間)する操作を2回繰り返したのち、室温20~25 $^{\circ}$ Cの室温で30分間沈殿を乾燥する。

【0013】次に上述のようにして得られた沈殿を滅菌超純水7 μ lに溶解し、これに70 mM塩化マグネシウムおよび1 mMジチオスレイトールを含む100 mM Tris-塩酸緩衝液(pH7.5)を2 μ l、0.6 mMデオキシアデノシン三リン酸を1 μ l、0.6 mMデオキシグアノシン三リン酸を1 μ l、0.6 mMデオキシチミジン三リン酸を1 μ l、3,000 Ci/mmoleの[$^{-32}$ P]デオキシチミジン三リン酸を5 μ l、5 μ Mに調製した2種のオリゴヌクレオチドYR3S7およびPR3S4をそれぞれ1 μ lずつ、2 U/klenow fragmentを1 μ l加えて、37 $^{\circ}$ Cで10分間DNA合成反応を行う。これに3 M酢酸ナトリウム(pH5.0)を3.0 μ l、5 M塩化ナトリウムを6 μ l、10 U/ μ lのMung bean nucleaseを1 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間静置した後、10 μ lを2%アガロースゲルでの電気泳動解析に用いる。分子量マーカーとして、1 kbp DNAラダー(Gibco-BRL社)を用いる。

【0014】次にキュウリモザイクウイルスの遺伝子型の識別を行う。詳細には、まず、10 cm x 8 cmのサイズのゲル(G)で、100 V定電圧条件で、ブロムフェノールブルーが8 cm移動するまで通電する。次に

0.1 μ g/mlエチジウムブロマイドで10分間染色後、UVトランスイルミネーターの透過照明で写真撮影して分子量マーカーの位置を記録する。その後ゲルをサララップに包み、X線フィルム(Kodak社BioMax MS)に露光する。そして30分~3時間の露光の後、感光したフィルムを現像し、DNA断片のバンドパターン肉眼で判読する。

【0015】I型CMVが感染している場合には、879塩基または881塩基の二本鎖DNAが合成され(系統によりサイズが異なる)、またII型CMVが感染している場合には、673塩基の二本鎖DNAが合成されることからCMVゲノムの塩基配列から予想される。図2に示すように、I型CMVに属するCMV-Y系統およびII型CMVに属するCMV-P系統のそれぞれを単独接種した個体から抽出したRNA(Y,P)では、それぞれ予想される1種類の大きさのDNA断片が現像したX線フィルムに現れ、CMV-Y系統およびCMV-P系統を混合接種した個体から抽出したRNA(Y+P)では、予想される2種類の大きさのDNA断片像が共に現れ、電気泳動の移動度の違いから両者は容易に識別できる。

【0016】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によると、これまで識別が困難であった遺伝子型の異なる2種類のCMV系統群の識別が容易となり、抵抗性遺伝資源的確な評価が実現し、CMVの効果的な防除技術及び抵抗性作物の効率的な開発が実現できるようになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】オリゴヌクレオチドの塩基配列を示す図である。

【図2】2種類のキュウリモザイク系統のcDNA断片の電気泳動後のイメージを示す図である。

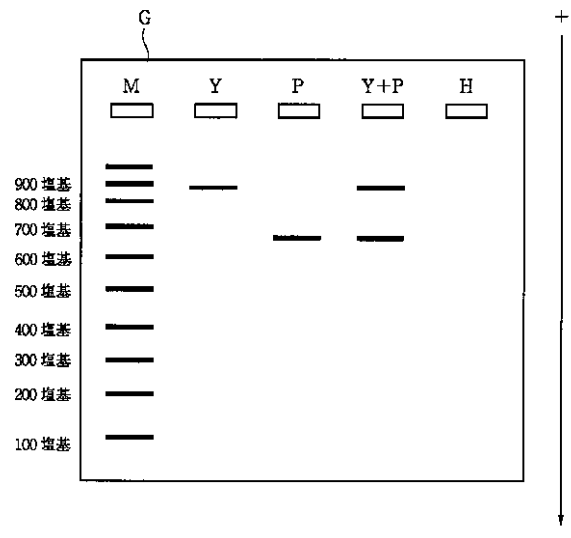
【符号の説明】

- G 1.5%アガロースゲル板
- M サイズ測定用標準DNAを入れた試料槽
- Y CMV-Y系統に感染したタバコから抽出したRNAを鋳型とするDNAを入れた試料槽
- P CMV-P系統に感染したタバコから抽出したRNAを鋳型とするDNAを入れた試料槽
- Y+P CMV-Y系統とCMV-P系統を同時接種したタバコから抽出したRNAを鋳型とするDNAを入れた試料槽
- H ウイルスに感染していないタバコから抽出したRNAを鋳型とするDNAを入れた試料槽

【図1】

オリゴヌクレオチド の名称	塩基配列
C3E2C	5' AGYCCTTCCGAAGAAAYCTAGGAGA 3'
YR3S7	5' CGAGTCATGGACAAATCTGAATCAA 3'
PR3S4	5' ACATCTATTACCCTGAAACCGCCTG 3'

【図2】



フロントページの続き

- (56) 参考文献 特開 平8 - 56672 (JP, A)
 特開 平7 - 327700 (JP, A)
 Eur. J. Biochem., Vol.
 1126, p. 217 - 226 (1982)
 J. Gen. Virol., Vol.
 70 (2), p. 499 - 504 (1989)
 J. Gen. Virol., Vol.
 70 (5), p. 1065 - 1073 (1989)
 J. Gen. Virol., Vol.
 71 (10), p. 2243 - 2249 (1988)
 Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., Vol. 54 p. 516 -
 522 (1988)
 Virus Res., Vol. 31
 (3), p. 379 - 384 (1994)

- (58) 調査した分野(Int.Cl.7, DB名)
 C12Q 1/70
 C12N 15/09 ZNA
 BIOSIS (DIALOG)
 CA (STN)
 GenBank / EMBL / DDBJ (G
 ENETYX)
 REGISTRY (STN)
 WPI (DIALOG)