

超薄切片法及びin situ hybridization法を用いたシソサビダニ体内におけるシソモザイクウイルス局在の調査

TAKAHATA, Kohei / 高畑, 康平

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

64

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2023-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00026454>

超薄切片法及び *in situ* hybridization 法を用いたシソサビダニ体内におけるシソモザイクウイルス局在の調査

INVESTIGATION OF THE LOCALIZATION OF PERILLA MOSAIC VIRUS IN *Aculops thymi* BY MICROSCOPY USING ULTRA-THIN SECTION AND *IN SITU* HYBRIDIZATION

高畑康平

Kohei TAKAHATA

指導教員 津田新哉

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Perilla mosaic virus (PerMV), which infects perilla and causes mosaic symptoms, is transmitted by the rust mite *Aculops thymi*, a member of the Eriophyidae, and causes major problems in cultivation. Its structure in plant tissues is less clear. Similarly, its dynamics in the tissue cells of the mites have not been analyzed. In this study, I aimed to clarify the localization of the virus in the infected perilla leaves and mites by electron microscopy using ultra-thin section, and *in situ* hybridization with PerMV oligonucleotide probe. Electron microscopy revealed salivary glands in the mite but no virus particles in the cells, while *in situ* hybridization showed the localization of the virus in the phloem tissues of perilla and in the forward body of the mite.

Key Words: *Perilla* mosaic virus, ultramicrotome, *in situ* hybridization

1. 諸言

シソに感染しモザイク症状を引き起こすシソモザイクウイルス(PerMV)はフシダニ科のシソサビダニによって媒介され、栽培上大きな問題を引き起こす(図 1、2)。PerMV はエマラウイルス属のウイルスであり、比較的新しく設定された属であるため性状解析が進んでおらず、植物組織内における構造はあまり明らかになっていない。また、同様にエマラウイルスを保持するサビダニ体内の組織細胞内での動態についても全く解析がなされていない。そのため、本研究ではウルトラミクロトーム(超薄切片作成装置)を用いたシソサビダニ樹脂包埋切片作成と電子顕微鏡による細胞内の観察、及び PerMV のプローブ核酸を用いた *in situ* hybridization 法により感染シソ葉とシソサビダニ体内におけるウイルス局在を明らかにすることを目的とした。



図 1 PerMV 感染シソ葉



図 2 シソサビダニ
Bar:0.1mm

2. 手法

(1) 保毒虫の調整とウイルス保毒検定

無保毒のシソサビダニを PerMV 感染シソ株葉上で獲得吸汁させた。同様に無保毒のシソサビダニを本ウイルス感染株上に顕微鏡下で移植、放飼し世代を繰り返すことで保毒ダニを調整した。各ダニが PerMV を保毒しているかを確認するために、RNA を抽出し特異的プライマー(表 1)を用いて RT-PCR を実施した。

表 1 使用したプライマー

プライマー名	プライマー記列	検出目的
PerMV_RNA2U	CACTCAACGTAGCACCAACC	PerMV
PerMV_RNA2D	GCTACGGGGATGTGAAGAAA	
LSUD1D2fw2	ACAAGTACCDTRAGGGAAAGTTG	フシダニ 28s rRNA
28SR0090	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC	

(2) シソサビダニの超薄切片作成及び観察

PerMV が感染したモザイク症状を呈するシソ上で飼育したシソサビダニを拾い上げ、低融点アガロースゲルで包埋して 1 mm×1 mm×5 mm 角に裁断し、固定・脱水して樹脂への包埋を行った。ゲル包埋サンプルを樹脂成型用カプセルに入れる際には、つまようじの後側を差し込みゲルの位置を固定した。超薄切片の作製と電子染色を行った後、透過型電子顕微鏡で観察した。

(3) PerMV プローブの作成

PerMV 罹病シソ葉について、RNA3 の N 遺伝子をターゲットとするプライマーを用いて RT-PCR を行った。ベクター pGEM ヘライゲーション、大腸菌へトランスフォ

一メーションした後に、コロニーPCRにより適当なサンプルを選別し、液体培養を行ってプラスミドを精製した。N 遺伝子のアンチセンス鎖をプローブとするようにプラスミドを制限酵素処理して線形化処理し、転写反応により DIG ラベリングをすることで RNA プローブを合成した。作成したプローブの有効性を確認するために罹病シソの粗汁液、及び抽出した total RNA を用いてドットプロット hybridization を実施した。

(4)シソ葉のパラフィン切片作成及び *in situ* hybridization

PerMV 感染シソ葉サンプルについてパラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド溶液で固定した後に、エタノールとブタノールで段階的な脱水を行い、60°Cで溶解したパラフィンに完全に置換し包埋ブロックを作成した(図3)。これをマイクロトームにより 20µm の厚さで薄切した。

プローブは終濃度が 0.2µg/ml となるよう調整し、スライドガラス上に伸展した切片を置きハイブリダイズさせ、最終的に NBT/BCIP 溶液により発色を確認した。



図3 パラフィン包埋シソサンプル

(5)ダニ虫体サンプル調整及び *in situ* hybridization

ダニ虫体も葉と同じようにパラフィン包埋サンプルの調整を行った。虫体は微小であるために前固定として低融点ゲルに包埋し、脱水した後にパラフィンに包埋した。また、ゲル包埋虫体に対して切片化せずに *in situ* hybridization を直接行い、顕微鏡にて観察した。その際、固定剤、ブロッキングバッファー、抗体、発色液などの各種反応段階のインキュベーションはサンプルの中心部まで薬液が浸透できるように長く行った。

3. 結果及び考察

(1)シソサビダニの PerMV 保毒率の調査

PerMV を獲得させたシソサビダニについてウイルス保毒検定を実施した。5頭まとめて、及び1頭のみから抽出した RNA サンプルに対して RT-PCR を行ったところ、いずれもウイルスが検出された。試験をそれぞれ 5 回繰り返し、ウイルス保毒率を算出したところ、80%であった(表2)。この結果より、各種包埋サンプルの作成、観察において、無保毒ダニの可能性は比較的低いものと考えられた。

表2 シソサビダニの PerMV 保毒率

	ダニ28s rRNA検出数	陽性サンプル数	保毒率
1匹/1チューブ	5/5	4/5	80%
5匹/1チューブ	5/5	5/5	80%

(2)シソサビダニの超薄切片作成及び観察

PerMV 感染によるダニの細胞内の変化を観察する目的で、ダニの超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡にて解析した。その結果、頭部付近に既報の別種のフシダニの唾液腺と非常に類似した構造が観察された(図4)。唾液腺内部に多く存在する球状の小胞は唾液腺に蓄積された分泌物であると考えられ、ウイルス保毒シソサビダニを観察サンプルとしたものの、唾液腺内部においてウイルス粒子及びその他の構造上の変化は確認できなかった。先行研究において、同じブニヤウイルス目に属するトマト黄化えそウイルスを、ミカンキロアザミウマの幼虫が獲得吸汁を行う際に前腸、中腸を通り唾液腺へとウイルスが移行することが明らかとなっているため、同様の現象が見られるか引き続き切片の作成及び観察を行い検証する必要がある。

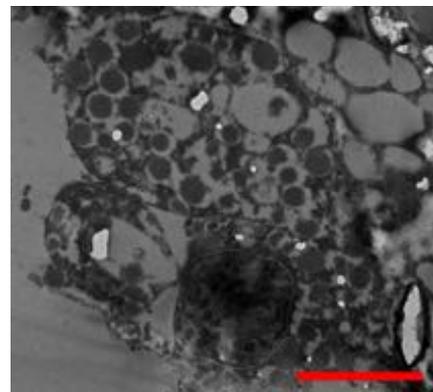


図4 シソサビダニの唾液腺 (Bar:2µm)

(3) PerMV プローブの作成

作成した DIG ラベルプローブを用いて、PerMV 感染シソ粗汁液と植物抽出 RNA についてドットプロット hybridization を実施したところ、ウイルス感染サンプル(シソ葉粗汁液、抽出 total RNA)では青紫色の発色が認められた一方で、非感染のサンプル(健全シソ葉粗汁液)では検出されなかった(図5)。また、感染シソ葉粗汁液及び抽出 RNA 両方の段階希釈液においても検出が可能であった。この結果から、プローブが適切に作成されたことを確認し、以後の *in situ* hybridization を行うこととした。



図5 ドットプロット hybridization による PerMV の検定 (左: 感染シソ葉抽出 total RNA、中: 感染シソ葉粗汁液 10 希釈 右: 感染シソ葉粗汁液 100 倍希釈)

(4) シソ葉切片における *in situ* hybridization

パラフィン包埋感染シソ切片に *in situ* hybridization を実施したところ、葉断面における師部細胞を中心に青紫色の発色が観察された(図 6)が、葉の内部の細胞は発色を呈していなかった。この結果より、PerMV は師部組織内に高濃度で存在することが示唆された。一方で、葉肉細胞は染色されず、表皮のみ発色していることから、切片の厚みなどに留意し、適正な切片作成の条件を検討して観察を続ける必要がある。

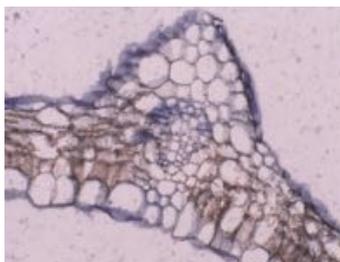


図 6 *in situ* hybridization によるシソ葉における PerMV の局在

(5) ダニ虫体への *in situ* hybridization

保毒シソサビダニをゲルに包埋した後にパラフィンに包埋し切片作成を試みた結果、側面から見た切片では消化管の染色が(図 7)、ダニを上面から見た切片では虫体前方での染色が観察された。この結果より、ウイルスが消化

管、虫体前方に局在していることが示唆された。今後も引き続き観察を行うことで、消化管や生殖器などのより詳細な体内構造の観察、および葉とシソサビダニ体内でのウイルスの局在の解明について取り組んでいきたい。



図 7 *in situ* hybridization によるシソサビダニ内の PerMV の局在

4. 謝辞

本研究を行うにあたり、シソサビダニを分譲していただいた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 久保田健嗣様、PerMV 感染シソ株を分譲していただいた法政大学 応用植物医科学研究室 新井亜美様、そしてご援助をいただきました植物医科学専修の皆様へ厚く御礼申し上げます。