

カンキツグリーニング病菌の検定法

はじめに

カンキツグリーニング病(Citrus Huanglongbing)の病原細菌(以下、HLB 菌)の検定は、分子生物学的手法が開発されるまでは、Madame Vinous Sweet Orange 等の指標植物への接木接種による生物検定が行われてきたが、判定結果が出るまでに長期間を要した。

その後、1994 年に Jagoueix らによって HLB 菌の 16S リボソーム DNA に対する特異プライマーを用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による検定法が開発され、一般的に用いられるようになった。

しかしながら、感染樹内での HLB 菌の局在性や感染初期の無病徴の試料からの検出が難しいことから、より高感度の検定法が必要とされている。また、PCR 法にはサーマルサイクラー等の特別な機器が必要となり、操作も煩雑で安定的に行うためには熟練も必要であることから、より簡易な方法が望まれている。

ここでは、より高感度な PCR 法である nested PCR 法、簡易で高感度な手法である Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いた検定法について紹介する。

nested PCR 法

nested PCR 法は、1 回目に行った PCR 増幅領域の内側にプライマーセットを設定し、1 回目の PCR 産物を鋳型として、2 回目の PCR を行う方法である(図 1)。一般的に、1 回目の PCR で十分な増幅が得られない場合や似た配列が多いときに行われ、2 回目の反応サイクルを新たなプライマーで行うことで特異性を高め、検出感度を上げようとするものである。2 回目の PCR に用いるプライマーは、「nested プライマー」と呼ばれる。

nested PCR 法を行う場合、2 回目の PCR 反応に 1 回目の PCR 産物を過剰に入れると、1 回目のプライマーの影響が出てしまうので、注意が必要となる。

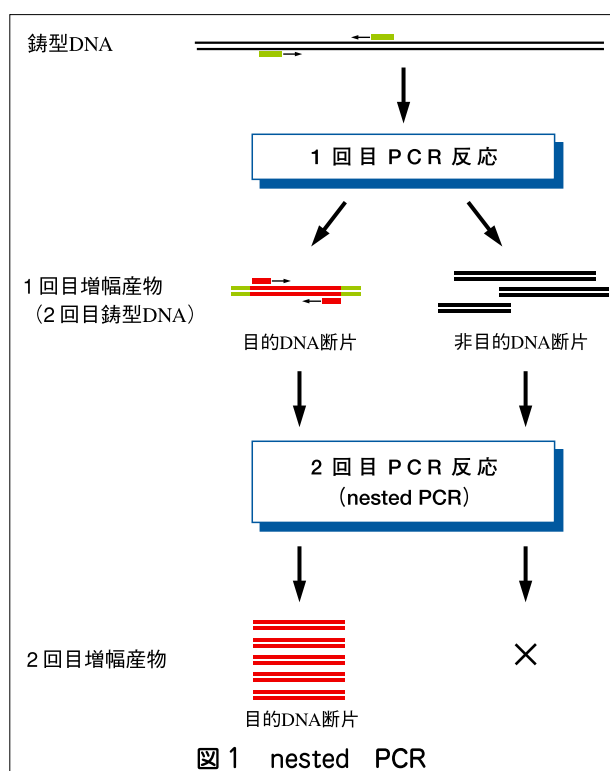
操作は、①リ病組織からの核酸抽出、②抽出核酸液及び試薬を混合し 1 回目(通常の) PCR

反応、③ 1 回目の PCR 産物及び試薬類を混合し nested PCR 反応、④アガロースゲル電気泳動・核酸染色の順に行い、目的とするバンドが確認できれば陽性となる。

Ding ら(2005)は、本法を用いて、無病徴のワンピから HLB 菌を検出している。また、通常の PCR 法と nested PCR 法の検出感度を比較し、nested PCR 法の方が 10^4 倍高かったとしている。用いたプライマーセットは別表のとおりである。

また、Zhou ら(2007)は、nested PCR 法で、寄生植物のネナシカズラを介して、リ病植物から健全なスウィートオレンジに HLB 菌が伝搬したことを確認したと報告している。用いたプライマーセットは別表のとおりである。

nested PCR 法は、検出感度が上がるものの、PCR 反応を 2 回行うため、時間がかかるという難点がある。



LAMP 法

LAMP 法は、簡易で迅速な新しい遺伝子増幅法として、2000 年(Notomi ら)に開発された。

この方法は、6 つの標的遺伝子領域に対して

表 プライマーの塩基配列

① DingらがnestedPCR法で用いたプライマー 1回目 F1: 5'-TGAATTCCTTCGAGGTTGGTGAGC-3' R1: 5'-AGAATTCGACTTAATCCCCACCT-3' 2回目 (nested プライマー) F2: 5'-GCGTTCATGTAGAAGTTGTG-3' R2: 5'-CCTACAGGTGGCTGACTCAT-3'	③ OkudaらがLAMP法で用いたプライマー LAMPプライマー rpl-FIP: 5'-GCATGCCGAGGATCAATGCCTTGCTTAAAGAGCGTGCTACG-3' rpl-BIP: 5'-TATGCCTAATGGCACGGGGTAAGCTTCATCCGCCCTTCGA-3' rpl-F3: 5'-TGGGTTAAGTGATGCTGTGG-3' rpl-B3: 5'-CAACAATATCAGCCCCCTGCT-3' Loopプライマー rpl-LF: 5'-TCTCAACTGTTTCATCAAACCTAGC-3' rpl-LB: 5'-CGTGGCGGTTTTTGTCTACA-3'
② ZhouらがnestedPCR法で用いたプライマー 1回目 OI1: 5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3' OI2: 5'-ATGGGTTGCGAAGTCGCGAGGC-3' 2回目 (nested プライマー) CGO3F: 5'-RGGGAAAGATTTTATTGGAG-3' CGO5R: 5'-GAAATAYCATCTCTGATATCGT-3'	

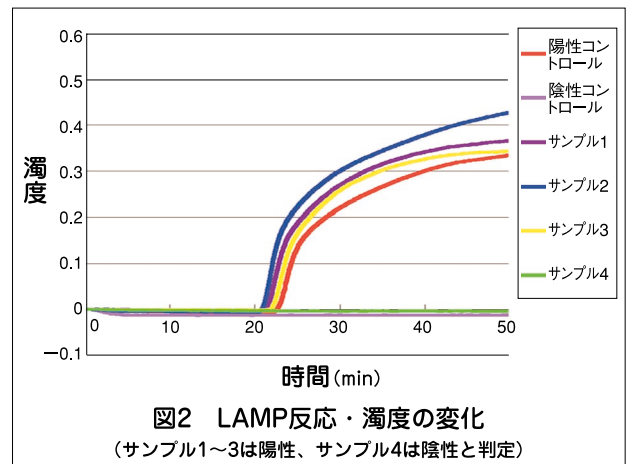
4種類のLAMPプライマーを設定し、鎖置換型DNA合成酵素による鎖置換反応を利用して一定温度（65℃付近）で反応させ、遺伝子増幅を行うものである。LAMPプライマーのうち、FIPとBIPと呼ばれるプライマーは、標的領域の配列と標的領域の相補的配列を組み合わせで設計されていて、増幅時に環状構造（Loop）を形成することで効率的な増幅が行われる。さらに、Loopプライマーと呼ばれる2種類のプライマーを加えるとLAMP反応を促進し、時間を短縮することができる。

特徴として、①6領域を認識する4種類のプライマーを用いるため特異性が高い、②増幅効率が高く、短時間で増幅可能（DNAを15分～1時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅可能）、③DNA合成に伴ってできるピロリン酸マグネシウムによって反応液が白濁するため増幅を目視によって判定することができる、等がある。

操作は、①リ病組織からの核酸抽出、②抽出核酸液及び試薬を混合しLAMP反応、の順で行う。LAMP反応の白濁は、リアルタイム濁度測定装置を用いるとリアルタイムで確認することができる。

LAMP法による増幅反応を成功させるためには、最適なプライマーの設計が重要となる。Okudaら（2005）は、HLB菌の遺伝子（*rpl* KAJL-*rpoB* operon）に対する4種類のLAMPプライマー（別表）を設定し、本法による検出を試みた。その結果、これらのプライマーセットは、高感度でアジアに分布するほとんどのHLB菌の検出に適用可能であるとしている。

Okudaらが設定したLAMPプライマーセット（2種類のLoopプライマーを含む）を用いて鹿児島県の徳之島で採取されたカンキツ葉から本法によりHLB菌の検出を試み、LAMP反応・



濁度の変化をリアルタイム濁度測定装置で確認した結果を図2に示した。反応開始後21～22分でグラフが立ち上がり、反応は1時間以内で終了した。

おわりに

カンキツグリーニング病の防除のためには、感染樹を早期に発見することが重要である。本稿で紹介したこれらの高感度な検定法を用いることにより、これまで困難であった初期の感染樹を発見することが期待される。

また、HLB菌の宿主範囲については、不確定な種が多く、今後、高感度の検定法を用いることによって、その範囲も明確になると考えられる。

参考文献

- Ding F., G.Wang, G. Yi, Y. Zhong, J.Zeng and B. Zhou, 2005. Infection of Wampee and Lemon by the Citrus Huanglongbing Pathogen (Candidatus Liberibacter Asiaticus) in China. Journal of Plant Pathology 87:207-212.
- Jagoueix, S., J. M. Bove, and M. Garnier. 1996. PCR detection of the two liberobacter species associated with greening disease of citrus. Mol. Cell. Probes 10:43-50.
- Notomi T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N.Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research. vol. 28, No.12 e63.
- Okuda M., Matsumoto M. and Tanaka Y., 2005. Characterization of the *tufB*-*secE*-*nusG*-*rpl*KAJL-*rpoB* Gene Cluster of the Citrus Greening Organism and Detection by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Plant Dis 89:705-711
- Zhou L. J., D. W. Gabriel, 2007. First Report of Dodder Transmission of Huanglongbing from Naturally Infected *Murraya paniculata* to Citrus. Plant Dis. 91:227