

植物防疫所 病害虫情報

No. 77

2005・11・15

植物検疫における遺伝子診断法の利用 — 遺伝子診断法を活用した病害診断 —

はじめに

近年、物流システムの発達による生鮮植物類の輸出入量の増加、海外からの遺伝資源の導入、果樹類、花き類等の国内農業生産に必要な種苗類の輸入増加などに伴い、植物検疫業務は量的にも質的にも増大の一途をたどっている。このため、多様な輸出入植物について、できるだけ短時間にかつ的確に検査することが求められている。

その対策として、植物防疫所では、従来から精力的に血清学的診断法や遺伝子診断法など簡易で迅速な診断法を検査に導入してきた。特に、PCR法に代表される遺伝子診断法は、検出の迅速性、簡便性、感度及び再現性において優れた方法であり、植物検疫へのさらなる利用が期待される。

以下、植物検疫の病害分野における遺伝子診断法の導入に関して、これまでの取組み及び今後の方向性と課題について紹介する。

1. PCR法の利用

病害診断への利用

現在では、病害の診断のため、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法が広く利用されている。本法は、短時間に大量の遺伝子のコピーを合成できることから、標的遺伝子を高感度に検出することが可能である。DNAを遺伝子として持つ細菌やファイトプラズマ、一部のウイルスなどの病原体では通常のPCR法、RNAを遺伝子として持つ多くのウイルス及び

ウイロイドではRNAからDNAを合成（逆転写）したあとPCRを行うRT-PCR法がそれぞれ利用される。

PCR法を行うためには、標的とする病原体に特異的な塩基配列の情報が必須である。近年、様々な植物病原体について遺伝子解析が行われ、膨大な塩基配列情報がインターネット上のデータベースに公開されているが、それらの中から特異的な塩基配列情報を入手し、PCRの開始点となるDNA断片（プライマー）を設計することにより、PCR法による特異的検出が可能となる。

これまで植物検疫において、PCR法が利用可能となった病原体を、表-1に示した。

核酸抽出の簡略化

一般にPCR法を用いた検定、特にウイルス、ウイロイド、ファイトプラズマなどを対象とした検定では、リ病植物から標的とする病原体の核酸（テンプレート）を取り出す核酸抽出の工程が必要である。通常、植物由来の核酸を含んだ全核酸を抽出することが多いが、抽出しようとする植物の種類、

病原体遺伝子の種類によってそれぞれに適した様々な方法がある。

核酸抽出の工程は、PCR検定において最も時間と手間を要するため、その簡略化は検定の迅速化、簡便化に直接結びつく。植物防疫所では、多様な病原体の検出のため、様々な植物から核酸抽出が行える汎用的な方法として、CTAB法やカリウム/SDS法をベースとした簡



易核酸抽出法を広く利用している。これらの方法は、全核酸を短時間（2～3時間）で効率的にしかも低コストで抽出することができ、植物検疫での利用に適している。

核酸抽出のいらないPCR検定

植物防疫所ではPCR法における核酸抽出の簡略化に加え、核酸抽出の不要なPCR検定についても検討を進めてきた。その結果、プラムポックスウイルスの検出法としてイムノキャプチャーRT-PCR法（図1）を検査に取り入れることにより、より単純な操作で検出を行うことが可能となった。

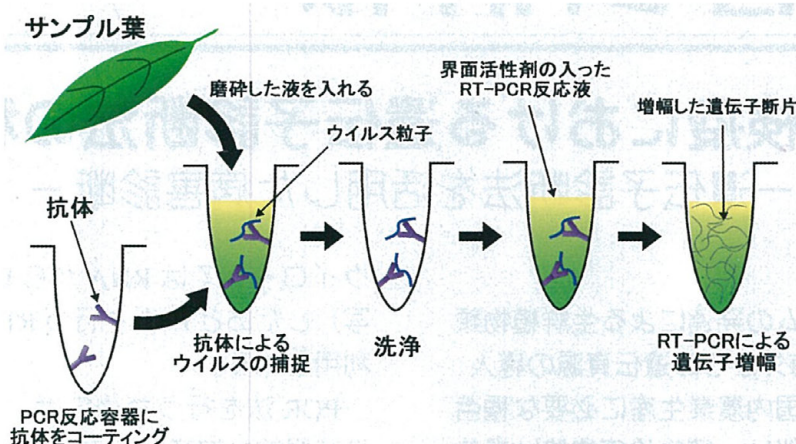


図1 イムノキャプチャーRT-PCR法による植物ウイルスの検出

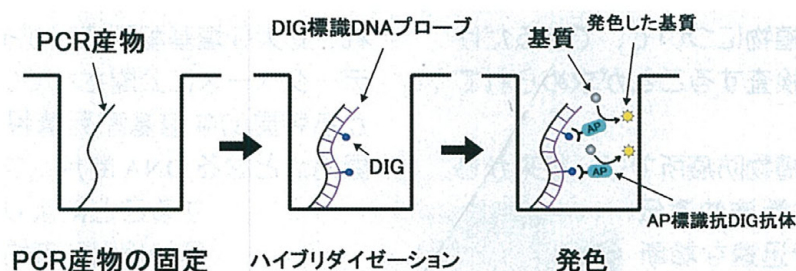


図2 PCRマイクロプレートハイブリダイゼーションの原理

PCR法の応用

PCR法の検出感度をさらに高めることにより植物体内の極めて低濃度の病原体でも検出できる技法として、PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法（図2）をウイロイド類などの検出法として取り入れた。また、PCRによる増幅DNAを制限酵素で切断してその電気泳動パターンを解析するPCR-RFLP法により、ナシ枝枯細菌病菌とこれに近縁な火傷病菌等を識別する方法を開発した。

2. 新たな技法の導入

パルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析

最近、疫学的調査を補う手段として分子疫学的技法の一つであるパルスフィールド電気泳動（PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis）法が開発された。PFGE法による細菌ゲノムDNAの制限酵素切断断片の解析は、病原性大腸菌O-157の系統分析で実用化されているように、菌株の由来（地域間差異）を特定するのに最も優れた方法とされる。

植物防疫所では、この方法を火傷病菌の識別等に利用することを現在検討している。火傷病菌の発生地域ごとの分離菌株についてPFGE法による解析を行って、それらの泳動パターンをデータベース化すれば、万が一わが国に火傷病菌が侵入した場合でも、このデータベースからその由来を特定することにより、侵入経路が推定でき、迅速・的確な対応が可能になる。

植物防疫所では、この方法を火傷病菌の識別等に利用することを現在検討している。火傷病菌の発生地域ごとの分離菌株についてPFGE法による解析を行って、それらの泳動パターンをデータベース化すれば、万が一わが国に火傷病菌が侵入した場合でも、このデータベースからその由来を特定することにより、侵入経路が推定でき、迅速・的確な対応が可能になる。

LAMP法による病原体の検出

LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法は、最近開発された遺伝子増幅法の一つである。その特徴として、①標的遺伝子部分の6つの領域を認識する4種類のプライマー（うち2種類はそれぞれ2つの領域をカバーする）を用いるため、PCR法に比べて特異性が高いこと、②鎖置換型DNAポリメラーゼを用いるため、PCRで必要な熱変性工程が不要となり一定温度（60～65℃）で増幅可能であること、③ダンベル構造を起点とする増幅による高い増幅効率のため、大量の増幅産物が得られること、及び④増幅反応の副産物として生じる不溶性物質により特異的増幅の確認を肉眼や濁度計により行うことが可能となることから、電気泳動による増幅産物の検出は不要になることが挙げられる。これらの特徴により、1ステップで極めて特異的に短時間での標的遺伝子の検出が可能になる。

現在、本法によるプラムポックスウイルス、ポテトスピンドルチューバーウイロイド、スイカ果実汚斑細菌病菌等の検疫上重要な病原体の検出法を検討中である。

現在、本法によるプラムポックスウイルス、ポテトスピンドルチューバーウイロイド、スイカ果実汚斑細菌病菌等の検疫上重要な病原体の検出法を検討中である。

3. 今後利用が期待される遺伝子診断法

遺伝子の機能解析手法として開発された網羅

的遺伝子発現解析法であるマイクロ／マクロアレイ法が、最近、病原体の検出に応用されている。その原理は、標的病原体由来の遺伝子断片（プローブ）をスポット状に固定したガラス板、メンブレン等の支持体（アレイ）の上で、ハイブリダイゼーションを行うことにより、被検体由来の遺伝子断片を検出しようというものである。これらの方法の利点は、1枚の支持体上で一度に何種もの病原体（10～数100種以上）を検出できること及び検出系の自動化が比較的容易なことである。将来、植物検疫に利用できれば、PCR法以上に検査の迅速化、簡便化が期待できる。

4. 遺伝子診断法による検査の課題

遺伝子診断法は、鋭敏な検出を可能にする反面、コンタミネーションに影響されやすく、誤った陽性の結果を招く危険性も高い。検査への利用においては、コンタミネーションの排除に努め、これが生じていないことを検証できるようなシステム作りが課題となる。

また、遺伝子診断法は塩基配列の違いを検出するものであるため、標的とする病原体とのわずかな遺伝子変異が検出の妨げになることがある。したがって、遺伝子のどの領域を検出のターゲットにするかは非常に重要である。遺伝子診断法を検査に用いるときは、病原体を直接捕らえているのではなく、特定の塩基配列部分を検出しているに過ぎないことを常に念頭に置く必要があ

る。このことは、同時に、遺伝子診断法が必ずしも生きた（活性のある）病原体のみを捕らえているのではないことを意味する。この点にも十分留意する必要がある。

おわりに

今後、植物防疫所が行う検査において、対象となる特定の病原体をより効率的に検出していくことは、ますます重要となると予想される。そのためには、これまでに述べたような遺伝子診断法をさらに積極的に検査に取り入れていく必要がある。植物検疫の現場で利用可能な検査法の開発を推進するとともに、これを組み入れた検査体制を整備していくことが急務であろう。

表-1 植物検疫に利用されている遺伝子診断法

対象病原体	宿主植物	遺伝子診断法
細菌類		
カンキツグリーニング病菌	カンキツ類	PCR法
スイカ果実汚斑細菌病菌	スイカ	PCR法
ナシ枝枯細菌病菌	ナシ、リンゴ等	PCR-RFLP法
火傷病菌	ナシ、リンゴ等	PCR法
ウイルス		
Apple stem pitting virus	リンゴ、ナシ	RT-PCR法
Apple stem grooving virus	リンゴ、ナシ	RT-PCR法
Apple chlorotic leaf spot virus	リンゴ	RT-PCR法
Citrus tatter leaf virus	カンキツ類	RT-PCR法
Citrus tristeza virus	カンキツ類	RT-PCR法
Plum pox virus	モモ、スモモ、アンズ等	IC-RT-PCR法
Grapevine berry inner necrosis virus	ブドウ	RT-PCR法
Grapevine fanleaf virus	ブドウ	RT-PCR法
Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3	ブドウ	RT-PCR法
Grapevine virus A	ブドウ	RT-PCR法
Grapevine virus B	ブドウ	RT-PCR法
Grapevine fleck virus	ブドウ	RT-PCR法
Rupestris stem pitting-associated virus	ブドウ	RT-PCR法
Strawberry mottle virus	オランダイチゴ	RT-PCR法
Strawberry mild yellow edge virus	オランダイチゴ	RT-PCR法
Strawberry vein banding virus	オランダイチゴ	PCR法
Sweet potato feathery mottle virus	オランダイチゴ	RT-PCR法
Potato leafroll virus	ジャガイモ	RT-PCR法
Tobacco rattle virus	球根類	RT-PCR法
Potyvirus (属レベルでの検出)	各種植物	RT-PCR法
ウイロイド		
Apple scar skin viroid	リンゴ	RT-PCR法
Apple fruit crinkle viroid	リンゴ	RT-PCR法
Citrus exocortis viroid	カンキツ類	RT-PCR法
Citrus viroid I, Citrus bent leaf viroid	カンキツ類	RT-PCR法
Citrus viroid -II, Citrus cachexia viroid	カンキツ類	RT-PCR法
Citrus III viroid	カンキツ類	RT-PCR法
Citrus IV viroid	カンキツ類	RT-PCR法
Citrus viroid -OS, CG	カンキツ類	RT-PCR法
Hop stant viroid	モモ、スモモ、アンズ等	RT-PCR法
Potato spindle tuber viroid	ジャガイモ、サツマイモ	RT-PCR法