

スイカ果実汚斑細菌病菌を対象とした生菌を選択的に検出する LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法の検討

白戸 奈奈¹⁾・小牟田 健慈²⁾・石井 一考³⁾・志岐 悠介・高上 直樹・
松浦 貴之・平川 崇史・清水 慶明⁴⁾・南部 耕平

横浜植物防疫所業務部

Studies of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method to Detect Viable *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Nana Shirato¹⁾, Kenji Komuta²⁾, Kazutaka Ishii³⁾, Yusuke Shiki, Naoki Takaue, Takayuki Matsuura, Takashi Hirakawa, Yoshiaki Shimizu⁴⁾ and Kohei Nanbu (Yokohama Plant Protection Station, 5-57, Kitanakadori, Naka-ku, Yokohama, 231-0003 Japan. ¹⁾ Tokyo Sub-station. ²⁾ Food Safety Commission Secretariat, Cabinet Office. ³⁾ Haneda Airport Sub-station. ⁴⁾ Research Division, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*. **51**: 43-48 (2015).

Abstract: The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) from seeds was reported (Oya *et al.*, 2008). After detection of Aac in contaminated seeds, we have to grow seeds for three weeks or more to judge the presence of viable bacteria. The method of detecting only viable bacteria, such as a food poisoning bacillus, was recently developed in and outside Japan (Nogva H. K. *et al.*, 2003; Soejima *et al.*, 2008). A kit based on the same theory as the above methods was sold by TaKaRa-Bio. This kit can detect only viable bacteria in the range of $10^4 \sim 10^8$ cfu/ml in cultured Aac cells. Moreover, it was possible to detect viable bacteria in the range of $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml in artificially contaminated seeds using the kit.

Key Words: Aac, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, LAMP, EMA, viable

緒 言

スイカ果実汚斑細菌病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (以下Aac))は、ウリ科作物に感染する植物病原細菌で、アメリカでは1989年から1995年にかけてスイカで大発生し大きな被害を出している(Latin and Hopkins, 1995)。日本でも1998年に山形県でスイカから感染が確認(菊池ら、1999; 白川ら、2000)されて以降、散発的に発生が確認されているが、その都度防除を行い、まん延を防止している。一次感染源は種子であり、育苗期の苗から収穫期の果実にまで感染し、高温多湿条件下では発病が助長され、甚大な被害を及ぼす。

このため、我が国ではAac発生国を対象として遺伝子診断法(Loop-mediated Isothermal Amplification (以下LAMP法))を種子検査に導入している(大矢ら、2008)。現在、検査上の対象は生きた菌のみであるが、現行のLAMP法を用いた検査では、死滅したAacであってもDNAが存在すれば陽性と

なるため、生菌を検出する必要があり、LAMP法で陽性を示した種子からAacの生菌を検出するためgrow out test法を用いている。しかし、当該手法は、種子を播種、育苗してAacの発病の有無を確認するため、多くの時間(3週間以上)、場所、施設及び労力を要する。このため、迅速に生菌のみを検出することが可能な遺伝子診断法が望まれていた。

近年、生菌の核酸のみを検出するPCR法が報告されたことを受け(Nogva *et al.*, 2003; Soejima *et al.*, 2008)、それらの手法を、現行のLAMP法に適応できるかを検討した。

生菌の核酸のみを検出するPCR法の原理は、死菌のDNAを効率的に修飾するEthidium monoazide (EMA)、DNAの複製に必要なトポイソメラーゼの働きを阻害するTopoisomerase poisonであるCiprofloxacin (CPFX)、Camptothecin (CPT)、Etoposide (ETP)などで処理し、死菌DNAを分解することにより、生菌DNAのみを検出するというものである。

¹⁾ 横浜植物防疫所東京支所

²⁾ 内閣府食品安全委員会事務局

³⁾ 横浜植物防疫所羽田空港支所

⁴⁾ 横浜植物防疫所調査研究部病菌担当

材料及び方法

1. 供試菌株及び種子

Aacの供試菌株には国内で分離された菌株(YPPS319)を用い、培養にはYPA固形培地(酵母エキス5g、ペプトン10g、リン酸水素二ナトリウム・12水和物4g、リン酸二水素カリウム0.5g、寒天15gを1,000mlにメスアップ)を使用し、24～36時間30℃で培養した後、滅菌蒸留水で懸濁し $10^3 \sim 10^8$ cfu/mlの濃度に調整した菌懸濁液を供試した。

健全種子はスイカ種子を供試し、死菌検出用の人工汚染種子として、 10^4 cfu/mlに調整したAac菌液1mlをスイカ種子1,000粒に混合し、80℃で2日間乾熱滅菌したものを供試した。なお、生菌検出用の人工汚染種子の作製は、野菜茶業研究所マニュアル(野菜茶業研究所(2009))を参照し、対照区として80℃2日間乾熱滅菌したものを用いた。

2. 試薬、PCR法、LAMP法及び種子からの検出法

Soejima *et al.*, (2008)の論文にあるEMAとTopoisomerase poisonを併用したPCR法を参考に、選択的膜透過性試薬にはEMA(Sigma, St. Louis, MO; 滅菌水で1mg/mlに調整)を、また、Topoisomerase poisonにはCPFEX (Buchs, Germany; 生理食塩水で0.5mg/mlに調整)、CPT (Sigma; DMSOで1mg/mlに調整)、ETP (Sigma; DMSOで1mg/mlに調整)を用いた。

PCR法、LAMP法で使用したプライマーはTable 1に示した(Schaad *et al.*, 1999; 大矢ら, 2008; Walcott *et al.*, 2003)。PCR法には、KOD FX(TOYOBO)を使用し、Schaad *et al.*, (1999)に準じた。すなわち2×PCR Buffer for KOD FX 12.5μl、dNTPs (2.0mM each) 5μl、25μM SEQID5 0.5μl、25μM SEQID4m 0.5μl、D. W. 1μl、KOD FX(1.0U/μl) 0.5μl、計20μlに対し鋳型を5μl添加した。反応条件は95℃5min→(95℃30sec→53℃30sec→72℃30sec)×40cycle→72℃5minとした。LAMP反応には、Loopamp DNA増幅試薬キット(栄

Table 1. LAMP and PCR primer sequences for detecting Aac.

	Primer name	Sequence (5' - 3')	Amplicon size
LAMP	AacLAMP20-F3	TTGATTCACCGCCGAACG	
	AacLAMP20-B3	TTACAGACGATAAATGACCCGG	
	AacLAMP20-FIP	TACGGCTGTCTACAGTCGTAGCTGACTCGCATGATTTCCCCA	
	AacLAMP20-BIP	TTGCACCTCATTGCAAATGCCCGTCTGGAATGAACTAAGCT	
	AacLAMP20-LB	TGAGTGGCGACAGACGCA	
PCR	AacSEQID4m	GTCATTACTGAATTTCACA	246bp
	AacSEQID5	CCTCCACCAACCAATACGCT	

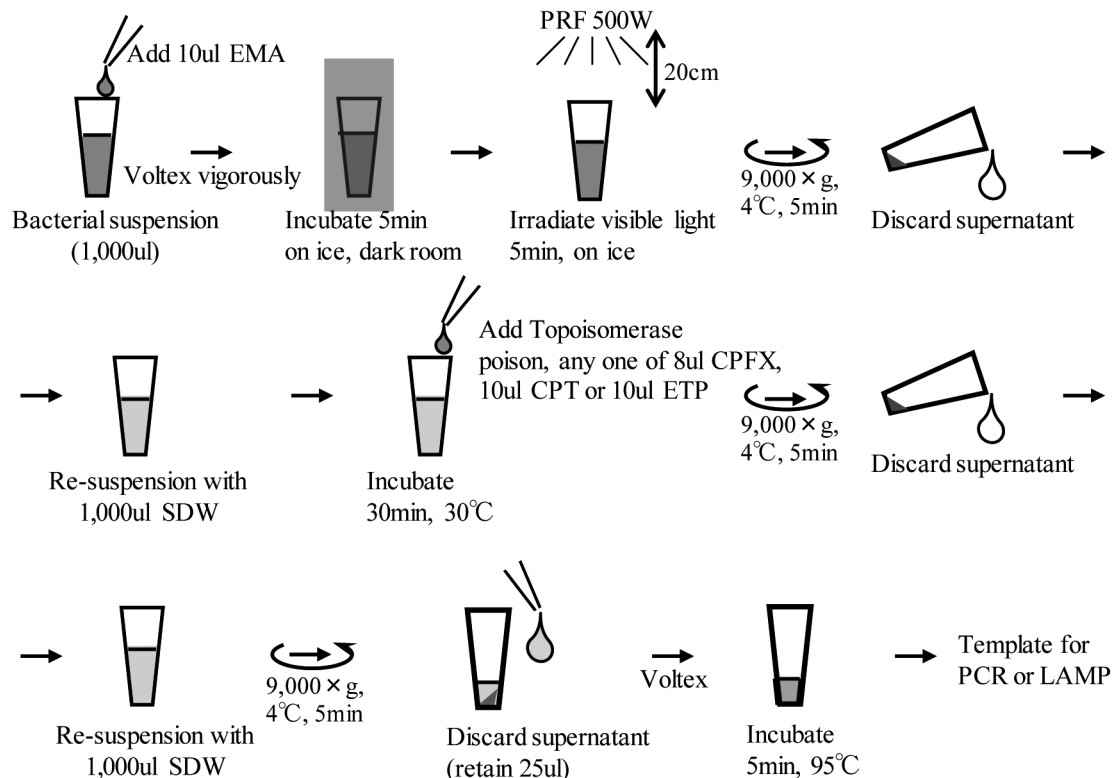


Fig. 1. Flowchart for PCR (or LAMP) method using EMA and Topoisomerase poison.

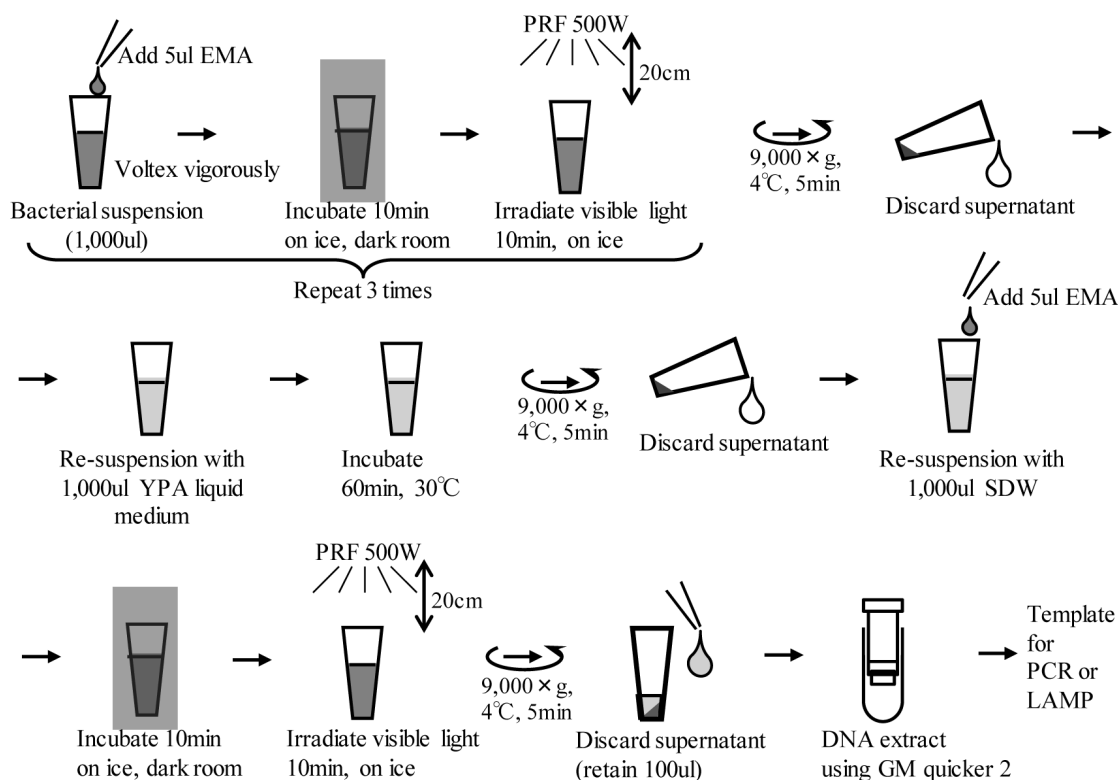


Fig. 2. Flowchart for PCR (or LAMP) method using EMA.

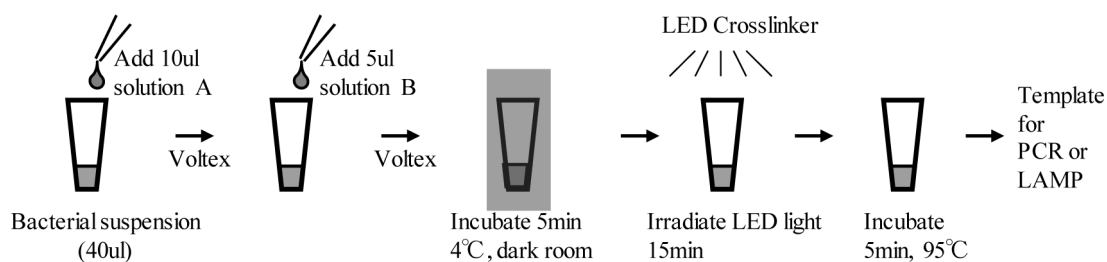


Fig. 3. Flowchart for LAMP method using "Viable Bacteria Selection Kit for PCR".

研化学)を使用し、大矢ら(2008)に準じた。すなわち65℃で90分間行い、リアルタイム濁度測定装置(LA-200、テラメックス)により濁度を測定し判定を行った。DNA抽出を行う場合はGMquicker2 (ニッポンジーン)を使用した。種子からの検出法には、大矢ら(2008)に準じた。

3. EMAやTopoisomerase poisonを使用した遺伝子診断法による生菌Aacの検出の検討

EMAとTopoisomerase poisonを使用した遺伝子診断法の検討は、Soejima *et al.*, (2008)の生菌の核酸のみを検出するPCR法(Fig. 1)をAacでも検出可能かを検証した後、最も効果的な手法(EMA-CPFX処理)及びSoejimaらの手法を改変したEMA複数回処理(Fig. 2)及び市販のViable Bacteria Selection Kit for PCR(タカラバイオ)(Fig. 3)を用いたLAMP法での実効を検討することとした。

結 果

1. EMAとTopoisomerase poisonを使用したPCR法によるAacの検出

Aac生菌のみを検出可能かを検証するため、 $10^3 \sim 10^8$ cfu/mlの菌懸濁液を2分間煮沸した死菌について、EMAとTopoisomerase poisonの効果を調査した結果、EMA-ETP処理とEMA-CPT処理では 10^4 cfu/mlまでのAacの死菌の検出を防ぐことができ、EMA-CPFX処理では 10^5 cfu/mlまでのAac死菌の検出を防ぐことができた(Fig. 4)が、これを超える濃度での死菌検出を防ぐことはできなかった。また、死菌検出用の人工汚染種子を用いてEMAとTopoisomerase poison処理及び未処理のPCR法を行ったところ、処理しなかった場合はAacが検出されたのに対し処理した場合はAacが検出されなかった(Fig. 5)。

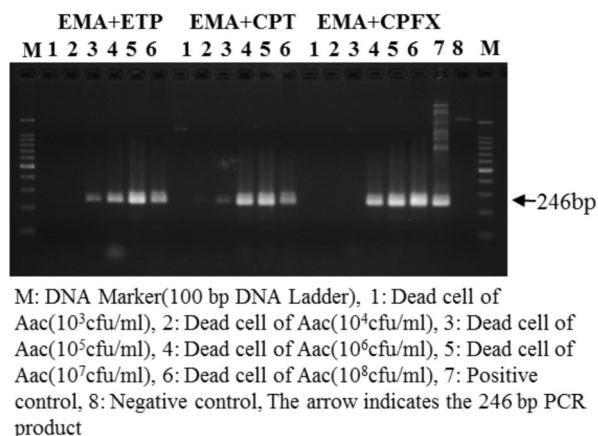


Fig. 4. Detection by PCR after chemical reagent treatment to decompose dead bacteria.

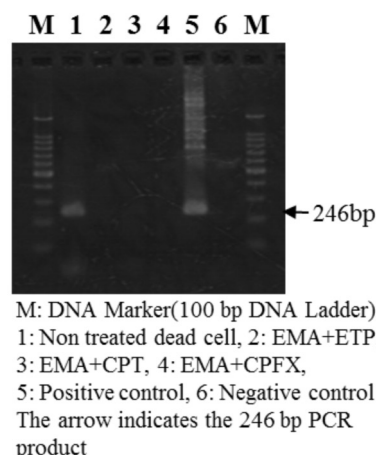


Fig. 5. Detection by PCR after chemical reagent treatment of artificially infected and sterilized seed.

Table 2. Comparison table of the result of the LAMP method.
A. Initial concentration of the bacterial culture

Treatment sample(cfu/ml)	EMA-CPFX	EMA $\times$ 4	Takara Kit
Live Bacteria 10^8	nt	○	○
Live Bacteria 10^7	nt	○	○
Live Bacteria 10^6	nt	○	○
Live Bacteria 10^5	nt	○	○
Live Bacteria 10^4	nt	○	○
Live Bacteria 10^3	nt	○	×
Dead Bacteria 10^8	○	○	×
Dead Bacteria 10^7	○	○	×
Dead Bacteria 10^6	○	○	×
Dead Bacteria 10^5	△	△	×
Dead Bacteria 10^4	×	×	×
Dead Bacteria 10^3	×	×	×

B. Artificially contaminated seeds

Treatment sample(cfu/ml)	EMA+CPFX	EMA+CPT	EMA+ETP	EMA $\times$ 4	Takara Kit	no treatment
Dead Bacteria 10^4	×	×	×	△	see Fig.8	○

○ : detected, △ : unstable, × : not detected, nt : not tested

2. EMA-CPFX処理もしくはEMA複数回処理したLAMP法によるAacの検出

EMAとTopoisomerase poisonを併用したLAMP法での検出は、1. のPCR法で死菌の検出を最も抑制できたEMA-CPFX処理により行った。試料の調製は1. と同様に作製したPCR鋳型を95℃5分間の熱処理を行い、LAMP法の鋳型として使用した。

また、EMAを複数回処理することによる死菌検出抑制についても検討した。その結果、EMA-CPFX処理後LAMP法を行ったところ、 10^4 cfu/mlまでのAacの死菌DNAの検出を防ぐことができた(Table 2 A. EMA-CPFX)。さらに、死菌検出用の人工汚染種子を用いてEMA-CPFX処理後LAMP法を行ったところ、無処理ではAacが検出されたのに対し、処理した場合はAacが検出されなかった(Table 2 B. Artificially contaminated seeds)。

また、EMA複数回処理後のLAMP法では、死菌についてはEMA-CPFX処理した場合と同等の結果であった(Table 2 A. EMA $\times$ 4)。

3. Viable Bacteria Selection Kit for PCRを使用したEMA-LAMP法

1. 及び2. からEMA-CPFX処理又はEMA複数回処理した後のLAMP法でもAac生菌のみの検出は可能と考えられたが、 10^5 cfu/ml以上の濃度で存在する死菌の検出抑制はできなかった。このためタカラバイオViable Bacteria Selection Kit for PCRを用いたLAMP法の検定を試みた。 $10^3 \sim 10^8$ cfu/mlの濃度のAac生菌及び死菌検出を試みたところ、 $10^4 \sim 10^8$ cfu/mlの濃度域で、培養菌液中の生菌を選択的に検出できた(Fig. 6)。さらに、 $10^4 \sim 10^8$ cfu/mlに調整した生菌中に死菌を 10^5 cfu/ml加え、検出の可否を調査したところ、全ての濃度で検出可能であった(Fig. 7)。

また、 $10^3 \sim 10^5$ cfu/mlの濃度で生菌検出用の人工汚染種子及び乾熱滅菌した対照区を用いて、検出の可否を調査したところ、死菌の検出は全て抑制でき、生菌の検出限界は 10^4 cfu/mlであった(Fig. 8)。

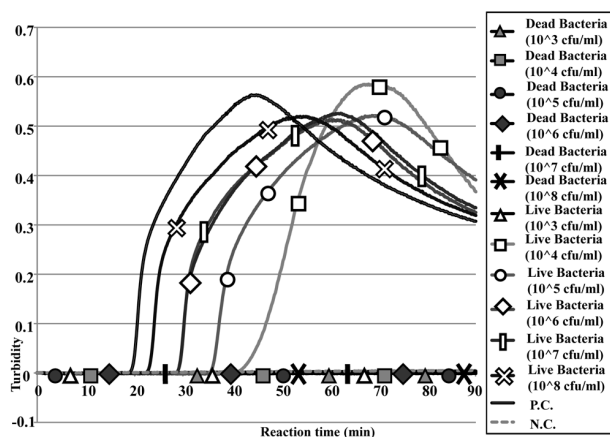


Fig. 6. The EMA-LAMP method which uses the "Viable Bacteria Selection Kit for PCR" for detecting only viable bacteria alternatively. Detection of dead Aac (less than 10^8 cfu/ml) was controlled.

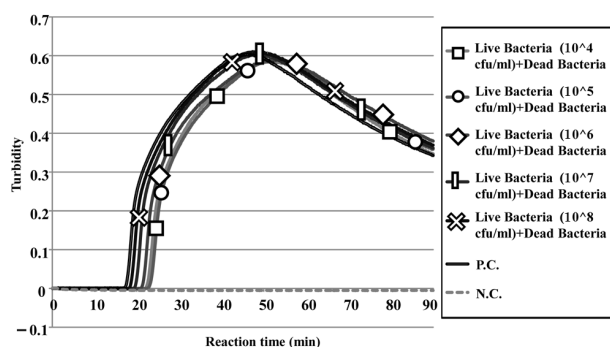


Fig. 7. The EMA-LAMP method using the Kit on an intermingled sample of dead and viable Aac. The outfit was able to detect viable bacteria without the effect of dead Aac.

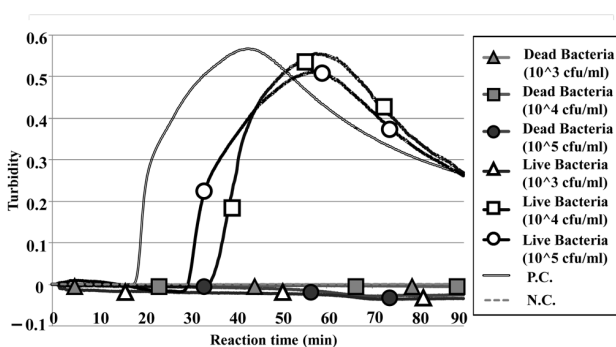


Fig. 8. The EMA-LAMP method using artificially infected seed and the Kit. Detection of dead Aac was controlled and viable Aac was detected between 10^4 cfu/ml and 10^5 cfu/ml.

考 察

EMAとTopoisomerase poisonを使用したPCR法では、PCR阻害は認められなかったものの、 10^5 cfu/mlを超える高濃度で存在する死菌の検出を抑制することはできなかった。また、EMAとTopoisomerase poisonを使用したLAMP法と、EMAを複数回添加したLAMP法についてもほぼ同様の結果となった。これは、PCRやLAMP反応における死菌DNAの増幅を抑制するためのEMA及びTopoisomerase poison処理条件が最適でなかったためと考えられる。一方で、Viable Bacteria Selection Kit for PCRを使用し生菌のみを検出するLAMP法は、高濃度に存在する死菌を検出することなく、培養菌液では初期濃度 $10^4 \sim 10^8$ cfu/mlの間において迅速に生菌のみを選択的に検出することが可能であった。また、人工汚染種子を用いた場合は $10^4 \sim 10^5$ cfu/mlの間で生菌の選択的検出が可能であったが、通常のLAMP法の検出限界(10^3 cfu/ml)と比較し、検出感度が低下した(Fig. 8)。これは、EMAの影響や検出時のステップが通常のメンブレンフィルター法よりも増えたことなどによる菌体回収率の低下が影響を及ぼしていると考えられる。

これらの結果から、Viable Bacteria Selection Kit for PCRを用いたAacのLAMP法は、迅速な判断を必要とする輸入検査の現場において、種子表面上の生菌を捉える方法の一つとして、十分な能力を有すると考えられ、他の種子伝染性細菌等にも応用が利くと考えられる。

一方で、今回の試験では、人工汚染種子を発芽させた時の発病率や自然汚染種子による試験ができなかったことから、本手法のみによる検疫措置の導入に際しては、専門家を交えた十分な検証と議論を行う必要がある。

謝 辞

本調査を遂行するに当たり、EMAの添加方法等、実験内容についてご助言をいただいた森永乳業株式会社の副島隆志博士に、厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Latin, R. X. and D. L. Hopkins (1995) Bacterial fruit blotch of watermelon: The Hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* **79**(8): 761-765.
- Nogva, H. K., S. M. Dromtorp, H. Nissen, K. Rudi (2003) Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5, nuclease PCR. *BioTechniques.* **34**(4): 804-813.
- Schaad, N. W., W. Y. Song and E. Hatziloukas (1999) PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent 6146834.
- Soejima, T., K. Iida, Q. Tian, H. Taniai, M. Seki and

- S. Yoshida (2008) Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. J. Clin. Microbiol., **46**(7): 2305-2313.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., and Castro, A. C. 2003. Role of blossom in watermelon seed infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* phytopathology **93**: 528-534.
- 大矢仁志・中川寛章・齊藤範彦・上松寛・小原達二 (2008) LAMP法を用いた種子からのスイカ果実汚斑細菌病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) の検出. 日植病報 **74**: 304-310.
- 菊池繁美・加藤智弘・本間隆・石山久悦・白川隆・我孫子和雄 (1999) 我が国で発生したスイカ果実汚斑細菌病: (1) 現地の発生実態と病徴. 日植病報 **65**: 359 (講要).
- 白川隆・菊池繁美・加藤智弘・我孫子和雄・川合昭 (2000) 日本におけるスイカ果実汚斑細菌病の発生. 日植病報 **66**: 223-231.
- タカラバイオ. Viable Bacteria Selectionシステムによる生菌由来DNAの選択的検出(EMA-PCR法)
〈http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?catcd=B1000711&subcatcd=B1000772&unitid=U100006890〉, (accessed_2012-3-20).
- 野菜茶業研究所 (2009) 『ウリ科野菜果実汚斑細菌病防除マニュアル(種子生産・検査用)』
〈http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/uri-2.pdf〉