

特集：キクわい化病

キクわい化ウイルスの検出技術と フリー化の現状と問題点

JA和歌山県農・植物バイオセンター 平 田 行 正

はじめに

和歌山県では、1990年代に入り、スプレーギク産地の成長に伴い、キクわい化病が特に問題となってきた。和歌山県経済農業協同組合連合会ではJA、生産者と連携し、ウイルス病対策に取りかかってきた。当センターは、本来、組織培養を用いた苗増殖が得意であるが、必要に迫られてウイルスの検出技術、フリー化技術を試行錯誤してきた。その経過を簡単に報告する。

I キクわい化ウイルスの検出技術

ウイルスはタンパク質をもたないため、ウイルスに用いられるELISA法などの血清学的診断法が適用できない。検出技術は、生物検定のほかには、遺伝子そのものを検出する電気泳動、ドットプロットハイブリダイゼーション、RT-PCR、RT-PCR hybridization、NASBA法などが知られている(HAYATA, 1999)。当センターでは、10年以上の間、主に栽培株にはcRNAプローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションによるCSVd検定を行っていた。だが、まれにはあるが、検定で陰性反応だった株を夏の間親株に使ったところ、夏の終わりに採種したロットからキクわい化病が大発生した事例が報告され、ドットプロットハイブリダイゼーションによる検定では検出感度が不足していると思われた。さらに感度の高いCSVd検定法となると、培養苗のCSVd検定に用いていたRT-PCR-hybridizationが考えられたが、手法が煩雑なうえ、キク体内の阻害物質のため、RT-PCR反応が阻害され、実際の検出感度はドットプロットハイブリダイゼーションよりわずかに優れる程度だと感じており、実用的に感度の高い検出法が必要であった。

近年、LAMP、ICAN™ (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids: 等温遺伝子増殖法)、Invader Assayなど新しい高感度検出のた

めの手法が開発され、当センターでも実用化の可能性について検討を行った。その結果、JA和歌山県農では栄研化学(株)より、植物のウイルス・ウイルス分野におけるLAMP法のライセンスを取得するに至った(2002年10月10日)。

LAMPとはLoop-Mediated Isothermal Amplificationの略で、PCRに代わる増幅法として栄研化学(株)が独自に開発し、既に米国ならびに日本で特許が成立している純国産遺伝子増幅法である。

細かな原理は割愛するが、LAMP法は、本来、遺伝子診断用に開発された手法であるため、他の遺伝子増幅法に比べて操作が簡便である、短時間で検出できる、特異性が高い、安価にできるなどの特徴をもっている(NOTOMI et al., 2002)。

II RT-LAMP法によるCSVdの検出

CSVd検査において、ポジティブコントロールとして維持しているスプレーギク‘セリアルプス’を用いて、RT-LAMP法によるCSVdの検出を試みた。対照として、LAMP法と同様に簡便なsingle tube RT-PCR法(OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN)を用い、まず、PAGE精製CSVd-RNAの検出を試みたところ、RT-LAMP法はsingle tube RT-PCR法より10万倍高い感度を示した(表-1)。

さらに、精製度の異なる様々な鋳型RNAを調整し、検出を試みたところ、single tube RT-PCR法では、精製度の高い鋳型RNAを用いなければ検出ができなかったのに対し、RT-LAMP法では、若いキクの葉を蒸留水ですりつぶしたり、幼葉の極小片を反応液中に入れるだけでも増幅産物が得られた(図-1; 平田ら, 2002)。

LAMP法は反応が始まるとその桁外れな遺伝子増幅のため、反応液内に副生成物としてピロリン酸マグネシウムが生じ、白濁する。検出手段として、この濁度を用いるとさらに検出効率も良くなる。CSVd罹病株の抽出RNAを10倍ずつの希釈段階でリアルタイム濁度計(テラメックスLA-200)で検出すると1億倍希釈まではほぼ定量的に、しかも30分程度で検出が可能だった(図-2; 平田ら, 2003)。cRNAプローブを用いたドットプロ

Recent Research and Problem in Chrysanthemum Stunt Viroid Diagnosis and Elimination. By Yukimasa HIRATA

(キーワード: キク, ウィロイド, キクわい化ウィロイド, 検出, フリー化)