

# 植物検疫の病害分野における遺伝子診断技法の利用

農林水産省横浜植物防疫所 小 原 達 二

## はじめに

農林水産省植物防疫所が行う植物検疫業務は、海外からの検疫害虫の侵入を未然に防ぐために海港・空港で行われる輸入検疫、重要病害虫の国内でのまん延を防ぐため行われる国内検疫、また、日本からの植物類を輸出する際に諸外国の要求に応じて実施される輸出検疫などからなっている。

植物検疫業務が対象とする植物や病害虫は、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頻繁な導入、果樹類、花き類等国内の農業生産に必要な種苗類の輸入増大などに伴いその量、質とも増大の一途をたどっている。このため、輸出入される多様な植物について、より短期間により多くのものを的確に検査することが求められている。

こうした植物類の輸出入にかかわる状況の変化に対応するため、植物防疫所では、従来より、血清学的診断技法や遺伝子診断技法などの理化学的な検査技法の導入を積極的に行ってきたが、その中でもPCR法に代表される遺伝子診断技法は、検出の迅速性、簡便性、感度、効率および信頼性において特に優れた技法であり、植物検疫の目的を達成するのに適した方法と期待される。

本稿では、病害分野における遺伝子診断技法の利用について、植物防疫所によるこれまでの取り組みおよび今後の導入計画を紹介する。

## I 遺伝子診断技法の活用面

### 1 輸出入検査の迅速化・高精度化

種苗類、特に生植物の輸出入検疫では、鮮度など植物の価値を損なうことのないよう適切な検査措置を実施することが重要である。したがって、より迅速で的確な検査対応が要求される。また、海外から輸入される種子や栄養繁殖する苗木・穂木、球根類などは、これが第一次伝染源となって侵入したウイルス病などがまん延する危険性が高いことから、特に精度の高い検査をする必要がある。このような植物の検査において、遺伝子診断技法は、迅速性と信頼性の高さから有用な検査手段であるといえる。

栄養繁殖するもののうち我が国で栽培される主要な作物については、一定期間隔離栽培して検査を行う検疫制

度がある。隔離栽培対象植物が大量に輸入される場合、これを一定期間植付けて検査するために必要とする広大な隔離圃場の確保、栽培管理上の多大な労力の負担などの問題から、常に隔離栽培の実施に困難さがつきまとう。また、接木接種検定、汁液接種検定等の生物検定が欠かせない隔離栽培検査においては、大量の検体は検査に多大な労力を必要とする。もし、検査の対象となる病害の一部でも遺伝子診断技法による検出ができれば、これによりスクリーニングを行うことで効率的な検査が可能となる。

輸出検疫においては、相手国から、特定の病害に侵されていないことを証明するよう要求される場合がある。この場合、対象とすべき病原体の検出に遺伝子診断技法が利用できれば、その効果は極めて大きい。

### 2 重要病害の侵入阻止

海外に発生する重要病害で我が国が特に侵入を警戒するものについては、その危険度や検査の難易度などに応じて輸入そのものを禁止するほか、輸出国に対する栽培地検査の要求や特定重要病害として輸入時の検疫強化といった措置を実施している。特定重要病害に指定されている病害については、「検査指標」に具体的な検査手順を定め重点的な検査を行っている。その中には、既にPCR法など遺伝子診断技法による検査が規定されているものもある。

### 3 国内検査の迅速化、高精度化

国内に流通するジャガイモの種いもや一部の果樹母樹については、優良種苗の管理、供給の目的で主にウイルス病を対象とした検疫（指定種苗検疫、果樹母樹検疫）が行われている。これらの種苗は、繁殖・増殖に使われるため病害のまん延源となる危険性があり、その検査にはより高い精度が要求される。遺伝子診断技法は、簡便でありながら高い検定精度が確保できることから、この目的に適している。

カンキツグリーニング病のような国内で新たに発生した重要病害について、初動対策として発生調査を行う場合にも、遺伝子診断法は利用価値が高い。このような対策においては、まず第一に迅速であること、第二に調査の確かさが重要となる。その意味で、遺伝子診断技法の利用は理にかなっている。

また、リンゴ、ナシの火傷病など未発生の重要病害の新たな侵入に備え、その侵入経路をいち早く特定できる技術を確立しておくことは重要である。その侵入経路を速やかに特定することにより、その後の新たな侵入を遮

Application of Gene Diagnosis for Plant Disease Quarantine.

By Tatsuji OHARA

(キーワード：植物検疫，病害，遺伝子診断)

断することができる。侵入経路の特定には、病原体遺伝子の地域間差異を検出することが有効と考えられ、病原ゲノム DNA の制限酵素切断断片の多型解析技法が利用できる。

## II PCR法の導入

### 1 病害の診断・同定のためのPCR法の利用

現在では、病害の診断・同定のため、病原体の検出法としてPCR法が広く利用されている。PCRとはPolymerase Chain Reaction, すなわちDNAポリメラーゼによる連続的なDNA合成反応である。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できる。PCR法の原理や手順については、

本誌(佐野, 1990)を参照いただきたい。細菌やファイトプラズマ、一部のウイルスなどDNA(デオキシリボ核酸)を遺伝子としてもつ病原体では通常のPCR法が使われる。RNA(リボ核酸)を遺伝子としてもつ多くのウイルスおよびウイロイドでは、RNAからDNAを合成(逆転写)してからPCRを行うRT-PCR法が利用される。

PCR法, RT-PCR法を行うためには、標的とする病原体に特異的な配列部分を含む塩基配列情報が必須であるが、近年、多くの植物病原体について遺伝子解析が行われ、数多くの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。それらの情報に基づき、PCRの開始点となるDNA断片(プライマー)が設計さ

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
<b>細菌類</b>		
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
<b>ウイルス</b>		
<i>Apple stem pitting virus</i>	リンゴ, ナシ	RT-PCR法
<i>Apple stem grooving virus</i>	リンゴ, ナシ	RT-PCR法
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	リンゴ	RT-PCR法
Citrus tatter leaf virus	カンキツ類	RT-PCR法
<i>Citrus tristeza virus</i>	カンキツ類	RT-PCR法
<i>Plum pox virus</i>	モモ, スモモ, アンズ等	IC-RT-PCR法
<i>Grapevine berry inner necrosis virus</i>	ブドウ	RT-PCR法
<i>Grapevine fanleaf virus</i>	ブドウ	RT-PCR法
Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3	ブドウ	RT-PCR法
<i>Grapevine virus A</i>	ブドウ	RT-PCR法
<i>Grapevine virus B</i>	ブドウ	RT-PCR法
Grapevine fleck virus	ブドウ	RT-PCR法
<i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>	ブドウ	RT-PCR法
Strawberry mottle virus	オランダイチゴ	RT-PCR法
<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>	オランダイチゴ	RT-PCR法
<i>Strawberry vein banding virus</i>	オランダイチゴ	PCR法
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	オランダイチゴ	RT-PCR法
<i>Potato leafroll virus</i>	ジャガイモ	RT-PCR法
<i>Tobacco rattle virus</i>	球根類	RT-PCR法
<i>Potyvirus</i> (ディジェネレート)	各種植物	RT-PCR法
<b>ウイロイド</b>		
<i>Apple scar skin viroid</i>	リンゴ	RT-PCR法
<i>Apple fruit crinkle viroid</i>	リンゴ	RT-PCR法
<i>Citrus exocortis viroid</i>	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
<i>Citrus III viroid</i>	カンキツ類	RT-PCR法
<i>Citrus IV viroid</i>	カンキツ類	RT-PCR法
Citrus viroid-OS, CG	カンキツ類	RT-PCR法
<i>Hop stant viroid</i>	モモ, スモモ, アンズ等	RT-PCR法
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	ジャガイモ, サツマイモ	RT-PCR法

れ、PCR法による特異的な検出が可能となる。

これまで植物検疫において、PCR法、RT-PCR法等による検出が可能となった病原体について、表-1に列挙した。

## 2 核酸抽出の簡略化

一般に、PCR法やRT-PCR法で検出を行うためには、罹病植物から標的とする病原体の核酸(テンプレート)を取り出すための核酸抽出の工程が必要である。通常は、病原体の核酸のみを純粋に抽出する必要はなく、全核酸として植物由来の核酸ごと抽出すればよい。核酸抽出の方法には多くの方法があるが、抽出しようとする植物の種類、病原体の遺伝子の種類によってそれぞれ適した方法がある。

核酸抽出の工程は、PCR法において最も時間と手間を要するもので、これを簡略化することは検出法全体の迅速化、簡便化に直接つながる。植物防疫所では、様々な植物から多様な病原体について核酸抽出が行える方法として、CTAB法(Doyle et al., 1987)やカリウム/SDS法(Dellaporta et al., 1983)をベースとした簡易核酸抽出法を常用している。これらの方法は、全DNA、全RNAを短時間で効率的に抽出することができ、PCRテンプレートの調製法として非常に有用である。

## 3 核酸抽出のいらぬ PCR 法

植物防疫所ではPCR法における核酸抽出の簡略化に加え、核酸抽出のいらぬPCR法についても検討を進めてきた。その結果、プラムボ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: IC-RT-PCR法(Wetzell et al., 1991; Adams et al., 1999)を導入し(図-1)、また、カンキツグリーニング病菌の検出法としてチューブ吸着法によるPCR法(小原・會澤, 1997)を開発(図-2)するなどした。

## 4 PCR法の応用

PCR法の検出感度をさらに高め、植物体内の極めて低濃度のウイロイドでも検出できる手法として、PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション(図-3)をカンキツエキソコーティスウイロイドなどの検出法として導入した(齊藤ら, 1994)。また、PCRによる増幅DNAを制限酵素で消化したあと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などを識別する方法を開発した(松浦ら, 2004)。

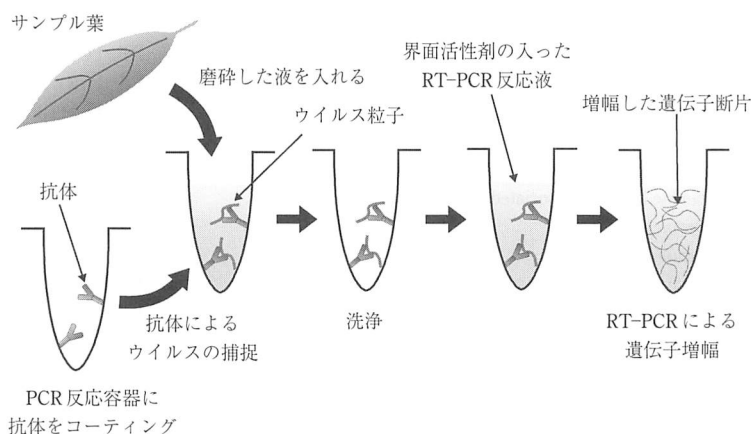


図-1 イムノキャプチャー RT-PCR法による植物ウイルスの検出

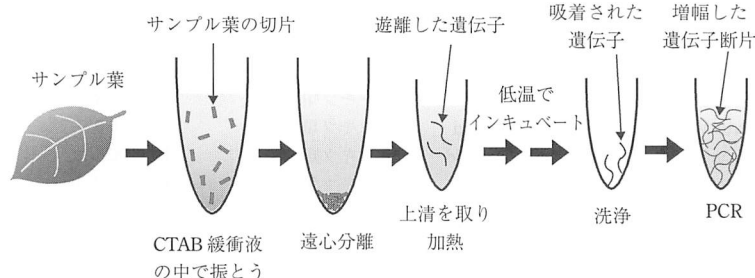


図-2 吸着法を用いた PCR法によるカンキツグリーニング病菌の検出

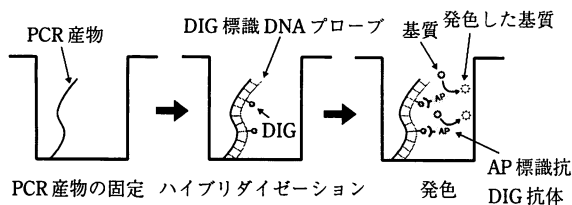


図-3 RCR-マイクロプレートハイブリダイゼーションの原理

### III 新たな技法の導入

#### 1 パルスフィールド電気泳動法を用いた遺伝子解析

最近、疫学的調査を補う手段として分子疫学的手法が開発された。パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) を用いた細菌ゲノム DNA の制限酵素切断断片の解析は、病原性大腸菌 O-157 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、これをリング、ナシの火傷病について導入することを検討している。発生地域ごとの火傷病菌株について PFGE 法による解析を行いそれらの泳動パターンをデータベース化することにより、我が国に火傷病菌が侵入した場合、その由来を特定し、侵入経路を推定することが可能になると考えられる。

#### 2 LAMP 法を用いた病原体の検出

LAMP 法は、最近開発された新規の遺伝子増幅法である。LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) とは、中間生成物のループ状構造を両端にもつダンベル型 DNA 断片を起点として一定温度で遺伝子増幅が行われることを意味する。LAMP 法の特徴として、①標的遺伝子部分の六つの領域を認識する 4 種類のプライマー (うち 2 種類はそれぞれ二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 では必要な熱変性が不要で一定温度 (60 ~ 65℃) での増幅が可能なこと、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、および④増幅反応の副産物として不溶性物質が生じることから、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り、電気泳動による検出が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標的遺伝子の検出が可能になる。

現在、プラムボックスウイルスやポテトスピンドルチューバーウイルスなどの未侵入重要病害について、LAMP 法による病原体の検出を検討している。

### IV 今後導入が期待される技術

もともと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アレイ法およびマイクロアレイ法が、最近、病原体の検出に応用されている。原理的には、ガラス板、メンブレン等の支持体の上に固定した標的病原体由来の遺伝子断片 (プローブ) と、PCR 法などで標識した検出対象由来の遺伝子断片との間で行うハイブリダイゼーション (分子交雑種形成) である。本法の利点は、1 枚の支持体上で一度に何種もの病原体 (10 種以上) を検出できることおよび検出系の自動化が比較的容易であることである。植物検疫に利用すれば、PCR 法以上に検査の迅速化が期待できる。

### V 遺伝子診断技法による検査の問題点

遺伝子診断技法は、鋭敏な検出を可能にする反面、クロスコンタミネーションに影響されやすい。検査に用いれば、より高感度に病原体を検出できる代わりに、誤った陽性の結果を招く危険性も高くなる。検査法の検討においては、クロス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、遺伝子診断技法は塩基配列の違いを検出するのであるため、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、特異的な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。

### おわりに

遺伝子診断のような高度な検出技法の導入は、より適切な植物検疫の実施に役立つ。それには、大学、独立行政法人研究機関、都道府県研究機関等の関係機関との協力・連携が欠かせない。有用な植物を害する病害虫の侵入・まん延を防止することにより、我が国の農業生産の安全・安定に寄与することは、病害虫防除研究、検疫・防疫行政に携わる者の共通した使命である。そのために、病害虫の研究を行い、合理的な検査法や防除法の開発、適切なリスク解析などを実施し、それを農業現場や検疫現場に導入していけるよう関係機関がうまく連携していくことが大切であろう。

### 引用文献

- 1) ADAMS, A. N. et al. (1999) : *Plant path.* 48 : 240 ~ 244.
- 2) DELLAPORTA, S. L. et al. (1983) : *Plant Mol. Biol. Rep.* 4 : 19 ~ 21.
- 3) DOYLE, J. J. and J. L. DOYLE (1987) : *Phytochem. Bull.* 19 : 11 ~ 15.
- 4) 松浦貴之ら (2004) : *植防研報* 40 : 107 ~ 111.
- 5) 小原達二・會澤雅夫 (1997) : *日植病報* 63(6) : 502 (講要).
- 6) 齊藤範彦ら (1994) : *植物防疫* 48 : 169 ~ 173.
- 7) 佐野輝男 (1990) : 同上 44 : 557 ~ 561.
- 8) WETZEL, T. et al. (1991) : *J. Virol. Meth.* 39 : 27 ~ 37.