

特集：カンキツグリーニング病

カンキツグリーニング病の高精度検定法の開発

九州沖縄農業研究センター ^{いわなみ}岩波 ^{とおる}徹*・^{おくだ}奥田 ^{みつる}充

はじめに

カンキツは、南西諸島および九州本土における重要作物である。カンキツグリーニング病は、世界の産地で壊滅的な被害を及ぼしている。本病は樹を枯死に至らしめ、ミカンキジラミによって虫媒拡散するうえに、発生初期では他の衰弱症と外見上判別できず、対策が遅れる難防除病害である。主な発生地域は、中国南部、台湾、東南アジアで、我が国への侵入が警戒されていた。ところが、1994年より沖縄本島各地で発生し、2002年以後、鹿児島県与論島、徳之島、喜界島で感染樹が発見された。発生域が北上を続けているように見えること、媒介昆虫のミカンキジラミが奄美大島までは普通に分布していることなどから、南西諸島全域及のカンキツにとって深刻な問題となることが懸念されている。

本病のまん延防止には、発生初期の段階における病原細菌の早期発見と早期伐採が重要で、このためには簡便な高精度検定法が不可欠である。ところが、本病の症状は樹の衰弱であり特異的なものではないので、微量要素欠乏症など類似障害との識別が困難である。また病原細菌は難培養性微生物で、師部細胞に非常に低濃度で局在しているため、通常の植物ウイルスや植物病原細菌で用いられるエライザ法などの簡易血清学的検出法の適用が極めて困難であった。この問題に対処するため、病原細菌の遺伝子を特異的に増幅して感度を高めたいくつかの高精度遺伝子診断法が開発された。その中で polymerase chain reaction (PCR) 法と loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法はプロトコルが最適化されて、高精度でかつ迅速簡便な検出方法として確立されている。本稿では、これらの検出方法を中心にカンキツグリーニング病の高精度検定法の概要を紹介したい。

I PCR 法

PCR 法は、熱変成と酵素反応の繰り返しにより微量な核酸を3, 4時間の反応時間で指数的に増幅する方法で、遺伝子工学の分野では確立した方法である。本法を適用するには、病原細菌遺伝子の塩基配列情報に基づいて最適なプライマーを設計する必要があるが、カンキツグリーニング病原細菌は培養が不可能なため、特異的な遺伝子の単離が遅れていた。フランスの研究グループが、特異的な遺伝子断片の塩基配列を決定して以来、いくつかのプライマーが考案されている (HUNG et al., 2004; JAGOUËIX et al., 1996)。筆者の経験では、どのプライマーを用いても感度はほぼ同じである。増幅に用いる耐熱性ポリメラーゼは各メーカーから販売されているが、各々の酵素で最適化した場合感度に大差はないようである。特殊な耐熱酵素を2種類混合し、やや複雑な反応ステップを行う Long PCR 法では通常の PCR 法より感度が1,000倍以上向上したとの報告もあるが (Hoy et al., 2001)、筆者の研究室では再現性が認められなかった。

PCR 法を用いてカンキツグリーニング病の検定を実際に行うには、まず罹病が疑われる樹の葉から鋳型となる核酸を抽出する必要がある。筆者の研究室では、植物からの全核酸抽出によく用いられる CTAB 法を採用している。CTAB 法 (MURRAY and THOMPSON, 1980) は比較的簡便な方法であるが、抽出試料に混在する不純物が PCR 反応を阻害することがあるのが欠点である。このような場合、粗抽出試料を珪藻土などを用いてさらに精製すると PCR 反応が問題なく進むことが多い。その他様々な核酸抽出法が試みられているが、CTAB 法より簡便さと感度が格段に向上することはないようである。今後この点を改良すれば、PCR 法や後述する LAMP 法を利用したカンキツグリーニング病の高精度診断はさらに普及すると考えられる。

II LAMP 法

PCR 法は感度の高い優れた検出法であるが、病組織からの遺伝子抽出が2時間、遺伝子増幅に3時間、電気泳動と染色に1時間を要する。一方、最近開発された LAMP 法は、反応時間が30分程度で、PCR 法と同等以

Sensitive Detection Methods of Citrus Greening Organism.

By Toru IWANAMI and Mitsuru OKUDA

(キーワード：カンキツグリーニング病, LAMP 法, 高精度検定法)

*現所属：果樹研究所

上の感度をもつ優れた方法である。LAMP 法は栄研化学株式会社により開発された方法で、4 種類のプライマーと鎖置換型 DNA 合成酵素を用いて標的とする遺伝子領域を増幅する技術である。4 種類のプライマーのうち、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て設計されており、増幅時に環状構造 (Loop) を形成する。この構造が LAMP 法による増幅反応の特徴となっており、効率的な増幅に役立っている。LAMP 法の反応原理については、栄研化学(株)のホームページ http://loopamp.eiken.co.jp/j/i_research/virtual/index.html に詳しく解説されている。LAMP 法は一定温度で反応が進行するため、PCR で必要となるサーマルサイクラーを必要としないなど設備負担が比較的少ない。また、反応時間も PCR の 2 ～ 3 時間と比較して、LAMP 法は 15 ～ 60 分と短く、迅速に診断を行うことができる。筆者らは、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「難防除病害カンキツグリーンング病の拡大阻止技術の開発」において、カンキツグリーンング病の診断に LAMP 法を適用するための試験を行った (Okuda et al., 2005)。カンキツグリーンング病病原細菌で報告されている遺伝子領域の一つである *rpl* KJAL-*rpoB* オペロンと呼ばれる遺伝子領域を標的としてプライマーを設計し、LAMP 法による増幅を行った。LAMP 法による増幅では標的領域を最少単位とする DNA 断片とその複数倍の分子量の DNA 断片が無数に合成されるため、電気泳動像はハシゴ (Ladder) 状となる (図-1)。試験の結果、罹病樹からのサンプルでのみ特異的な増幅が得られたことから、

LAMP 法はカンキツグリーンング病感染の診断に有効であることが示された。我々はさらに LAMP 反応産物をナイロン膜に滴下し、AzurB で染色することで、電気泳動を行わずに増幅の有無を確認する方法を開発した (図-1)。本法の開発により反応と検出が 35 分ほどで完了することになるが、前処理としての遺伝子抽出は PCR 法と同じく 2 時間を要するので、検出に必要な時間は 2 時間 35 分である。この技術は、技術講習会などで九州各県の農業試験場と植物防疫所に普及を計っている。なお、LAMP 法を開発した栄研化学では、LAMP 反応産物の生成を反応液の濁度で測定する濁度計を発売している。濁度計を使用すれば、上述の AzurB 染色の手間と時間を省くことも可能である。

グリーンング病は、大きくアジア型とアフリカ型に類別される。一般的にアジア型の方がアフリカ型よりは症状が激しいとされるが、特に前者は高温 (27 ～ 30℃) でも症状がよく発現するのに対し、後者は高温条件下では症状が隠蔽されるのが特徴である。アジア型とアフリカ型の病原細菌は、それぞれ *Candidatus Liberibacter asiaticus* および *Candidatus Liberibacter africanus* と仮称されており、遺伝子の塩基配列でも明確に区別されているので、ほぼ別種の細菌と考えてよいようである。鹿児島県、沖縄県で発生しているグリーンング病はすべてアジア型である。アジア型とアフリカ型との違いほど大きくはないが、アジア型の中にも若干遺伝子の変異が認められる。日本とインドネシア、ベトナムの病原細菌分離株で *rpl* KJAL-*rpoB* オペロン領域の塩基配列を比較すると、0.1% 程度の割合で塩基が変化している。この差は、PCR 反応産物の制限酵素処理によっても明確に検出される (図-2)。一方、これまで調査した範囲では日本国内の分離株間には全く変異が認められていない。上述の LAMP 法でプライマーのアニールする部位の塩基配列は、日本と東南アジアのすべての分離株で 100% 一

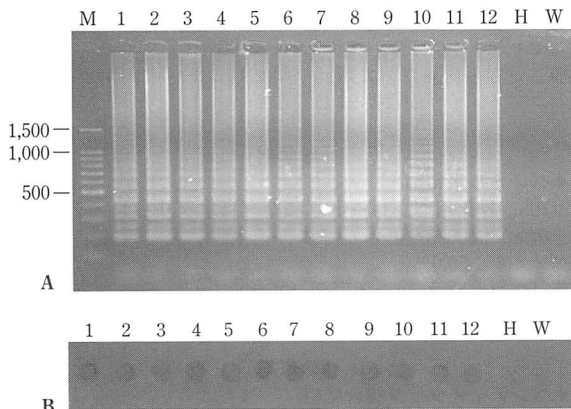


図-1 LAMP 法による病原細菌の検出
A: 反応産物のアガロースゲル電気泳動像. B: 反応産物をナイロン膜に滴下し、AzurB 染色した。1 ～ 12 は沖縄県、鹿児島県で採集したサンプル、H と W は、健全カンキツおよび蒸留水。

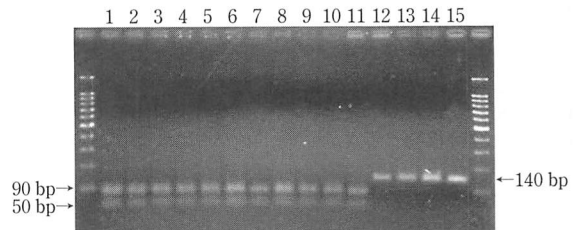


図-2 カンキツグリーンング病原細菌の *rpl* オペロン領域の一部を PCR 法で増殖し、制限酵素で処理した後のアガロースゲル電気泳動像
1 ～ 11 は日本の分離株、12 ～ 15 はインドネシア分離株。両端は分子量マーカー。

致している。このため、日本と東南アジアに分布するすべてのカンキツグリーニング病原細菌が LAMP 法で漏れなく検出されるはずである。

III サンプルングの問題

PCR 法や LAMP 法は高精度な診断法ではあるが、極端に病原細菌が低濃度である葉から安定して検出することは技術的に困難である。筆者の研究室で通常行っている PCR 法や LAMP 法では、葉の中肋 1g 当たり約 500 万コピーの病原細菌遺伝子が存在していれば安定して検出されるが、その 100 分の 1 程度の濃度しか存在しない場合、検出されないことが多い。なお、ここで述べる感染組織中の細菌遺伝子コピー数は、抽出効率が 100% であると仮定した場合のコピー数であり、ロスを考慮すると安定した検出にはさらに多くの細菌遺伝子が存在している必要がある。現在の PCR 法や LAMP 法の感度を 100 倍以上向上させることは可能であるが、あまり感度を上げるとサンプル間でのコンタミネーションを起こし、陰性のサンプルを陽性と判断する危険性が高くなる。そのため、信頼性のある高精度診断をするには、中

肋 1g 当たり約 500 万コピー以上の病原細菌遺伝子が存在する葉をサンプルングすることが重要となる。しかしながら、1 本の罹病樹でも、葉ごとに病原細菌の濃度にはばらつきがあり、その傾向は一定ではない。現段階で罹病樹の検定漏れを防ぐ最良の方法は、樹冠内のランダムに選んだ数箇所からやや黄化が始まった葉を採集することである。

おわりに

カンキツグリーニング病罹病樹の検定技術は、PCR 法や LAMP 法の導入でほぼ確立したといえる。これら高精度検定技術の有効活用により、本病の早期発見が可能で、罹病樹の早期伐採が進むものと思われる。今後、効率のよいサンプルング法と核酸抽出法が開発されれば、その実用性がさらに高くなることが期待できる。

引用文献

- 1) HOY, M. A. et al. (2001): *Biological control* 22: 278 ~ 287.
- 2) HUNG, T. H. et al. (2004): *Plant Pathology* 53: 96 ~ 102.
- 3) JAGOUEX, S. et al. (1996): *Mol. Cell. Probes* 10: 43 ~ 50.
- 4) MURRAY, M. G. and W. F. THOMPSON (1980): *Nucleic Acids Res.* 8: 4321 ~ 4325.
- 5) OKUDA, M. et al. (2005): *Plant Dis.* 89: 705 ~ 711.

新しく登録された農薬 (17 ページから続き)

やまのいも：アブラムシ類、ヤマノイモコガ、アザミウマ類：収穫 7 日前まで
てんさい：ヨトウムシ：収穫 7 日前まで
さといも：ハスモンヨトウ、アブラムシ類：収穫 7 日前まで
かんしょ：イモコガ：収穫 7 日前まで
茶：チャノココクモンハマキ、チャノミドリヒメヨコバイ、チャノホソガ、チャノキイロアザミウマ：摘採 14 日前まで
そらまめ：アブラムシ類：収穫 7 日前まで
オクラ：ハスモンヨトウ、アブラムシ類、カメムシ類：収穫前日まで
しろな：アオムシ：収穫 7 日前まで
みずな：アブラムシ類、ダイコンハムシ、ヤサイゾウムシ：収穫 14 日前まで
さるなし：キイロマイコガ：収穫 7 日前まで
つるむらさき：ヨトウムシ：収穫 7 日前まで
はばたん：アオムシ：発生初期
花き類・観葉植物：カメムシ類、ハマキムシ類、ヨトウムシ類：発生初期
くちなし：アザミウマ類：発生初期

「殺虫・殺菌剤」

●クロチアニジン・フェリムゾン・フサライド水和剤
21702：ブラシダントツフロアブル（住化武田農薬）
2006/5/10
クロチアニジン：6.6%，フェリムゾン：15.0%，フサライド：15.0%

稲：いもち病、ウンカ類、カメムシ類：収穫 21 日前まで（無人ヘリコプターによる散布、空中散布）
●エチプロール・シラフルオフェン・カスガマイシン・フサライド粉剤
21703：ホクコーゲットワン粉剤 DL（北興化学工業）
2006/5/10
エチプロール：0.25%，シラフルオフェン：0.40%，カスガマイシン：0.11%，フサライド：1.5%
稲：いもち病、ウンカ類、ツマグロヨコバイ、カメムシ類、コブノメイガ：収穫 21 日前まで

「殺菌剤」

●ベノミル水和剤
21705：緑化用ベンレート水和剤（日本グリーンアンドガーデン）
2006/5/10
ベノミル：50.0%
芝（ペントグラス）：葉腐病（ブラウンパッチ）、ダラースポット病、炭疽病：発病初期

「除草剤」

●ペンディメタリン複合肥料
21708：クサトレピアン（エスディーエス バイオテック）
2006/5/25
ペンディメタリン：1.10%
日本芝：一年生雑草（キク科を除く）：秋期雑草発生前（芝生育期）