

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、夏の終わりに採穂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る。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・ウイルスド分野における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(Noromi 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は良くなる。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, ウィルス, キクわい化ウィルス, 検出,
フリー化)

表-1 濃度の異なる精製ウイルスを用いての検出結果

ウイルス量	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg	100 ag	10 ag	1 ag
RT-PCR 法	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RT-LAMP 法	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

判定は、増幅産物を2%アガロース電気泳動し (RT-PCR法は8 μ l, RT-LAMP法は2 μ l使用), 臭化エチジウムで染色した後UV下で観察し, 判定した。

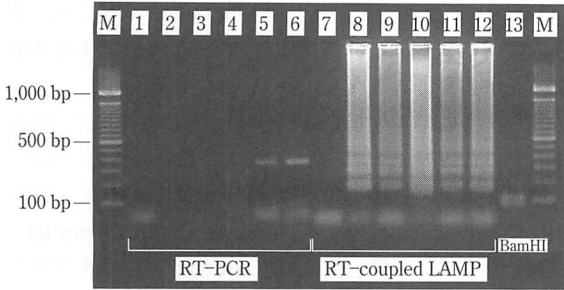


図-1 RT-PCRとRT-coupled LAMPの比較 (材料: スプレーグク 'セリアルブス')

M: 100bp ladder, 1, 7: 蒸留水, 2, 8: 葉を1mm角で切り取り, 反応溶液の中に入れてもの, 3, 9: 葉を蒸留水ですりつぶした汁液, 4, 10: フェノール-SDS抽出後, エタノール沈殿したもの, 5, 11: フェノール-SDS抽出後, エタノール沈殿, CC41セルコースで精製したもの, 6, 12: RNeasy Mini Kit (QIAGEN) により抽出したもの, 13: LAMP産物のBam HI digest.

ットハイブリダイゼーションは1,000倍希釈が検出限界であることを考えるとその感度の高さが実感できる。

このようにLAMP法は高感度な遺伝子診断法であり, PCR法と比較して阻害物質にも強い, プライマーは6領域を認識するために特異性が強い。反応は1時間内に終了し迅速に検査を進めることができる。

III RT-LAMP法の問題点

RT-LAMP法を実施する際の問題点は, 二つある。一つめは高感度だけにコンタミネーションによる擬陽性が心配される点である。特に増幅産物を解析するためには, 反応の終了したチューブを開けるだけで, その部屋はしばらくの間, 検定には使えない。このような作業はすべてドラフトチャンバー内で慎重に行う必要がある。当センターでは, 植物材料より核酸を抽出する部屋, 試薬を調合・分注する部屋, テンプレートを添加する部屋, 増幅・検出を行う部屋を別々にしており, 試薬を調合する部屋にはクリーンブースを設置し, テンプレートはクリーンベンチ内で添加している。

二つめにLAMP法は, PCR法に比べれば阻害物質に

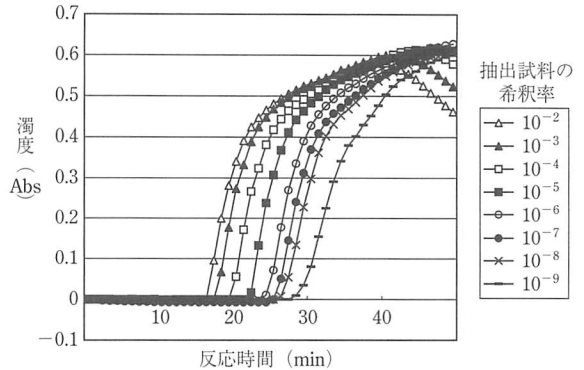


図-2 リアルタイム濁度及ばず初期接種量の影響

強いが, 低濃度のターゲットを検出する際には, 阻害物質の影響を強く受ける。植物からウイルスを抽出する際に問題となる阻害物質 (おそらく多糖類やポリフェノール類) を回避するために, 市販試薬にも様々なものが販売されており, 我々も様々な手法を試みているが決定的な手法は見つかっていない。実際にそれらの阻害物質がLAMP法に及ぼす影響を調べるために, TRIzol Reagent (Invitrogen) で抽出したキクの核酸に, コントロールDNAおよびRNAを希釈添加し, 検出限界を調査したところ, DNAでは1/10に, RNAでは1/200 (RTだけでは1/20) に低下し, 抽出物に含まれる阻害物質の存在を確認した。

また, 簡易抽出法として, 大石ら (2005) と細川ら (2005) から同時に同様な手法が報告されている。大石は植物体の柔らかい先端をつまようじでつまみ, RT-LAMPの反応液でゆすぎ, 細川はメスの刃あるいは注射針で行い, RT-nested PCRを行うものである。大石らの手法は, 使い捨てのつまようじと少量のRT-LAMP反応液で安価かつ迅速にCSVd検査が可能であり, 細川らの手法は簡易抽出で高感度な検査が可能である。大石らの手法を用いて高濃度でCSVdを保毒している株をチェックすると市販試薬に劣らない感度で検出できる。しかし, 低濃度でCSVdを保毒している株は, つまようじや注射針を用いての簡易抽出のみならず, 市販試薬AおよびBを用いて抽出しても検出できず, 当センターの抽出法でのみ検出された (図-3)。細川らの手

法では低濃度の保毒株も検出が可能であるが、定量的な結果を得ることはできない。結局、低濃度の検体も定量的にとらえたい我々は、抽出・精製法の改良を続けながら RT-LAMP を行っている。

IV ウイロイドフリー化の手法

基本的なウイロイドフリー化の方針としては、伝統的な輪菊栽培の篤農家技術である「寒さを十分受けた冬至芽を翌年の親株にする」、あるいはスプレーギク生産者のいう「冬越しの株から採穂すれば、その年はスタンツ(キクわい化病)は出ない」という現象を再現させることを基本に考えている。

組織培養でウイロイドフリー化を図る手順としては、①まず、試験管苗を作成する。これは大量の系統を処理するために各個体をコンパクトにする必要があるためである。②試験管苗を4℃の低温で6か月間処理する。このときはできるだけ光を当てたほうがよく、暗所では効果がほとんどない。小ギクは低温の効きが悪く、夏秋系のスプレーギクは低温に弱いものもある。③低温処理後、葉原基を一つつけた茎頂(直径0.2~0.3 mm)を切り取り、RNA合成阻害剤である Amantadine を 50 ppm 加えた培地で植物体を再生させる。④再生個体から最も CSVd 濃度の低いものを選抜する。このような処理で CSVd 濃度を著しく低下させることができる(図-4; 平田, 2000)。

このフリー化の際に茎頂を小さく切り取る弊害としては、枝変わりによって得られた品種やキメラ品種がしばしば親あるいは L2 層由来の品種に戻る現象を確認しており、処理の後の開花検定が必要である。

また、細川ら(2004)は茎頂のドーム部分を葉原基なしで切り取り、キャベツの根に移植培養(茎頂接ぎ木)することによって再生した 64 個体中 2 個体の完全 CSVd フリー株を得ている。画期的な手法であるが、接ぎ木変異の確率は高く(平田, 1993)、再生個体は詳細な検査が必要であろう。

さらに、このような CSVd フリー化を図る際に、植物体内での CSVd の分布を把握しておくことは重要である。

筆者らは、LAMP 法におけるインナープライマーを DIG 標識して、切片上で RT-LAMP を行う *in situ* RT-LAMP を行い、茎頂近傍における CSVd の分布を調査したところ、低濃度に保毒している株ですら茎頂の内部まで CSVd が確認されたが(図-5)、通常の RT-LAMP において極低濃度でしか検出されない系統の茎頂内部には CSVd は観察されなかった(平田ら, 2005)。

また、茎頂分裂組織内部に大量の CSVd が存在するケースがあることは、わい化症状を示す株の茎頂分裂組織

培養温度	23℃				4℃			
茎頂サイズ	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5(mm)

図-4 cRNA プローブによるドットプロットハイブリダイゼーション

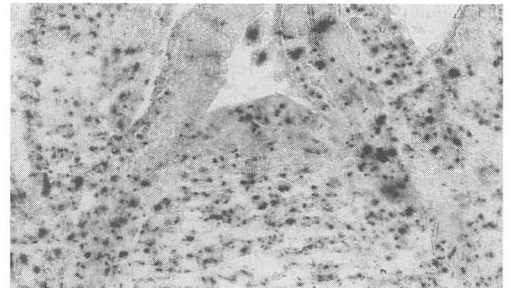


図-5 CSVd に低濃度で保毒しているスプレーギク 'セイプリンス' (茎頂近傍) を用いての *in situ* RT-LAMP の結果

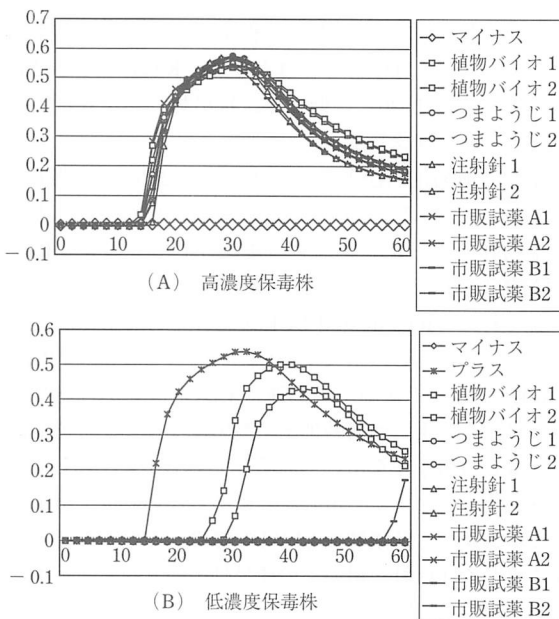


図-3 異なる抽出法が CSVd の検出に及ぼす影響

のドーム部分をわずかに薄くそぎ、反応液に入れ、RT-LAMPを行うと非常に高濃度で検出されることから明らかである。

このように CSVd の植物体内の分布は調査可能であり、当センターでは低温処理を代替する処理も見ついている。ウイルスフリー化が容易になる日は近いと思われる。

V ウィロイドフリー苗の生産と供給体制

当センターでは、県内JAをはじめとして全国各地のJAおよび種苗メーカーの要望に応じて苗を生産するために、キク培養苗を継代し、検定により CSVd 濃度の薄い系統が選抜された時点で置き替えている。

供給用の親株の維持については、そのための労力も少なく、ハウスでは再感染の危険性も大きいことから培養苗で維持・増殖を図っている。取り扱いはずべてクリーンベンチで行い、1品種、1系統につき器具を取り替えて、金属の器具はずべて200℃、3時間の乾熱滅菌を行い、実験室内での感染防止に努めている。

培養は、ポリカーボネート製のカルチャーボックスを用いている。1～1.5か月で、3～5倍の増殖が得られる。増殖した苗は、培養器から取り出し、1節ごとに切り分け、セル成形トレイやロックウールなどに直接さし芽して発根させている (ex-vitro rooting)。1ボックス当たり、40～50芽(頂芽、側芽)が得られる。挿し芽後約1か月の小苗を出荷している。

おわりに

以上述べたように、キクわい化ウイルスの検定技術

は、めざましい進展が見られるが、それぞれに長所と短所があり、フリー苗の判定など極微量な濃度が対象の場合は複数の検定法を用い、総合的に判断したほうが安全である。ウイルスフリー化技術については地道に状況を確認していく作業を行えば、それほど難しいことではないかもしれない。我々は、全国から依頼されるキクわい化ウイルスの受託検査を年間2,000検体以上行っており、培養しているキク類の系統は130種を超える。社会的責任も重く、諸先生方に教を乞い、今後もたゆまぬ努力を続けたいと考えている。

なお、本稿で述べた研究・事業を行うに当たり、一貫してウイルス検査技術を指導していただいた弘前大学佐野輝男教授、適宜助言をいただいた北海道大学畑谷達児講師、キク全般にご指導いただいた(独)花き研究所柴田道夫研究管理監、研究全般にご指導いただいた岐阜大学福井博一教授、LAMP法についてご指導いただいた栄研化学(株)の皆様へ深く感謝の意を表す。また、現在ともにウイルス検出技術・フリー化技術の開発を行っているJA和歌山県農・植物バイオセンター山下裕子研究員に感謝の意を表す。

引用文献

- 1) 大石一史ら (2005): 園学雑 74(別1): 466.
- 2) HATAYA, T. (1999): Recent Res. Devel. Virol. 1: 789～815.
- 3) 平田行正 (2000): 農業技術体系花卉編6 追録: 206の2～6.
- 4) ————ら (2002): 園学雑 71(別2): 261.
- 5) ————ら (2003): 同上 72(別2): 277.
- 6) ————ら (2005): 同上 74(別1): 467.
- 7) 平田 豊 (1993): 育種とバイオサイエンス, 養賢堂, 東京, p. 305～322.
- 8) 細川宗孝ら (2004): 園学雑 73(別2): 457.
- 9) ————ら (2005): 同上 74(別1): 465.
- 10) NOTOMI, T. et al. (2000): Nucleic Acids Res. 28: e63.

(新しく登録された農薬15ページからの続き)

● TPN 水和剤

21759: ST ダコニール 1000 (住化武田農薬) 2006/8/16

TPN: 40.0%

りんご: 斑点落葉病, モニリア病, 黒星病: 収穫45日前まで

なし: 黒斑病, 黒星病: 収穫45日前まで

もも: 灰星病, 黒星病: 収穫前日まで

ネクタリン: 灰星病, 黒星病: 収穫前日まで

いちじく: 疫病: 収穫前日まで

キウイフルーツ: 果実軟腐病: 収穫60日前まで

マルメロ: ごま色斑点病: 収穫30日前まで

かりん: 黒点病, ごま色斑点病, 白かび斑点病: 収穫45日前まで

パッションフルーツ: 円斑病, 疫病: 収穫14日前まで

パパイヤ: 炭疽病: 収穫前日まで

ばれいしょ: 疫病, 夏疫病: 収穫7日前まで

やまのいも: 炭疽病, 葉渋病, つる枯病: 収穫30日前まで

もりあざみ: ステムフィリウム葉枯症: 収穫30日前まで

らっかせい: 褐斑病: 収穫14日前まで

きゅうり: べと病, 炭疽病, うどんこ病, 灰色かび病, 黒星病, 褐斑病: 収穫前日まで

にがうり: 炭疽病, うどんこ病, べと病, 斑点病, つる枯病: 収穫前日まで

ズッキーニ: うどんこ病: 収穫前日まで

すいか: 炭疽病, つる枯病: 収穫3日前まで

メロン: うどんこ病, べと病, つる枯病: 収穫3日前まで

かぼちゃ: べと病, 白斑病, うどんこ病: 収穫7日前まで

トマト: 疫病, 輪紋病, 葉かび病: 収穫前日まで

ミニトマト: 疫病, 輪紋病, 葉かび病: 収穫7日前まで

(23ページへ続く)