

# ジャガイモ主要病害虫を網羅的に同時検出できるマクロアレイ

(独)農研機構北海道農業研究センター **眞岡 哲夫・堀田 光生\*・佐山 充**  
**奈良部 孝・植原 健人\*\***  
 北海道立総合研究機構中央農業試験場 **田中 文夫・竹内 徹\*\*\*・堀田 治邦**  
 北海道立総合研究機構北見農業試験場 **古 川 勝 弘**  
 北海道大学大学院 **畑 谷 達 児**  
 (株)ラボ **丸 田 幸 男**

## はじめに

平成20年度の我が国のジャガイモ生産量は274万tで、食料では水稻に次ぐ基幹作物として農業上重要な地位を占めている。「食料・農業・農村基本計画」(農林水産省, 2010)では、ジャガイモの生産量を2020年までに290万tに増加させる目標が設定されており、特に加工用ジャガイモの周年安定供給体制の構築が課題となっている。

イネやムギ等の植物の種子は一般的に病原体が入りづらい構造になっているため、たとえ親が病気にかかっても、次世代へ伝搬するリスクは低く抑えられる。ところが、ジャガイモの場合は、種子ではなく植物体の茎の一部である塊茎を植え付け、子いもを収穫する。このような増殖を栄養体繁殖といい、特にウイルス病にかかると種いもを通じて次世代にウイルスが感染し大きな被害をもたらす。

ジャガイモのウイルスは世界で36種が報告されており、このうち我が国では12種(アルファルファモザイクウイルス(AMV)、キュウリモザイクウイルス(CMV)、ジャガイモ黄斑モザイクウイルス(PAMV)、ジャガイモ葉巻ウイルス(PLRV)、ジャガイモモップトップウイルス(PMTV)、ジャガイモAウイルス(PVA)、ジャガイモMウイルス(PVM)、ジャガイモSウイルス

(PVS)、ジャガイモXウイルス(PVX)、ジャガイモYウイルス(PVY)、トマト輪点ウイルス(ToRSV)およびトマト黄化えそウイルス(TSWV)の発生が記録されている(表-1)。これらのウイルスの研究は、主に1960年代から70年代後半にかけて行われてきたが、戦後まもなく植物防疫法に基づく無病種いも増殖・供給体制が整備され、茎頂培養によるウイルスフリー種いもが

表-1 マクロアレイで検出できるジャガイモ主要病害虫(略称)

既発生ウイルス  
 アルファルファモザイクウイルス(AMV)  
 キュウリモザイクウイルス(CMV)  
 ジャガイモ黄斑モザイクウイルス(PAMV)  
 ジャガイモ葉巻ウイルス(PLRV)  
 ジャガイモモップトップウイルス(PMTV)  
 ジャガイモAウイルス(PVA)  
 ジャガイモMウイルス(PVM)  
 ジャガイモSウイルス(PVS)  
 ジャガイモXウイルス(PVX)  
 ジャガイモYウイルス(PVY)  
 トマト輪点ウイルス(ToRSV)  
 トマト黄化えそウイルス(TSWV)

侵入が警戒されるウイルス・ウイロイド  
 タバコ茎えそウイルス(TRV)  
 Potato virus T (PVT)  
 Potato spindle tuber viroid (PSTVd)

細菌  
 黒あし病菌<sup>1)</sup>(Ds)  
 輪腐病菌(Cms)  
 青枯病菌<sup>2)</sup>(Rs)

線虫  
 ジャガイモシストセンチュウ(PCN)

Application of cDNA Macroarray for Simultaneous Detection of Potato Pathogens : Virus, Viroid, Bacteria and Nematode. By Tetsuo MAOKA, Mitsuo HORITA, Mitsuru SAYAMA, Takashi NARABU, Taketo UEHARA, Fumio TANAKA, Toru TAKEUCHI, Harukuni HORITA, Katsuhiko FURUKAWA, Tatsuji HATAYA and Yukio MARUTA

(キーワード: ジャガイモ, ウイルス, ウイロイド, 細菌, センチュウ, 検出法, マクロアレイ)

\* 現所属: (独)農業環境技術研究所

\*\* 現所属: (独)農研機構本部

\*\*\* 現所属: 北海道立総合研究機構北見農業試験場

<sup>1)</sup> *Dickeya* spp., *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* を検出。

<sup>2)</sup> Phylotype I-IV を検出。

一般圃場に普及・定着すると、圃場でのウイルス病の発生は PLRV や PVY 等に限られ、その被害も限定的になったことから、これらウイルスの発生に関する報告はほとんど見られなくなった。

一方植物ウイルスの検出法は、1990年代に入ると RT-PCR 法などの遺伝子診断法が普及したが、ジャガイモウイルスで遺伝子診断法が開発されたのは、圃場に発生する PLRV, PVS, PVX, および PVY の4種にすぎず(佐藤ら, 2000), その他のウイルスについては、同法の開発は行われなかった。このため、せっかく一部ウイルスの遺伝子診断法が開発されても、その他のウイルスについては並行して従来法による診断を行わねばならず、遺伝子診断法の有効性が活かされていない状況となり、育種、検疫、種いも生産の現場において、問題となっていた。

さらに近年、我が国が加盟している国際植物防疫条約 (IPPC) の加盟国間では、植物検疫措置に関する国際基準 (ISPM) が検討され、議案の一つにマイクロチューバー (MT) などの無病害虫種いもの貿易が取り上げられ、多数のジャガイモウイルスが検疫対象としてリストアップされた。このうちどのウイルスを規制対象にすべきか、また、MT を輸出する際に相手国からどのウイルスの検査を求められるかなどは今後決めていかなければならず、そのためにもでき得る限りのウイルスについて検定技術を開発しておく必要が生じている。

これらジャガイモの病害診断、検疫をとりまく情勢の変化に鑑み、検出特異性の高いマクロアレイを用いて、全ジャガイモウイルスを一括して検出できる遺伝子診断法を開発することとし、平成17年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業(農林水産省)「ジャガイモ病害虫の簡易検出・高精度診断技術の開発」(参画機関:北海道農業研究センター, 北海道大学, 北海道立農業試験場(現:北海道立総合研究機構), (株)ラボ)の採択を受けて研究を実施した。さらに、ウイルス以外のジャガイモ主要病害虫についても検出法を開発したので、以下に紹介する。

## I マクロアレイの原理

マクロアレイは、医学分野でヒト肉腫の病理診断などに使用されている(元井, 2004)。最近では植物ウイルスの診断にも使用される例が増えてきた(SUGIYAMA et al., 2008; AGINDOTAN and PERRY, 2008)。その基本原理は、ナイロンメンブレン上の遺伝子と、増幅した遺伝子をハイブリダイズし、標識物質を仲立ちにして検出するものであるが、ターゲットとする遺伝子領域の選び方や、遺

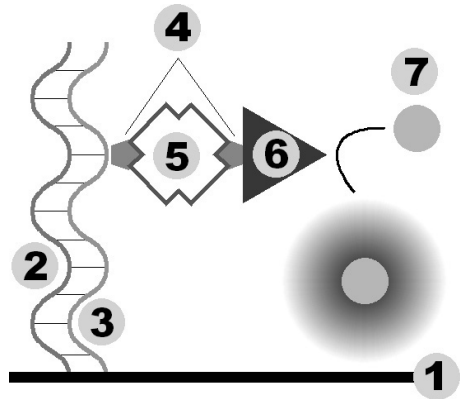


図-1 マクロアレイの原理

1:ナイロンメンブレン, 2:キャプチャープローブ, 3:ビオチン標識標的cDNA, 4:ビオチン, 5:ストレプトアビジン, 6:ビオチン結合アルカリフォスファターゼ, 7:基質。

伝子の増幅の仕方などに様々なバリエーションがあり、目的に応じて使い分けられている。

筆者らが採用した方法では、まずナイロンメンブレン上に検出したい遺伝子の一部(キャプチャープローブ)を植え付けたアレイメンブレンを作製する。キャプチャープローブは、目的とするウイルスにだけ反応し、他のウイルスには非特異反応を起こさないよう設計しておく。標的となるウイルスの遺伝子はRNAであるため、試料中からRNAを抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により標的遺伝子を増幅する。この際標識物質であるビオチンを添加し、増幅cDNAを標識しておく。メンブレン上のキャプチャープローブと標識cDNAをハイブリダイズさせ、結合した標識cDNAにストレプトアビジンを介してアルカリフォスファターゼ(AP)を付着させた後、基質を添加し、APの酵素反応による発色をもとに目的遺伝子の検出を行う(図-1)。本法は、バイオサイエンス系の研究では一般的な技術であり、使用する試薬類は各社からキットとして販売されている。さらに、判定を肉眼で行うことができ、高価な解析機器を必要としないため、植物病理学分野でも応用普及が可能である。

## II ジャガイモウイルス用マクロアレイの作製とウイルスの検出

アレイメンブレンを作製するためには、検出の対象となるウイルス遺伝子を確保する必要がある。しかし、これまで我が国に発生する全ジャガイモウイルスを残らず

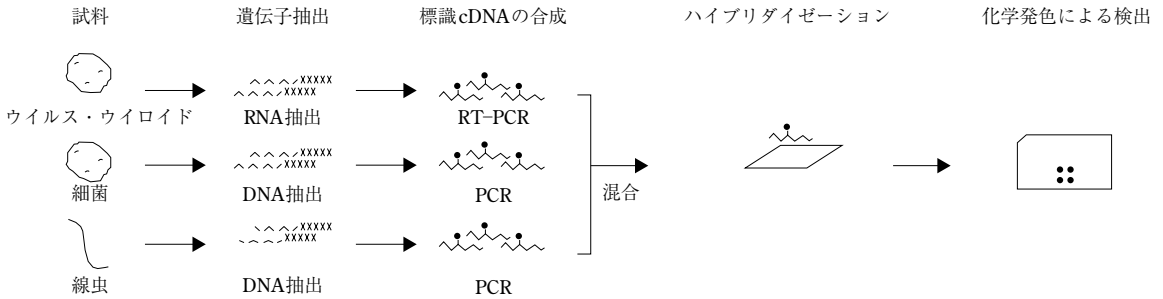


図-2 マクロアレイによる主要ジャガイモ病害虫の検出手順

収集した機関はなかった。そこで、北海道農業研究センターのほか、農業生物資源研究所ジーンバンク、北海道大学、種苗管理センター等関係各機関の協力を得て12種のジャガイモウイルス株を収集した。これらの遺伝資源を用いて、ウイルスの特定に利用できる遺伝子領域を選定し、各ウイルス株からRNAを抽出してクローニングした。プラスミドに組込まれたウイルス由来遺伝子を鋳型に、PCRで300～600 bp程度のcDNA（キャプチャープローブ）を増幅して、2.7 cm × 8.5 cmのナイロンメンブレンに1ウイルス当たり4個所スポットしたアレイメンブレンを作製した。ウイルス感染植物組織から各ウイルス特異的プライマーセットによるRT-PCRを行い増幅断片をビオチン標識した。市販キットを用いてハイブリダイゼーションを行い、発色による判定を行った（図-2）。その結果、アレイメンブレン上の発色反応として各ウイルスを検出できた。標識遺伝子は他のウイルスのスポットに全く反応せず、各ウイルスを特異的に検出できることが明らかとなった。

本法を実際に利用し、我が国で収集した在来ジャガイモ品種の診断を行ったところ、PVAやPVM等が多数検出され、これまで検出法がなく、発生実態が明らかでなかったウイルスをジャガイモから検出できるようになった（図-3、Маока et al., 2010）。2005年に北海道でPMTVが発生した際には、本法がウイルスの同定法として利用されるなど（北海道病害虫防除所、2006）、今後、育種、検疫、種いも生産等での利用が期待されている。

### III ウイルス以外のジャガイモ主要病害虫への適用

ジャガイモの生産を脅かす要因は、ウイルス病だけではない。例えば、ジャガイモシストセンチュウは、その発生圃場では法律上種いも栽培ができなくなる特定重要害虫である。このほかにも、細菌によって起こる輪腐病、国内のトマト等で既に発生しているウイロイドの*Potato*

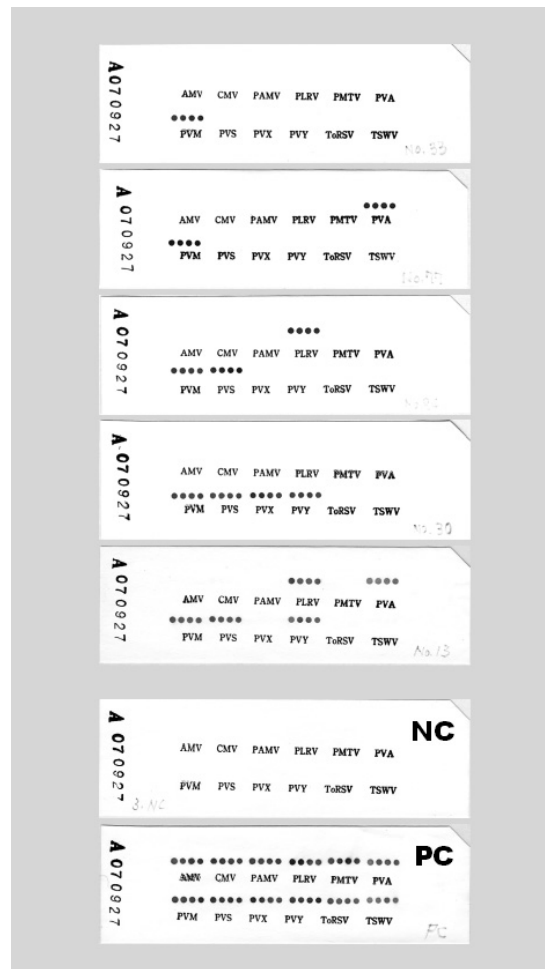


図-3 マクロアレイによるジャガイモウイルスの検出例

NC：陰性対照（健全ジャガイモ）、PC：陽性対照（各ウイルス感染植物から増幅したウイルス特異的cDNAを混合）。上段5枚が圃場で採集したジャガイモ葉から実際にウイルスを検出した例。

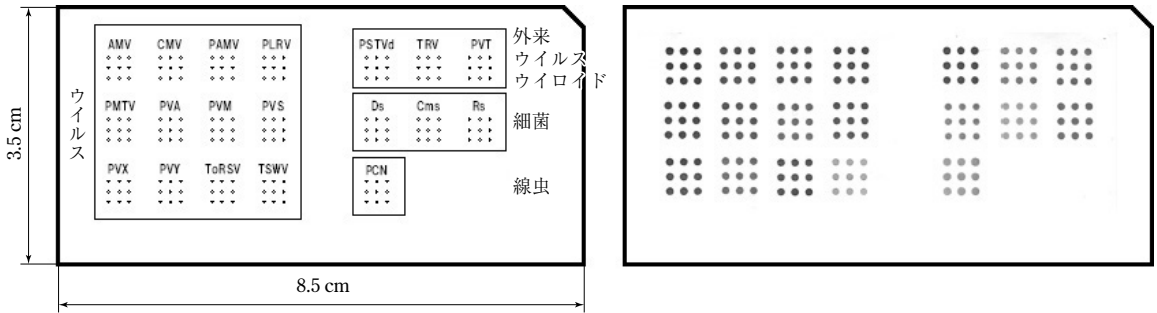


図-4 マクロアレイによる主要ジャガイモ病害虫 19 種の検出例

19 種病害虫の陽性対照の遺伝子を鋳型に標識 cDNA を合成し、混合して反応させた。

*spindle tuber viroid* (PSTVd) など、ジャガイモでの発生や侵入を警戒すべき特定重要病害がある。そこで、ウイルスの検出で一定の成果が得られたマクロアレイをこれらの病害虫にも適用することを考え、上記病害虫の網羅的検出を試みた。ターゲットは、ウイルス・ウイロイドでは前項の 12 種に、発生が予想される 2 種 (タバコ茎えそウイルス (TRV)、ジャガイモ T ウイルス (PVT)) と PSTVd を加えた。細菌では特定重要病害の輪腐病菌と、黒あし病菌、青枯病菌を選び、これにジャガイモシストセンチュウを加えた 19 種の病原とセンチュウを検出するマクロアレイ (3.5 cm × 8.5 cm) を作製した (図-4)。それぞれの病原とセンチュウから遺伝子 (RNA または DNA) を抽出し、RT-PCR または PCR で標識増幅後、マクロアレイ上でハイブリダイズしたところ、問題なく検出が可能であった (図-4)。以上から、ジャガイモの主要な 19 種の病害虫をマクロアレイで検出することが可能になった。

#### IV 問 題 点

マクロアレイには全く問題がないわけではない。例えば、ジャガイモウイルスを一括検出する際には、その網羅性に起因する問題が生じる。単独のウイルスを検出するだけであれば、RT-PCR やハイブリダイゼーションの至適条件を自由に設定することができる。ところが複数病原体の一括検出を目的とする場合は、種類や性状の全く異なる複数のウイルスを、ほぼ同じ効率で増幅、標識、検出できる共通条件を設定する必要がある。上記ジャガイモウイルスにおいても、一部ウイルスで、RT-PCR における増幅効率およびビオチンの取り込み効率が他ウイルスに比べ劣り、ハイブリダイゼーションでもシグナルが弱い傾向が認められたので、RT-PCR で増幅する断片の分子量を小さく設計し直すなどの対応を行った。さらに、種内の系統や遺伝子の多様性が報告され

ている PVY や PVM 等では、すべての系統・分離株をもれなく検出できる遺伝子領域の設計が必要となり、技術的な難易度が高くなる。また、検出する病原を新たに追加する場合にも、他ウイルスとのクロスハイブリダイゼーションを確認する必要があり、ウイルスの数が増加するに従い一括診断システムとして完成させるためには技術的ハードルが高くなっていく。もう一つの問題点としては、1 回の試験で取り扱える試料数が限られることがあげられる。例えば、同じハイブリダイゼーションの手法を用いたマイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH) 法では、ELISA プレートを用いて検出を行うため、1 回に 100 検体近い試料を供試できる。しかしメンブレンベースのマクロアレイでは、1 回の試験で供試できる検体数はせいぜい 10 検体程度である。このようにマクロアレイは多検体の処理には適さないが、1 検体から多種病原とセンチュウを網羅的に検出できるところに利便性がある。したがって、例えば新品種の母本の検定など、重要性の高い少数試料から精密に病原体とセンチュウの検出を行う場合などに適した検出法といえる。マクロアレイの実用にあたってはこれらの長所短所をあらかじめ認識し、他の検出法と併用しながら、目的に応じた場面で使用することが望ましい。

#### お わ り に

我が国のジャガイモ生産は、植物防疫法により世界的に見ても極めてレベルの高い無病種いも生産配布体制が敷かれ、種いもを原因とするジャガイモ病害、特にウイルス病の発生は一部を除き低いレベルで推移してきた。しかしながら、近年の植物防疫行政の変化、無病種いも生産配布体制の維持に配する人員の減少等により、今後も現状の低発生レベルが維持できるとは限らず、本技術を含む新たな診断技術の開発、普及がますます重要となっている。

## 引用文献

- 1) AGINDOTAN, B. and K. L. PERRY (2008): Plant Dis. 92: 730 ~ 740.
- 2) 北海道病害虫防除所 (2006): 平成 18 年度病害虫発生予察情報 第 2 号特殊報第 1 号.
- 3) MAOKA, T. et al. (2010): Plant Dis. 94: 1248 ~ 1254.
- 4) 元井 亨 (2004): 臨床検査 48: 1059 ~ 1065.
- 5) 農林水産省 (2010): 食料・農業・農村基本計画関係資料, 農林水産省, 東京, p. 55.
- 6) 佐藤仁敏ら (2000): 北日本病虫研報 51: 87 ~ 92.
- 7) SUGIYAMA, S. et al. (2008): J. Virol. Meth. 153: 241 ~ 244.

## 新しく登録された農薬 (22.11.1 ~ 11.30)

掲載は、種類名、登録番号、商品名（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、対象作物：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、適用作物、適用雑草等を記載。（登録番号：22804 ~ 22831）種類名に下線付きは新規成分。※は新規登録の内容。

## 「殺虫剤」

- **アクリナトリン・スピロメシフェン水和剤**  
22817: クリアオール水和剤 (バイエルクロップサイエンス) 11/09  
アクリナトリン: 6.0%, スピロメシフェン: 30.0%  
なす: コナジラミ類, ミカンキイロアザミウマ, ハダニ類, アブラムシ類: 収穫前日まで  
トマト: コナジラミ類, トマトサビダニ, オオタバコガ, ミカンキイロアザミウマ: 収穫前日まで  
ミニトマト: コナジラミ類, トマトサビダニ, オオタバコガ, ミカンキイロアザミウマ: 収穫前日まで  
ピーマン: ハダニ類, ミカンキイロアザミウマ, アブラムシ類: 収穫前日まで  
すいか: コナジラミ類, ハダニ類: 収穫前日まで
- **クロラントラニプロール・ピメトロジン粒剤**  
22821: ホクコーフェルテラチェス箱粒剤 (北興化学工業) 10/11/10  
22822: シンジェンタフェルテラチェス箱粒剤 (シンジェンタジャパン) 11/10  
クロラントラニプロール: 0.75%, ピメトロジン: 3.0%  
稲 (箱育苗): ウンカ類, ツマグロヨコバイ, ニカメイチュウ, コブノメイガ, フタオビコヤガ, イネドロオイムシ, イネミズゾウムシ: 移植 3 日前 ~ 移植当日
- **エマメクチン安息香酸塩・クロラントラニプロール水和剤**  
22827: ポリアムガンダム顆粒水和剤 (シンジェンタジャパン) 11/24  
エマメクチン安息香酸塩: 2.0%, クロラントラニプロール: 5.0%  
キャベツ: コナガ, アオムシ, ハスモンヨトウ, ハイマダラノメイガ, タマナギンウワバ: 収穫 7 日前まで  
はくさい: コナガ, ヨトウムシ, ハイマダラノメイガ: 収穫 7 日前まで  
レタス: オオタバコガ, ナモグリバエ: 収穫 3 日前まで  
非結球レタス: オオタバコガ, ナモグリバエ: 収穫 3 日前まで  
ブロッコリー: コナガ, アオムシ: 収穫 7 日前まで  
ねぎ: シロイチモジヨトウ: 収穫 7 日前まで

## 「殺虫殺菌剤」

- **クロラントラニプロール・プロベナゾール粒剤** ※新製剤  
22823: ホクコーファーストオリゼフェルテラ粒剤 (北興化学工業) 11/10  
22824: ファーストオリゼフェルテラ粒剤 (明治製菓) 11/10

クロラントラニプロール: 0.75%, プロベナゾール: 20.0%  
稲 (箱育苗): いもち病, イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ, ニカメイチュウ: は種時 (覆土前)

## 「殺菌剤」

- **プロパモカルブ塩酸塩液剤** ※既製剤 (新規参入)  
22805: プロプラント液剤 (アリストライフサイエンス) 11/09  
プロパモカルブ塩酸塩: 66.7%  
はくさい: べと病: 収穫 7 日前まで  
たまねぎ: べと病: 収穫 14 日前まで
- **シアゾファミド・ポリオキシシン水和剤**  
22825: 石原グリーンワーク WP (石原産業) 11/24  
22826: 科研グリーンワーク WP (科研製菓) 11/24  
シアゾファミド: 20.0%, ポリオキシシン: 9.0%  
西洋芝 (ベントグラス) (生産圃場): 葉腐病 (ブラウンパッチ), ピシウム病, 炭疽病, 赤焼病: 発病初期

## 「除草剤」

- **ピリミスルファン粒剤**  
22806: ベストパートナー 1 キロ粒剤 (クミアイ化学工業) 11/09  
ピリミスルファン: 0.67%  
移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ, オモダカ (東北, 北陸, 九州), クログワイ (東北, 北陸, 九州), シズイ (東北), コウキヤガラ (東北, 九州), アオミドロ・藻類による表層はく離 (北陸を除く)
- **ピリミスルファン・フェントラザミド粒剤**  
22807: ヤイバ 1 キロ粒剤 (クミアイ化学工業) 11/09  
ピリミスルファン: 0.50%, フェントラザミド: 3.0%  
移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ (九州を除く), アオミドロ・藻類による表層はく離 (関東・東山・東海を除く)
- **ピリミスルファン・メフェナセット粒剤**  
22808: ムソウ 1 キロ粒剤 (日本農業) 11/09  
ピリミスルファン: 0.50%, メフェナセット: 12.0%

(27 ページに続く)