

マクロアレイを用いたマイクロチューブハイブリダイゼーション法によるイチゴ病害診断

ホクサン株式会社植物バイオセンター ^ふ古 ^た田 ^{かず}和 ^{よし}義
 北海道大学大学院農学研究院 ^{ながしま}長嶋 ^{さき}紗希・^{いぬかい}犬飼 ^{つよし}剛・^{ますた}増田 ^{ちから}税

はじめに

ホクサン株式会社（旧北海三共株式会社）では、北海道およびホクレン農業協同組合連合会の委託事業としてイチゴの原産種の生産と道内の生産者への親苗供給を行っている。また、四季成り性イチゴの育成を行い、‘エッチェス-138’と‘すずあかね’を品種登録し、自社品種の苗増殖と供給も行っている。このイチゴ事業に付随した品質管理の一環として、ウイルス検定、出荷前の病理検定、生産現場で発生した病害診断等を行っているが、検定精度や判定に要する時間・労力等改善すべき点が多く、迅速で正確な診断法が必要であった。これらの課題を解決するため、北海道大学の増田 税教授らが開発したマイクロチューブハイブリダイゼーション法（MTH法）とマクロアレイを組合せた病害診断法（SUGIYAMA et al., 2008）を導入した。本稿ではイチゴ病害への適用検討について紹介したい。

I マクロアレイと MTH 法について

1 マクロアレイ

マクロアレイは、基板となるメンブレンに数十から数百種の遺伝子プローブを任意に配置・スポットしたもので、多種遺伝子の同時検出に有効なツールである。シグナル検出には専用リーダーなどの高価な機器を必要としない。アレイ作製も容易であり、目的に応じて柔軟にデザイン設計（サイズやスポット配置等）ができる。作製および実験コストはマイクロアレイに比べて安価であり導入しやすい技術と考えるが、その一方で、メンブレンの操作が煩雑とされる点が障壁となっている。

2 MTH 法

MTH 法は上述した煩雑さを解消する、簡便かつ効率的なハイブリダイゼーション手法である。2.0 ml のマイ

クロチューブの内径に合わせたメンブレン（マクロアレイ）をシリコン製ホルダーに挟み、ハイブリ～洗浄の一連の工程をヒートブロックに設置したマイクロチューブ内で行うことを特徴とする（図-1）。MTH 法では、メンブレンをホルダーごとマイクロチューブへ移動させるだけで緩衝液の交換作業が終了する。また、ヒートブロックがあれば十分で、ハイブリオープンは不要である。さらに、マイクロチューブ内で緩衝液が対流するため、振盪機も不要である。ホルダーは各工程でチューブの蓋の役割を担うほか、メンブレンの「持ち手」となり、チューブ間の移動をサポートする。このように、MTH 法

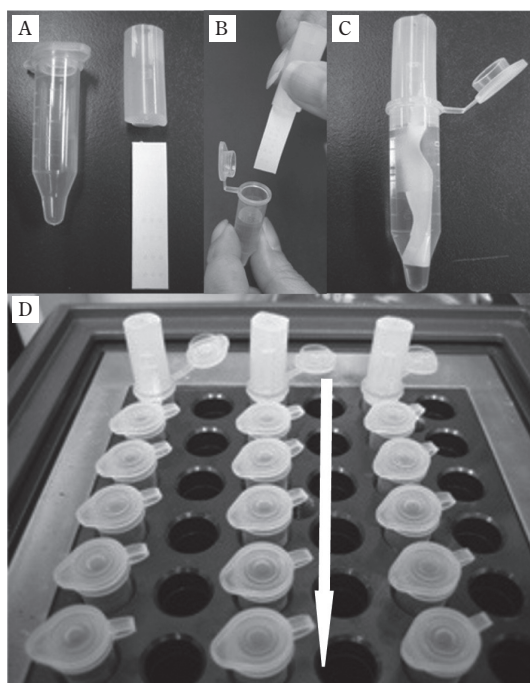


図-1 マイクロチューブハイブリダイゼーション

- A: マイクロチューブ、ホルダー、マクロアレイの各外観
 B: マクロアレイをマイクロチューブへ設置の様子
 C: マイクロチューブ内のマクロアレイ
 D: ハイブリダイゼーション～洗浄の実施形態
 洗浄工程では、Bのようにホルダーを掴んでアレイを矢印の方向に移動させる。

Convenient Diagnosis of Strawberry Disease using DNA Macroarray and Microtube Hybridization Method. By Kazuyoshi FURUTA, Saki NAGASHIMA, Tsuyoshi INUKAI and Chikara MASUTA

（キーワード：マクロアレイ、マイクロチューブハイブリダイゼーション、イチゴウイルス、イチゴ炭疽病菌）

は「ダウンサイズ」されたマクロアレイに最適な手法である。また、化学発色検出を採用すれば、検出機器も不必要となる。核酸抽出と PCR が可能な環境だけで高感度かつ簡便な遺伝子診断が導入できるため、農業分野においては生産現場に近いレベルでの活用も期待できる。

II イチゴウイルスの同時検出

1 マクロアレイ作製

ホクサン株式会社では、イチゴ斑紋ウイルス (*Strawberry mottle virus*, SMoV), イチゴマイルドイエローエッジウイルス (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV), イチゴベインバンディングウイルス (*Strawberry vein banding virus*, SVBV) の 3 種ウイルスを対象とした RT-PCR 法による遺伝子診断法を独自に開発している (古田, 2003)。この知見に基づき、3 種ウイルスの遺伝子と内部標準としてイチゴの *ndhB* 遺伝子を加えた 4 遺伝子を同時に検出するマクロアレイを作製した (口絵①)。SMoV は 3' 非翻訳領域から、SMYEV と SVBV は外被タンパク質領域からマクロアレイ用プライマーセットを構築した (表-1)。各ウイルス罹病イチゴ由来の RNA を鋳型として RT-PCR を行い、各増幅産物をクローニングした。各クローンからそれぞれに対応するプライマーにて DNA 断片を増幅し、3.6 cm × 0.9 cm のナイロンメンブレン (Biodyne, Pall) 上に 5 ng ずつ (25 ng/μl × 0.2 μl) 3 反復スポットした。スポットされた DNA を変性するためメンブレンを 120℃ 30 分間の Baking 処理し、

さらに DNA をメンブレン上に固定するため UV クロスリンカー (CL-1000, UVP) を用いて UV 照射 (120 mJ/cm²) を行った。

2 検出手順

(1) 概要

マクロアレイによるイチゴウイルス検出は以下の手順で行う。①イチゴ葉から total RNA 抽出, ② One-step multiplex RT-PCR によるビオチン標識ターゲットの増幅, ③標識ターゲットとマクロアレイの MTH, ④発色反応による検出と判定。RNA 抽出から判定まで 3 ~ 4 日間で終了する。

(2) RNA 抽出

イチゴ組織には PCR を阻害する多糖類, ポリフェノール類が多く含まれている。そのため一般的な抽出方法や汎用の抽出キットで得た核酸では PCR に適用できない。そこでバナナ組織の核酸抽出法に基づき (Asif et al., 2000), 一部改変を加えイチゴ葉から total RNA を抽出した。すなわち、イチゴ葉を抽出バッファー (2% CTAB, 0.1M Tris-HCl pH8.0, 50 mM EDTA pH8.0, 1.4M NaCl, 0.1% 2-メルカプトエタノール) で磨碎し、熱処理 (65℃ 30 分間) した。室温で自然冷却後にクロロホルムで清澄化し、清澄液に最終濃度が 3M となるよう 10M LiCl を添加して RNA 沈殿を得た。RNA 沈殿を滅菌水で再懸濁し、エタノール沈殿で濃縮した total RNA を標識ターゲット増幅の鋳型核酸とした。

表-1 プライマー一覧

Target	Primer	Sequence 5'-3'	Product size (nt)
SMYEV coat protein	Forward	GGGAGATCAGCCACGACCAC	546
	Reverse	TTGGCTGGCTGGATTGAGCA	
SVBV coat protein	Forward	AGAGAAAGACTCGAACAAC	369
	Reverse	TTCAATGAGTTGTCTTCGGT	
SMoV 3'-UTR	Forward	TAGTTTAGTGACAATCCAAGCG	253
	Reverse	CGTGTTATCTTTCACCGTAATG	
<i>ndhB</i> ^{a)}	Nad2.1a	GGA CTCTGACGTATACGAAGGATC	188
	Nad2.2b	AGCAATGAGATTCCCAATATCAT	
<i>C. acutatum</i> <i>MAT1-2</i>	Forward	TATCCTCTACCGCAGCGACTAC	217
	Reverse	TTGTTGTGGCGCTCCTTGTAGGCT	
<i>G. cingulata</i> <i>MAT1-2</i>	Forward	AAGCAGGAAAACAGCCACCTAAGC	169
	Reverse	CCTGTGCATCTTGCAAGTTCGG	
18SrDNA ^{b)}	NS6	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	377
	NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	

^{a)} THOMPSON et al. (2003) より.

^{b)} WHITE et al. (1990) より.

(3) 標識ターゲット増幅と MTH

表-1 に記載した 3 種ウイルスと内部標準の遺伝子を増幅するプライマーセットを混合し、Tth DNA polymerase (Roche) を用いて逆転写反応と 4 種の cDNA 増幅を同一反応系で同時に行う One-step multiplex RT-PCR にてビオチン標識ターゲットを増幅した。なお、ビオチンは各フォワードプライマーの 5' 末端に標識した。ハイブリバッファー (PerfectHyb Hybridization Solution, TOYOBO) を必要本数の 2.0 ml マイクロチューブに 1.8 ml ずつ分注し、これを 69℃ に設定したヒートブロックに設置した。少なくとも 20 分間加温した後、ホルダーで保持したマクロアレイをマイクロチューブにセットし、40 分間静置した (プレハイブリダイゼーション)。その間に、増幅した標識ターゲット (反応系 25 μ l) を 99℃ 5 分間熱変性させ氷上で急冷した後、10 μ l を同じく 2.0 ml のマイクロチューブにて 69℃ で保温したハイブリバッファーに添加した。プレハイブリダイゼーション後のマクロアレイを、標識ターゲット添加済みのマイクロチューブへ移動させ、ヒートブロック上で 69℃ 一晩ハイブリダイゼーションした。

(4) 検出

洗浄から検出を以下の手順で行った。洗浄作業に先立ち、洗浄液 1 (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS) および洗浄液 2 (0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS) を 1.8 ml ずつ各 3 本の 2.0 ml マイクロチューブに分注し、69℃ に設定したヒートブロックに設置した。各洗浄液を十分に加温した後、一晩静置したマクロアレイをホルダーごと取出し、以下の手順でマイクロチューブに移し替えることで洗浄を行った。①洗浄液 1 のチューブにて 1 分間保温を 2 回繰り返す、②洗浄液 1 のチューブにて 10 分間保温、③洗浄液 2 のチューブにて 1 分間保温を 2 回繰り返す、④洗浄液 2 のチューブにて 10 分間保温。洗浄後のマクロアレイを取り出し、直ちに化学発色検出を行った。なお化学発色反応はすべてプラスチック容器 (コニカルチューブやタッパーなど) にて実施可能で、各緩衝液 15 ml で最大 12 枚のマクロアレイを同時に操作できる。以下、緩衝液量は 15 ml とした。洗浄済みのマクロアレイをブロック液 (5% SDS, 125 mM NaCl, 25 mM リン酸ナトリウム pH7.2) にて 5 分間室温で振盪した (ブロッキング)。ブロッキング後のマクロアレイは、1.0 mg/ml ストレプトアビジン (NEB) を 10 μ l 添加したブロック液に移し、5 分間室温で振盪し、洗浄液 3 (ブロック液を滅菌水で 10 倍希釈) で 2 回軽くすすいだ後、洗浄液 3 にて 5 分間室温で振盪した。続いて、マクロアレイを 0.5 mg/ml ビオチン標識アルカリフォスファターゼ (NEB) を

10 μ l 添加したブロック液に移し、5 分間室温で振盪し、洗浄液 3 (ブロック液を滅菌水で 10 倍希釈) で 2 回軽くすすいだ後、洗浄液 3 にて 5 分間室温で振盪した。続いて、洗浄液 4 (10 mM Tris-HCl pH9.5, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) で 2 回軽くすすいだ後、洗浄液 4 にて 5 分間室温で振盪し、染色液 (NBT/BCIP ready-to-use tablet, Roche) に浸漬し発色反応を行った (反応は最長で 1 時間まで)。

3 検出結果

口絵②にビオチン標識ターゲットのアガロースゲル電気泳動像と、マクロアレイの結果を示した。電気泳動像とマクロアレイともに、各ウイルス罹病葉から内部標準とウイルス特異的な DNA 断片およびシグナルが検出された。マクロアレイでは、他のウイルス種とのクロスハイブリも認められなかった。各ウイルス感染葉を混合して RNA 抽出を行い (3 種混合)、標識ターゲットの増幅とマクロアレイ解析を行ったところ、全ターゲットでシグナルが検出され、4 種ターゲットを同時に検出できることが示された。3 種混合の total RNA を 1 μ g から 10 倍で段階希釈し、これを鋳型に標識ターゲットを増幅してマクロアレイ解析を行った。比較として増幅産物をアガロースゲル電気泳動に供した (泳動量は 10 μ l)。結果を口絵③に示す。アガロースゲル電気泳動像では、RNA 10 ng まで、全ターゲットの増幅が確認できたのに対し、マクロアレイでは 1 ng まで全ターゲットのシグナルを確認することができた。アガロースゲル電気泳動像で目視判定できないようなターゲット増幅をマクロアレイでは検出可能であり、マクロアレイの検出精度がより優れていることが示された。

III イチゴ炭疽病菌の検出

1 マクロアレイ作製

イチゴ炭疽病は、難防除病害の一種であり、イチゴ栽培において甚大な被害をもたらす重要病害である。近年になって北海道でも本病害の発生が確認され警戒感が強まっている (角野ら, 2009; 三澤ら, 2010)。そのため、イチゴ炭疽病菌である *Glomerella cingulata* および *Colletotrichum acutatum* を発病前のイチゴ苗から迅速に検出するマクロアレイを作製した。菌種間の配列のホモロジーや種同定への応用事例から、検出する遺伝子として交配型遺伝子 *MAT1-2* を選択した (Du et al., 2005)。各イチゴ炭疽病菌の *MAT1-2* と内部標準遺伝子 (18SrDNA) を増幅するプライマーセットを構築し (表-1)、マクロアレイを作製した (口絵①)。

2 検出工程

(1) 概要

マクロアレイによるイチゴ炭疽病菌の検出は以下の手順で行う。①検体（イチゴ葉、葉柄、葉柄基部またはランナー）からの糸状菌培養、②糸状菌のDNA簡易抽出、③標識ターゲットの Multiplex PCR による増幅、④標識ターゲットとマクロアレイの MTH、⑤発色反応による検出と判定。菌の培養を含め判定まで5～6日間で終了する。

(2) 培養とDNA簡易抽出

イチゴ葉およびランナーなどを採取し、流水で数時間から一晩洗浄した後に小片を切り取って次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌した。これをショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地に置床し、25℃暗所で3～4日間培養した。切片から増殖した菌糸を爪楊枝で少量掻き取り、1.5 ml マイクロチューブ中の滅菌水(100 μ l)に懸濁した。なお、菌糸を採取する際、培地を一緒に掻き取らないように注意する（後のPCRが阻害される場合がある）。滅菌水に懸濁した菌糸は、マイクロチューブ用ペッスルで磨砕し、遠心分離（10,000 rpm, 5分間）して残渣を沈殿させ、上清をDNA溶液としてPCRへ供試した。

(3) 標識ターゲット合成とMTH

表-1に示したイチゴ炭疽病菌用プライマーセットを混合して Multiplex PCR を行い、ピオチン標識ターゲットの合成を行った。なお、ピオチンは各フォワードプライマーの5'末端に標識した。PCRはTth DNA polymerase (Roche) を使用し反応液は20 μ lとした。増幅産物15 μ lをMTHへ供試した。

3 検出結果

標識ターゲットのアガロースゲル電気泳動像とマクロアレイの検出結果を口絵④に示した。各イチゴ炭疽病菌を接種したイチゴ苗由来の葉切片より増殖した菌糸から、それぞれ接種した菌種が検出された。また、生産圃場で発見された3株の生育不良イチゴ苗のうち、2株から *C. acutatum* が検出された。このように、培養開始初期の菌糸や器官の形態観察では菌種同定が困難な段階でも、マクロアレイで迅速にイチゴ炭疽病菌の検出・同定が可能であった。検出工程に菌の培養作業が伴うが、その培養期間は従来法よりも短縮できた。

IV ハイブリダイゼーションによる診断について

MTH法により作業の煩雑さは解消したが、ハイブリ

工程が検定作業においてタイムロスとの指摘も考えられる。しかし、ターゲットとプローブのハイブリダイズに依拠した特異性の高いシグナル検出は診断において大きなアドバンテージを有する。PCR産物のアガロースゲル電気泳動法では、ターゲットと増幅サイズが近似した非特異的なDNA断片が検出されることも少なくない。疑似陽性と思われる増幅断片が観察された事例を口絵⑤に示した。こうした事例の場合、再試験もしくは nested-PCR などの追加試験を行うか、「疑わしきは陽性」として当該イチゴ株を廃棄する対応を取るようになる（その他、コンタミの疑いから器具の洗浄、試薬の更新等が必要となる場合もある）。しかし、このような「疑わしいDNA」もマクロアレイでは、イチゴウイルスの事例は非特異的反応、イチゴ炭疽病の事例は *C. acutatum* の単独感染とそれぞれ明確に判断することができた。このようにマクロアレイは判定精度が高く結果がわかりやすいため、生産現場に適した診断ツールと考える。

おわりに

本稿のイチゴ病害診断法は、ほんの一適用事例に過ぎず、マクロアレイを用いたMTH法はあらゆる病害診断に応用できるものと考えられる。核酸抽出とPCRが実施可能な実験環境が必要となるが、近年、(比較的)安価なサーマルサイクラーが販売されるなど、遺伝子診断に必要な機器も導入しやすくなりつつある。生産圃場に近い現場で本技術が導入され広く普及することを期待する。

本研究を行うにあたり、技術導入と指導いただいた旧株式会社ラボ 谷田昌稔氏、丸田幸男氏、イチゴ炭疽病菌を分譲いただいた地方独立行政法人北海道立総合研究機構 農業研究本部 花・野菜技術センター 角野晶大氏、同 道南農業試験場 三澤知央氏に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Asaf, M. H. et al. (2000): Plant Mol. Biol. Rep. 18: 109 ~ 115.
- 2) Du, M. et al. (2005): Mycologia 97: 641 ~ 658.
- 3) 古田和義 (2003): 日植病報 69: 345 (講要).
- 4) 三澤知央ら (2010): 同上 76: 92 ~ 96.
- 5) SUGIYAMA, S. et al. (2008): J. Viol. Methods 153: 241 ~ 244.
- 6) 角野晶大ら (2009): 北日本病虫研報 60: 82 ~ 87.
- 7) THOMPSON, J. R. et al. (2003): J. Viol. Methods 111: 85 ~ 93.
- 8) WHITE, T. J. et al. (1990): PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, New York, p. 315 ~ 322.