

ファイトプラズマ病の簡便・迅速なオンサイト遺伝子診断技術 (LAMP 法) の製品化

東京大学大学院農学生命科学研究科
 前島 健作・吉田 哲也・二條 貴通・
 岡野 夕香里・大島 研郎・難波 成任

はじめに

ファイトプラズマは、1967年に東京大学植物病理学研究室の故土居養二博士（東京大学名誉教授）らにより世界に先駆けて発見され「マイコプラズマ様微生物 (mycoplasma-like organism, MLO)」と命名された植物病原微生物である（土居ら、1967）。ファイトプラズマの宿主範囲は非常に広く、世界中で1,000種類以上の植物に黄化、萎縮、叢生、てんぐ巣、葉化、突き抜け等の形態異常を伴う病徴を引き起こしている。特に作物に感染すると短期間に圃場全体にまん延し、大幅な収量・品質の低下をもたらすなど、農業生産上の問題となっている（口絵①）。また、直径0.2～1 μ mと一般細菌よりも微小であり、植物の節部に局在しヨコバイなどの吸汁性昆虫や栄養繁殖・接ぎ木を介して伝搬される点で、一般の植物病原細菌よりもむしろウイルスに類似している。一般にはあまり認知されていないが、ファイトプラズマに感染したアジサイが緑花品種として高価で取引され、育種された無病のポインセチアがファイトプラズマを接種され、商品価値の高い萎縮・叢生形態の品種として広く市販されるなど、我々の日常生活に身近な病原体でもある。一方で、診断には電子顕微鏡観察やPCR等、高価な設備や試薬と高度な技術を要する点で、ファイトプラズマ病の診断を実施できる機関は限られていた。

東京大学植物病院[®]では2008年の開設以来、植物病の発生やまん延を抑止するための社会教育活動として、農家・企業・公的機関等に加え、一般市民を対象に植物病の各種診断サービスを提供するとともに、専門家から一般市民まで容易にフィールドで利用できる植物病診断キットを開発・製品化してきた。その中にはウイルス病や土壌病害に加え、ファイトプラズマ病の診断キットも含まれる。これら診断キットは最先端の科学技術的知見に基づいて開発されており、検出感度に加えて簡易性・

迅速性においても従来どの方法よりも優れている。

本稿では、ファイトプラズマ病とその診断技術について概説するとともに、東京大学植物病院[®]において世界で初めて製品化されたファイトプラズマ病の遺伝子診断キットの開発の経緯としくみ・使用方法について紹介する。

I ファイトプラズマ病について

ファイトプラズマおよびその病害については、既に本誌第26巻5号「マイコプラズマ」特集号（1972）をはじめ、諸先達による詳細な解説がなされている（與良ら、1968；奥田、1970；杉浦、1983；難波、1993；1995；1996）。本稿ではファイトプラズマ病の新規診断技術の説明に先立ち、ファイトプラズマの生物学および分類学的性状に関する最低限の必要な情報について概説する。

我が国におけるファイトプラズマによる病害は、江戸時代より養蚕業に甚大な被害を与えたクワ萎縮病をはじめ、作物や樹木において多数報告されていた。本病は世界各地でも知られていたが、その原因は長年にわたって不明であった。土居らは、電子顕微鏡下でクワ萎縮病など萎縮叢生症状を示す各種植物の節部細胞内に局在する動物マイコプラズマに似た微小細菌を世界で初めて発見し（土居ら、1967）、その形態的特徴とテトラサイクリンにより治癒すること（石家ら、1967）から、MLOと命名した。その後、世界中でMLOの存在が追認され、新たな植物病原微生物群として注目された。しかし、培養が困難なことから病原体の性状解析は困難を極め、分類学的位置づけも明らかではなかった。また、萎縮叢生などの共通した症状を示す各種植物には同様なMLO粒子が電子顕微鏡下で観察されるが、培養できないことからそれらの病原体間の判別や比較は困難であり、各植物に発生する病害ごとに病原MLOの名称（植物名+特徴的性状名称+MLO）が付されていた。その結果、国内で約60種類、世界で700種類以上ものMLOと称される植物病原体が認知される結果となり、明確な整理・分類基準が求められていた。

1990年代になって、MLOの16S rDNA遺伝子の特異的なPCR増幅法（NAMBA et al., 1993 a）およびその増幅DNAのダイレクトシーケンスデータに基づいた分類法

Development of a Simple and Rapid Diagnosis Kit of Phytoplasmal Diseases Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). By Kensaku MAEJIMA, Tetsuya YOSHIDA, Takamichi NIO, Yukari OKANO, Kenro OSHIMA and Shigetou NAMBA

(キーワード: LAMP, ファイトプラズマ, 病害診断)

(NAMBA et al., 1993 b) が急速に普及し、MLO がマイコプラズマとは進化的に独立した生物群であることが明らかになった。このことからこれまで不明であったモリキエータス (Mollicutes) 綱における MLO の分類体系が明らかになり、MLO をファイトプラズマ (Phytoplasma) と呼称することが提案・承認され (難波, 1995 ; 1996), ファイトプラズマ (Phytoplasma) 属が新設された (IRPCM, 2004)。これによりファイトプラズマに分子レベルのメスが入られる機運が高まり、16S rDNA 遺伝子の塩基配列の差異による、ファイトプラズマ種の分類基準も整備され (IRPCM, 2004), 現在では世界に発生するファイトプラズマは提案中のものも含め約 40 種に整理されている。

国内に発生するファイトプラズマ病として正式に記載されているものは、約 70 種類あるが (日本植物病理学会・農業生物資源研究所 編, 2012), これらについても現在 9 種にまとめられている (表-1)。興味深いことに、クワ萎縮病を含む多数の病害が *Candidatus Phytoplasma asteris* 一種により引き起こされることが明らかになっている。*Ca. P. asteris* は海外においても最も多くしかも広域に病害を引き起こすファイトプラズマとして知られ、同時に最大の種集団を形成している (LEE et al., 2004)。一方で、他の 7 種により引き起こされる病害は、種類は少ないが、アジサイ葉化病やイネ黄萎病等被害の大きなものも含まれている (表-1)。

II 従来のファイトプラズマ病の診断技術

ファイトプラズマ病は伝染性病害であり、その防除には、伝染源となる感染植物の早期診断による特定が重要である。ファイトプラズマが発見された当初は、病徴観察や媒介昆虫による媒介試験、節部超薄切片の電子顕微鏡観察によるファイトプラズマ粒子の検出が主な診断手法であった。中でも電子顕微鏡観察は最も強力な武器であったが、超薄切片試料作製と電子顕微鏡が必須であるため、非常に高額かつ大型な設備が必要なうえに、迅速な診断には不向きであった。そこで、1980 年代になって、いくつかの簡易診断法が開発された。直接蛍光観察 (direct fluorescence detection, DFD) 法 (難波ら, 1981) や DAPI 法 (HIRUKI et al., 1986) はその好例であった。これらはそれぞれ、ファイトプラズマ感染により壊死過程にある節部細胞や、節管細胞内のファイトプラズマ DNA を検出する手法であり、徒手切片の蛍光顕微鏡観察により容易に診断できる利点があった。一方、当時ウイルス病の診断技術として、特異抗体を用いた簡易で高感度な ELISA 法が普及していたが、ファイトプラズマ

表-1 国内に発生するファイトプラズマおよびその病害^{a)}

病原 ^{b)}	宿主植物	病名
<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	アイスランドポピー	萎黄病
	アジサイ	葉化病
	アゼナ	てんぐ巣病
	アネモネ	てんぐ巣病
	キク	てんぐ巣病
	キバナコスモス	萎黄病
	キリ	てんぐ巣病
	クワ	萎縮病
	コスモス	萎黄病
	シネリア	てんぐ巣病
	スターチス	てんぐ巣病
	セリ	萎黄病
	タマネギ	萎黄病
	チドリソウ	てんぐ巣病
	チャービル	萎黄病
	トマト	萎黄病
	ナス	萎縮病
	ニンジン	萎黄病
ヌルデ	萎黄病	
マーガレット	マイコプラズマ病	
ミシマサイコ	萎黄病	
ミツバ	てんぐ巣病	
レタス	萎黄病	
<i>Ca. P. pruni</i>	アズキ	萎黄病
	ウド	萎縮病
	ツワブキ	てんぐ巣病
	リンドウ	てんぐ巣病
<i>Ca. P. aurantifolia</i>	キク	緑化病
<i>Ca. P. castaneae</i>	クリ	萎黄病
<i>Ca. P. fragariae</i>	イチゴ	黄化病
<i>Ca. P. japonicum</i>	アジサイ	葉化病
<i>Ca. P. luffae</i>	ホルトノキ	萎黄病
<i>Ca. P. oryzae</i>	イネ	黄萎病
<i>Ca. P. ziziphi</i>	ナツメ	てんぐ巣病

^{a)} 病原が明らかな病害のみ記載した (眞山・難波, 2010)。

^{b)} 本稿で紹介するキットの検出対象をボールドで示した。

の精製に成功していなかったため、その特異抗体の開発や抗原試料の調整が極めて困難であり、ELISA 法は適用できなかった。

上述のファイトプラズマ 16S rDNA 遺伝子の特異的 PCR 増幅法 (NAMBA et al., 1993 a) はファイトプラズマの分類に利用されるとともに、感度の極めて高い検出診断技術としても有効であり、現在最も普及している (田中, 2001)。しかし、PCR 法は遠心機、サーマルサイクラー、電気泳動装置、ゲル撮影装置等高価な設備が必要

であるうえに、全行程完了までに4時間以上要する。したがって、ファイトプラズマ病の診断は設備と時間がボトルネックであり、フィールドで利用可能な診断技術はこれまで確立されていなかった。

III LAMP法によるファイトプラズマ病の診断技術

1 LAMP法による診断技術の開発

loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法は、我が国で開発された等温遺伝子増幅法である。LAMP法のメカニズムについては既に本誌において福田(2005)により詳しく紹介されているため、ここでは割愛させていただく。LAMP法のPCR法より優れている点として、検出感度と特異性が高いうえに、特別な設備が不要で、保温ポットと温水があれば、定温(60~65℃)で遺伝子増幅反応が進行する。

LAMP法は植物病害診断の場においてもPCR法に代わる遺伝子診断技術としてウイルス病を中心に利用されており、東京大学植物病院[®]でもウメ輪紋ウイルス(plum pox virus, PPV)やイチジクモザイクウイルス(fig mosaic virus, FMV)の検出キットを開発・製品化している。これらのキットは、爪楊枝を葉や果実に刺すだけでよい簡易核酸サンプリング法と、蛍光発色液による遺伝子増幅の可視化を採用することにより、60分以内に迅速な遺伝子診断が可能であることを確認したうえで開発された。これら知見を応用して、LAMP法によるファイトプラズマ病の迅速・簡便な診断技術の開発を試みた。

前述のように国内には8種のファイトプラズマの発生が確認されているが(表-1)、なかでも国内外で最も多数の病害を引き起こしている*Ca. P. asteris*および国内各地のアジサイ園地で問題となっている*Ca. P. japonicum*を対象に開発を試みた。LAMPプライマーのターゲットには、分子シャペロンをコードする*groEL*遺伝子を用いた。種内における*groEL*遺伝子の保存性は高く、塩基レベルで*Ca. P. asteris*では93.8%以上(平均98.1%)(Mitrović et al., 2011)、*Ca. P. japonicum*では100%保存されている。サンプリング法については、ウイルス病の場合とは異なり爪楊枝を用いた簡易核酸サンプリングは不適であった。そこで、抽出バッファー中での加熱による簡易核酸抽出法を確立した。その結果、東京大学植物病院[®]では簡便・迅速・高感度なファイトプラズマ検出技術の開発に成功し、2011年9月に世界初のファイトプラズマ病の遺伝子診断キットとして製品化した。なお、当初は名称を「アジサイ葉化病診断キット」としていたが、2012年11月から「ファイトプラズマ検出キット」(株式会社ニッポンジーン, NE0111)としている。

また、この成果の一部については論文として発表している(SUGAWARA et al., 2012)。

2 診断手順

本キットによるファイトプラズマ病の診断は、(1)簡易核酸抽出(95℃, 10分間)、(2)LAMP反応(61℃または63℃, 30~60分間)、(3)目視による結果判定の3ステップにより行う。診断はサンプリングから70分以内に完了する(口絵②)。必要な器具類は表-2に示したが、試薬類とPCRチューブはキットに含まれており、実験器具はマイクロピペットなどを除き日用品で十分である。以下に、フィールドもしくはそれに準じた環境において本キットを利用する際の手順を紹介する。

(1) 簡易核酸抽出

ファイトプラズマは篩部局在性であるため、核酸抽出には葉脈などの篩部を含む組織を用いる。まず、1.5 ml マイクロチューブにファイトプラズマ抽出液を100 μl ずつ分注する。植物の葉などからカミソリで切り出した葉脈など維管束部分(2 mm × 5 mm 程度)を入れ、95℃で10分間静置し、核酸を抽出する。保温ポットを用いる場合は、発泡スチロールなどのフロートにチューブを挿し垂直に保つ。

(2) LAMP 反応

簡易核酸抽出の間に、LAMP反応液を調整する。キットには*Ca. P. asteris*と*Ca. P. japonicum*をそれぞれ特異的に検出するための2種類の検査液が含まれるので、目的に応じ、いずれかを用いる。1テスト当たり、検査液(バッファー、プライマー、dNTPを含む)21 μl、両検出に共通のファイトプラズマ酵素液(耐熱性鎖置換型DNA polymeraseを含む)1 μl、蛍光発色液1 μlを混合し、0.2 ml PCRチューブに23 μl ずつ分注しておく。これに(1)の核酸抽出液を2 μl 加え、ミネラルオイルを20 μl 重層し、チューブの蓋を閉じる。判定基準のため、かならず陽性コントロール区と陰性コントロール区も設ける。61℃(*Ca. P. asteris*の場合)または63℃(*Ca. P. japonicum*の場合)で30~60分間反応させ、LAMP反応を行う。保温ポットを用いる場合は、先ほどの熱水に水を加え、適温になるまで冷まして用いるとよい。

表-2 必要な試薬・器具類

ファイトプラズマ検出キット(冷凍)・マイクロピペット(1~200 μl 程度を扱える容量のもの)・チップ(10 μl, 200 μl: フィルター付きを推奨)・1.5 ml マイクロチューブ・チューブ立て・カミソリ・魔法瓶・熱水・水・温度計・フロート・UVランプ・ポリ袋

(3) 結果判定

LAMP 反応後、直ちに目視で結果判定を行う。陽性コントロール区 (黄緑色) および陰性コントロール区 (変化なし。ほぼ無色) の発色を判断基準にする。UV 照射により発色が鮮明になる。研究用の UV ランプは高価だが、図-1 のような市販 (数百円) のキーホルダー型 UV-LED ランプ (波長 375 nm) により代用できる。

3 注意点

LAMP において最も注意すべき点は、既に述べられているように (福田, 2005) 反応後の増幅産物による検査環境の汚染である。汚染するとしばらくは偽陽性を生じ検査できなくなる。増幅産物の電気泳動やオートクレーブはもとより、反応後のチューブを開けることも避けるべきである。また、反応後のチューブや、検査液と酵素液が付着していると考えられるチップ、チューブは、すべてポリ袋に密封して廃棄することを推奨する。

また、本キットで採用している核酸抽出法が植物体のごく一部を用いる簡易法である点にも注意が必要である。サンプリング部位が不適切な場合は偽陰性を生じることがあるため、病徴を呈している組織を用いることが重要である。偽陰性が疑われる場合は、複数の部位を検定すること、一般的な DNA 抽出法を採用して試みることも、PCR 法等別の手法を試みることも有効である。

おわりに

ファイトプラズマの発見から半世紀近く経て、ようやくフィールドで利用可能な診断技術が実用化に至った。本キットによる診断は従来の PCR 法と比較して遙かに迅速かつ簡便である。また、国内外で多くの植物・農作物に発生している最大のファイトプラズマ群である *Ca. P. asteris* を広く検出できることから、多数のファイトプラズマ病の診断に利用できる。本キットの普及により生産現場におけるファイトプラズマ病防除への貢献が見込まれる。また、ファイトプラズマ病への理解を深めるための科学教材としての活用も期待される。現在、国内に発生する他のファイトプラズマ種についてもキット化を検討中であり、キットの輸出のほか、海外に発生するフ



図-1 キーホルダー型 UV-LED ランプを用いた判定

ライトプラズマについてもキット化が待たれる。今後は、本キットをさらに改良することにより、ファイトプラズマ病の包括的な防除基盤に繋げていきたい。

引用文献

- 1) 土居養二ら (1967): 日植病報 33: 259 ~ 266.
- 2) 福田至朗 (2005): 植物防疫 59: 157 ~ 160.
- 3) HRUKI, C. et al. (1986): Can. J. Plant Pathol. 8: 185 ~ 188.
- 4) IRPCM (2004): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1243 ~ 1255.
- 5) 石家達爾ら (1967): 日植病報 33: 267 ~ 275.
- 6) LEE, I.-M. et al. (2004): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1037 ~ 1048.
- 7) 眞山滋志・難波成任 編 (2010): 植物病理学, 文永堂出版, 東京, p. 75 ~ 76.
- 8) MITROVIĆ, J. et al. (2011): Ann. Appl. Biol. 159: 41 ~ 48.
- 9) NAMBA, S. et al. (1993 a): Phytopathology 83: 786 ~ 791.
- 10) ——— et al. (1993 b): Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 461 ~ 467.
- 11) 難波成任ら (1981): 日植病報 47: 258 ~ 263.
- 12) ——— (1993): 植物防疫 47: 86 ~ 93.
- 13) ——— (1995): 同上 49: 11 ~ 14.
- 14) ——— (1996): 同上 50: 152 ~ 156.
- 15) 日本植物病理学会・農業生物資源研究所 編 (2012): 日本植物病名目録 (第2版).
- 16) 奥田誠一 (1970): 植物防疫 24: 155 ~ 159.
- 17) SUGAWARA, K. et al. (2012): J. Gen. Plant Pathol. 78: 389 ~ 397.
- 18) 杉浦巳代治 (1983): 植物防疫 37: 11 ~ 19.
- 19) 田中 穰 (2001): 同上 55: 495 ~ 498.
- 20) 興良 清ら (1968): 同上 22: 2 ~ 8.