

ミニ特集：養液栽培における高温性水媒伝染病害の安全性診断

LAMP 法による培養液中の病原菌検出技術の開発

愛知県農業総合試験場 環境基盤研究部 生物工学研究室 ^{ふくた}福田 ^{しろう}至朗・^{たかはし}高橋 ^{れいこ}麗子

I LAMP 法とは

1 LAMP 法の特徴

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は NOTOMI et al. (2000) によって報告された新しい DNA 増幅法である。LAMP 法では、増幅のターゲットとする配列からそれぞれ 20 bp 程度の領域を 6 箇所選び、4 種類のプライマー（外側の F3 と B3 プライマーおよび内側の FIP と BIP プライマー）を設計する。このうち、外側の F3 プライマーと B3 プライマーはそれぞれ F3 領域のセンス配列と B3 領域のアンチセンス配列を持っている。また、FIP プライマーは F1 領域のアンチセンス配列に F2 領域のセンス配列をつなげた約 40 bp のプライマー、BIP プライマーは B1 領域のセンス配列に B2 領域のアンチセンス配列をつないだものである（図-1）。これらの 4 種のプライマーに、DNA を合成する酵素 *Bst* DNA polymerase や検定したいサンプルの DNA 等を加え、60～68℃の一定温度で 1 時間程度保温することで多量の DNA を増幅することができる。

LAMP 法の長所を以下に挙げる。

- ① 60～68℃の一定温度で 1 時間反応させることによって DNA を増幅することができる。そのため、サーマルサイクラーなど高価な機器は不要で、恒温器や恒温水槽等の簡易な機器、または電気ポットや保温性の高い水筒等を利用することができる。
- ② 増幅の有無を確認するための電気泳動は必要なく、保温終了後に反応液が白く濁っているか否か、または HNB などの色素を使うことにより、色相の変化で DNA 増幅の有無を判定することができる。そのため、電気泳動に必要な技術や機器は必要ない。
- ③ LAMP 反応は植物や昆虫等に含まれている反応阻害物質による影響を受けにくい。そのため、鋳型の精製度が低くても DNA 増幅反応が可能である。

このような特徴から、LAMP 法は農業生産現場で行う

ことができる病害診断技術として利用することができる。

2 LAMP 法を用いた高温性 *Pythium* 属菌の検出

近年、野菜や花き類の養液栽培は、栽培管理の行き届いた生産施設で行われることが多いが、これまでに全くなかった高温性 *Pythium* 属菌による水媒伝染性病害の発生が大きな問題となっている。これらの病害では、養液を介して病原菌が施設全体に瞬く間に伝染するため、急速かつ甚大な被害を及ぼすこともある。さらに、毎年同じ施設、同じ時期に同じ病害が繰り返し発生しており、被害の軽減と防除対策の策定が生産現場における緊急の課題となっている。病害防除の基本は正確な診断にあり、すべての防除対策は診断結果をもとに組み立てる必要がある。ところが、従来の *Pythium* 病害の診断には、サンプルから病原菌を分離・培養した後、形態による同定が必要であり、熟練と労力、さらには判定に 4～5 日かかることから、農業生産現場での利用は難しかった。

そのため、LAMP 技術を利用した高温性 *Pythium* 属菌の簡易検出法を開発し、農業生産現場での正確な病原菌モニタリングと既存の防除技術を組合せた「安全診断マニュアル」を策定することを目的として今回の研究を行った。本稿では、その基幹技術となる 3 種の高温性 *Pythium* 属菌に対する LAMP 法を利用した簡易診断技術の開発について紹介する。

II LAMP プライマーの設計と特性

1 LAMP プライマーの設計

LAMP 反応を利用して高温性 *Pythium* 属菌を検出するためには、それぞれの菌を精度よく特異的に検出することのできるプライマーを設計する必要がある。通常、*Pythium* 属菌の種特異的な遺伝子診断には、ITS 領域またはミトコンドリア DNA の *cytochrome oxidase II* 遺伝子を用いることが多い。今回の研究では、ITS 領域を用いてプライマーを設計した。*Pythium* 属菌の ITS 領域、特に同じ単系統 (Clade) に属している種の塩基配列を比較し、高温性の *Pythium* 属菌 *P. aphanidermatum*, *P. helicoides*, *P. myriotylum* のそれぞれに特徴的な配列を選び出した。これらの配列から 3 種の *Pythium* 属菌 (FUKUTA et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2014) をそれぞれ検出できる LAMP プライマーを設計した。

Development of the Detection Method for High-temperature-*Pythium* in Hydroponic Solution by the LAMP Assay. By Shiro FUKUTA and Reiko TAKAHASHI

(キーワード：高温性ピシウム, 診断, 養液栽培, loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

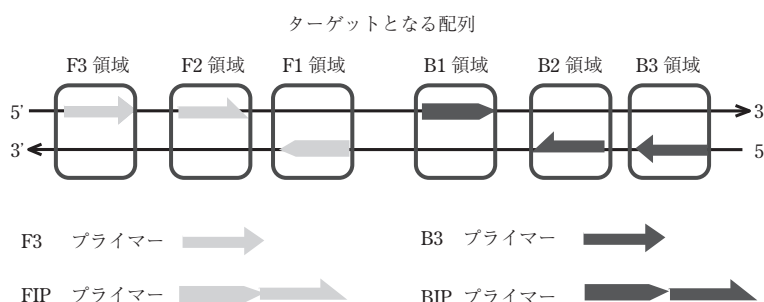


図-1 LAMP 反応に用いるプライマー

2 LAMP 反応

LAMP 反応には、20 mM Tris-HCl pH8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Triton X-100, 0.8 M betaine, 4 mM MgSO_4 , 1.6 mM dNTPs, 0.2 μM F3 と B3 プライマー, 1.6 μM FIP と BIP プライマー, 0.8 μM FLoop と BLoop プライマー, 8 units の *Bst* DNA polymerase, 1 μl の DNA 液を含む 25 μl の反応液で行った。

3 LAMP プライマーの特異性と検出限界

設計した LAMP プライマーが目的の高温性 *Pythium* 属菌のみを検出する「特異性」を持っていることを確認するため、40 種の *Pythium* 属菌から抽出した DNA を用いて LAMP 反応を行った。反応には、リアルタイム濁度測定装置を用いた。これは、LAMP 反応を行いながら反応液の濁度を測定することのできる装置で、DNA が増幅している反応液では、反応産物として生成する不溶性のピロリン酸マグネシウムによって反応液が白く濁ることを利用して DNA 増幅の有無や増幅が始まった時間を確認することができるものである。

濁度検出の結果、本研究で設計した LAMP プライマーは、それぞれ目的の *Pythium* 属菌のみで濁度の上昇が認められた。*P. aphanidermatum* では反応開始から 20 分後 (図-2 A) *P. helicoides* では 15 分後 (図-2 B), *P. myriotylum* では 25 分後に濁度が上昇した (図-2 C)。一方、その他の *Pythium* 属菌では反応開始から 1 時間以内では濁度の上昇は認められなかった。さらに、11 種の *Phytophthora* 属菌や、トマト萎凋病などの原因菌である *Fusarium oxysporum*, 多犯性の *Rhizoctonia solani* などを含んだ 10 種の土壌伝染性病害菌に対しても濁度の上昇は認められなかった。

次に、設計したプライマーの検出限界を調べた。*P. aphanidermatum*, *P. helicoides*, *P. myriotylum* の菌糸から DNA を抽出し、濃度を定量した後、1 pg/ μl ~ 10 fg/ μl まで 10 倍ずつ段階希釈した。これらの DNA 液 1 μl を使って PCR および LAMP 反応を行った。その結果、*P.*

helicoides および *P. myriotylum* では PCR, LAMP とともに 100 fg/ μl の DNA まで検出でき、両者の検出感度は同等であることが明らかとなった。また、*P. aphanidermatum* では、PCR の検出限界が 1 pg/ μl だったのに対し、LAMP 反応では 10 fg/ μl まで検出でき、LAMP 反応は PCR の 100 倍の検出感度を有することがわかった。以上のように、LAMP 反応による検出は PCR に比べ、同等か 100 倍高い検出感度を持っていることが明らかとなった。

III LAMP 法を使った病害診断

1 養液からの病原菌の検出

開発した LAMP 診断技術を使い、実際の農業生産施設で水耕栽培に用いている培養液からの *Pythium* 属菌検出を行った。愛知県内のポインセチア栽培農家および三重県内のトマト栽培農家で経時的にサンプリングした養液 2 l を、1 l ずつ 2 枚のメンブレンフィルター (ポアサイズ: 5 μm) でろ過した。*Pythium* 属菌の遊走子は 10 μm 程度であるため、培養液中の遊走子はメンブレン上に残る。このメンブレンから抽出した DNA を用いて LAMP 反応を行うことにより 3 種の高温性 *Pythium* 属菌の検出を試みた。また、同時にもう 1 枚のメンブレンフィルターを用いて選択培地を用いて培養を行い、培養物の形態観察によって *Pythium* 属菌の種類と数を調べた。結果を表-1 に示した。従来の培養と形態観察を用いた手法で高温性 *Pythium* 属菌が検出された培養液のほとんどで LAMP 反応でも同じ *Pythium* 属菌が検出された。これにより、今回開発した LAMP プライマーが高温性 *Pythium* 属菌による病害の診断に利用できることを確認することができた。

2 簡易診断技術の開発

養液栽培における水媒性の伝染病害の最も大きな問題は、一度病気が発生すると培養液などを通じて瞬刻間に病気が広がる可能性があることである。そのため、診断

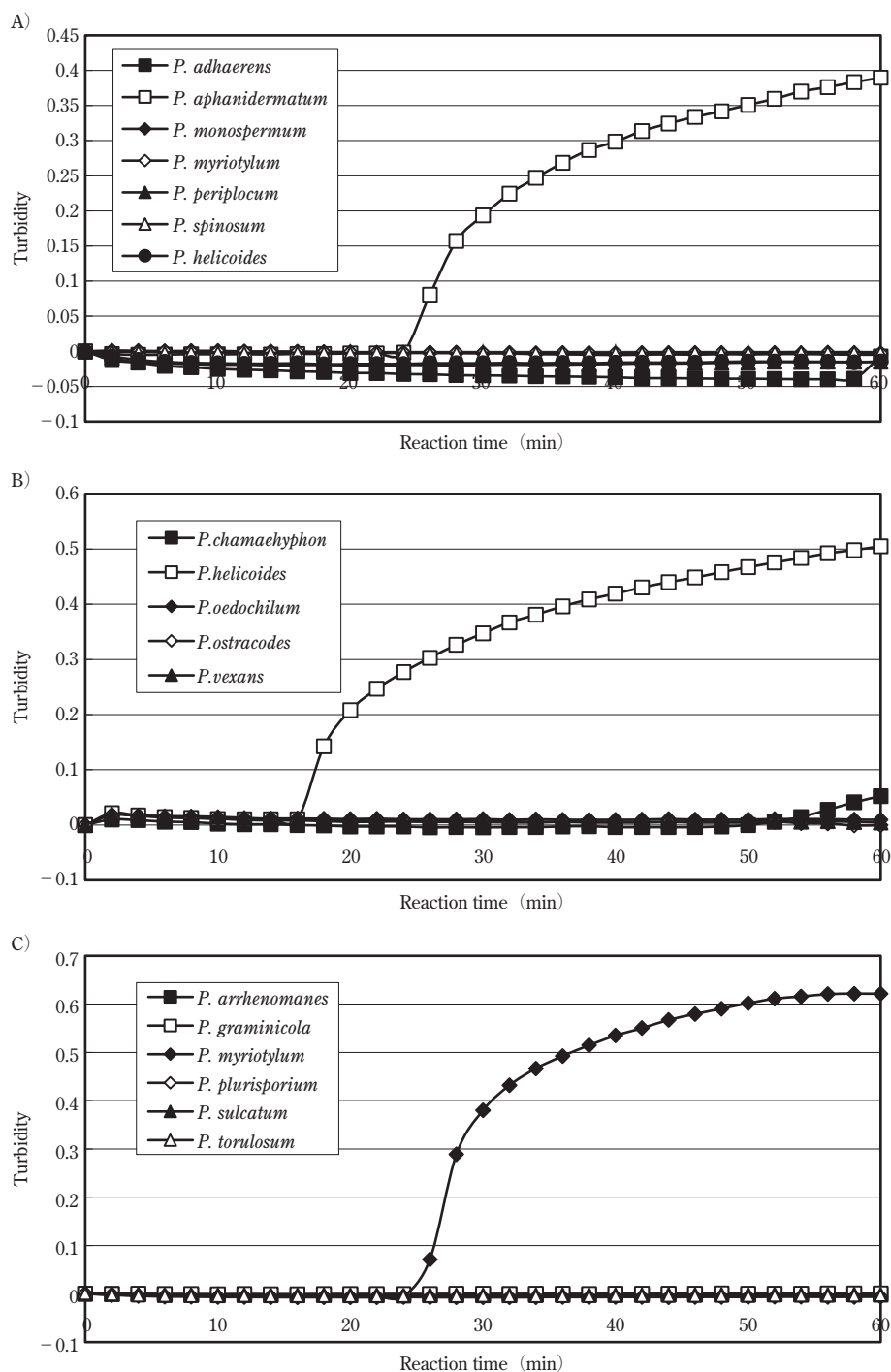


図-2 3種の高温性 *Pythium* 属菌の LAMP プライマーの特異性検定
 A) : *P. aphanidermatum*, B) : *P. helicoides*, C) : *P. myriotylum*.

表-1 農業生産施設の培養液からの高温性 *Pythium* 属菌の検出

ポインセチア栽培施設の培養液 LAMP 法					トマト栽培施設の培養液 LAMP 法			
	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. helicoides</i>	<i>P. myriotylum</i>	非検出	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. helicoides</i>	<i>P. myriotylum</i>	非検出
<i>P. aphanidermatum</i>	12	0	0	0	9	0	0	0
<i>P. helicoides</i>	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>P. myriotylum</i>	0	0	0	0	0	0	9	2
検出されない	0	2	1	49	1	0	1	13

LAMP 法と培養法で結果が一致していたサンプル数を網掛けで示した。

表-2 農業生産現場で行った簡易検出技術による診断結果

作目	検出の対象	簡易検出技術		分離同定法	
		菌種	検体数	菌種	検体数
植物体-LAMP 法	ポインセチア 腐敗根	<i>P. aphanidermatum</i>	5	<i>P. aphanidermatum</i>	5
		<i>P. helicoides</i>	12	<i>P. helicoides</i>	12
		陰性	5	陰性	5
		計	22	計	22
	バラ 腐敗根	<i>P. helicoides</i>	2	<i>P. helicoides</i>	2
植物体-LAMP 法	キク 腐敗根	<i>P. helicoides</i>	1	<i>P. helicoides</i>	1
ベイト-LAMP 法	ポインセチア 養液 (エゴマ)	<i>P. helicoides</i>	7	<i>P. helicoides</i>	6
		<i>P. myriotylum</i>	1	<i>P. myriotylum</i>	0
		陰性	82	陰性	84
		計	90	計	90
	バラ 養液 (エゴマ)	<i>P. helicoides</i>	77	<i>P. helicoides</i>	78
		陰性	7	陰性	6
		計	84	計	84
ミニバラ 養液 (エゴマ)		<i>P. helicoides</i>	21	<i>P. helicoides</i>	25
		陰性	21	陰性	17
		計	42	計	42

に用いる発病農作物や培養液のサンプリング・診断・診断結果に基づいた防除対策は一連の作業として短時間に行われることが望ましい。このようなことから病害診断の研究分野では、近年、サンプリングしたその場で診断を行う「On-site Diagnosis」の手法開発が急速に進んでいる。従来から用いられている抗原抗体反応を使った「イムノストリップ法」もその一例であるが、発病前診断という予防的な見地から、より高い検出感度を持った遺伝子診断の現場利用が必要であると考えられる。高温性 *Pythium* 属菌の農業生産施設での診断技術開発にあたって、その手法に求められる特徴は以下のようなものであった。

・栽培施設内の管理舎のような簡易な施設で行うことが

できる。

- ・診断には高額な機材を使用せず、なるべく低コストで行うことができる。
- ・短時間の作業で行うことができる。
- ・高度な技術を必要としない。
- ・判定基準がわかりやすい。

また、養液栽培の現場でのピシウム菌検出には様々な対象が想定される。例えば、農作物や周辺雑草等の植物サンプル、養液や原水等の水のサンプル、育苗に用いる土壌や Ebb&Flow 栽培でのポット土壌などの土サンプル、栽培前や終了後の資材などである。資材からの検出は、水を張った容器に資材を入れ、水に出てくるピシウム菌を検出することで可能となる。そのため、大きくわ

けると、植物・土・水の3種類がピシウム菌検定の対象となると考えられる。

(1) 植物体からのサンプル調整

根や茎からの高温性 *Pythium* 属菌の検出には、「植物体-LAMP 法」を用いた。サンプルを水に入れて振り混ぜることにより、感染植物の表面に付着した *Pythium* 属菌の菌糸や遊走子等を剥がし、その水を使って LAMP 診断を行う手法である。「植物体-LAMP 法」は以下の手順で行う。

- ① 根であれば2～3 cm の長さのものを2～3本、茎は1 cm 程度のものをサンプリングする。
- ② 採集した植物を、あらかじめ5 ml の滅菌水を入れたコニカルチューブに入れ、ふたをして1分間手で振り混ぜる。
- ③ 5 μ l を LAMP 反応に用いる。

植物体を用いたサンプル調整には、枯死してしまったサンプルを用いない。病気などで枯れてしまった植物を使うと、植物体の表面に菌糸や遊走子がおらず、*Pythium* 属菌が感染している植物でも菌を検出できないことがあるためである。

(2) 培養液・土壌からのサンプル調整

培養液や原水、ポット内や廃土等の土壌からの高温性 *Pythium* 属菌の検出には「ベイト-LAMP 法」を利用することができる。ベイト法は、*Pythium* 属菌がエゴマ種子や芝の葉片に感染しやすいことを利用し、エゴマ種子を餌(ベイト)として養液や土壌中に生息する *Pythium* 属菌をおびき寄せるという手法である。ベイト法によって *Pythium* 属菌が感染したエゴマ種子からは、LAMP 法を利用して容易に高温性 *Pythium* 属菌の検出を行うことができる。このようにベイト法と LAMP 法を組合せたのが「ベイト-LAMP 法」である。「ベイト-LAMP 法」は以下の手順で行う。

- ① お茶パックに滅菌したエゴマ種子を入れた「ベイト」を作成する (WATANABE et al., 2008)。
- ② 検定したい養液または土壌中にベイトを入れ、3日～1週間静置する。その間、養液や土壌中に高温性 *Pythium* 属菌がいればベイトに誘引され、エゴマに侵入し増殖する。
- ③ エゴマ種子を回収し、あらかじめ5 ml の滅菌水を入れたコニカルチューブに入れ、ふたをして1分間手で振り混ぜる。
- ④ 5 μ l を LAMP 反応に用いる。

(3) LAMP 反応

簡易検出法に用いる LAMP 反応には、II 章2節で示した組成の反応液に、判定を容易にするための色素

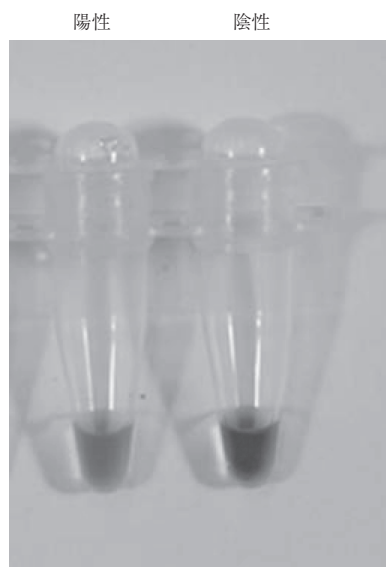


図-3 簡易検出技術での LAMP 反応後の反応液の色の变化

Hydroxy Naphthol Blue (HNB) を 120 μ M になるように添加した。実験室で LAMP 反応試薬を作成し、反応用チューブに分注した後、現地で(1)または(2)の方法で調整したサンプルを5 μ l 加えた。LAMP 反応は保温性の高いステンレス性のフードジャーを用いて行った。ジャーに80℃程度の湯を入れ、水を加えながら温度計を用いて約65℃になるように調整した後、発泡スチロールなどで作ったフロートを使って反応チューブを浮かべ、蓋をして60分反応させた。

(4) 簡易 LAMP 反応の結果

図-3 に HNB を加えた LAMP 反応試薬の反応後の色の变化を示した。陽性の反応液では、紫色を呈していた試薬の色が水色に変化しており、色の变化のない陰性の反応液とは容易に識別することが可能であった(図-3)。

高温性 *Pythium* 属菌の簡易検出法である「植物体-LAMP 法」および「ベイト-LAMP 法」を用いた診断の結果を表-2 に示した。「植物体-LAMP 法」では、バラ、キク、ポインセチアを使った農業生産現場での診断の結果、退色し根腐れ症状を呈した根のサンプルの多くからは高温性 *Pythium* 属菌が検出された。これらの根から培養と形態観察による手法を用いて *Pythium* 属菌の分離、同定をしたところ、LAMP 診断で確認されたものと同種の菌であることを確認することができた(表-2)。

また、水耕栽培に用いる培養液中に生存する高温性 *Pythium* 属菌を「ベイト-LAMP 法」を用いて診断した。その結果、ポインセチア栽培施設の培養液90サンプル中、*P. helicoides* が7サンプルから、*P. myriotylum* が1

サンプルから検出された。バラ水耕栽培施設では、培養液 84 サンプル中、*P. helicoides* が 77 サンプルから、さらに Ebb&Flow で栽培されたミニバラ栽培施設の培養液 42 サンプル中 *P. helicoides* が 21 サンプルから検出された。LAMP 診断に用いた同じエゴマを使って培養と形態観察による手法を用いて *Pythium* 属菌の分離・同定を行ったところ、ほとんどのサンプルで両者の結果は一致し、「バイト-LAMP 法」の有用性を確認することができた(表-2)。「バイト-LAMP 法」と分離・培養の結果が一致しなかったサンプルの多くは、バイトに用いたエゴマ種子への *Pythium* 属菌の感染率が低い傾向にあった。今後、これらの低感染率の場合でも検出できるようにするための技術改善が必要である。

IV LAMP 法の注意点

LAMP 反応は短時間に多量の DNA を増幅することができる極めて有用な技術である。一方、増幅効率が高いため、以下のような注意点が必要となる。

- ① エゴマや植物等のサンプルを扱う際には、サンプル間でピシウム菌が交じり合わないよう、サンプルを扱う際に用いるピンセットを取り替えるか、滅菌用エタノールなどでよく洗ってから使う。また、抽出液を扱う際にも、サンプルごとにチップを取り替えることが重要である。特にチップは、エアロゾルに含まれる DNA がピペットに入り込まないように、フィルター付きの物を使うのが望ましい。
- ② LAMP 反応において最も問題となるのが増幅産物のコンタミネーションである。増幅した DNA が反応試薬に混入してしまうと、すべての反応チューブで極めて短時間に DNA が増幅されるようになる。鋳型 DNA を入れていない反応液で陽性と判定される色相になるようであれば、まずコンタミネーションを疑わなければならない。コンタミネーションを防ぐための最も有効な方法は、場所と器具を分けることにある。試薬調整、サンプル調整、反応終了後の反応液等はそれぞれ別の器具、別の空間で取り扱うことが必要とな

る。特に、反応後のチューブの蓋を絶対開けず、色相の判定後はそのままビニール袋などに入れ廃棄することで、コンタミネーションの危険性を低く抑えることができる。

- ③ 現地での病害検出を行う際には、実験室などで必要本数分の試薬を分注した後に現地に移動する。現地でのサンプル調整についてもなるべく落ちていて作業できる管理舎などを使うことで、診断の失敗を防ぐことができる。また、LAMP 反応の作業を複数人で行うと、サンプルの入れ忘れや順番の間違い等の誤操作が起きやすくなる。作業に慣れないうちは、一連の作業は一人で行うことを勧める。
- ④ 診断を行う際には必ず陽性と陰性の対照を加える。これらの色相の変化と対比させることによって判定を行うことが重要である。陽性、陰性の対照は、現地に行く前にあらかじめ作成しておく、コンタミネーションの影響が少なくなる。

V 今後の課題

上述のように、今回の研究で開発した LAMP 反応を用いた簡易検出技術は、農業生産現場での診断に十分実用性を有することが明らかとなった。これらの手法は、ピペットと反応試薬が準備できれば、生産圃場内の簡易な施設で十分行うことができる。基本的には普及指導員や営農指導員等を対象にした手法開発を目指したが、先進的な農家であれば十分利用可能な技術であると考えている。今後は、これらの診断技術と防除手法の最適な組合せを検討するとともに、より扱いやすい技術とするための改良を進めていきたいと考えている。

引用文献

- 1) FUKUTA, S. et al. (2013): European Journal of Plant Pathology 136: 689 ~ 701.
- 2) ——— et al. (2014): Letters in Applied Microbiology (in press).
- 3) NOTOMI, T. et al. (2000): Nucleic Acids Research 28: e63.
- 4) TAKAHASHI, R. et al. (2014): FEMS Microbiology Letters (in press).
- 5) WATANABE, H. et al. (2008): Journal of General Plant Pathology 74: 417 ~ 424.