

マクロアレイ技術を利用した植物病原体検出法の研究開発

学位論文内容の要旨

ジャガイモと食用ユリは共に北海道において重要な作物である。ジャガイモは北海道の基幹作物であり、食用ユリは国内生産量の95%が道内で生産されている。これらの栽培において、シストセンチュウやウイルスによる病害が特に問題となっており、効果的な防除には早期発見が重要であることから、正確で簡便な病原体の検出法が求められている。本研究では、cDNA マクロアレイを用いて、ジャガイモシストセンチュウの検出と重複感染ユリからの高感度ウイルス検出法を研究・開発した。以下に主要な研究成果について要約する。

1) 作物健康センサーを用いたジャガイモシストセンチュウの検出

有害な植物寄生性線虫の中でも、ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*, Potato cyst nematode, 以下 PCN) は、世界的に極めて重要な農害虫の一つであり、国内でも、1972年に初めて北海道で発見されて以来、その発生地は徐々に拡大し、ジャガイモやトマトなどナス科作物の根に寄生して甚大な被害を及ぼしている。本線虫は、卵を保護するシスト(包囊)という形で、寄主作物を栽培しなくても10年以上生存するため、一度圃場に侵入・繁殖してしまうと根絶が非常に困難であり、早期発見することが重要である。従来の線虫検診法には植え付け前の「土壌検診」と栽培中の「植物検診」がある。土壌検診は土壌中からシストを分離して顕微鏡下で形態により同定する検診法であり、植物検診は圃場から抜き取った作物の根を肉眼で観察してシストの有無を調べる方法である。しかし、土壌検診は熟練技術と専門知識を要する方法であり、植物検診はこの方法で検出された時点では既に圃場全体に蔓延していることが多い。これらの理由により農業現場では検診実施率はかなり低いのが実状である。

病原体の出現など環境が悪化しても移動できない植物は環境変化に対して鋭敏でなければならず、わずかな環境変化をも感知する能力を特に発達させてきた。本研究では、このような植物の環境を感知する能力を利用した土壌環境診断システム、作物健康センサー (Plant Health Sensor, 以下 PHS) を開発した。本診断法では、まず、検査土壌に「おとり植物」を植え、一週間後 cDNA マクロアレイを用いてその植物の遺伝子発現を解析し、得られた植物遺伝子の発現データに基づいて土壌中に存在する病原体や養分などを診断する。

PCN を診断する PHS を開発するため、まず、2期幼虫を接種した罹病性トマト(強力米寿)の根について DNA マイクロアレイ法と SAGE 法による網羅的な遺伝子発現解析を行い、線虫感染により発現誘導されるトマト遺伝子を選抜した。PHS に利用する遺伝子を決定するため、ノーザンブロット解析や半定量 RT-PCR により選抜遺伝子の PCN 感染応答性を詳細に検討した。さらに、卵密度が段階的に異なる PCN 卵液を接種した強力米寿について

選抜遺伝子の発現解析を行い、発現が卵密度と相関を示した遺伝子を cDNA マクロアレイに搭載した。

次に、様々な提供元から収集した一般圃場 112 サンプルの土壌で栽培した強力米寿苗について、PHS として作製した cDNA マクロアレイを用いて遺伝子発現を解析した。それら遺伝子の発現比と従来の土壌診断（ふるい分けシスト流し法）の結果を総合評価して、各遺伝子の発現比に対して閾値を設定し、PCN 検診のための診断基準を作成した。その結果、実際の圃場土の診断結果は従来の卵密度検査の結果とよく一致した。一部のダイズシストセンチュウ汚染土壌で PCN 用搭載遺伝子の発現が観察されたが、その後 PCN に特異的に反応する遺伝子を同定することができ、シストセンチュウ種の判別が可能となった。さらに、PCN を接種した抵抗性トマト品種（ドクターK）が強力米寿とは異なる遺伝子発現パターンを示したため、これを利用して PCN 診断をダブルチェックすることが可能となった。

本研究で開発した作物健康センサーは、病原体の種類に応じた特殊な設備や熟練技術や専門知識などを必要としない新しい土壌診断システムである。また、病原体感染を植物が感知して初めて検出するため、土壌微生物の病原性を反映した診断が可能であり、病原体の死骸などを誤って検出しないことも本診断法の特長である。

2) cDNA マクロアレイとマイクロチューブハイブリダイゼーションを用いた重複感染ウイルスの簡易高感度検出法

食用ユリの栽培において、最も被害の大きい病害はウイルス病であり、減収や品質低下をもたらす。一般に、ウイルスは薬剤による防除が不可能であるため、茎頂培養によるウイルスフリー球根の増殖が重要である。ウイルスフリー球根の安定した生産と供給を実現するためには、正確で簡便なウイルス診断法が求められている。

北海道の食用ユリでこれまで報告されているウイルスは、CMV (*Cucumber mosaic virus*) と LSV (*Lily symptomless virus*), LMoV (*Lily mottle virus*), PLAMV (*Plantago asiatica mosaic virus*) の 4 種のウイルスである。これらのウイルスが単独あるいは重複感染し、感染したウイルス種が多いほど葉のモザイクやえそ、奇形などの症状は重篤化する。

本研究では、4 種類のユリウイルスを同時に高感度で検出するために、cDNA マクロアレイを利用した簡便なウイルス検出法を開発した。本検出法では、まず、in vitro transcription を利用したシステムにより、ユリ組織から抽出した全 RNA からビオチン標識 cRNA プロブを合成するためにユリウイルス RNA を増幅する。次に、それを各ウイルスの cDNA を固定したマクロアレイとハイブリダイゼーションして、酵素基質を加え発色反応により検出する。増幅された cRNA が非特異的にハイブリダイズしないように、プライマーはアレイ上のウイルス配列と一致しないように特別に設計されている。ハイブリダイゼーションでは、安価なアルミブロックのみを用いて簡便な操作で行えるように考案したマイクロチューブハイブリダイゼーション法（以下 MTH）を開発した。このウイルス検出法により、ユリの葉と球根の根から 4 種類のユリウイルスを効率よく検出することができた。RT-PCR と検出感度を比較した場合には 25~125 倍検出感度が低かったものの、DAS-ELISA 法と比較すると、ELISA と同程度、ウイルスによっては ELISA 以上の検出感度を示した。

従来のウイルス検出法として、RT-PCR は高感度であるが非特異バンドが問題となることが多い。また、ELISA の感度と特異性は抗体の質に依る部分が大きく、非特異反応（交差反応）が問題となることが少なくない。また、ウイルスの同時検出に関しては、ELISA

は 1 反応で 1 ウイルスしか検出できず，マルチプレックス RT-PCR は非特異バンド出現の可能性が増える．これらの従来法と比較して，本研究で開発したウイルス検出法は複数ウイルスを同時検出する簡便な方法として，十分な検出感度と高い特異性をもち，ウイルスの重複感染が問題となる植物では特に有効なウイルス検出法である．

学位論文審査の要旨

主査	教授	増田	税
副査	教授	上田	一郎
副査	准教授	金澤	章
副査	助教	犬飼	剛

学位論文題名

マクロアレイ技術を利用した植物病原体検出法の研究開発

cDNA マクロアレイは数十～数百の遺伝子の発現量を同時に解析する安価な方法として利用されている。本研究では、cDNA マクロアレイを用いて、ジャガイモシストセンチュウの検出法とユリからの高感度ウイルス検出法を研究・開発した。以下に主要な研究成果について要約する。

1) 作物健康センサーを用いたジャガイモシストセンチュウの検出

ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*, Potato cyst nematode, 以下 PCN) は、1972 年に国内で初めて北海道において発見されて以来、その発生地は徐々に拡大し、ナス科作物の根に寄生して甚大な被害を及ぼしている。シストという殻で保護された卵は長期生存するため根絶が困難であり、早期に発見することが重要である。従来の土壌検診では土壌中からシストを分離して顕微鏡下で形態により同定するが、熟練と専門知識を要するため、農業現場での実施率は低いのが実状である。

本研究では、植物の優れた環境感知能力を利用した土壌環境診断システム、作物健康センサー (Plant Health Sensor, 以下 PHS) を開発した。まず、検査土壌に「おとり植物」を植え、一週間後 cDNA マクロアレイを用いて植物の遺伝子発現を解析し、その発現データに基づいて土壌中の病原体や養分などを診断する。

線虫感染に反応する遺伝子を選抜するため、2 期幼虫を接種した罹病性トマト (強力米寿) の根について網羅的遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ法と SAGE 法) を行い、ノーザンブロット解析や半定量 RT-PCR により選抜遺伝子の感染応答性を詳細に検討した。さらに、段階的に異なる卵数を接種した強力米寿について選抜遺伝子の発現を解析し、線虫感染に最も鋭敏に反応した遺伝子をマクロアレイに搭載した。

次に、一般圃場土 112 サンプルを PHS により解析し、各遺伝子の発現比と従来の土壌

検診結果を総合評価して、PCN 検診のための診断基準を作成した。設定した診断基準による診断結果は従来の土壌検診結果とよく一致した。

本研究で開発した作物健康センサーは、病原体の種類に応じた設備や熟練技術や専門知識を必要としない新しい土壌診断システムである。また、病原体感染を植物が感知して初めて検出するため、土壌微生物の病原性を反映した診断が可能であり、病原体の死骸などを誤って検出しないことも本診断法の特長である。

2) cDNA マクロアレイとマイクロチューブハイブリダイゼーションを用いた重複感染ウイルスの簡易高感度検出法

食用ユリ栽培において最も被害の大きい病害はウイルス病であり、減収や品質低下をもたらす。ウイルスフリー球根の安定した生産のために、正確で簡便なウイルス診断法が求められている。

本研究では、北海道の食用ユリでこれまで報告されている 4 種のウイルス (*Cucumber mosaic virus* と *Lily symptomless virus*, *Lily mottle virus*, *Plantago asiatica mosaic virus*) を同時に検出するため cDNA マクロアレイを利用した簡便なウイルス検出法を開発した。まず、*in vitro* transcription を利用したシステムにより、ユリ組織から抽出した全 RNA からユリウイルス RNA のビオチン標識 cRNA プロブを増幅する。次に、それを各ウイルスの cDNA を固定したマクロアレイとハイブリダイゼーションして、酵素基質を加え発色反応により検出する。増幅された cRNA が非特異的にハイブリダイズしないように、プライマーはアレイ上のウイルス配列と一致しないように特別に設計されている。また、安価なアルミブロックのみを用いて簡便な操作で行えるように考案したマイクロチューブハイブリダイゼーション法を開発した。このウイルス検出法により、ユリの葉と球根の根から 4 種類のユリウイルスを効率よく検出することができた。検出感度は RT-PCR より 25~125 倍感度が低かったものの、ELISA 法と同程度、ウイルスによってはそれ以上の感度を示した。

従来のウイルス検出法として、RT-PCR は高感度であるが非特異バンドが問題となることが多く、ELISA も交差反応が問題となることが少なくない。さらに、ウイルスの同時検出に関しては、ELISA は 1 反応で 1 ウイルスしか検出できず、マルチプレックス RT-PCR は非特異バンド出現の可能性が増える。これらの従来法と比較して、本研究で開発したウイルス検出法は複数ウイルスを同時検出する簡便な方法として、十分な検出感度と高い特異性をもち、ウイルスの重複感染が問題となる植物では特に有効なウイルス検出法である。

よって、審査員一同は、杉山俊平氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。