

第2章、マイクロプレートハイブリダイゼーション法 (MPH) の検出感度

2- (1)、概略

MPHを実用的な診断法として利用していくためには、従来行われてきた診断法と検出感度でどの程度の差があるのか結果の信頼性を評価しておかなければならない。以下に、メンブレンハイブリダイゼーション、電気泳動法、そしてELISA法との比較を行った。

また反応の特異性について、即ち塩基配列の類似した分子間で生じるクロスハイブリダイゼーションの程度を評価した。

2- (2)、メンブレンハイブリダイゼーション法との比較：メンブレンを使うか？それともマイクロプレートにするか？ また発色反応の至適時間は？

第1章、1- (2) で用いたものと同じCEVd感染エトログシトロン樹から抽出した核酸試料 (2 M LiCl 可溶性分画) 或いはプラスミドpBS-CEV-4からT3 RNAポリメラーゼで転写したCEVdプラス鎖RNA (定量済み) を検定試料とし、DIG標識したCEVdのcRNAをプローブとしてメンブレン及びマイクロプレートハイブリダイゼーション法を同時に行い、検出感度を比較した。その結果、まず定量済みの転写CEVd-RNAを用いた場合、MPHの検出限界は well (200 μ l) 当たり 0.8 pg であり、これはメンブレンハイブリダイゼーション法の検出限界であるスポット (2 μ l) 当たり 0.8 pg とほぼ一致した。さらにCEVd感染エトログシトロン抽出液を用いた場合でも樹の感染状態により差が認められたが、激症樹の場合共に40 μ g 相当、また軽症樹の場合でも共に200 μ g 相当の組織からの抽出液があれば検出できることが分かった (図4)。以上の結果を評価すると、MPHの検出感度はメンブレンハイブリダイゼーション法とほぼ同程度と考えてよいだろう。先にも触れたが、MPHでは検出感度の劣る発色基質を用いているにも拘わらず、発光基質を使用したメンブレンハイブリダイゼーション法とほぼ同程度の検出感度が得られた。このことは今後化学発光を計測できるようなマイクロプレートリーダー (現在市販の機種はまだ極めて高価である) が普及するようになれば、将来的にはMPHがメンブレンハイブリダイゼーション法の検出感度を凌ぐ可能性が充分にあることを示唆している。

メンブレンハイブリダイゼーション法で発光をX線フィルムに記録する時に出くわす一つの煩わしさは、最高のシグナル/ノイズ比を得るために、X線フィルムへの露光時間を何時間にするかと、フィルム現像をどの程度で停止するかという問題である。露光時間が長すぎて或いは短すぎてもう一度露光のやり直しというのは良くあることである。また、ELISAでも発色の具合を見ながら適当な頃合を見計らって反応停止或いはプレートリーダーで読み取りを行わないといつの間にか全部真っ黄色、或いはバックグラウンドが高くて判定不能ということも珍しくない。MPHではどの程度の時間発色させたら最高のシグナル/ノイズ比が得られるのだろうか？第1章、1- (2) でも少し触れたが、実はMPHでは時間の制限は全く考慮しなくてもよい。2時間後でも、1日後も、2日経ってもバックグラウンドはほとんど全く見られない。マイナス試料はいつまでたっても透明のままである。液を乾かさないようにしておけば室温で1週間後でもほとんど反応が出なかった例もある。さらに都合の良いことにプラスの試料は時間が経つにつれ黄色が濃くなっていくので37°Cで2時間程度インキュベートして一度結果を判定した後、そのまま室温に放置して翌日もう一度肉眼或いはマイクロプレートリーダーで再確認することが出来る。特殊な装置を使わずに肉眼判定で済ます様な場面には特に効果的と思われる。

2- (3)、電気泳動法との比較 --- ウイロイドの場合

リターンポリアクリルアミドゲル電気泳動 (R-PAGE)、連続 (シーケンシャル) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S-PAGE) 或いは2次元電気泳動 (2D-PAGE) 等はウイロイドの簡易診断法として非常に有効な方法である。いずれの手法も最後にゲルを銀染色してウイロイドのバンドを検出するため、実用的にほぼ問題のないレベルの検出感度を有している。

福島県下のホップ圃場で矮化病の感染が疑われた試料を検体としてR-PAGE、S-PAGE及び2D-PAGEとMPHの検出感度を比較した。検体ホップから抽出した核酸試料 (2 M LiCl 可溶性核酸分画) の一部を各手法で処理し、ホップ矮化ウイロイド (HSVd) 感染を検定した。尚、MPHはDIG標識したHSVdのcRNAをプローブとして実施した。HSVdのDIG標識cRNAプローブは、HSVdの全長cDNAを含むプラスミドpBS-HSVからDIG RNA labeling mixture (Boehringer mannheim 社) とT7 RNAポリメラーゼで転写反応を行ない作製した。

HSVd感染が疑われた11検体につき、まずR-PAGEとS-PAGE検定を実施した。その結果、S-PAGEで6検体からHSVdと同じ移動度を示すバンドが確認された (図5)。この内の1サンプルを2D-PAGEで再検定した結果、移動度からほぼHSVdに間違いのないであろうことが確認された。しかし、R-PAGEでは混合感染しているホップ潜在ウイロイド (HLVd) のバンド (供試した全ての試料に現われた) とHSVdのバンドが非常に近接して現われるため正確なHSVdの診断が困難であった。一方、MPHの結果は S-PAGEの結果と完全に一致した (図5)。電気泳動による検定は試料数が増えると大変手間が掛かり、特にS-PAGEは一度ゲルから切り取り回収した核酸試料を再度電気泳動しなければならず、一度に処理できる数はせいぜい10検体程度である。2D-PAGEに至っては一枚のゲルで処理できる数はたったの1検体である。MPHでは1枚のプレートで最高96検体の処理が可能であり、検体数が多くなる圃場採集試料では特に有効となるであろう。これについては第3章、3- (2) で実例を示した。

2- (4)、ELISA法との比較 --- ウイルスの場合

今までの例は全て核酸のみの病原体ウイロイドを用いて行ったものであるが、MPHは独自の遺伝子を持つ全ての生物種、ウイルスに適応できるはずである。ここでは植物ウイルス病診断分野への応用の可能性を検討した。植物ウイルス病の診断には血清学的手法が最も一般的であり、ELISAに代表されるように既に実用レベルの診断手法が確立されているので、今さら遺伝子診断法開発の必要もないように思われるかもしれない。しかし最近ヒトの肝炎ウイルスに代表されるように、未だ病原体が明らかでないウイルス性病害で、ウイルスそのものの姿を捕まえることが出来なくても、微量なウイルス遺伝子断片を手掛かりにウイルス本体の確認に辿り着くというようなケースも出てきており、遺伝子診断は非常に重要な技術となっている。植物ウイルスでも状況は変わらない。現在問題が残されているウイルス病の多くは病原ウイルスの精製が困難である等の理由で優れた抗血清が得られず、効果的な診断手法が確立していないものである。ウイルス粒子は精製できなくてもウイルス遺伝子の一部を取り出す手法はいくらでもある。今後植物ウイルス病診断の分野でも、このような精製が困難なウイルス病では遺伝子診断法の適応を検討することが必要であろう。さらに血清学的手法の抱える将来的な課題として、今後実験動物 (ウサギやマウス) による抗体作成と供給の問題が出てくる可能性がある。動物愛護の観点から実験動物の使用は制限される方向にあり、誰でも自由にウイルスをウサギやマウスに注射して抗体を得ることが出来なくなるかもしれない。その点クローン化した

図5、MPHとS-PAGEの比較 --- HSVd感染ホップ

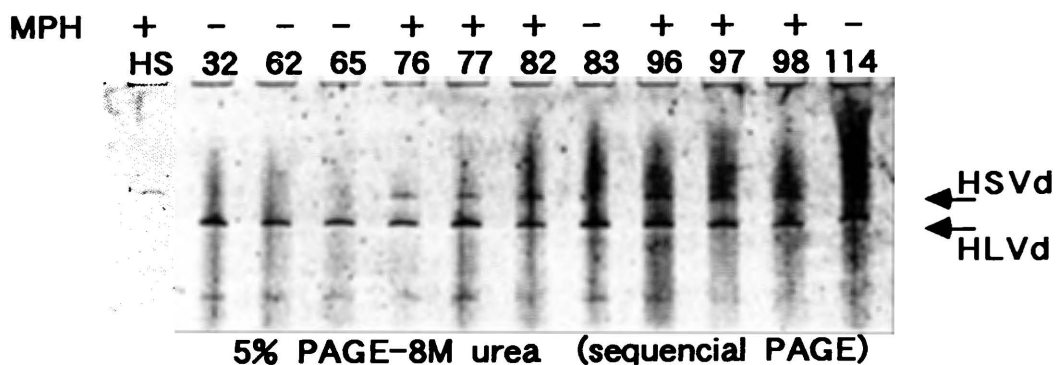


図6 a、MPHとELISA検出感度比較 --- 精製HLV

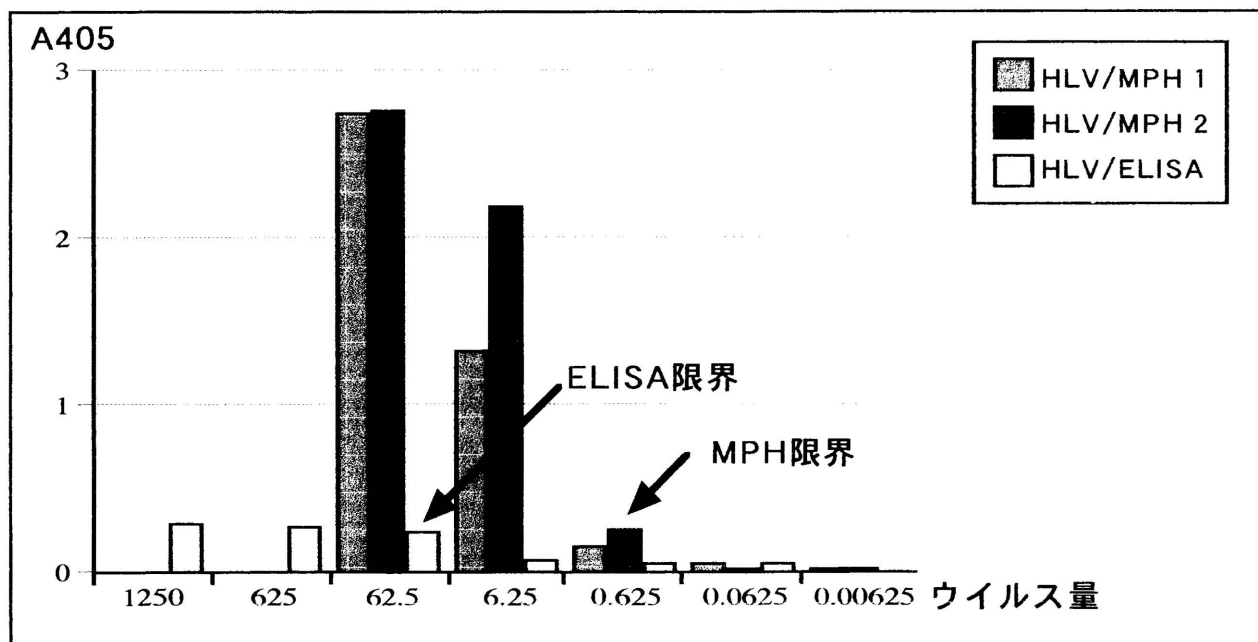
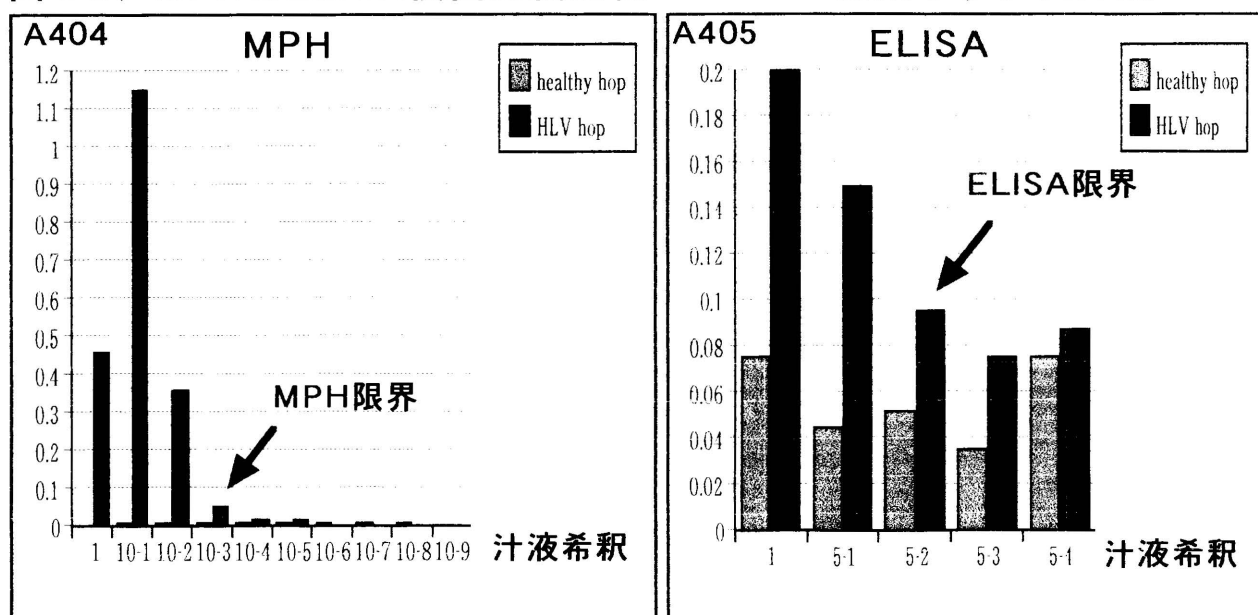


図6 b、MPHとELISA検出感度比較 --- HLV感染ホップ粗汁液



cDNAから試験管内でプローブを作成できる遺伝子診断は理想的な手法であろう。

MPHは植物ウイルス病の診断にも使えるだろうか？

ホップ潜在ウイルス (HLV) はホップに感染するCarlavirusグループに属するウイルスである。感染植物体内のウイルス濃度は低く、自然感染宿主であるホップ以外に適当な増殖宿主がないことから、純度の高いウイルス標品を得るのが困難で、なかなか力価の高い抗血清が得にくいウイルスの一つである。今まで我々が独自に抗血清を作成し、ホップのウイルスフリー化事業等にELISA用ガンマグロブリンとエンザイムコンジュゲート等の供給を行ってきたが、検出感度にいま一つ物足りなさを感じる状況であった。そこで、北海道大学農学部の畑谷達児先生からHLVのクローン化cDNA (クローン番号: A57) を分譲していただき、HLVの外被蛋白質遺伝子を含むゲノムの3' 側約3200塩基対を転写用プラスミドベクターに再クローニングした。このプラスミドpBS-HLVから転写したDIG標識HLV-cRNAをプローブとしてMPHを行い、ELISAと比較した。

まずホップからHLVを純化し定量後、一部を10倍段階希釈してELISAで検定した。その結果ELISAの検出限界はウイルス量で約1.25 μ gであった。一方、純化試量の一部からゲノムRNAを抽出しMPHで検定した結果、検出限界はゲノムRNA量で625pg、HLVの核酸含量を5%としてウイルス量に換算すると12.5ngであった (図6-a)。即ちMPHがELISAより実に100倍も高感度という結果になった。さらにMPHの利点は検出感度だけではなく、ELISAでは抗原濃度を上げてwell当たり25 μ gのHLVを入れた時でも37°C 2時間後の黄色の発色は波長405nmの吸光値で約0.3でしかなかったのに対し、MPHは同じ量 (ウイルス量に換算して) で2を超えた。2は一見しただけでプラスと分かる強い黄色であるのに対して、0.3という値は肉眼でやっとプラスかな? と思える程度の発色である。MPHはシグナル/ノイズ比でもELISAより格段に優れていた。

次に圃場からHLV感染ホップの新梢を採取し、一部は上記のELISAで、一部はMPHで診断した。ELISAには常法に従い、試量を5倍量のPBS-tweenで磨砕後、微量遠心機で10000rpm5分の上清を、またMPHには抽出用緩衝液 (0.2Mリン酸カリウム緩衝液、pH7.4、1%SDS、0.1%亜硫酸ナトリウム) で磨砕し、フェノール:クロロフォルム抽出した上清をエタノール沈殿後、適当量の滅菌蒸留水に溶かしたものを供試した。検出感度を比較するために葉重量換算で濃度を揃え、5或いは10倍段階希釈して検定した。その結果ELISAでは25倍希釈、MPHでは1000倍希釈液まで反応が見られ、粗汁液を用いた試験でもMPHの方がELISAより約40倍高感度であった (図6-b)。

ELISAではウイルスにより抗血清の出来に大きな差があるため、この結果から一概にMPHがELISAより高感度であると断定はできない。HLVではたまたま抗血清の出来が悪かったのがこのような約50~100倍という大きな差になって現われたものと思う。実際後述のように、キュウリモザイクウイルス (CMV) でもMPHを行ったが、この場合MPHとELISAの検出感度はほぼ同程度と考えられた。しかし一般的にいえることは、抗血清はウイルスの種類により出来不出来に大きな違いが出るためウイルスによってELISAの検出感度に大きな差が生じ得るのに対し、cDNA或いはcRNAプローブは試験管内で合成するので基本的にはウイルスの種類による出来不出来の差は生じ得ないはずであり、従ってMPHの検出感度はどのようなウイルスでもほぼ均一になることが期待される。

2- (5)、反応の特異性 --- クロスハイブリダイゼーションの問題

植物ウイルス、ウイロイド病診断は時として類似したウイルス、ウイロイドの特異的な識別ということも重要な要素となってくる。あるウイルスの特殊な系統 (たとえば強毒系統) のみを識別検出するモノクロー

ナル抗体の利用がその好例であろう。MPHではどの程度の遺伝子配列の違いを識別するのだろうか？ 8種類のウイロイドを使って反応特異性とクロスハイブリダイゼーション出現の可能性を調べた。表3に示したようにプレートの横方向に同一ウイロイド試料を吸着させ、縦方向に各ウイロイドのDIG標識cRNAプローブを入れMPHを行った。数値は黄色の発色（A405値）を示している。右肩下がりの対角線上に陽性の数値（アンダーライン）が並んでいるので各プローブは対応するウイロイドと特異的に反応している事が明らかである。HSVdホップがHLVdプローブとも強く反応しているが、これはHSVdホップにHLVdが混合感染しているためでありHSVdとHLVdプローブのクロスハイブリダイゼーションではない。明らかなクロスハイブリダイゼーションが potato spindle tuber viroid（PSTVd）、キク矮化ウイロイド（CSVd）とCEVdプローブ間で、また、CSVdとPSTVdプローブ間で認められた。これらのウイロイドとプローブの組み合わせは両者が同一ウイロイドサブグループの属するケースであり、塩基配列相同性は55～60%程度に達する。自然感染宿主中での各ウイロイド濃度は大きく変化し得るので、同一サブグループ内のウイロイドが混合感染しているようなケースでは判定に注意を要するものと考えられた。

第3章、マイクロプレートハイブリダイゼーション法（MPH）の実施例

3-（1）、キュウリモザイクウイルス（CMV）とサテライトRNAの同時検定

キュウリモザイクウイルス（CMV）は宿主範囲が広くアブラムシで非永続的に伝染される事から、野菜類を中心に被害が多く分布域も広い現在最も流行している植物ウイルスの一つである。CMV自体の診断は血清学的な手法が確立されており特に問題はないが、CMVにはサテライトRNAが付随して感染しているケースがあり、トマトではエソが生じ症状が悪化して被害が増大する傾向がある。CMVサテライトRNAは約320～391ヌクレオチドの1本鎖線状RNAからなり、ヘルパーウイルスであるCMVに依存して複製増殖するが、ウイロイドと同様に独自の外被蛋白質等を持っていないので、診断はもっぱら電気泳動による方法が主流であった。

弘前大学付属千年農場等からウイルス性の症状を示す各種作物及び周辺雑草を採集し、茎葉（0.5～1g）を抽出用緩衝液（0.2Mリン酸カリウム緩衝液、pH7.4、1% SDS、0.1% 亜硫酸ナトリウム；1 ml）で磨砕し、フェノール：クロロフォルム処理後、エタノール沈殿して適量（100 μ l）の滅菌蒸留水に溶かした。一部を表2の手順で変性し、半分をCMV、残りをサテライトRNAの検定に供した。尚、CMVプローブはCMV-RNA3の全長cDNAを含むpGEM-CMV-RNA3から、サテライトRNAプローブは389ヌクレオチドのCMVサテライトRNAの全長cDNAを含むpGEM-CMV-satから各々調製したDIG標識cRNAプローブを使用した。結果を表4に示したように、エソ症状を示すトマトがサテライトRNAを有するCMVに感染していることが確認された。またモザイク症状のメロン、キュウリ、アズキ、クローバーからはサテライトRNAを持たないCMVが検出された。以上のようにMPHによりCMVとサテライトRNAを一枚のプレートで同時に診断することが可能になった。

3-（2）、ホップ矮化ウイロイドの大量検定

第2章、2-（3）で触れたように、矮化病感染が疑わしい株が散見された福島県下のホップ圃場から試

表 3、MPHの特異性 --- 近縁ウイルス間のカロスハイブリダイゼーション

Viroid	Probe							
	CEVd	PSTVd	CSVd	ASSVd	PBCVd	HSVd	HLVd	CbVd
CEVd	<u>0.73</u>	0.07	0.05	0.08	0.04	0.06	0.11	0.14
PSTVd	0.49	<u>0.70</u>	0.12	0.06	0.06	0.04	0.07	0.05
CSVd	0.78	0.27	<u>0.74</u>	0.08	0.05	0.03	0.07	0.05
ASSVd	0.07	0.04	0.09	<u>0.80</u>	0.04	0.04	0.07	0.06
PBCVd	0.02	0.03	0.04	0.10	<u>0.35</u>	0.04	0.04	0.04
HSVd	0.06	0.07	0.03	0.00	0.07	<u>0.85</u>	<u>0.78</u>	0.00
HLVd	0.08	0.06	0.08	0.08	0.08	0.13	<u>0.86</u>	0.16
CbVd	0.08	0.04	0.05	0.15	0.04	0.03	0.00	<u>0.71</u>

* ; アンダーラインは相同な組み合わせによる陽性反応

* ; 枠で囲んだものはクロスハイブリダイゼーション反応

* ; 波線は混合感染による反応

表 4、CMVとサテライトRNAの同時検出

試料番号	作物名	症 状	検定結果 (A405)		判 定 CMV/サテライト
			CMV	サテライトRNA	
1	メロン	モザイク	0.21	0.02	+/-
2	メロン	モザイク	0.41	0.02	+/-
3	メロン	モザイク	0.43	0.02	+/-
4	キュウリ	モザイク	0.09	0.02	+/-
5	キュウリ	モザイク	0.06	0.02	-/-
6	キュウリ	モザイク	0.05	0.02	-/-
7	トマト	紫染モザイク	0.05	0.03	-/-
8	トマト	紫染モザイク	0.04	0.02	-/-
9	トマト	紫染モザイク	0.04	0.02	-/-
10	ダイズ	黄化&葉脈緑帯	0.04	0.02	-/-
11	ダイズ	黄斑	0.04	0.02	-/-
12	ダイズ	微斑モザイク	0.03	0.02	-/-
13	インゲン	黄斑	0.03	0.02	-/-
14	インゲン	葉脈緑帯	0.03	0.02	-/-
15	アズキ	モザイク	0.11	0.02	+/-
16	アズキ	モザイク	0.09	0.02	+/-
17	アズキ	モザイク	0.13	0.02	+/-
18	クローバー	黄化モザイク	0.04	0.03	-/-
19	クローバー	黄化&脈間赤色	0.05	NT	-/NT
20	カボチャ	モザイク	0.04	0.02	-/-
21	クローバー	黄化モザイク	0.05	NT	-/NT
22	クローバー	強い黄化	0.37	NT	+/NT
23	クローバー	外観健全	0.05	NT	-/NT
24	トマト	エソモザイク	0.30	0.16	+/+
25	トマト	モザイク	1.20	0.02	+/-
26	トマト	エソモザイク	0.95	0.28	+/+
27	トマト	健全実生	0.04	0.02	-/-

料を採集し、MPHによるHSVd検定を実施した。結果の一覧を表5に示したが、126検体中38検体と高い率でHSVd検出された。これは矮化症状を呈する株の前後周辺の集中的にサンプリングしたために特に高率の感染が検出されたので、全ての圃場でこのように高いHSVd保毒率を示すものではない。かつて矮化病が猛威を振るっていた頃は、未だ検定体制が確立しておらず、ホップの症状だけが唯一診断基準であった。その後 α 酸検定法やキュウリ検定法が開発され、矮化病の発生を激減させることに成功したが、 α 酸検定もキュウリ検定も非常に精度が高い優れた診断法である反面長い時間と多大な労力を要するものであったため、矮化病は日本のホップ栽培地帯では今だに大流行当時の記憶も生々しく、再発が最も警戒されている病気の一つである。矮化病の恐ろしい点は、病原体であるHSVdが感染してもすぐに矮化症状を呈するわけではなく4～5年後になってようやく矮化が目についてくるという点である。しかし、ホップの最も重要な成分の一つである α 酸含有量は感染の当年或いは翌年には間違いなく低下しているのである。矮化症状が目についた頃は、上記の検定結果から明らかなように、すでに感染がかなり広がって α 酸が減少していることが予想されるのである。この点、MPHを用いれば簡単に多数の試量を検定することが可能で、発病以前の早い段階でHSVd感染の有無を確認することが可能である。これからは矮化病の未然の拡散防止も容易になるものと思われる。

3- (3)、ホップ潜在ウイルス (HLV) の大量検定

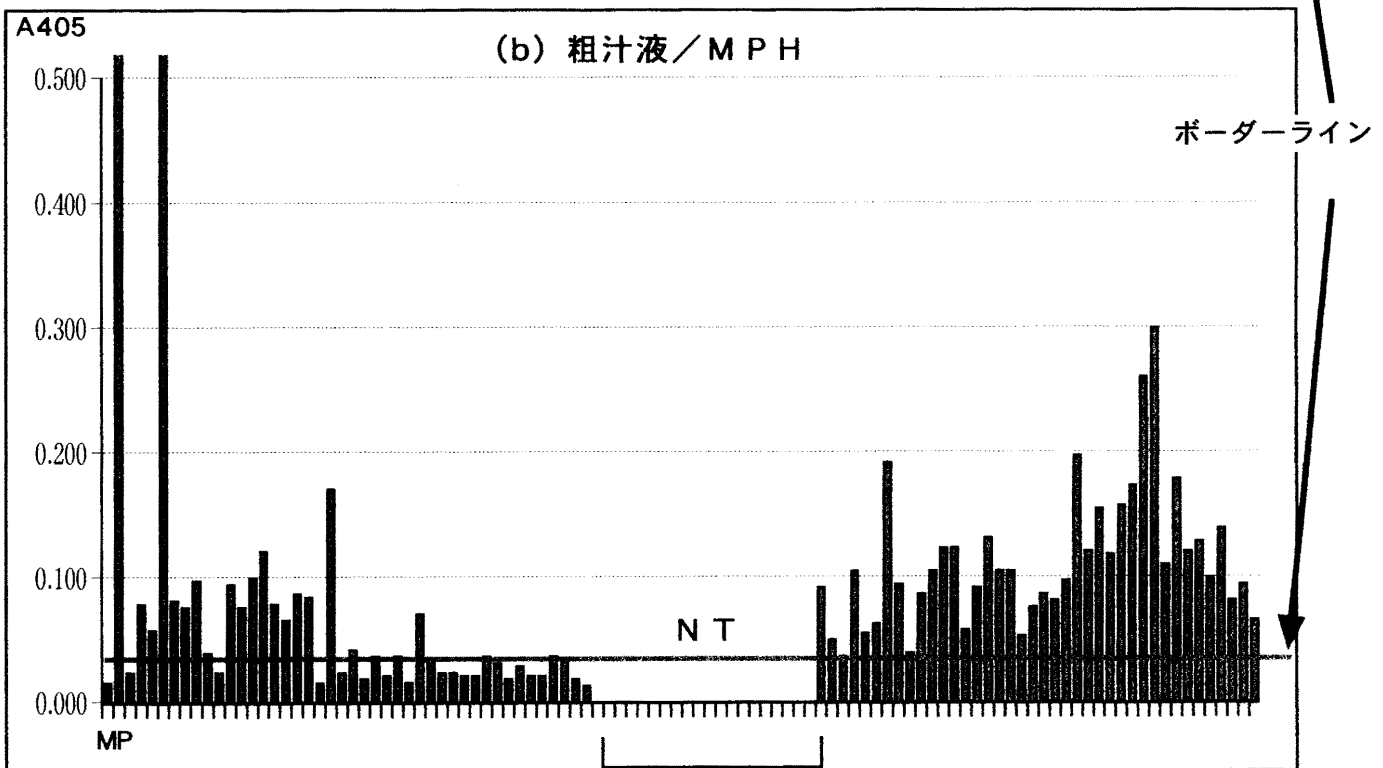
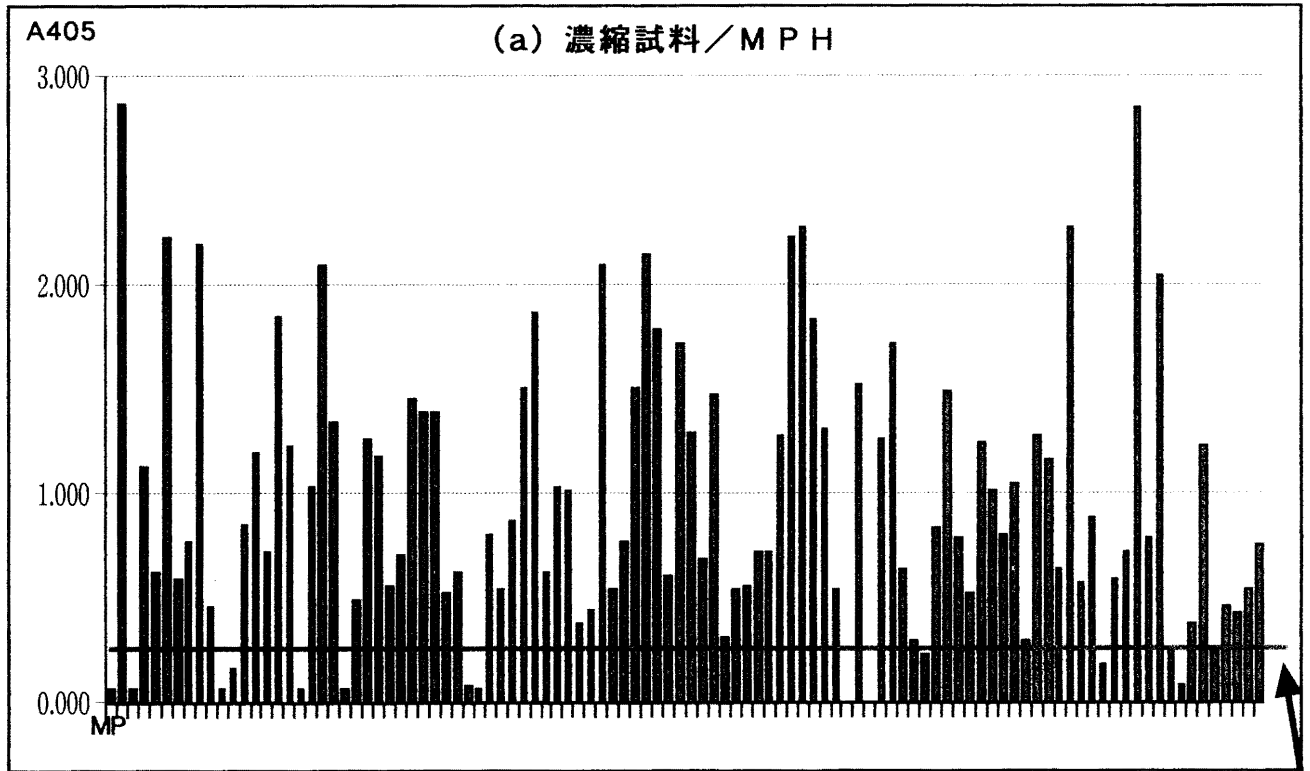
ホップ植物体中のHLV濃度はそう高くなり、ホップの生長と共に葉組織中のウイルス感染或いは抽出阻害物質が増えてくるため、ホップの栄養生長がほぼ終了し生育の異常等が目につきます7～8月頃の展開葉はウイルス診断に向かない。その為、ホップのウイルス(日本で問題になるウイルスはHLVとリンゴモザイクウイルスである)診断を確実にを行うためには、最もウイルス濃度が高い春先の新梢或いは側枝の先端を用いるという方法を取らざるを得ない。これではウイルス検定の時期が春先のごく短い期間のみに限られてしまうため、生育の全期間を通じて検定出来る感度の良い診断方法の開発が望まれていた。

第2章、2- (4)に述べたように、HLVの場合、MPHがELISAより40～100倍も高感度であった。つまり、MPHは上記のHLV検定の問題を改善できるかもしれない。毛花の開花期である7月上旬に各地の圃場より採集した100検体以上に及ぶ試料(展開葉)をデシケーター中で1年間にわたり乾燥保存した試料を用いてMPHによるHLVの大量検定を実施した。まず前述(第2章、2- (4))の手順でMPHを行ったが、82検体中陽性は55検体であった(図7)。この感染率は日本の栽培圃場におけるHLVの感染実態を考慮するとまだまだ低い値であったので、次に残りの乾燥試料を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で磨砕し、60℃で10分加熱処理を加え、微量遠心機で10000rpm5分遠心分離して上清液を回収した。これにポリエチレングリコールとNaClを最終濃度が各々5%、0.1Mとなるように添加して氷上で1時間静置後、10000rpm10分遠心分離してHLVを沈殿濃縮した。この部分純化液を半分はELISAに、残りの半分からフェノール：クロロフォルム処理で核酸を抽出してMPHに供した。その結果図7のように、MPHでは102検体中91検体、先の82検体中では71検体が陽性と判定され、十分に満足のいく結果が得られた。一方、ELISAでは102検体中陽性と判定されたのはわずか32検体であり、MPHで陽性の2/3以上が間違えて陰性と診断されてしまった。本試験ではデシケーターに1年間も乾燥保存したサンプルを供試したため、濃縮処理が必要になってしまったが、生葉を用いれば展開葉でもこの濃縮ステップは必要ないであろう。今後この点はさらに検討が必要と思われる。

表5、MPHによるHSVdの大量検定

91	麒麟2号	0.09	HSVd	204	麒麟2号	0.05	
92		0.32	HSVd	205		0.54	HSVd
93		0.12	HSVd	206		0.04	
94		0.27	HSVd	207		0.73	HSVd
95		0.12	HSVd	208		0.03	
96		0.16	HSVd	209		0.11	HSVd
97		0.57	HSVd	210		0.46	HSVd
98		0.12	HSVd	211		0.04	
99		0.13	HSVd	212		0.04	
100		0.15	HSVd	213		0.04	
101		0.08	HSVd	214		0.54	HSVd
102		0.78	HSVd	215		0.04	
103		0.11	HSVd	216a		0.04	
104		0.12	HSVd	216b		0.04	
105		0.03		217	かいこがね	0.03	
106		0.04		218		0.12	HSVd
107		0.03		219		0.28	HSVd
108		0.03		220		0.16	HSVd
109		0.03		221		0.30	HSVd
110		0.06		222		0.25	HSVd
111		0.03		223		0.32	HSVd
112		0.03		224		0.37	HSVd
113		0.03		225		0.04	
114		0.03		226		0.04	
115		0.03		227		0.03	
116		0.03		228		0.04	
117		0.03		229		0.28	HSVd
118		0.03		230		0.04	
119		0.03		231		0.04	
120		0.03		232		0.32	HSVd
121		0.03		233		0.39	HSVd
122		0.03		234		0.04	
123		0.03		235		0.32	HSVd
124		0.03		236		0.04	
165	カイコガネ	0.04		237		0.16	HSVd
166		0.04		238		0.42	HSVd
167		0.06		239		0.24	HSVd
168		0.05		240		0.26	HSVd
169		0.04		241		0.12	HSVd
170		0.04		242		0.48	HSVd
171		0.04		243		0.69	HSVd
172		0.03		244	麒麟2号	0.04	
173		0.03		245		0.04	
174		0.06		246		0.04	
175		0.04		247		0.04	
176		0.04		248		0.18	HSVd
177		0.04		249		0.05	
178		0.04		250		0.05	
179		0.04		251		0.04	
180		0.03		293		0.05	
181		0.03		294		0.04	
182		0.03		295		0.05	
183	麒麟2号	0.03		296		0.05	
184		0.03		297		0.04	
185		0.04		298		0.04	
186		0.04		299		0.04	
187		0.04		300		0.05	
188		0.04		301		0.05	
189		0.03		302		0.05	
190		0.03		303		0.06	
191		0.03		304		0.05	
192		0.04		305		0.04	
203		0.04		306		NT	

図7、MPHによるHLVの大量検定 --- 乾燥した展開葉



M ; マイナスコントロール

P ; プラスコントロール

NT ; 未検定

むすび

植物ウイルス、ウイロイドの新しい遺伝子診断法、マイクロプレートハイブリダイゼーション法(MPH)を開発した。本法は96穴ポリスチレン製マイクロプレート上で核酸ハイブリダイゼーションを行いピコグラムレベルのウイルス、ウイロイド遺伝子を検出できる手法である。手順はELISA法とほぼ同じで、器具装置も共用可能である。種々のウイルス、ウイロイドを材料に実施した本法の実用化試験結果はいずれも満足のいくものであり、ELISA法等の血清学的診断が適応できないウイロイド病にあってはもちろん、優れた血清を得にくい一部のウイルス病でも今後本研究で開発した遺伝子診断法の利用を検討する価値は充分にあると思われる。

本法の診断コストは従来の遺伝子診断法に比較して格段に安く、栽培現場でウイルス、ウイロイド病を大量に診断するための実用性を十分に備えていた。さらに本法は感染植物体中のウイルス遺伝子発現やウイロイド蓄積量を解析するような基礎研究分野への応用も可能で、感染植物体中のウイルス、ウイロイド濃度の正確な定量が容易になった。実際にウイロイドの病原性検定或いはトランスジェニック植物のウイロイド抵抗性検定等に利用した例を関連論文として本報告書の末尾に添付した。詳細は添付論文を参考にして戴きたい。

近年、植物病理学分野ではウイルス、ウイロイドから細菌、菌類に至るまで急速に種々の病原体の遺伝子解析が進み、その遺伝情報に関するデータベースが充実してきた。即ちその背景には解析の済んだ大量のcDNAクローンが保存されているはずであり、クローン化したcDNAの有効利用という意味からも、本研究で開発した遺伝子診断法は今後さらに種々の改良を経ながら発展していく可能性を秘めているものと考えられる。

MPH用プローブの一覧

最後に本研究で作製した植物ウイルス、ウイロイドの遺伝子診断用プローブのリストを以下に記した。

植物ウイルス

cucumber mosaic virus (RNA3)	cucumber mosaic virus - satellite RNA
hop latent virus (CP & 3' region)	hop mosaic virus (3' region)
melon necrotic spot virus (CP)	potato virus Y (CP)
turnip mosaic virus (CP partial)	white clover mosaic virus (partial)

ウイロイド

apple fruit crinkle viroid	apple scar skin viroid
chrysanthemum stunt viroid	citrus exocortis viroid
citrus viroid III	coleus blumei viroid
grapevine yellow speckle viroid	hop stunt viroid (cucumber pale fruit viroid)
hop latent viroid	pear blister canker viroid
potato spindle tuber viroid	