

カンキツグリーニング病菌 (*Candidatus Liberobacter asiaticum*) の LAMP 法による検定方法の検討

房安聡司*・佐藤哲二・清水宏昭**

門司植物防疫所・*門司植物防疫所下関出張所・**門司植物防疫所福岡支所

Detection of Citrus Greening Disease (*Candidatus Liberobacter asiaticum*) by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Satoshi FUSAYASU*, Tetsuji SATO and Hiroaki SHIMIZU** (Moji Plant Protection Station, 1-3-10, Nishikaigan, Moji-ku, Kitakyushu, Fukuoka 801-0841, Japan, *Shimonoseki Branch, Moji Plant Protection Station and **Fukuoka Sub-station, Moji Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 42: 81-87 (2006)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a method that amplifies nucleic acid with high efficiency, specificity, and rapidity under isothermal condition. This method was investigated for detection of citrus greening disease (*Candidatus Liberobacter asiaticum*). The LAMP method was able to detect a 10^{-3} fold DNA dilution of *Candidatus Liberobacter asiaticum*, in contrast with the PCR method, which had a detection limit of a 10^{-1} fold DNA diluted sample. As a result, it is considered that the LAMP method is more effective than the PCR method for detection of *Candidatus Liberobacter asiaticum*. Moreover, the LAMP products were digested with *SphI* restriction enzyme into two fragments (about 1.2-kbp and 1.8-kbp) that confirmed correct amplification of the target DNA. To determine a suitable method of DNA extraction for the LAMP method, two methods: the potassium-SDS precipitation method and the CTAB method, were investigated. As a result, LAMP amplification was carried out on the same amount of midrib with both methods. However, the CTAB method is considered to be more suitable, because it can reduce contamination risk.

Key words: Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, citrus greening, detection

結 言

カンキツグリーニング病はアジア、アフリカのカンキツ栽培地域で発生が見られ、カンキツ生産に甚大な被害を与える病害として危惧されている。我が国では 1988 年に沖縄県西表島において発生が確認されて以来 (MIYAKAWA *et al.*, 1989)、現在まで分布範囲は奄美群島の一部にまで拡大しており (義永, 2003)、今後九州本土への侵入が懸念されている。

現在、これらの地域における本病の発生・分布調査には、主として PCR 法を用いている。しかし、調査本数の多さや発生地域の拡大による調査地点の増加傾向から、より迅速で簡便な検定方法の確立が求められている。LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法は我が国で開発された簡便、迅速、高感度及び低コストな遺伝子診断法とされる (MORIET *et al.*, 2001; NAGAMINE *et al.*, 2002; NOTOMI *et al.*, 2000)。PCR 法が標的遺伝子における 2 種類のプライマーで挟まれた DNA 断片を DNA 鎖の熱変性、プライマーのアニーリング及び伸長反応の 3 工程をそれぞれ異なる温度で繰り返し行うのに対し、本法は標的遺伝子における 6 カ所の領域を認識する 4 種類のプライマーを用いて、自己伸長反応と鎖置換合成反応を一定温度 (60～65℃) で繰り返すことにより、遺伝子増幅反応が進行することを

特徴とする (Fig. 1) (NOTOMI *et al.*, 2000)。特に、医学分野や食品衛生の分野において微生物の検出に LAMP 法を利用するための研究が進められているが、農業分野においても、トマト黄化葉巻ウイルス (FUKUTA *et al.*, 2003)、トマト黄化えそウイルス (FUKUTA *et al.*, 2004)、シンビジウムモザイクウイルス (福田, 2005) 等の LAMP 法による検出が報告されている。カンキツグリーニング病についても、LAMP 法を用いた簡易診断技術に関する報告が行われた (OKUDA *et al.*, 2005)。

そこで我々は、カンキツグリーニング病菌の検出について LAMP 法及び PCR 法の検出限界を比較することで感度を評価し、LAMP 法のカンキツグリーニング病検定における実用性について検討を行い、また、発生・分布調査のための検出プロトコルを作成する上での基礎データを得るため、LAMP 法に適したカンキツグリーニング病菌からの核酸抽出法についての検討を行った。

本報告にあたり、LAMP 法による簡易診断技術についてご教授頂いた九州沖縄農業研究センターの奥田充主任研究官及び栄研化学株式会社の太田嘉則博士に厚くお礼申し上げる。

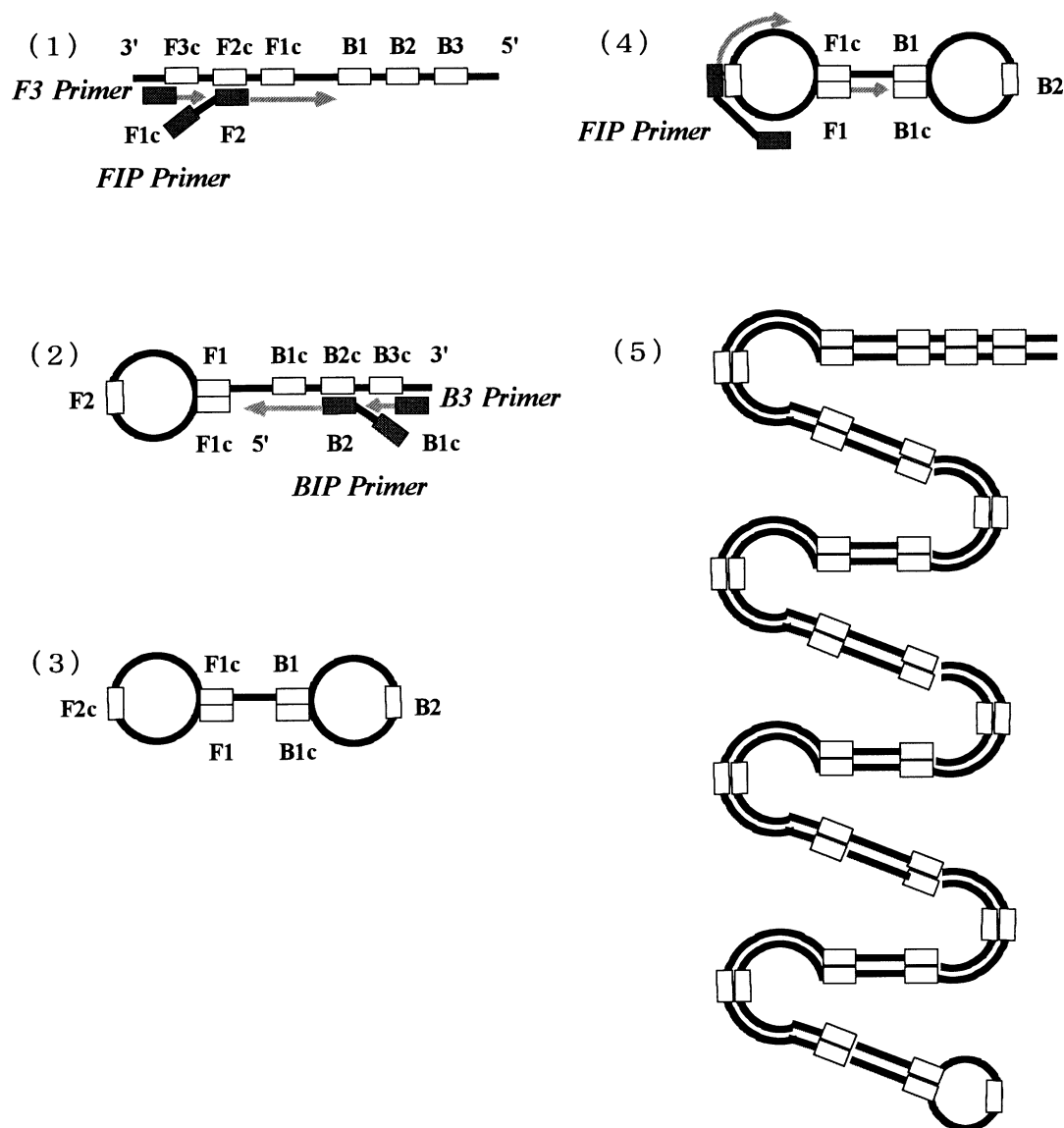


Fig. 1. Schematic representation of the LAMP reaction. (1) *FIP Primer* hybridizes to F2c, leading synthesis of complementary strand. *F3 Primer* hybridizes to F3c, leading strand displacement extension. (2) *BIP Primer* hybridizes to B2c, leading synthesis of complementary strand. *B3 Primer* hybridizes to B3c, leading strand displacement extension. (3) The displaced single strand forms "dumbbell-like structure" by self-primed DNA. (4) *FIP Primer* hybridizes to the loop in the stem-loop DNA, leading strand displacement extension. (5) Cycle amplification products mixtures of stem-loop structure with various stem lengths.

材料及び方法

核酸の抽出

奄美群島のカンキツグリーンニング病の発生・分布調査において、葉の黄化、退緑など明瞭に本病の特徴的な症状が現れているタンカンまたはボンカンの実生樹から採集した葉の中肋を陽性コントロールサンプル、症状が現れていない健全樹から採集した葉の中肋を陰性コントロールサンプルとして供試した。

(1) カリウム-SDS法

DELLAPORTA *et al.* (1983) の方法を改変して行った。カンキツ葉中肋約 0.1 g を 2.0 ml チューブ内でミキサーミル MM300 (Retsch 製) 及びタングステンビー

ズを用いて摩砕し、抽出用緩衝液① (0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 M NaCl, 2% 2-メルカプトエタノール) 及び抽出用緩衝液② (0.1 M EDTA, pH 8.0, 1.5% ラウリル硫酸ナトリウム: SDS, 6.6% ポリビニルピロリドン: PVP M.W. 40,000) をそれぞれ 750 μ l ずつ加え、65°C で 10 分間処理した。5 M 酢酸カリウムを 500 μ l 加え、水中で 30 分間静置した後、10,000 rpm で 10 分間遠心した。上清 1.25 ml にイソプロピルアルコール 750 μ l を加え、水中で 30 分間静置した後、10,000 rpm で 10 分間遠心し、沈殿を 400 μ l の蒸留水に懸濁した。10,000 rpm で 10 分間遠心して得られた上清にエタノール 1 ml 及び 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、-20°C で 30 分間静置した。その後、10,000 rpm で 10

分間遠心し、沈殿を 200 μ l の滅菌蒸留水に懸濁してカリウム-SDS 法による核酸抽出液とした。

(2) CTAB 法

NAKASHIMA *et al.* (1991) の方法を改変して行った。カンキツ葉中肋約 0.1 g を 2.0 ml チューブ内でミキサーミル MM300 (Retsch 社製) 及びタングステンビーズを用いて摩砕し、CTAB 緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8.0, 2% CTAB) を 1 ml 加え、65°C で 10 分間処理後、クロロホルム：イソアミルアルコール (24：1) を加え、12,000 rpm で 5 分間遠心した。上清に 0.7 倍量のイソプロピルアルコールを加え、室温で 10 分間静置した後、12,000 rpm で 10 分間遠心した。沈殿を 70% エタノールによってリンスした後、100 μ l の 1×TE に懸濁して CTAB 法による核酸抽出液とした。

核酸の増幅

(1) PCR 法

宝酒造製 rTaq DNA Polymerase PCR 反応試薬に JAGOEIX *et al.* (1994) のカンキツグリーニング病原菌の 16S rDNA に対する特異的プライマーセット (Table 1) 及び核酸抽出液 2.0 μ l を加え、反応液を調製した。増幅反応はサーマルサイクラー ASTEC PC-700 (ASTEC 社製) を用いて、94°C, 30 秒間 (1 サイクル目のみ 5 分間) の熱変性、68°C、2 分間のアニーリング及び伸長反応を 40 サイクル行った。

(2) LAMP 法

LoopampDNA 増幅試薬キット (栄研化学) に OKUDA *et al.* (2005) が報告したカンキツグリーニング病原菌の *rplKAJL-rpoB* オペロン領域に対する特異的プライマー (Table 1) と核酸抽出液 2.0 μ l を加え、反応液を調製した。増幅反応はブロックインキュベーター BI-535A (ASTEC 社製) またはリアルタイム濁度測定装置 LA-200 (栄研化学製) を用い、65°C の一定温度で 1 時間行った。

感度比較試験

核酸抽出法としてカリウム-SDS 法を用いた。カンキツ葉の中肋より得られた核酸抽出液を蒸留水を用いて $10^0 \sim 10^{-4}$ 倍の 10 倍連続希釈段階系列を作製し、PCR 法及び LAMP 法を用いて核酸増幅を行った。増幅反応後、アガロースゲルを用いて 100 V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲル長の 1/2 程度まで進んだところで終了した。電気泳動用緩衝液には 0.5×TBE 緩衝液を用いた。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線下 (260 nm) でバンドの確認を行った。さらに、リアルタイム濁度測定装置 LA-200 を用いた LAMP 増幅を、同一試料の連続希釈段階系列について実施した。

特異性の確認

LAMP 法によって得られた増幅産物を制限酵素 *SphI* (ニッポンジーン社) で切断処理をし、電気泳動によるバンドパターンを調べた。制限酵素処理は、各反応ごとに滅菌蒸留水で 10 倍希釈した増幅産物 2.0 μ l, 制限酵素 *SphI* 1.0 μ l, 10×緩衝液 (ニッポンジーン社) 1.0 μ l 及び蒸留水 6.0 μ l を加え、37°C で 1 時間保温することで実施した。反応後、アガロースゲルによる電気泳動を行った。

核酸抽出法の比較試験

カリウム-SDS 法及び CTAB 法の LAMP 法における適性について比較した。核酸抽出に用いる供試サンプルは、陽性コントロールサンプルを陰性コントロールサンプルに混合することにより調製を行った。全量を 1.0 g とし、陽性コントロールサンプルの混入率を $10^0 \sim 10^{-4}$ 倍の 10 倍連続段階系列に設定した。得られた核酸抽出液は LAMP 法を用いて DNA 断片を増幅し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。

結 果

感度比較試験

PCR 法及び LAMP 法における、カンキツグリーニング病菌の検出に関する感度比較試験の結果を Fig. 2 に

Table 1. Primers for PCR and LAMP.

Primer name	Sequence
for PCR	
OI1	5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3'
OI2c	5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'
for LAMP	
rpl-F3	5'-TGGGTAAAGTGATGCTGTGG-3'
rpl-B3	5'-CAACAATATCAGCCCCTGCT-3'
rpl-FI	5'-GCATGCCGAGGATCAATGCCTTGCTTAAAGAGCGTGCTACG-3'
rpl-BIP	5'-TATGCCTAATGGCACGGGGTAAGCTTCATCCGCCTTCGA-3'
rpl-LF	5'-TCTCAACTGTTTCATCAAACCTAGC-3'
rpl-LB	5'-CGTGGCGGTTTTTGCTACA-3'

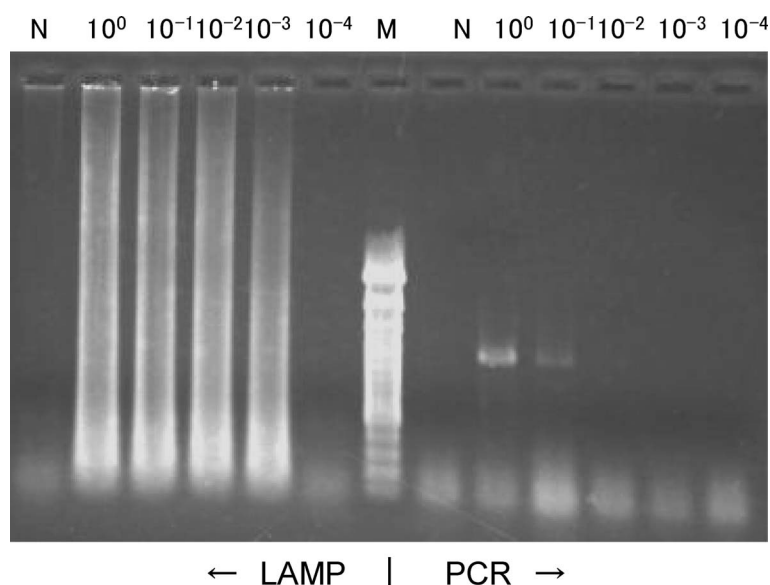


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of LAMP (left side) and PCR (right side) products from total DNA isolated from citrus midrib infected with *Candidatus Liberobacter asiaticum* after serial 10-fold DNA dilutions from 10^0 to 10^{-4} with distilled water. Lane M, DNA size marker (100 bp ladder). Lane N, negative control.

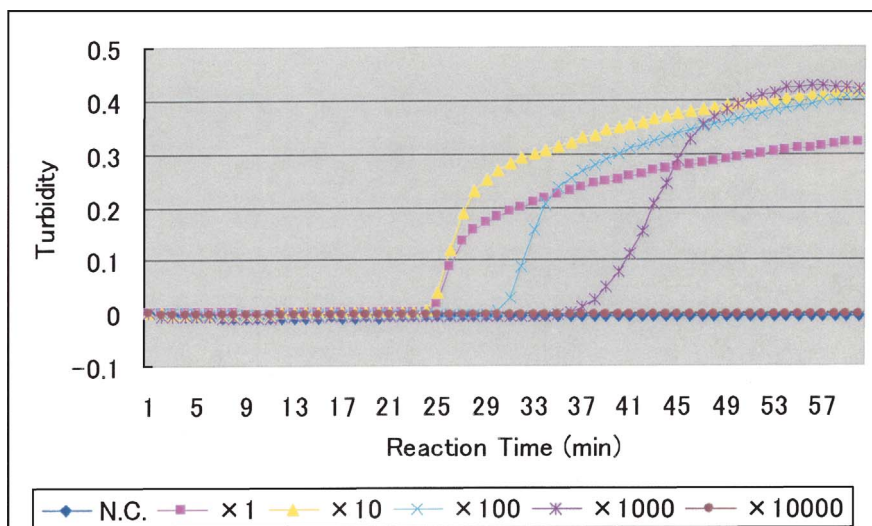


Fig. 3. Real-time turbidimetry of LAMP reaction from total DNA isolated from citrus midrib infected with *Candidatus Liberobacter asiaticum* after serial 10-fold DNA dilutions from 10^0 to 10^{-4} . N.C., negative control.

示した。電気泳動を行ってバンドの有無を調べた結果、PCR法では核酸抽出液の原液と 10^{-1} 倍希釈率において増幅産物が確認されたが、 10^{-2} 倍以上の希釈率では増幅産物が認められなかった。一方、LAMP法では核酸抽出液の原液と、 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 倍希釈率において、LAMP法に特徴的なラダー状の増幅産物が確認された。また、LAMP法に関してリアルタイムによる濁度測定法を用いた試験を行った結果、電気泳動法と同様に $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 倍希釈率において増幅産物が確認された (Fig. 3)。

特異性の確認

感度比較試験におけるLAMP法によって得られた増幅産物が、カンキツグリーニング病菌以外の遺伝子の混

入による誤反応を起こすことなく、標的遺伝子が正確に増幅されたものであることを確認するため、制限酵素 *SphI* によって増幅産物の切断処理を行った。*SphI* 処理によって得られる切断断片の予想されるサイズは136 bp及び187 bpである。電気泳動を行ってバンドの出現パターンを調べた結果、LAMP法によって得られたラダー状の増幅産物は、120 bp及び180 bp付近の2本のバンドに集約し (Fig. 4)、予想される切断断片とほぼ一致した。

核酸抽出法の比較試験

2種類の核酸抽出法、カリウム-SDS法及びCTAB法のカンキツグリーニング病菌のLAMP法における適性を比較した結果を Fig. 5 に示した。検出感度の比較

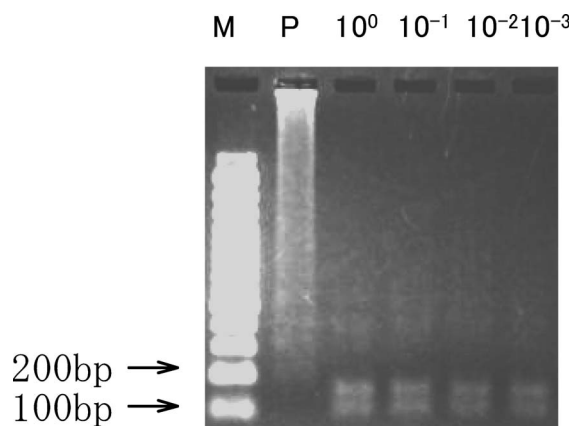


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of *SphI* products from LAMP products from total DNA isolated from citrus midrib infected with *Candidatus Liberobacter asiaticum* after serial 10-fold DNA dilutions from 10^0 to 10^{-3} . Lane M, DNA size marker (100 bp ladder). Lane P, positive control.

のため、電気泳動を行って増幅の有無を確認した結果、カリウム-SDS (Fig. 5.A) 法及び CTAB 法 (Fig. 5.B) いずれにおいても、 $10^0 \sim 10^{-3}$ 倍の陽性コントロールサンプルの混入率において、LAMP 法に特徴的なラダー状の増幅産物が確認された。また、CTAB 法はカリウム-SDS 法と比較して操作手順が少ないため、本試験においてもより簡便に核酸抽出を行うことができた。また、カリウム-SDS 法が抽出工程に約 7 時間を要したのに対し、CTAB 法では約 3 時間と、カリウム-SDS 法の半分以下の時間で抽出が可能であった。

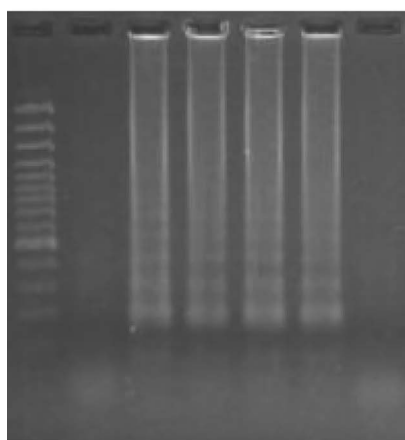
考 察

カンキツグリーニング病菌の検出方法は、以前は接ぎ木による生物検定や電子顕微鏡による観察が用いられていた。その後、モノクローナル抗体 (GARNIER *et al.*, 1987) やハイブリダイゼーション (VILLECHANOUX *et al.*, 1992) による手法が開発されたが、現在は PCR 法による遺伝子診断が主流となっている。本調査において、PCR 法における検出限界が 10^{-1} 倍希釈の核酸抽出サンプルであったのに対し、LAMP 法では 10^{-3} 倍希釈の核酸抽出サンプルを検出することが可能であり、LAMP 法は PCR 法と比較してカンキツグリーニング病菌の検出において 100 倍程度感度が高いことが確認された (Fig. 2)。PCR 法によるカンキツグリーニング病菌の検出感度は生物検定とほぼ同等とされることから (宮川ら, 1999)、LAMP 法を用いた検定はこれまでの検定の精度を飛躍的に向上させるものと期待される。

また、LAMP 法の増幅産物を制限酵素 *SphI* 処理した結果、増幅領域から予想される切断断片のサイズとよく一致したことから、カンキツグリーニング病菌以外の遺伝子の混入による誤反応を起こすことなく正確に標的遺伝子が増幅されたことが分かった (Fig. 4)。これによって、制限酵素 *SphI* 処理は、LAMP 法に関する特異性を確認する方法として有効であることが示唆される。

LAMP 法は増幅効率が高く短時間に増幅産物が大量に生成されるため、コンタミネーションの問題が懸念される。つまり、検定操作中に陽性サンプルの遺伝子が本来陰性であるはずのサンプルに混入してしまうと、検定結果が擬陽性になってしまう可能性が高い。そのため、コンタミネーションの防止に配慮した信頼性の高い検定

A
M N 10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}



B
M N 10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}

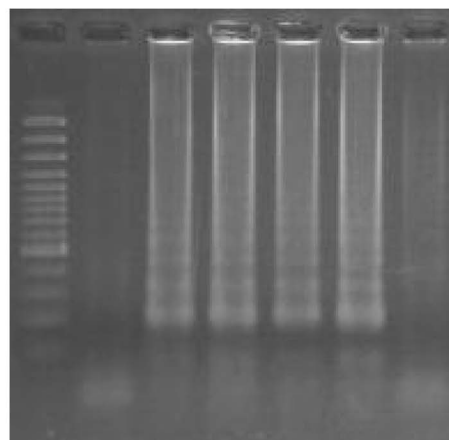


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of LAMP products from citrus midrib infected with *Candidatus Liberobacter asiaticum* after serial 10-fold DNA dilutions from 10^0 to 10^{-4} with uninfected midrib. Total DNA was extracted by the alkaline-SDS method (A) or the CTAB method (B). Lane M, DNA size marker (100 bp ladder). Lane N, negative control.

プロトコルの作成が必要である。

カリウム-SDS法は、現在実際のPCR法によるカンキツグリーニング病発生調査で用いられている核酸抽出法であるが、クロロホルム等の有害試薬を用いることなく核酸を抽出できる利点がある。しかし、抽出用試薬の成分であるSDS (Sodium Dodecyl Sulfate) は増幅反応に対する阻害物質となるため、エタノール沈殿によるSDS除去のための操作が必要である。一方、CTAB法は不純物の除去にクロロホルムが用いられるが、阻害物質が残存しにくく、純度の高い核酸を得ることができる。加えて、CTAB法はカリウム-SDS法と比較して操作手順が少ないため、チューブの開閉回数も少なくなり、コンタミネーションを起こす可能性が低くなる。また、CTAB法は、カンキツグリーニング病菌のLAMP法による検出においてカリウム-SDS法と同等の検出感度があり、検出の迅速性、簡便性においてカリウム-SDS法より優れることから、カリウム-SDS法と比較してLAMP法によるDNA増幅により適した核酸抽出法であると考えられる。

増幅産物の検出に濁度測定法を用いた場合、ピロリン酸マグネシウムの沈殿生成を指標とした吸光分析が行われるため (Mori *et al.*, 2001)、反応後のチューブを開閉する必要がなく、コンタミネーションの危険性が減る。また、本法はリアルタイムでの検出が可能のため、電気泳動を行う必要がなく、さらに迅速かつ簡易な検出が可能となる。

本調査によりLAMP法のカンキツグリーニング病菌の検出における高い有効性が確認された。植物検疫の現場ではその他多種多様な病原菌の検定を行っているが、今後はそれらの病原菌へのLAMP法の適用についても検討を進めていく必要がある。

摘 要

カンキツ葉の中肋より得られた核酸抽出液の連続希釈段階系列を作製し、PCR法及びLAMP法を用いて核酸増幅を行った。PCR法における検出限界が 10^{-1} 倍希釈の核酸抽出サンプルであったのに対し、LAMP法では 10^{-3} 倍希釈の核酸抽出サンプルを検出することが可能であった。これによってLAMP法はPCR法に対してカンキツグリーニング病菌の検出感度が非常に優れていることが確認された。また、LAMP法の増幅産物を制限酵素 *SphI* 処理した結果、120 bp 及び 180 bp 付近の2本のバンドに集約し、増幅領域から予想される切断断片のサイズとよく一致したことから、カンキツグリーニング病菌以外の遺伝子の混入による誤反応を起こすことなく正確に標的遺伝子が増幅されたことが分かった。カンキツ葉の中肋における陽性コントロールサンプルの混入率を $10^0 \sim 10^{-4}$ 倍の10倍連続段階系列に設定し、2種類の核酸抽出法、カリウム-SDS法及びCTAB法を用いて核酸抽出を行い、LAMP法による検出を

行った。カリウム-SDS法及びCTAB法いずれにおいても、 $10^0 \sim 10^{-3}$ 倍の陽性コントロールサンプルの混入率において検出が可能だったことから、両抽出方法の間にカンキツグリーニング病菌の検出感度に関して大きな差は認められなかった。しかし、CTAB法はカリウム-SDS法と比較して操作手順が少なく、チューブの開閉回数も少ないため、LAMP法で危惧されているコンタミネーションの確率が小さくなるものと考えられることから、CTAB法はカリウム-SDS法と比較してLAMP法による核酸増幅に適した核酸抽出法であると考えられる。

引用文献

- DELLAPORTA, S. L., J. WOOD and J. B. HICKS (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(4): 19-21.
- 福田至朗 (2005) RT-LAMP法によるシンビジウムモザイクウイルス (CyMV) の検出. 植物防疫 59: 157-160.
- FUKUTA, S., S. KATO, K. YOSHIDA, Y. MIZUKAMI, A. ISHIDA, J. UEDA, M. KANBE and Y. ISHIMOTO (2003) Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods* 112: 35-40.
- FUKUTA, S., K. OHISHI, K. YOSHIDA, Y. MIZUKAMI, A. ISHIDA and M. KANBE (2004) Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *Journal of Virological Methods* 121: 49-55.
- GARNIER, M., G. MARTIN-GROS and J. M. BOVE (1987) Monoclonal antibodies against the bacterial-like organism associated with citrus greening disease. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138: 639-650.
- JAGOEUX, S. J., M. BOVE and M. GARNIER (1994) The phloem-limited bacterium of Greening Disease of Citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379-386.
- 宮川経邦・内藤 孝・尾崎克己 (1999) カンキツグリーニング病感染樹からの病原検出における生物検定とPCR検定の比較 (講要). 日植病報 65: 368.
- MIYAKAWA, T. and K. TSUNO (1989) Occurrence of Citrus Greening Disease in the southern islands of Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 667-670.
- MORI, Y., K. NAGAMINE, N. TOMITA and T. NOTOMI (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 150-154.
- NAKASHIMA, K., S. KATO, S. IWANAMI and N. MURATA (1991) Cloning and Detection of Chromosomal and Extrachromosomal DNA from Mycoplasma-like Organisms That Cause Yellow Dwarf Disease of Rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12): 3570-3575.
- NAGAMINE, K., Y. KUZUHARA and T. NOTOMI (2002) Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1195-1198.
- NOTOMI, T., H. OKAYAMA, H. MASUBUCHI, T. YONEKAWA, K. WATANABE, N. AMINO and T. HASE (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:

- e63.
- OKUDA, M., M. MATSUMOTO and Y. TANAKA (2005) Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* Gene Cluster of the Citrus Greening Organism and Detection by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease* 89(7): 705-711
- VILLECHANOUX, S., M. GARNIER, J. RENAUDIN and J. M. BOVE (1992) Detection of several strains of the bacterium-like organism of citrus greening disease by DNA probes. *Current Microbiol.* 24: 89-95.
- 義永秀親 (2003) 平成 15 年度施策方針産業の振興対策について. 農業の振興. 平成 15 年 4 月号, 広報せとうち.