

網羅的植物病原菌 on-site 検出システムの開発

農業生物資源研究所・上級研究員 梶原 英之

■ 目的

Short PCR と質量分析法を組み合わせた Mass Spectrometric Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (MS-CAPS 法)を用い、トマトを材料に短時間でそれに感染する菌の同定を可能とする系の確立を目的とした。

■ 方法

各種データベースを用い、トマトに感染する菌のリストアップを行い、それぞれについて現時点で得られているゲノム情報を集めた。また、農業生物資源研究所ジーンバンク中から配布可能な植物病原菌をリストアップし、本研究で使用可能なものについて分与を申請した。病原菌およびトマト組織から得たゲノム DNA をテンプレートとして MS-CAPS 法を行った。即ち、short PCR と質量分析の組み合わせによって 1 時間以内に目的病原菌が検出できるか調べ、至適条件を検討した。また、プライマーの一つに蛍光色素をつけておき、PCR 反応後、紫外線を照射することで増幅の有無を判別できることも調べた。さらに、MALDI-biotyping 法をトマト病原菌に対して行った。

■ 結果および考察

十分なゲノム情報があれば、MS-CAPS 法によって目的とする植物病原菌を検出する系を確立できることがわかった。即ち、1 時間以内に低コストで植物病原菌の有無を質量スペクトルのピークとして検出できた。しかし、現状では植物病原菌のゲノム情報が十分でなく、現時点ですぐにプライマー作製を試みることができるのは多く見積もってもまだ全植物病原菌の 2-3 割程度であると推測された。質量分析や電気泳動のような PCR 産物を確認する手段を経ないが、あらかじめ蛍光色素をプライマーにつけておき携帯型 PCR 装置を使用すれば on-site で植物病原菌の有無を検出できることがわかった。MS-CAPS 法は有用な手法であると思われるが、プライマー作製に必要なゲノム情報が植物病原菌についてはないものが多い。そのようなものについては MALDI-biotyping 法の応用が有用と考えられた。

■ 結語

MS-CAPS 法は有用な手法であり、十分なゲノム情報があるものについては特異的なプライマーを見出し、キット化することもできると思われた。また、蛍光色素を使用し、携帯型 PCR 装置を使うことができれば圃場でも菌の有無を確認できると考えられた。しかし、ゲノム情報が乏しい菌に対してはプライマーを作製できず、現状では如何ともしがたいことがわかった。そのようなものについては MALDI-biotyping が有用であると期待された。これはゲノム情報が調べられていないものにも応用できる。当研究所には植物病原菌を収集したジーンバンクがあるので、次に行うべき課題として、これらの病原菌のスペクトルを調べ、データベース化することが重要と思われた。そのようなデータベースを作製し、公開することができれば、それにアクセスすることによって病原菌の同定を 5 分で行うことができるようになる。これは植物病原菌のコレクションがある生物資源研究所でなければできない研究であるので、現時点では見通しが無いが、何らかの研究費を得て行っていきたい。