

## 32. Competitive PCR によるカンキツグリーン病の病原体 DNA の定量

[ 要約 ] カンキツグリーン病に感染した植物組織中の病原体に由来する DNA を Competitive PCR (競合 PCR) により定量することで、病原体の増殖量を推定できる。

所属	国際農林水産業研究センター・沖縄支所			連絡先	0980(83)9111		
推進会議名	国際農林水産業	専門	作物病害	対象	カンキツ	分類	研究

### [背景・ねらい]

カンキツグリーン病は、熱帯・亜熱帯のカンキツ産業のもっとも大きな生産阻害要因となっている。日本を含む各国のカンキツ栽培地帯で、本病の侵入と感染地域の拡大が問題となっている。

同病の診断は、病徴観察や PCR 法などで行われているが、これらの手法では病原体の定量はできない。病原体の定量は、その感染機構の解明や、カンキツ品種の抵抗性の評価、農薬施用などの有効性の判定に必要である。そこで、Competitive PCR による病原体の定量法を開発する。

### [成果の概要・特徴]

1. 測定対象の DNA 領域と同じプライマーで増幅するが少し短い競合 DNA (測定対象 DNA の増幅長: 1,166 bp、競合 DNA の増幅長: 1,000 bp) を作成し、この DNA を一定濃度で PCR 反応液に添加することで、互いの DNA 増幅に競合反応が生じる (図 1)。
2. プラスミドにクローニングした測定対象の DNA と競合 DNA を、260nm の吸光度から得られる DNA 量から計算される分子数で等しくなるように PCR 反応液に添加すると、それぞれから増幅する DNA の分子数は等しくなる。そこで、競合反応の判定は、増幅した DNA の総量ではなく、分子数で比較する。
3. PCR による増幅前の DNA 分子数比と、増幅後の DNA 分子数比は、対数軸のグラフ上で直線になる。それぞれの DNA の増幅数が等しくなる競合 DNA 濃度に相当する濃度が測定対象の DNA 濃度と推定される (図 2、図 3)。
4. リアルタイム PCR による DNA の定量では測定対象 DNA 溶液に PCR 反応を阻害する物質が共存すると定量性が損なわれるとされているが、Competitive PCR による DNA 濃度の測定には影響がみられない (図 4)。
5. 測定値は病原体ゲノムのコピー数 (濃度) を示し、病原体の濃度を反映していると推定される。罹病カンキツ組織中の濃度を測定することにより、カンキツのグリーン病抵抗性に関する品種間差を明らかにできる (表 1)。

### [成果の活用面・留意点]

1. 直接の測定対象が DNA であるので、測定対象となる DNA の抽出効率に注意する必要がある。
2. PCR 法による DNA 検出と同程度の設備と技術が必要である。
3. リアルタイム PCR による定量法に比べて、使用機器が比較的安価に揃うこと、PCR 反応を阻害する物質が測定対象の DNA 抽出液に含まれる場合でも正確な測定が可能であることが利点である。しかし、より多くの実験操作が必要となり、測定により長時間かかるので、多数の検体を測定する場合にはリアルタイム PCR の利用を検討すべきである。
4. 電気泳動像から DNA 量を測定する画像処理ソフトウェアが市販されているが、発展途上国の研究機関で同様の研究を実施しやすくするために、当研究室では画像処理ソフトウェアを開発して測定に用いている。

### [具体的データ]

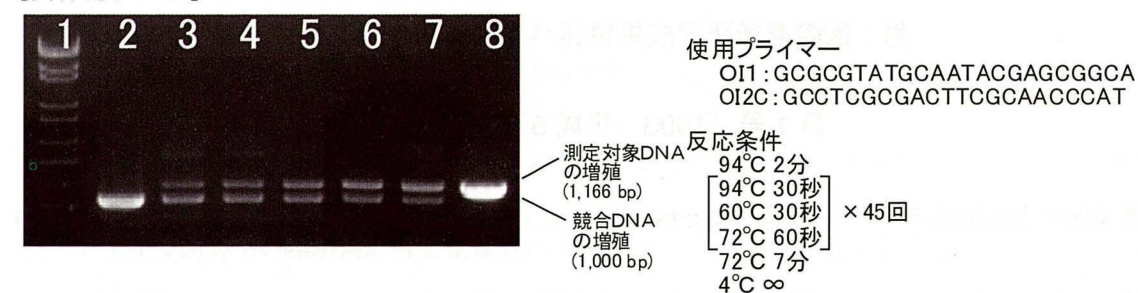


図 1 競合 PCR の反応例

Lane1: サイズマーカー ( $\lambda$ EcoT141)、  
Lane2: 競合 DNA のみ反応液に添加、  
Lane3 ~ 7: 1pM の測定対象 DNA および競合 DNA の濃度は 100pM、10pM、1pM、100nM、10nM をそれぞれ添加、  
Lane8: 測定対象 DNA のみを反応液に添加

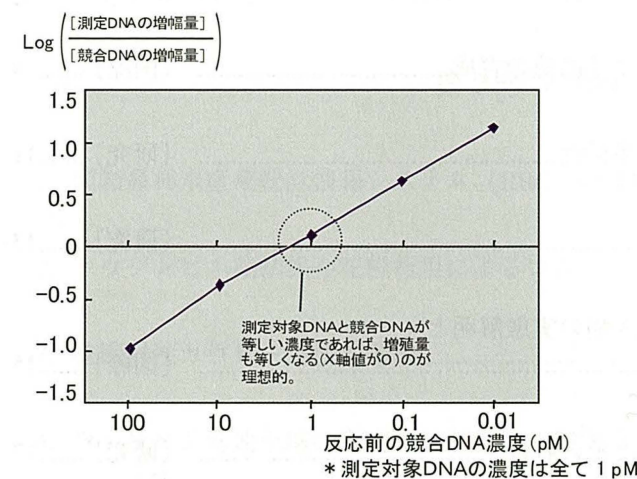


図 2 増幅した DNA 量でグラフ化

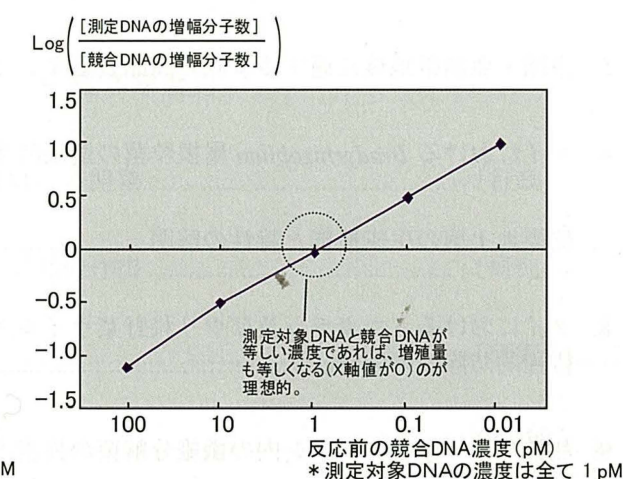


図 3 増幅した DNA 分子数でグラフ化

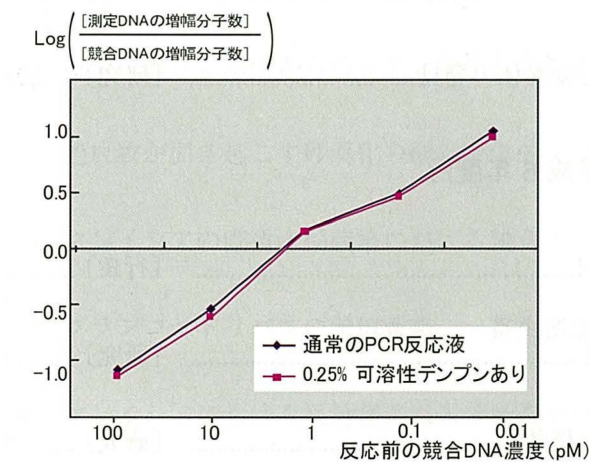


図 4 競合 PCR の定量性への可溶性デンプンの影響

表 1 罹病カンキツ葉中肋の病原体濃度の測定例

栽培品種 (ベトナム名)	検体数	濃度の測定値 (fmol/g·fw) *2			
		最大	最小	平均	標準偏差
Cam Sanh	47	92.9	0.0	35.3	23.5
Nam Roi *1	33	22.0	1.1	5.6	4.1

\*1 Nam Roi はカンキツグリーン病に“強い”品種とされている。  
\*2 濃度の測定には、カンキツグリーン病の病徴を示す葉から中肋を切り出して、その基部側 1cm をさらに切り分けて用いた。切り出した中肋から、CTAB 法に準じて DNA の抽出を行い、DNA 濃度の測定に供試した。

### [その他]

研究課題: カンキツグリーン病の伝播機構の解析

予算区分: 基盤研究

研究期間: 2003 年度 (2002 ~ 2005 年度)

研究担当者: 河辺邦正

発表論文等:

- 1) 河辺・大貫 (2003): カンキツグリーン病の病原体量を Competitive PCR 法により測定する. 日本植物病理学会報, 69 (3): 308