

所属	大学院理工学研究科	氏名	萩原 正規
----	-----------	----	-------

課題名	農作物のウィロイド感染を、現場で簡便・迅速に検出する方法の開発
-----	---------------------------------

1. 概要

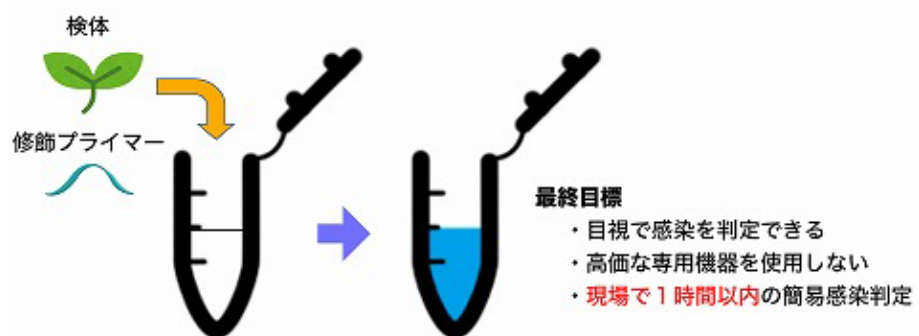
ウィロイドはRNAから形成される現在知られている最小の病原体で、リンゴ、ホップ、トマトなど様々な植物に感染し時に深刻な被害をもたらす。ウィロイドはRNAを遺伝子として有するため、容易に遺伝子変異を引き起こす結果、適応・進化を繰り返し、これまで知られていない新たな宿主に対する感染性を獲得する恐れがある。新たな植物感染症の発生を引き起こす『潜在的な危険因子』であるウィロイド感染の有無を現場で迅速に検出する手法は、必要不可欠な技術である。

現在、ウィロイド検出手法としては、一般的なRNA検出法として知られるRT-qPCR法、あるいはマルチプレックス法が開発されている。RT-qPCR法では、標的ウィロイドRNAをDNAへ変換（逆転写反応）した後、ウィロイド遺伝子特異的なプライマーセットを用いてPCRを行い、増幅産物を蛍光量変化により検出する。マルチプレックス法では遺伝子増幅に複数のプライマーセットを利用し、蛍光量変化あるいは電気泳動法により増幅産物を検出することにより、複数のウィロイドの同時検出が可能になる。これらの手法は検出感度が高いものの、高価な専用の機器を必要とするため、現場におけるウィロイド検出には適さない。

今回提案する方法では、遺伝子増幅反応に申請者が開発した化学修飾プライマーを利用する点が独創的である。化学修飾プライマーを利用して、ウィロイド遺伝子の逆転写反応産物を増幅する。遺伝子増幅反応液に検出用試薬を添加することにより、5-10分後には、電気泳動などの特別な解析装置を利用することなく遺伝子増幅の有無が視覚的に判断できる。

本申請では植物抽出液中の呈色反応阻害物質による誤検出の可能性を排除するために、遺伝子増幅を呈色反応の増強により検出する手法開発を特許取得を視野に入れて取り組む。並行して、感染植物から抽出したウィロイドRNAをDNAへと変換したサンプルを用いて、化学修飾プライマー法の有用性をPCR法により実証する。本手法の有効性を明らかにした後、PCR法とは異なる遺伝子増幅反応として開発された「等温遺伝子増幅法」を利用すること

で、『植物抽出サンプルの逆転写反応、DNA増幅反応、呈色反応の全てを現場で行うことが可能なウィロイド感染診断法』の開発へと挑戦したい。



(1) 簡便なウィロイド検出手法の開発

2. 画像の説明

(1) 簡便なウィロイド検出手法の開発