

2017年2月28日
JST東京本部別館

核酸増幅と塩基配列解読の イイトコドリした遺伝子診断技術

農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門
生産・流通研究領域 病害ユニット

主任研究員 藤川 貴史

1. 医療における遺伝子関連検査 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」より

・病原体遺伝子検査

ヒトに感染症を引き起こす外来性の病原体(ウイルス・細菌等微生物)の核酸(DNAあるいはRNA)を検出・解析する検査
例: 結核菌、クラミジア・淋菌、肝炎ウイルス、マイコプラズマ遺伝子

・体細胞遺伝子検査

ガン細胞特有の遺伝子の構造異常等を検出する遺伝子検査および遺伝子発現解析等、疾患病変部・組織に局限し、病状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする検査
例: 肺ガンにおけるALK融合遺伝子、EGFR遺伝子変異

・遺伝学的検査

単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報を明らかにする検査
例: 出生前診断における染色体検査、ハンチントン病、筋ジストロフィー

1. 医療における遺伝子関連検査 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」より

・病原体遺伝子検査

ヒトに感染症を引き起こす外来性の病原体(ウイルス・細菌等微生物)の核酸(DNAあるいはRNA)を検出・解析する検査
例: 結核菌、クラミジア・淋菌、肝炎ウイルス、マイコプラズマ遺伝子

・体細胞遺伝子検査

ガン細胞特有の遺伝子の構造異常等を検出する遺伝子検査および遺伝子発現解析等、疾患病変部・組織に局限し、病状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする検査
例: 肺ガンにおけるALK融合遺伝子、EGFR遺伝子変異

・遺伝学的検査

単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報を明らかにする検査
例: 出生前診断における染色体検査、ハンチントン病、筋ジストロフィー

2. 健康増進に着眼した遺伝子関連検査

= 消費者向け(DTC)遺伝子検査ビジネス

遺伝子診断技術の現場展開

ヒトを対象とした遺伝子検査

1. 医療用
遺伝子検査

2. 消費者向け
遺伝子検査
ビジネス



食品衛生・畜産業・農業における遺伝子検査

1. 食品
品質・衛生
管理

2. 家畜
品質・衛生
管理

3. 農作物
品質・衛生管理

遺伝子診断技術の現場展開

食品衛生・畜産業・農業における遺伝子検査

1. 食品
品質・衛生
管理

2. 家畜
品質・衛生
管理

3. 農作物
品質・衛生管理

食中毒菌検査
肉種判別検査
魚介種判別検査
遺伝子組換え食品検査

鳥インフルエンザ検査
ウシ呼吸器病遺伝子
(マイコプラズマ・ウイルス)検査
魚病検査
家畜遺伝子疾患検査

遺伝子診断技術の現場展開

3. 農作物
品質・衛生管理



遺伝子診断技術の現場展開

3. 農作物 品質・衛生管理

農作物の品質・衛生管理においても、 遺伝子検査のニーズは高まっている！

- ・遺伝子組換え作物か否か*
- ・表示されている品種や産地で間違いないか*
- ・権利が保護されるべき新品種が流出していないか
- ・病原体に汚染しているか*
- ・病虫害防除・消毒の効果は十分か
- ・種子は均一性を有しているか
- ・種苗は健全に生育するか
- ・機能性成分が十分な量発現しているかどうか 等

(* についての検査の一部は市場化済み)

遺伝子診断技術の現場展開

3. 農作物 品質・衛生管理

農作物の品質・衛生管理においても、 遺伝子検査のニーズは高まっている！

- ・遺伝子組換え作物か否か*
- ・表示されている品種や産地で間違いがないか*
- ・権利が保護されるべき新品種が流出していないか
- ・病原体に汚染しているか*
- ・病虫害防除・消毒の効果は十分か
- ・種子は均一性を有しているか
- ・種苗は健全に生育するか
- ・機能性成分が十分な量発現しているかどうか 等

(* についての検査の一部は市場化済み)

遺伝子診断技術

PCR法
シーケンシング解析
マイクロアレイ解析
ハイブリダイゼーション法
SNP解析
マイクロサテライト解析 等

これらの技術のいずれか(または複数の組み合わせ)で検査が実施される

遺伝子診断技術の現場展開

3. 農作物
品質・衛生管理



導入課題・壁が多い

農作物の品質・衛生管理においても、 遺伝子検査のニーズは高まっている！

- ・遺伝子組換え作物か否か*
 - ・表示されている品種や産地で間違いないか*
 - ・権利が保護されるべき新品種が流出していないか
 - ・病原体に汚染しているか*
 - ・病害虫防除・消毒の効果は十分か
 - ・種子は均一性を有しているか
 - ・種苗は健全に生育するか
 - ・機能性成分が十分な量発現しているかどうか 等
- (* についての検査の一部は市場化済み)

遺伝子診断技術の現場展開



導入課題・壁が多い

- ・検査されるべき農作物の種類が圧倒的に多い
医療であれば「ヒト」だけ。食品衛生検査では特定の微生物やウイルス。家畜検査では数限られた家畜が対象。農作物は穀物、野菜、果樹、茶、イモ、種子と対象は多い。
- ・検査されるべき試料数が圧倒的に多い
種子では何千、何万もの数を検査する。
- ・検査項目数が圧倒的に多い
病害検査では、一つの農作物につき複数の病原体の遺伝子検査を実施する必要がある。
- ・検査に要する時間的な制限が多い
農作物は生ものが多く、傷まないうちに検査される必要がある。輸出入時における植物検疫でも流通への時間的影響を極力抑える必要がある。
- ・検査に要する経済的な制限が多い
農作物の検査に、医療や食品衛生並のコストを充てることができない。大量生産されるものの、工業製品ではないため個々の検査誤差は大きく、また検査費用を農作物の価額に反映させるにも限度がある。

遺伝子診断技術の現場展開



導入課題・壁が多い

・検査されるべき農作物の種類が圧倒的に多い

医療であれば「ヒト」だけ。食品衛生検査では特定の微生物やウイルス。家畜検査では数限られた家畜が対象。農作物は穀物、野菜、果樹、茶、イモ、種子と対象は多い。

・検査されるべき試料数が圧倒的に多い 種子では何千、何万もの数を検査する。

・検査項目数が圧倒的に多い

病害検査では、一つの農作物につき複数の病原体の遺伝子検査を実施する必要がある。

・検査に要する時間的な制限が多い

農作物は生ものが多く、傷まないうちに検査される必要がある。輸出入時における植物検疫でも流通への時間的影響を極力抑える必要がある。

・検査に要する経済的な制限が多い

農作物の検査に、医療や食品衛生並のコストを充てることができない。大量生産されるものの、工業製品ではないため個々の検査誤差は大きく、また検査費用を農作物の価額に反映させるにも限度がある。

従来技術とその問題点

遺伝子診断技術

- | | |
|--------------|------------------------------------|
| PCR法 | → 検体試料の質によって、非特異的な陽性反応がでる |
| シーケンシング解析 | → 解析に時間がかかる(装置を有する機関も少なく外注が多い) |
| マイクロアレイ解析 | → 条件検討に時間とコストが掛かるため多数の検査にはまだ非効率的 |
| ハイブリダイゼーション法 | → 精度が低い |
| SNP解析 | → 解析にバイオインフォマティクスの処理が必要で、機関によっては困難 |
| マイクロサテライト解析 | → 解析にバイオインフォマティクスの処理が必要で、機関によっては困難 |

とくに、

日本国内に存在しない農業上重要な病原体(=侵入病害虫)の感染が疑われる場合、

核酸増幅法(PCR法)とシーケンシング解析といった両方の遺伝子検査の結果によって判断する等、慎重な検査を要する。

(すなわち検査時間も検査費用もさらに掛かってしまう)

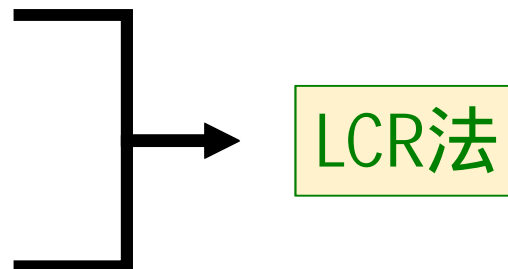
一度で複数の原理をこなせるような遺伝子診断技術はないものか？

新技術の特徴

一度で複数の原理をこなせるような遺伝子診断技術はあります！

核酸増幅 (PCR法)

塩基配列解読 (シーケンシング解析)



LCR: DNAリガーゼ連鎖反応 (Ligase Chain Reaction)

参考: PCR: DNAポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction)

原理を簡潔に言うと.....

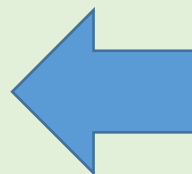
「一塩基の違いでターゲットの核酸のみを増幅させることができる」

新技術の特徴

1) ターゲットの塩基配列

AAAAAAAAAGCCCCCCCCC

TTTTTTTTTCGGGGGGGGGG



反応



熱耐性DNAリガーゼと
4種のオリゴDNA

AAAAAAAAAG

CCCCCCCCC

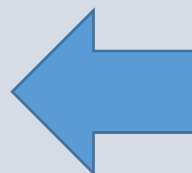
TTTTTTTTT

CGGGGGGGGG

2) 非ターゲットの塩基配列

AAAAAAAAAACCCCCCCCC

TTTTTTTTTTGGGGGGGGGG



反応



熱耐性DNAリガーゼと
4種のオリゴDNA

AAAAAAAAAG

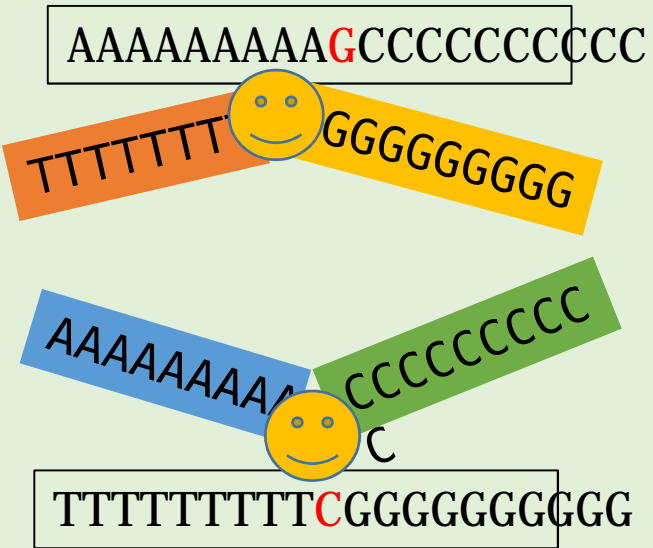
CCCCCCCCC

TTTTTTTTT

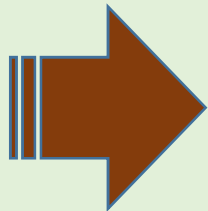
CGGGGGGGGG

新技術の特徴

1) ターゲットの塩基配列

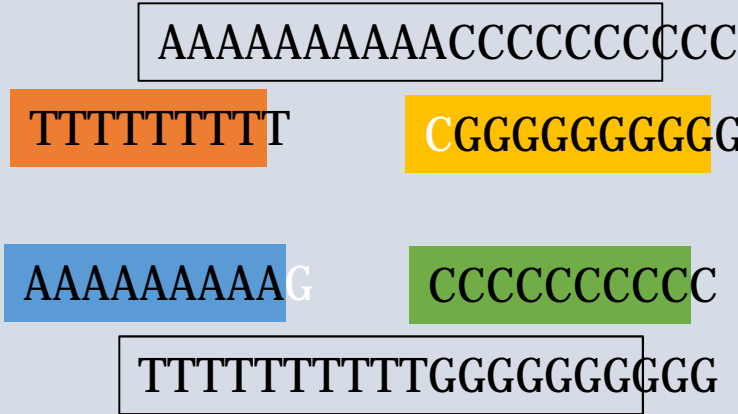


結合・
反復



PCRと同じく指数関数的に増幅する

2) 非ターゲットの塩基配列



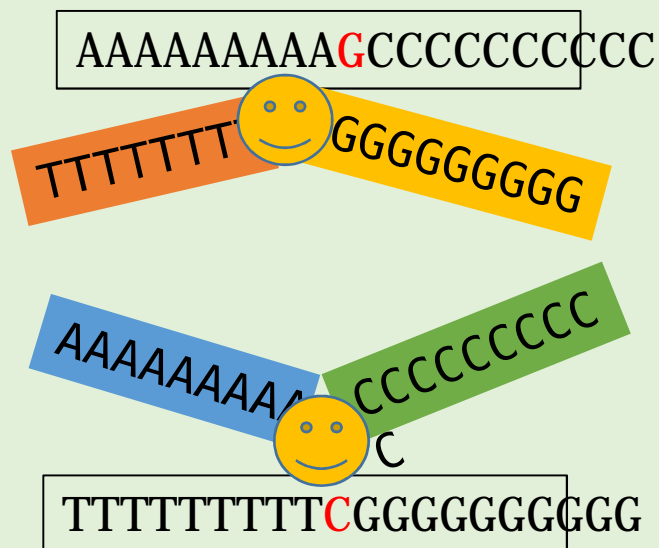
無認識



非増幅

新技術の特徴

1) ターゲットの塩基配列



PCRと同じく指数関数的に増幅する

鋳型配列にアニールする2本のプライマー（オリゴマー）の繋ぎ目が、**鋳型の塩基と完全に相補な場合にのみ、ライゲーション反応**が起こり、2本のプライマーは1本のオリゴマーに結合される

LCR法スキーム

LCRはPCRに比べて特異性に優れ、**一塩基の違い**を区別することができる。
また増幅を繰り返しても非特異的なDNA断片が生じない等検出力にも優れている。
PCRやRFLPと異なり、**複数の似たような配列のDNAが存在していても個別に識別が可能**（それぞれ特有の配列のみライゲーション反応が見られる）

新技術の特徴

LCR法は非常に便利！

1. PCR法を利用できる検査現場では、その装置をそのまま用いることができる。
2. PCR法では疑陽性になりやすいものでも、精度高く検査できる。
3. 複数の対象生物(対象ターゲット核酸)であっても、同時に診断できる。
4. PCR法の検査の後、シーケンシング解析を連続して実施する検査については、LCR法一回の検査で十分。

果樹ファイトプラズマ識別技術

植物防疫法施行規則 第二章 輸入植物の検査

(検疫有害動植物)

第五条の二 法第五条の二[検疫有害動植物]第一項の農林水産省令で定める有害動物又は有害植物は、別表一のとおりとする。

別表一 第二 有害植物

一 まん延した場合に有用な植物に損害を与えるおそれがあることが明らかである有害植物

(二)細菌

Acidovorax avenae subsp. citrulli (スイカ果実汚斑細菌病菌)

Apple rubbery wood phytoplasma

Aster yellows phytoplasma group

Candidatus Liberibacter africanus (カンキツグリーニング病菌アフリカ型)

Candidatus Liberibacter americanus (カンキツグリーニング病菌アメリカ型)

Candidatus Liberibacter asiaticus (カンキツグリーニング病菌アジア型)

Candidatus Liberibacter solanacearum

Candidatus Phytoplasma aurantifolia (Lime witches'-broom phytoplasma)

Candidatus Phytoplasma australiense

Candidatus Phytoplasma mali

Candidatus Phytoplasma prunorum (Apricot chlorotic leafroll)

Candidatus Phytoplasma pyri

Clavibacter michiganensis subsp. Nebraskensis

(トウモロコシ葉枯細菌病菌)

Cranberry false blossom phytoplasma

Curtobacterium flaccumfaciens pv. betae

Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens

(インゲンマメ萎ちよう細菌病菌)

Erwinia amylovora (火傷病菌)

Erwinia tracheiphila (ウリ類青枯病菌)

Grapevine flavescence doree phytoplasma

Grapevine yellows phytoplasma

Pantoea stewartii [SYN: Erwinia stewartii]

(トウモロコシ萎ちよう細菌病菌)

Peach rosette phytoplasma

Peach X-disease phytoplasma

Peach yellows phytoplasma

Potato purple top wilt phytoplasma

Potato stolbur phytoplasma

Pseudomonas syringae pv. actinidiae biovar 3

Rubus stunt phytoplasma

Spiroplasma citri

Strawberry lethal decline phytoplasma

Sugarcane grassy shoot and white leaf phytoplasmas

Sugarcane yellows phytoplasma

Vaccinium witches'-broom phytoplasma

Xanthomonas arboricola pv. juglandis

[SYN: Xanthomonas campestris pv. juglandis] (クルミ褐色腐敗病菌)

Xanthomonas arboricola pv. populi

[SYN: Xanthomonas campestris pv. populi]

Xanthomonas campestris pv. vasculorum (サトウキビゴム病菌)

Xanthomonas oryzae pv. oryzaicola (イネ条斑細菌病菌)

Xylella fastidiosa

国内未発生のファイトプラズマによる脅威は計り知れない

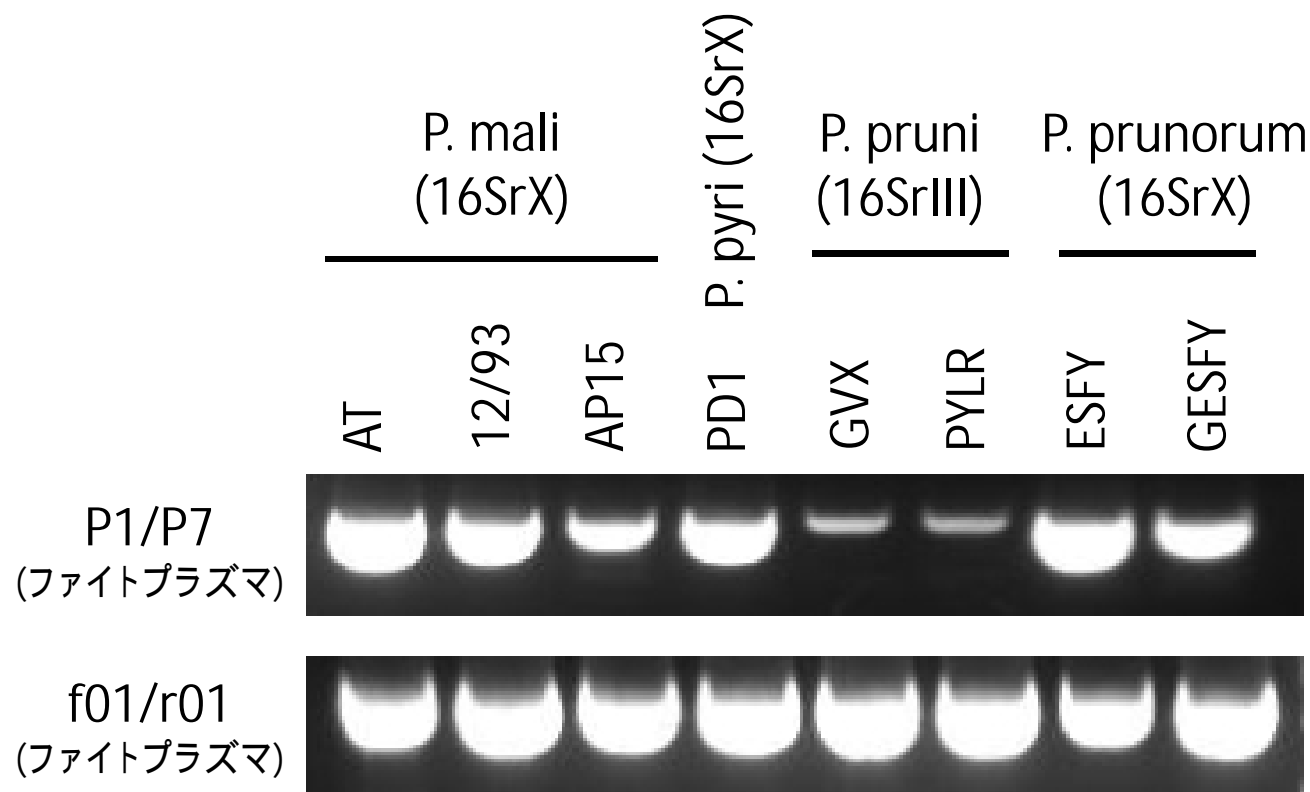
果樹ファイトプラズマ識別技術

現状

- ・ファイトプラズマの検出は主にPCR
(eg. Deng and Hiruki, 1991; Heinrich et al. 2001)
- ・真にファイトプラズマかどうか、また種や病原グループを同定するためには、シーケンシングによって塩基配列を解読するか、RFLP法等の解析手法が必要
(eg. Sawayanagi et al. 1999; Martini and Lee 2013)
- ・複数種(グループ)のファイトプラズマが混合感染している場合に、PCR、キャピラリーシーケンシング、RFLPでは技術的に判別できない

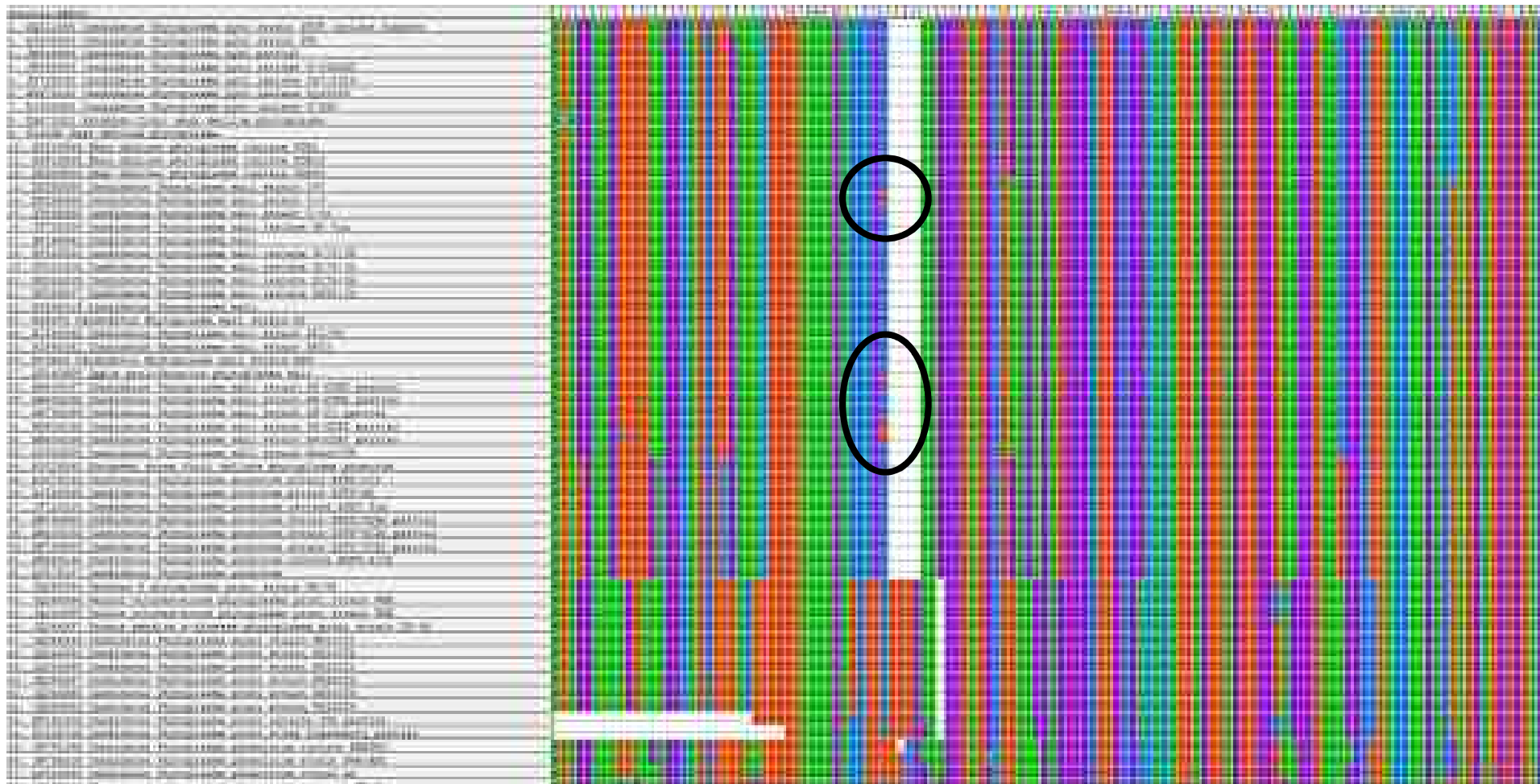
果樹ファイトプラズマ識別技術

現状



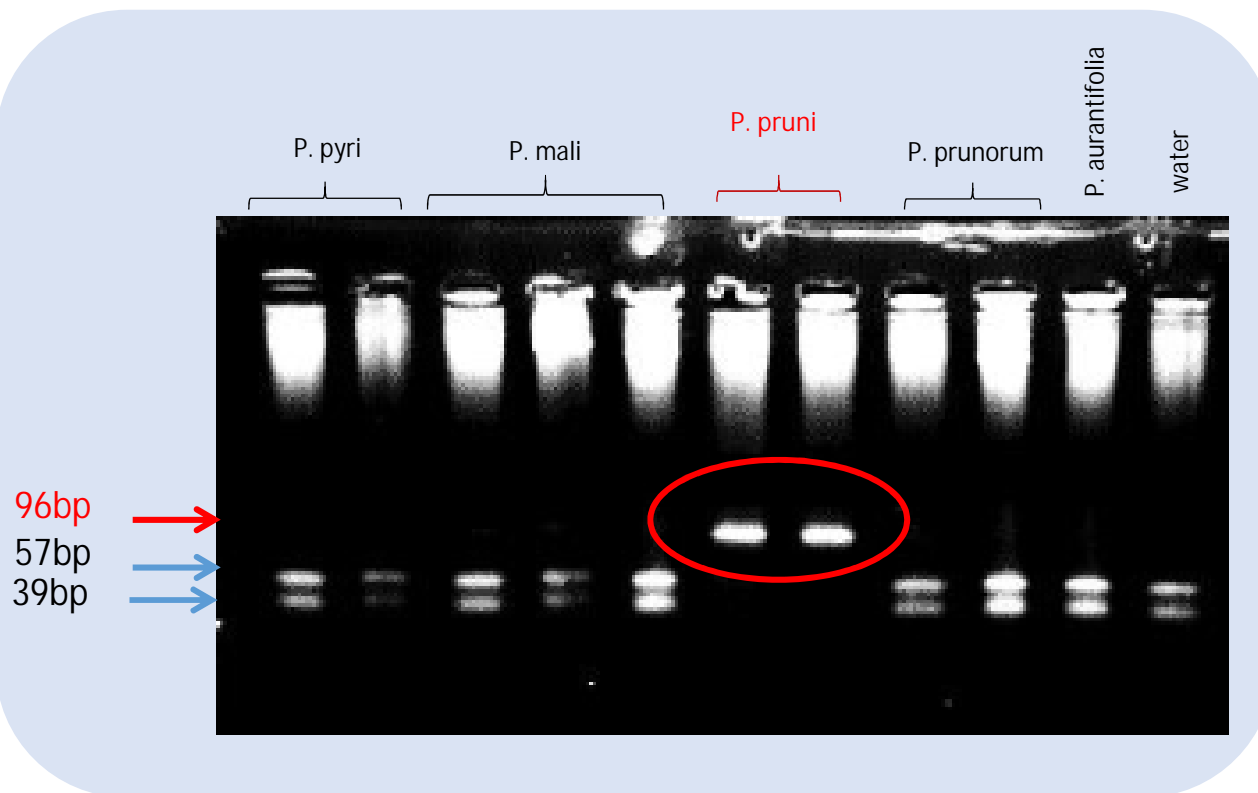
従来の技術では、類似の塩基配列をもったファイトプラズマを識別できない

果樹ファイトプラズマ識別技術



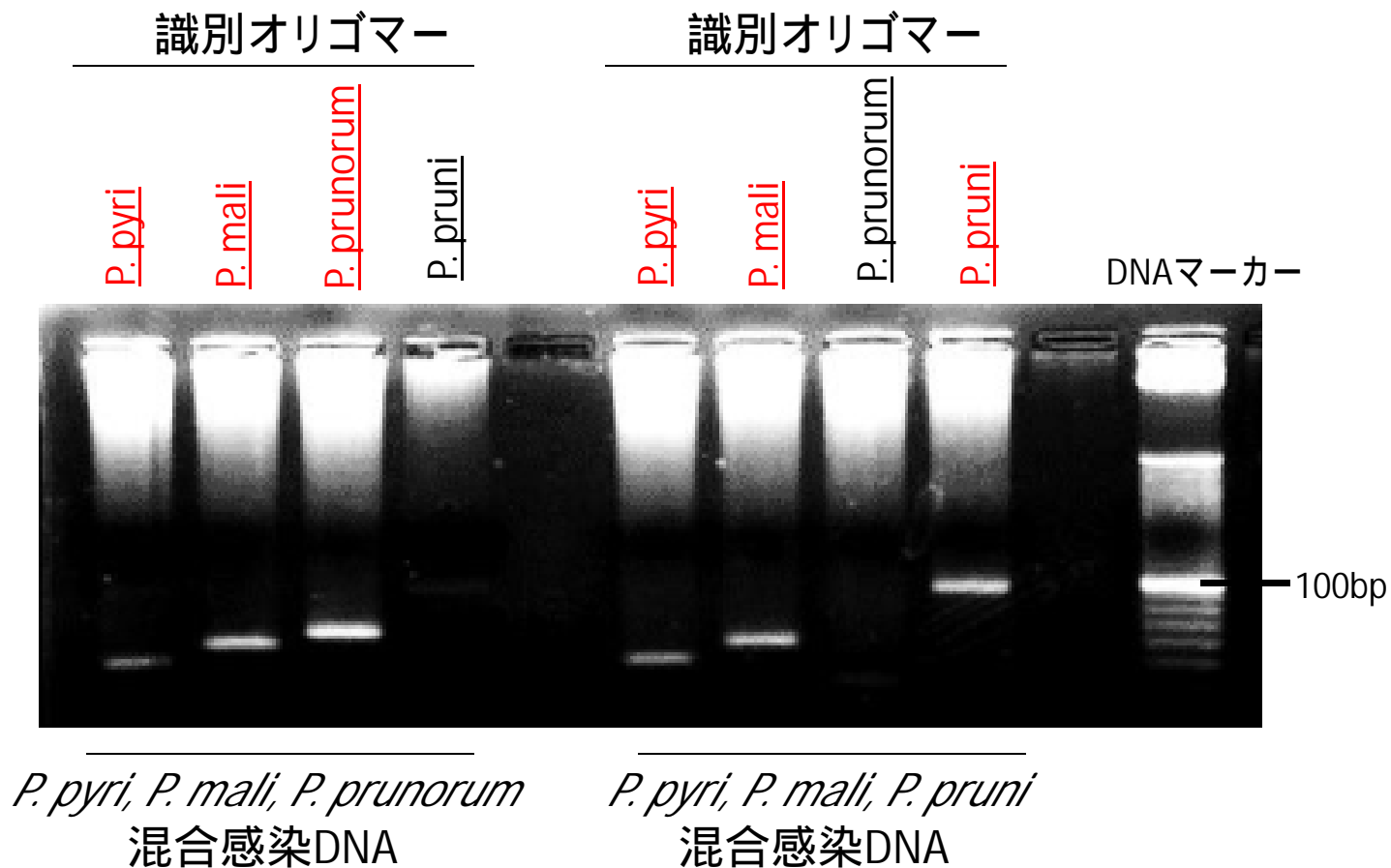
果樹ファイトプラズマのグループ特有のSNPが見つけれれる

果樹ファイトプラズマ識別技術



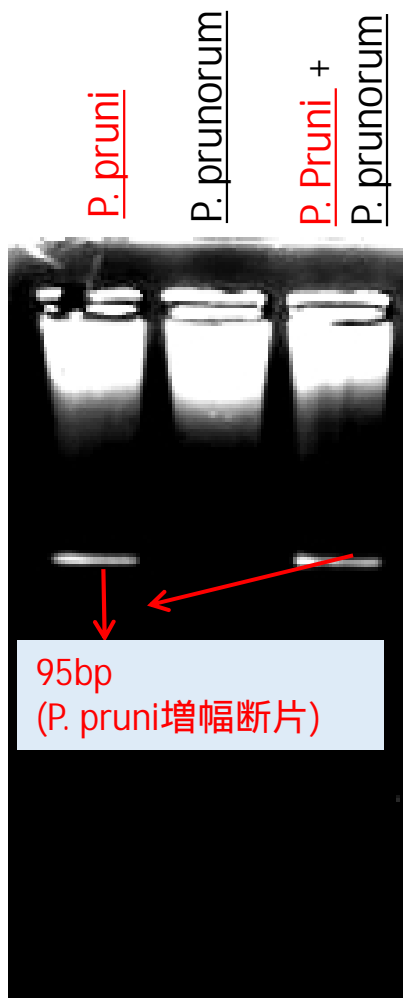
様々なファイトプラズマDNA試料に対して
モモのファイトプラズマ識別オリゴマーを用いてLCR法を行うと、
モモのファイトプラズマ試料のみ増幅（結合）断片が得られる。
（識別できる）

新技術では、類似の塩基配列をもったファイトプラズマを明瞭に識別できる



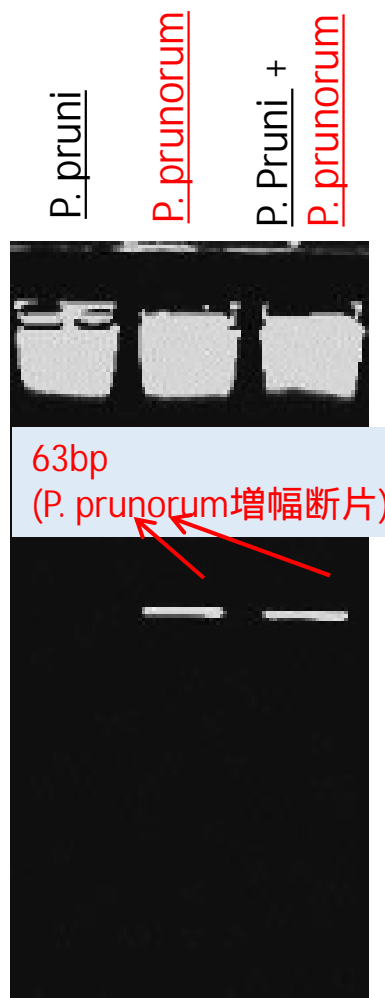
ファイトプラズマが混合感染しているDNA試料に対して各ファイトプラズマ識別オリゴマーを用いてLCR法を行うと、混合感染しているファイトプラズマを個別に識別できる。

識別オリゴマー



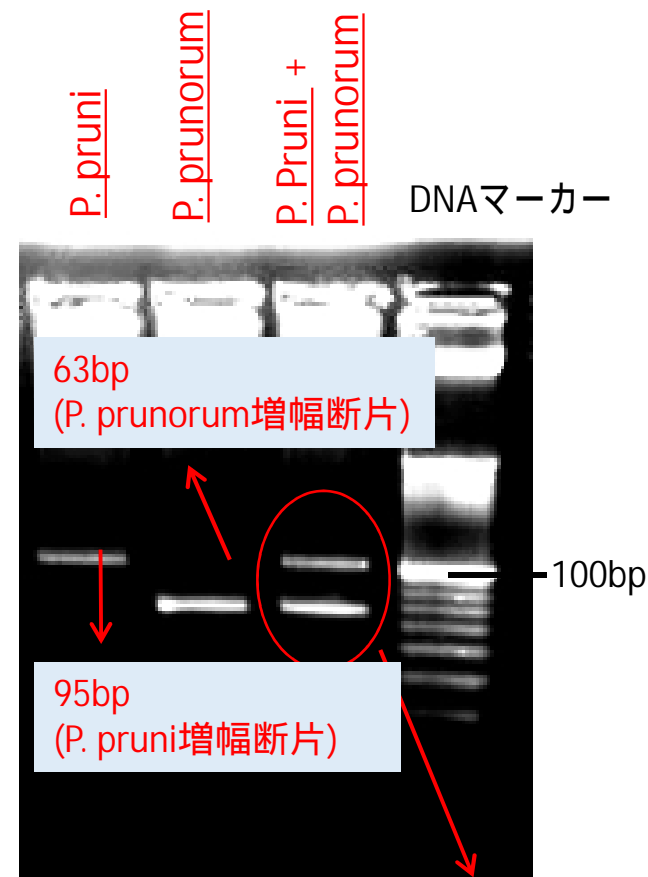
P. pruni 単独感染DNA

識別オリゴマー



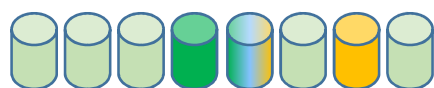
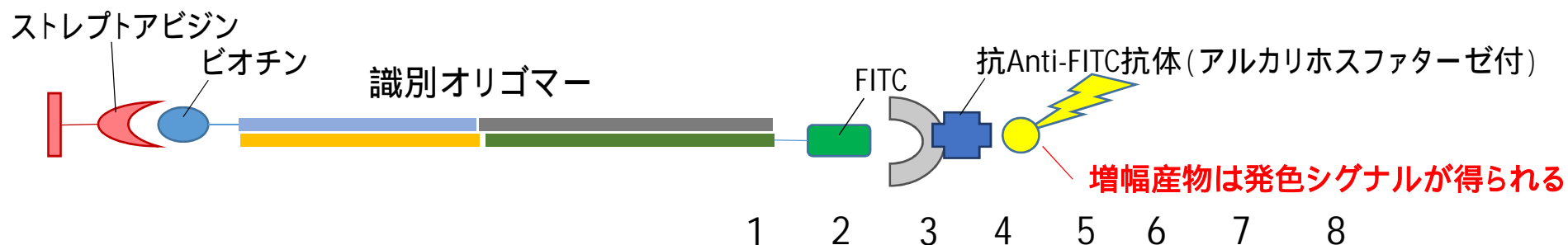
P. prunorum 単独感染DNA

識別オリゴマー

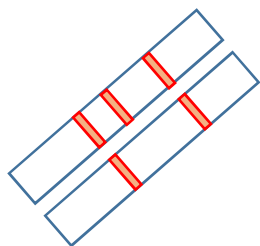


混合試料に対して2種オリゴマーセット併用で正確に識別できる

P. pruni, *P. prunorum* 混合感染DNA



ELISA法



イムノクロマト法



増幅産物を免疫検出化させることによって、迅速で「見える」遺伝子検査にできる
= キットとして便利

想定される用途

- ・種子や苗、果樹園や田畑の病害検査を効率化できる。
- ・品種鑑定や遺伝資源の由来鑑定に利用できる。
- ・医農食等の検査現場では、一塩基でも異なるものであれば、従来困難な遺伝子の判別に利用できる。

新技術の特徴

1. PCR法を利用できる検査現場では、その装置をそのまま用いることができる。
2. PCR法では疑陽性になりやすいものでも、精度高く検査できる。
3. 複数の対象生物(対象ターゲット核酸)であっても、同時に診断できる。
4. PCR法の検査の後、シーケンシング解析を連続して実施する検査については、LCR法一回の検査で十分。

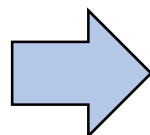
想定される用途

3. 農作物
品質・衛生管理

農作物の品質・衛生管理においても、
遺伝子検査のニーズは高まっている！

- ・遺伝子組換え作物か否か*
 - ・表示されている品種や産地で間違いがないか*
 - ・権利が保護されるべき新品種が流出していないか
 - ・病原体に汚染しているか
 - ・病虫害防除・消毒の効果は十分か
 - ・種子は均一性を有しているか
 - ・種苗は健全に生育するか
 - ・機能性成分が十分な量発現しているかどうか 等
- (* についての検査の一部は市場化済み)

LCR法



一つのユニバーサルな技術で検査できる

実用化にむけた課題と企業への期待

LCR法を用いた遺伝子診断技術の課題

- ・実施例が少ないため、実用化に向けて、多くのテストモデルにチャレンジし、技術の確立化を図る必要あり。
- ・LCR法のキット化のためには、試薬(酵素、検出系)のコストダウンが重要であり、そのためには汎用性の高い試薬を用いたマスプロ化が必要。

農業における遺伝子検査の課題

- ・農作物の種類が多さや、検査数の多さに対して柔軟な試料調製技術が望まれおり、遺伝子診断技術と合わせて開発していく必要がある。
- ・農業における遺伝子検査の普及を促進するために、技術のマーケティングとプロモーションが重要であり、企業の視野が必要不可欠。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：2種以上の検出対象生物を同時に検出する方法およびキット
- 出願番号：特願2014-031958
- 出願人：農研機構
- 発明者：藤川貴史、宮田伸一、岩波徹

関連する知的財産権と資格

・発明の名称：核酸、プライマーセットおよびこれを用いたカンジダタス・リベリバクター・ソラナセアルムの検出方法

出願番号：特願2015-159251

発明者：藤川貴史

・発明の名称：植物の病原体による感染を診断する方法

出願番号：特願2016-045274

発明者：藤原和樹、藤川貴史

・藤川貴史 博士(農学)、技術士(農業部門・植物保護)、植物医師、樹木医

本技術に関するお問い合わせ先

農研機構 連携広報部 知的財産課 特許チーム

TEL 029-838-6465

FAX 029-838-8905

E-mail naro-kyodaku@naro.affrc.go.jp

技術的なお問い合わせは

果樹茶業研究部門 生産・流通研究領域 病害ユニット

藤川 貴史

TEL 029-838-6544

E-mail ftakashi@affrc.go.jp