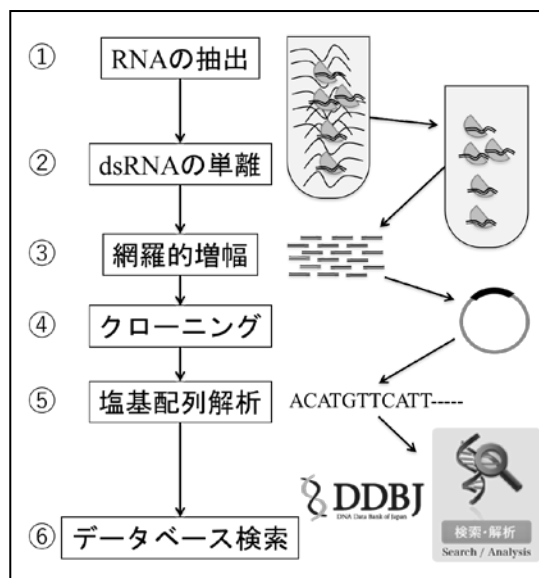


## 愛媛大学大学院農学研究科 研究シーズ集 (研究者情報)

<b>氏名</b>	小林 括平	<b>専攻</b>	食料生産学
		<b>コース</b>	農業生産学
<b>職名</b>	教授	<b>専門分野</b>	分子生物資源学
<b>メールアドレス</b>	kappei@ehime-u.ac.jp	<b>その他連絡先</b>	089-946-9868
<b>研究課題</b>	植物ウイルス病原体の探索・同定と診断法の開発		
<b>キーワード</b>	植物ウイルス, 網羅的探索, 新規ウイルス, 遺伝子診断, 核酸抽出		

**研究内容:** ウイルスによると疑われる植物病害について, その原因病原体の候補を迅速に見つけ出し, 簡便, かつ迅速な遺伝子診断法を開発します.



**網羅的植物ウイルス探索法** どんなウイルスが感染しているかわからない植物からでも, ウイルスの尻尾を捕まえることができます.

- ① 植物ウイルスの大部分を占める RNA ウイルスを対象とし, まず RNA を抽出します.
- ② 植物自身は作らない二本鎖 RNA (dsRNA) を濃縮します.
- ③ dsRNA から cDNA を合成し, そのすべてを網羅的に増幅します.
- ④ 増幅された DNA をランダムにクローニングします.
- ⑤ ランダムに選んだクローンの塩基配列を決定します.
- ⑥ 決定された塩基配列すべてについて, データベース中のウイルス遺伝子配列から似たものを探し出します.

現在では, ④と⑤は次世代シーケンサーを用いることによって, ワンステップで行うこともできます. この方法で捕まえた尻尾からウイルス本体を手繰り寄せ, PCR などの遺伝子診断法を開発・提供します.

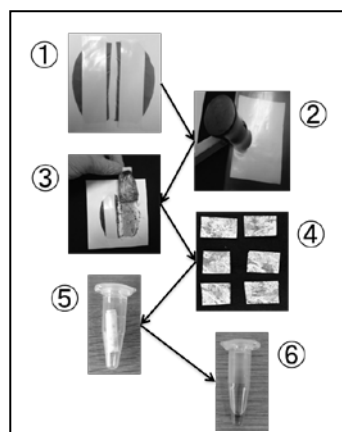
Kobayashi K, Tomita R and Sakamoto M. (2009) *Journal of General Plant Pathology*. 75, 87-91 (2011 年 JGPP 論文賞).

Yanagisawa H, (ほか 5 名), Kobayashi K and Sekine K.-T. (2016) *Viruses* 8(3): 70 (次世代シーケンサー利用).

### 新規ウイルス発見の実績

リンドウこぶ症関連ウイルス: Kobayashi, K ら (2013) *Journal of General Plant Pathology* 79, 56-63.

トルコギキョウえそ輪紋ウイルス: Shimomoto Y ら (2014) *Journal of General Plant Pathology* 80, 169-175.



### ウイルス病診断のための簡便・迅速な植物核酸抽出法

PCR などの遺伝子診断法を行うには, まず核酸を抽出する必要があります. これまでにろ紙と金づちを用いた簡便・迅速な核酸抽出法を開発しました. さらにウイルスの核酸を濃縮するための改良にも取り組んでいます.

- ① 葉の向軸面 (おもて面) にビニールテープを貼り付けます.
- ② ①の葉を二枚のろ紙に挟み込み, クリアフォルダに入れて金づちで叩いて葉の組織を破壊し, 汁液を濾紙に染み込ませます.
- ③ ビニールテープとともに葉の残渣を取り除きます.
- ④ 叩き潰された葉の汁液を吸い込んだろ紙を約 2 cm 角に切り取ります.
- ⑤ ④のろ紙片を筒状に丸め, マイクロ遠心管に入れます.
- ⑥ 核酸を含む植物成分を強力な界面活性剤を含む抽出液に溶解させ, 通常の方法で核酸を抽出します.

Akhter MS ら (2016) *Journal of General Plant Pathology* 82:268-272.

### 提供可能な資源・技術・その他

原因病原体が不明な発病植物から網羅的探索法によって抽出した病原体候補ウイルス遺伝子情報  
遺伝子診断技術 (核酸抽出法, PCR プライマーの設計)

### プロジェクト研究希望テーマ

重要作物の新病害における原因病原ウイルスの特定

ウイルス病診断のための簡便・迅速・安価な核酸抽出法の開発