

16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅による植物病原 MLO の検出と分類

東京大学農学部附属農場 なん ば しげ とう
難 波 成 任

はじめに

マイコプラズマ様微生物 (mycoplasma-like organisms; MLO) はその発見以来 (土居ら, 1967), 今日まで約 300 以上の植物病害の病原であると考えられてきた (McCoy et al., 1989)。しかしながらこれまで, *in vitro* で培養できないことから (Lee and Davis, 1986), 病気の診断や MLO の分類に関する研究はなかなか進まず, 専ら感染植物の病徴, 電子顕微鏡による節部組織の観察, それに昆虫伝搬の特異性に関して研究されてきた。しかし, これらの実験には時間がかかり, 時には困難であるため, 多くの MLO でその性状が十分に調べられていないのが実状である。

MLO を分類・整理するために, より信頼性の高い, 特異的な方法として, 血清試験やハイブリダイゼーション法の利用が考案された。すなわち, MLO に対する抗体を作出し, ELISA や免疫電子顕微鏡法により, 感染植物より MLO を高感度に検出できるようになった (Lin and Chen, 1985; Clark, 1989; Kirkpatrick, 1991)。また, 感染植物 (Sears et al., 1989; Davis et al., 1990; Koller et al., 1990; Lee et al., 1990; Kuske et al., 1991a, b; Nakashima et al., 1992) 及び保毒虫 (Kirkpatrick et al., 1987) から抽出した MLO ゲノムの一部をクローニングし, これをプローブとして, MLO を植物や昆虫より検出し, その遺伝学的関係を調べた。これらの方法により, 迅速でしかも病徴によるよりも正確に MLO の分類ができるものと期待される。しかし一方で, MLO の生物学的または系統分類上の位置を知ることも重要である。最近, 16S rRNA の研究が行われるようになり (Lim and Sears, 1989; Kirkpatrick et al., 1990), 進化上, MLO はむしろアコレプラズマに近縁で, 動物マイコプラズマとは異なるのではないかと考えられるようになった。また, 16S rRNA に共通なプライマーを用いて, MLO の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅できることや (Deng and Hiruki, 1991), その増幅 DNA の RFLP の解析により, MLO が少なくとも 2 種類以上に分けられるらしいことがわかってきた (Ahrens and Seemüller et al., 1992)。筆者らは最近, 異なる媒介虫により伝搬される 6 種の MLO (表-1) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を明らかに

し, それらが, I 群 (キリてんぐ巢 (土居ら, 1967), クワ萎縮 (土居ら, 1967), タマネギ萎黄 (宮原ら, 1982), トマト萎黄病 MLO (加藤ら, 1988)), II 群 (ツワブキてんぐ巢病 MLO (加藤・岩波, 1990)), III 群 (イネ黄萎病 MLO (奈須ら, 1967)) の進化的に異なる三つのグループに分けられること, そしてとくに I 群の MLO では, 媒介虫が異なっても進化的には同一種と考えられることなどが明らかになった。

なお, 16S rRNA の塩基配列に基づいた細菌分類法の基本的な概念については, 本誌前号で澤田らにより詳説されているので, 本稿では, 16S rRNA 遺伝子を利用した MLO をめぐる分子遺伝学的な最近の研究成果に付いて, 著者らの研究成果を中心に, その基礎的及び応用的な側面から, 主に実験手法を中心に紹介することにした。なお, 紙面に限られているので, 詳細についてはまた別の機会に譲ることとして (S. Namba et al., submitted), ここでは専ら要点のみを述べるにとどめたことをお許し願いたい。

I MLO の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅による系統学的解析

1 16S rRNA の利点

地球上にある生命が 1 個の生命体, すなわち祖先生物の子孫であることは誰もが認めるところであるが, その祖先がどんなもので, どのように派生してきたかはよくわかっていない。進化の道筋を再現する方法の一つに, 現存する細胞にある分子化石を調べるやり方がある。分子化石とは, 系統上きわめて離れた生物に共通の構造や

表-1 本研究で供試した MLO 病の所属群とその媒介虫及び地理的発生分布

MLO 群	病名	媒介虫	発生地
I	タマネギ萎黄病	ヒメフタテンヨコバイ	埼玉, 兵庫, 佐賀, 山口, 長崎
	トマト萎黄病	ヒメフタテンヨコバイ	佐賀, 広島
	クワ萎縮病	ヒシモンヨコバイ ヒシモンモドキ	日本, 中国, 朝鮮半島
	キリてんぐ巢病	タバコメクラガメ クサギカメムシ	日本, 中国, 朝鮮半島, 台湾
II	ツワブキてんぐ巢病	キマダラヨコバイ	宮崎
III	イネ黄萎病	ツマグロヨコバイ	日本, 東南アジア
		クロスジツマグロヨコバイ タイワンツマグロヨコバイ	

Detection and Differentiation of Plant-pathogenic Mycoplasma-like Organisms (MLO) Using PCR Amplification of 16S rRNA Genes. By Shigetou NAMBA

機能を指し、おそらく最初の細胞に既に存在していたと考えられるものである。中でも遺伝子の変異の集積は極めて遅く、保存性の高いRNAやタンパク質をコードしている遺伝子に集積した変化(変異)の数を数えると、生物相互の進化上の類縁関係を推測することができるとする考え方がある。共通の祖先から始まった生物の進化の過程は系統樹として表すことができる。これまでグロビンやシトクロムcなどのよく保存されているタンパク質や遺伝子が分子時計として利用されてきた。しかし微生物の中にはシトクロムcを欠くものがあり、また仮に持っていたとしても相互のタンパク質が違いすぎて、類縁関係を確定しにくいものがあることから、MOESEら(1980)は16S rRNAの利用を試みた。その利点は、①生物に普遍的に存在し、その構造と機能がよく保存され、系統樹の作成が比較的容易であり、②大量に存在し、精製・分析がしやすい事にある。今日、16S rRNAの塩基配列を分子化石として用いることにより得られた結果は強く支持されており、その意味で、16S rRNA遺伝子を用いた系統発生的な比較研究は、Mollicutes綱の微生物と考えられている培養の困難なMLOの進化的な由来と生物分類上の位置づけに、きわめて有効な武器となる。

2 Mollicutes 綱の分類学的位置

Mollicutes 綱の細菌はヒトや動物、昆虫、植物の重要病害に関連したものが多く(RAZIN and BARILE, 1985)、細胞壁を欠き、小型である点で、他の原核微生物とは区別される(表-2)。事実、それらは最小の自己複製微生物であると考えられている。動物マイコプラズマのゲノムは、約680-1600 kbで(NEIMARK and LANGE, 1990)、これは、大腸菌の4700 kbや植物の6000-60000 Mbに比べると格段に小さい。これまでの研究では、16S rRNA及び5S rRNAの塩基配列、また16S rRNAオリゴヌクレオチドカタログの解析などにより、Mollicutes 綱の細菌は系統学的にはグラム陽性細菌に近縁で、clostridiaから退化的な進化を遂げて発生してきたものと考えられている(WOESE et al., 1980; MANILOFF, 1983; ROGERS et al., 1985; WEISBURG et al., 1989)。rRNAの配列が似ていることに加えて、Mollicutes 綱はゲノムのG+C含量の低

い点でも clostridia に似ている。

3 MLO の 16S rRNA 遺伝子の PCR による増幅

16S rRNAの解析は従来、逆転写酵素を利用したり、ゲノムライブラリーを作製して行われていたが、既に述べたように、この遺伝子は微生物を通じて高度に保存されており、また Mollicutes の多くでゲノムに約1-2コピー存在する事が知られている(SAWADA et al., 1981)。そこでまず、Mollicutes の16S rRNA遺伝子をデータベースを用いて解析し、Mollicutes 綱及びリケッチア類に特異的なプライマーをデザイン・合成した(ユニバーサルプライマーセット、図-1)(SOMMER and TAUTZ, 1989)。次にMLO濃縮分画試料をLEE and DAVIS (1988)の方法に基づき若干の改良を加えて、酵素処理により調製した。PCR反応は以下の条件で行った。各抽出DNAサンプル1 μ l (MLO-濃縮分画DNA(収量6 μ g/g 維管束組織): 約8 ng; *Mycoplasma orale* 抽出全DNA)をPCR反応の鋳型として用いた。増幅反応は、20 μ l PCR反応ミックス(各250 μ MのdATP, dCTP, dGTP, dTTP; 各1 μ M 5'-及び3'-プライマー; PCR反応バッファー; 0.5 U *Taq* DNAポリメラーゼ(プロメガ, USAなど)、100 μ l 流動パラフィン(No. 261-32GR, ナカライテスクで十分である))により行った。シークエンス用の鋳型調製は100 μ lのスケールのPCR反応で行った(NAMBA et al., submitted)。PCR反応はサーモプロセッサTR-100(タイテック(株))を用いて、特に断らない限り50サイクル行った。サイクル条件は、以下の通りである: 最初のサイクル: 熱変性(94 $^{\circ}$ C, 90秒間)、温度降下(40秒間)、アニーリング(60 $^{\circ}$ C, 2分間)、温度上昇(30秒間)、伸長反応(72 $^{\circ}$ C, 3分間); 続く50サイクルは熱変性を2分間で行う他はアニーリング・伸長反応は最初のサイクルと同じ; 最後の伸長反応は7分間行う(SAIKI et al., 1988; INNIS and GELFAND, 1990)。以下、本稿では特に断らない限りこれを「通常の条件」と称した。

本研究では、各種の媒介虫により伝搬される6種類の

表-2 Mollicutes 綱の分類

Kingdom	Division	Class	Order	Family	Genus
Prokaryotae	"Photobacteria"	The bacteria			
	Tenericutes	Rickettsiales	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	<i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i>
				Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma</i>
		Mollicutes	Anaeroplasmatales	Anaeroplasmataceae	<i>Anaeroplasma</i> <i>Asteroplasma</i>
				Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae — <i>Acholeplasma</i>

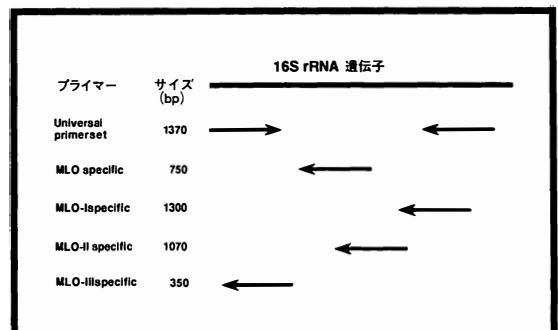


図-1 各プライマーの位置と増幅DNAのサイズ

MLO病についてそれぞれPCR増幅を試みた結果、そのいずれから予想どおり約1400 bpのDNA断片が増幅された。このDNAは、健全試料からは増幅されず(図-2)、またサザン及びノーザンハイブリダイゼーションにより、MLO感染植物に特異的で、16S rRNA遺伝子に相補的な配列を持つことが確認された。

4 PCR増幅DNAの塩基配列決定

各種生物の16S及び16S様rRNAの塩基配列のデータをデータベースより検索・解析し(NEEFS et al., 1990), 18種のシーケンス用プライマーを合成した。

各MLOサンプルよりPCR増幅した反応液を精製してシーケンス反応の鋳型とし、合成プライマーを用いてダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。シーケンス反応は、 35 S dATPを用いてSe-

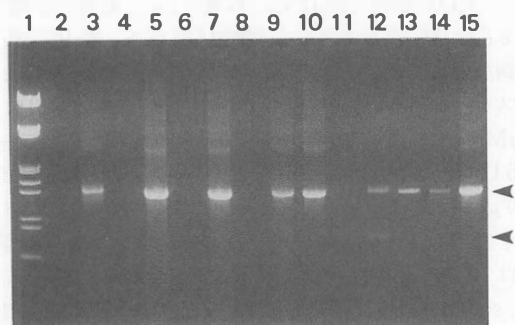


図-2 (1) MLO濃縮分画試料または全DNA試料からユニバーサルプライマーを用いて増幅したゲル泳動写真(矢印上: 1370 bp; 下: 750 bp) (H: 健全試料; D: それぞれのMLOに感染した試料)

- 1 λ Hind III・EcoRI マーカー
 - 2 タマネギ(H) (MLO濃縮分画法により調製した試料をPCR)
 - 3 タマネギ(D) (MLO濃縮分画より; 以下のレーンは全DNA試料)
 - 4 タマネギ(H)
 - 5 タマネギ(D)
 - 6 ツワブキ(H)
 - 7 ツワブキ(D)
 - 8 イネ(H)
 - 9 イネ(D)
 - 10 *Mycoplasma orale*
 - 14 無毒媒介虫(ヒメフタテンヨコバイ)の全DNA試料
 - 15 保毒虫
- (2) 全DNA試料からユニバーサルプライマーセット及びMLOに特異的なプライマーを用いてRPCR法により増幅したDNAのゲル泳動写真
- 11 タマネギ(H)
 - 12 タマネギ(D)
 - 13 *Mycoplasma orale*

quenase Version 2.0 (USB, USA) により、図-3のプロトコルに従って行った(TABOR and RICHARDS, 1989; NAMBA et al., submitted)。その結果、1370塩基の配列が決定され、それらはいずれも *Mollicutes* の16S rRNAと高い相同性を示した。またそれらは、その塩基配列の相同性から表-1のように三つの群に分かれた。I群の本邦産MLOの配列は全て同じであった。また米国で報告されたwestern aster yellows MLOの強毒系統(SAY-MLO)と *Oenothera hookeri* のフィロディー症状に関与するMLO(O-MLO)。(I群との相同性はそれぞれ99.7%及び99.8%)はI群と相同性が高かった。

本研究で用いた合成プライマーは、スピロプラズマ(WHITEHEAD, 1980)にも共通な配列をもつが、シーケンスの結果、増幅されたDNAにはスピロプラズマにホモロジーのある配列は認められなかった。

MLOの16S rRNAのG+C含量は、動物マイコプラズマをはじめとする *Mollicutes* のそれとほぼ同じで、大腸菌など他の細菌に比べ、非常に低い事が知られているが、本邦産の6種のMLOでも、同様に低いレベルであった。

これらI~III群の配列データを用いて、まずGenBankデータベースに登録されているすべての生物のrRNA(16Sまたは18S)の配列と相同性の比較を行った。その結果、比較的近縁であることが明らかになった属の細菌を中心に8属の細菌、すなわち: *E. coli* (グラム陰性細菌), *Bacillus subtilis* (グラム陽性細菌), *Methanococcus vannielii* (古細菌) 及び *Mollicutes* 綱の *Mycoplasma gallisepticum* (動物マイコプラズマ), *Urea-*

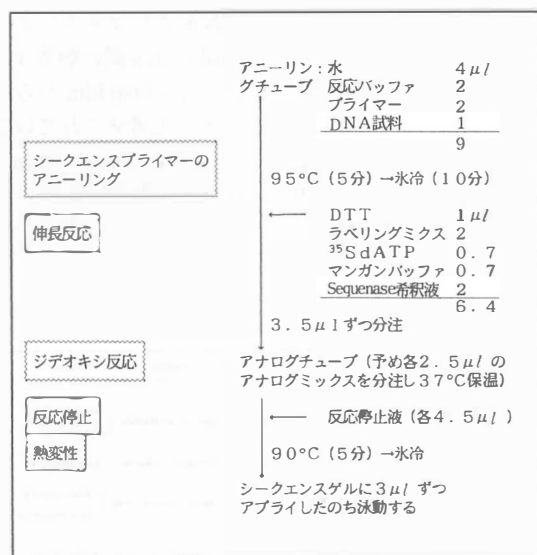


図-3 シーケンス反応の手順

plasma urealyticum (ウレアプラズマ), *Acholeplasma laidlawii* (アコレプラズマ), *Spiroplasma citri* (スピロプラズマ), *Anaeroplasmia varium* (アナエロプラズマ), 及び米国の MLO 2 種: SAY-MLO, O-MLO のそれぞれと詳細に比較を行った。MLO と Mollicutes 綱の配列を比較すると, *E. coli*, *B. subtilis* にはないデリーションがいくつか共通して認められる。また, これらの細菌を通じて高度に保存された領域 (保存領域) と異なる領域 (可変領域) が認められる。しかしながら, これらの可変領域も, その二次構造を比較すると極めてよく似ている (GUTTEL et al., 1985) (図-4)

各 MLO と Mollicutes 綱の各属細菌についてユニークなオリゴヌクレオチドの有無について調べてみると, MLO はアコレプラズマやアナエロプラズマに近縁であるが, 動物マイコプラズマやスピロプラズマ, ウレアプラズマとは進化的に離れており, 両者が早いスピードで進化的変遷を遂げたと推測される (表-3; LIM and SEARS, 1989; WOESE et al., 1980)。また SAY-MLO と O-MLO のオリゴヌクレオチドパターンはいずれも MLO I 群と全く一致していた。WOESE ら (1980) は, Mollicutes 綱の細菌では, すべての真正細菌の 16S rRNA で認められる高度に保存された配列の多くが欠失し, その代わりに多くのユニークな配列が認められることから, その高い突然変異率が結果的に急速な進化をもたらしたものと説明している。実際のユニークな配列は, 各 MLO 群に認められるが, Mollicutes 綱の多くの属に認められる保存配列も欠失している。

5 MLO の系統学的な比較

Mollicutes 綱の他の属と MLO の系統学的な関係を

明らかにする目的で, 配列データを元に, 系統樹を作成した。進化距離 (KIMURA, 1980) を *Knuc* 値 (塩基置換率) により評価し, Neighbor joining (NJ) 法 (近隣結合法) により (SAITOU and NEI, 1987) 系統関係を解析して系統樹を作成した (図-5)。基準菌には, *Methanococcus vannielii* を用いた。系統樹の各横軸の長さは *Knuc* 値の大きさ (系統進化上の隔たり) を示している (スケール参照)。またこの系統樹は, 分子進化学解析システム「ODEN」を用いたブートストラップ法 (FELSENSTEIN, 1985) により評価したクラスタートポロジーの信頼度 (%) から, 比較的信頼性の高いものである事が確認された。これを見ると, 米国の MLO (O-MLO と SAY-MLO) はそれぞれ I 群の MLO に含まれることを示しており, このことは, 地理的に隔離されたある種の MLO が同様な祖先から進化してきた事を示唆するもので興味深い。*Knuc* 値から, MLO や動物マイコプラズマでは, *B. subtilis* よりも進化の速度が大きく, また MLO の II 群と III 群は比較的近縁であり, 両群とも I 群よりも進化速度が大きいものと推定される。MLO はアコレプラズマとアナエロプラズマに近縁であるが, スピロプラズマ, 動物マイコプラズマ, ウレアプラズマとは別のクラスターを形成している。このことは, MLO が Mollicutes 綱のメンバーのマイコプラズマやスピロプラズマ, ウレアプラズマから, 早期に分かれてきたことを示唆している。

このように, MLO は動物マイコプラズマや (*S. citri* や *S. kunkelii* のような) 植物病原スピロプラズマとは進化的に異なるとともに, それ自身変異をもったグループであることが明らかになった。また, I 群の本邦産 MLO の塩基配列に変異が認められないことは, 進化的に保存さ

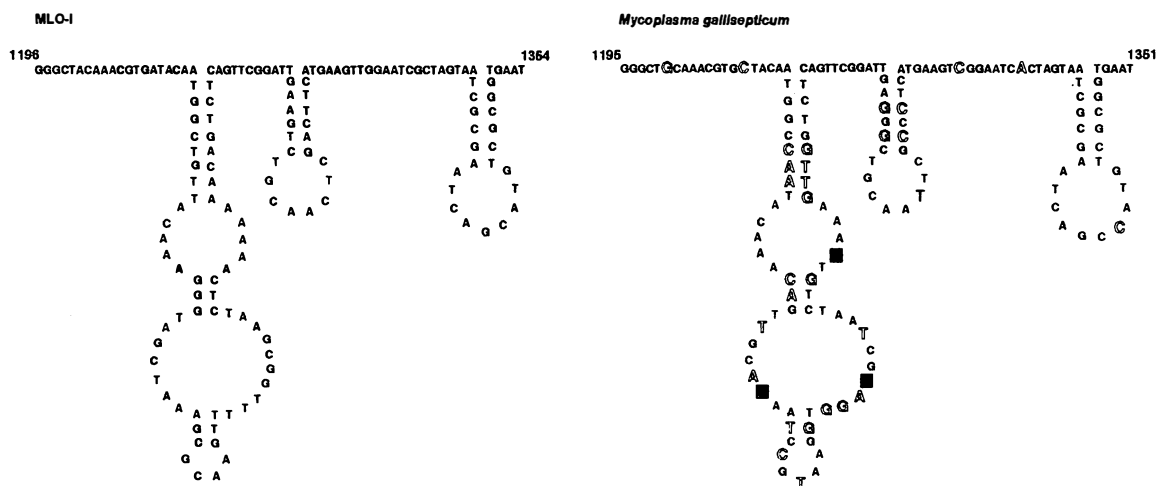


図-4 16S rRNA 遺伝子の 3'末端部分の推定される二次構造の比較。■は欠失, 中抜き文字は MLO-I と異なる配列を示している。

表 - 3 Mollicutes 網の各種の 16S rRNA 遺伝子におけるユニークなオリゴヌクレオチドの存在

Sequence	Occurrence in :									
	O-MLO SAY-MLO	MLO-I	MLO-II	MLO-III	Anaeroplasm varium	Acholeplasma laidlawii	Spiroplasma citri	Mycoplasma capricolum	Ureaplasma urealyticum	Other bacteria
AGCG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UUCUG	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(-) ^{a)}
CAACUG	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
UACUAG	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
AAUUUUG	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AAUCCUG	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CUACUUG	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
UUNUCCUG	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
UUAUCCUG	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
AAUUUUUCCUG	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

a)非常にまれ.

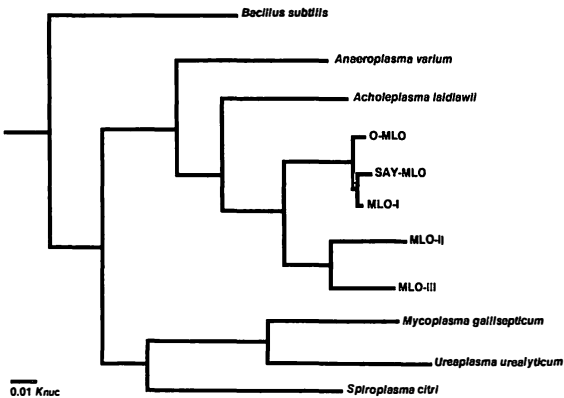


図 - 5 Mollicutes 網の各属細菌の 16S rRNA 遺伝子の配列に基づいて作成した系統樹。横棒の長さは系統進化的な隔たりを示す。

れた均一な群を形成しており、異なる媒介虫をもつ MLO よりなる群にも関わらず、MLO としては進化的にきわめて近接したステージにあるものと考えられる。また、II・III群の MLO もそれぞれ固有の異なる媒介虫により伝搬され、特に、II群の媒介虫は I 群の MLO を媒介しないし、その逆も同様である (加藤・岩波, 1990 ; 加藤ら et al., 1988)。以上のことは、媒介虫特異性が、比較的新しい進化的適応現象である事を示唆している。しかしながら、MLO は媒介虫体内で増殖するわけで、MLO と媒介虫の親和性はやはり MLO 分類上重要なファクターであるといわねばならないだろう。

MLO は培養に成功しておらず、まだ分類上の結論は得られていない。しかしながら、以上のデータより MLO は Mollicutes 網に分類するのが適当であり、また、マイコプラズマ・スピロプラズマ・ウレアプラズマに比べ、アコレプラズマやアナエロプラズマにより近縁であると考えられる。またこのことは、従来この微生物が MLO として呼称されてきたことに再考を促すものであり、むしろ、

phytoplasma (ファイトプラズマ ; phyto- (ギリシャ語 (phuton) で「植物」の意) + -plasma (ギリシャ語 (plasma) で「形成されたもの」の意)) のような呼称の方が適当であると考えられるようになってきた。またこれら MLO の系統発生的な比較から、少なくとも I・II・III の複数の群に類別される進化的に異なったグループからなること、また、媒介昆虫が異なり、地理的に隔離された地域に発生する MLO でも、系統発生的にはほぼ同一の MLO からなる群 (I 群 MLO) が存在することが明らかになった。以上の知見は、培養の困難な MLO の人工培養に手がかりとなるものであり、また MLO の検出診断法に新たな可能性を示唆するものである (NAMBA et al., submitted)。

II 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅による MLO の検出

Mollicutes 網の細菌の高度に保存された rRNA (5S 及び 16S) の塩基配列やオリゴヌクレオチド分類に関する研究により、Mollicutes の起源や系統発生的な関係が解明されてきた (WOESE et al., 1980 ; MANILOFF, 1983 ; WOESE, 1987 ; WEISBURG et al., 1989)。クローン化した rRNA 遺伝子をプローブに用いて、細胞培養におけるマイコプラズマのコンタミネーションを検出したり (GOBEL and STANBRIDGE, 1987 ; HARASAWA et al., 1986)、AIDS 患者からのマイコプラズマの検出 (Lo et al., 1989)、さらに Mollicutes の種レベルでの検出などが試みられてきた (GOBEL et al., 1984)。また、マイコプラズマの 16S rRNA 遺伝子に高いホモロジーを持つオリゴヌクレオチドプローブにより、MLO の検出はクローン化したクロモゾーム DNA プローブよりも 10~20 倍も検出感度が向上した (KIRKPATRICK and FRASER, 1988)。最近、マイコプラズマのコンタミネーションが PCR により検出で

きること報告されている (KUNITA et al., 1989)。さらに PCR により, MLO ゲノム DNA の精製試料から, 16S rRNA 遺伝子の特異的に増幅できることも明らかになった (DENG and HIRUKI, 1991)。

本項では, 罹病植物より直接抽出した全 DNA から効率的に MLO の 16S rRNA 遺伝子のみが増幅できること, また, MLO の各群を判別する特異的なプライマーを合成することにより, それぞれのグループを特異的に増幅できること, 及び微量の DNA サンプルより, MLO かどうか, さらにその所属する群を判別する一連の PCR 反応を, 1本のチューブでしかも短時間行う「二段階 PCR 法」を紹介する (NAMBA et al., Submitted)。

1 PCR 増幅に用いる鋳型 DNA の調製

植物体から抽出する PCR 増幅用の鋳型 DNA は, 既報の方法 (KOLLAR et al., 1990; NAKASHIMA et al., 1991) を一部改変して, 植物体の各部位の罹病組織より全 DNA を調製して得た。すなわち, 各 0.3 g の植物組織を液体窒素中で磨砕し, 融解後, 0.9 ml の抽出バッファー (1.4 M NaCl, 1% PVP, 2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0)) を加え, 乳鉢で磨砕し, 1.5 ml の遠心チューブで 65°C, 30 分インキュベートした後, 1,200 g で 5 分遠心する。遠心後の上清に等量のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) を加え抽出し, 1,200 g で 5 分遠心後, 上清に 0.7 vol 以下のイソプロパノールを加えボルテックス後, 室温で 5 分静置し, 同様に遠心する。沈澱を 50 μ l の TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), pH 8.0) で懸濁し, PCR 反応の鋳型用 DNA サンプルとする。

2 プライマーおよび PCR 増幅による MLO の検出

塩基配列のデータをもとにして, MLO の各群を判別できるような特異的なプライマーをデザインした (図-1)。すなわち, (A) Mollicutes 綱に特異的かつその中の各微生物に共通な 5'-及び 3'-プライマー (ユニバーサルプライマー) セット, (B) MLO に特異的なプライマー (以下 3'-プライマー), (C) I 群に特異的なプライマー, (D) III 群に特異的なプライマーをそれぞれ合成した。PCR 反応の条件は, アニーリング温度を 40°C で行った他は, プライマー (C) 及び (D) には通常の条件で 10 サイクル, プライマー (B) には同様に 20 サイクル行った。いずれも 5'-プライマーにはプライマーセット (A) の 5'-プライマーを用いた。

ユニバーサルプライマーセットを用いた PCR 反応により, 各種感染植物, 保毒媒介昆虫及び動物マイコプラズマ培養菌体から抽出した全 DNA 試料から, ほぼ全長の 16S rRNA 遺伝子の DNA が増幅された (図-2)。また, MLO, I 群及び III 群のおおのに特異的なプライマーセットを用いたところ, 予想されたサイズの DNA 断

片がそれぞれ増幅された (図-6)。

3 二段階 PCR (Recycled-PCR (RPCR)) 法

各プライマーを用いて PCR による検出法の改変を試みた (NAMBA et al., Submitted)。すなわち, まずユニバーサルプライマーセットを用いて PCR 反応を行い, 増幅された DNA について, さらにそれが MLO の 16S rRNA であるかどうかを PCR 反応により確認したいわけであるが, そのつど PCR 反応を行っていると, 時間と手間及び経費がかかる。そこで最初に PCR 反応を行ったチューブに適当なプライマーを加えるだけで, 他には何も加えずに PCR 反応を継続して行った。すなわち, ユニバーサルプライマーセットにより 16S rRNA 遺伝子部分を十分量 PCR 増幅し (第 1 段階), そこに内部プライマー (B, C または D) を添加し, PCR 反応 (第 2 段階) を行った (図-7)。サイクル条件は, 第 1 段階は通常の条件で 10 サイクル行った。第 2 段階は, アニーリング温度を 40°C にした他は, 通常の条件で 20 サイクル行った。我々はこの PCR 増幅法を「二段階 PCR (Recycled-PCR (RPCR)) 法」と称した。

RPCR により, MLO 特異的な 16S rRNA 遺伝子の断片が非常に効率よく増幅される。最近 DENG and HIRUKI (1991) は, アニーリング温度が低い (50°C 以下) と, 健全植物や *E. coli* やクロロプラストの 16S rRNA 遺伝子は Mollicutes 綱の 16S rRNA と高いホモロジーを持っているので, 非特異的な DNA 増幅が起こることを報告している。本研究で新たに開発した RPCR 法は, この非特異反応を効果的に抑えることが出来た (図-6)。この二度の PCR 反応により得られる増幅 DNA は, アガロース電気泳動により, 第 1 段階及び第 2 段階でそれぞれ増幅される DNA バンドの複合パターンとして得られる。RPCR 法により, MLO に特異的なプライマーを用いて, 各群の 16S rRNA フラグメントが, 植物体及び媒介虫体内から効果的に増幅され (NAMBA et al., submitted), これにより, MLO の所属群を効率的に判別できることがわかった (図-2, 6)。

4 媒介虫からの MLO DNA の検出

タマネギ萎黄病 MLO の媒介虫であるヒメフタテンヨコバイを 5 頭用いてその磨砕組織より全 DNA を抽出しユニバーサルプライマーセットを用いて PCR を行ったところ, 無毒虫及び保毒虫の双方から, タマネギ萎黄病 MLO 罹病株より増幅されたのと同サイズの DNA が増幅された (図-2)。そこで MLO に特異的なプライマーを内部プライマーに用いて RPCR を行ったところ, 1370 bp のバンドは無毒・保毒虫の両者より検出されたが, 730 bp のバンドは保毒虫からのみ増幅された (図-6)。1370 bp のバンドはユニバーサルプライマーセットにより増幅されたバンドである。保毒虫の 730 bp バンドは,

RPCRの二段階目に加えたMLO特異的なプライマー(B)と最初に加えたユニバーサルプライマーセットの5'-プライマーにより増幅されたDNAと考えられる。実際、1370 bpと730 bpのバンドをゲルより再抽出し、それぞれシーケンスしたところ、I群の16S rRNAとそれぞれ配列が一致した。しかし、無毒虫の1370 bp及び900 bpのバンドは、MLOのI～III群のいずれの配列とも全く異なり、リケッチアやクラミジアに最も相溶性が高かった。したがってこのDNAは、MLO病に関与するバクテリア由来のものではないと考えられる。そこで、MLOに特異的なプライマーセット((B)及びユニバーサルプライマーセットの5'-プライマー)を用いて直接両サンプルよりPCRを行ったところ(図-6)、保毒虫でのみ

750 bpのDNAバンドが増幅された。このDNAは、シーケンスにより、I群のMLOの16S rRNAと配列が一致した。以上のことから、無毒虫より増幅されたDNAは恐らくヒメフタテンヨコバイに寄生あるいは共生している微生物由来のものと考えられた。以上の結果から、MLO特異的なプライマーセットを用いることにより、昆虫に寄生あるいは共生する微生物を保毒するMLO無毒媒介虫とMLO保毒媒介虫とを区別することができるものと考えられる。したがって、MLO以外の微生物と相溶性の高い保存領域を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションによるMLO検出法に比べ、本法は非特異反応が少なく優れているといえよう。

おわりに

PCR法は、(1) 遺伝子(DNA)を検出する現在最も感度の高い方法であり、(2) 試料として使用するDNAの純度(タンパク質・RNAなどの不純物のコンタミネーションの問題)やDNAのサイズなどは余り問題にならない。また、(3) 適切なプライマーを使用すれば、操作は簡単で、高い再現性が得られ、(4) 検出までに要する時間が短い。MLOは培養不能であり、篩部局在性であることから、組織内の濃度がきわめて低く、通常の方法ではMLOの16S rRNA遺伝子を得るのは困難であり、煩雑である。しかしながらPCRは、特異的なプライマーを用いてサイクル条件を適当にコントロールすれば、真核細胞内の核及び細胞内小器官のDNAを除かなくとも細菌

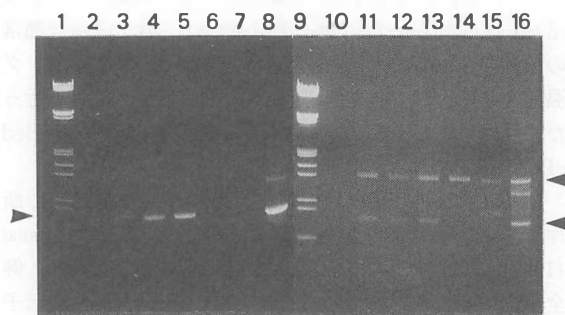


図-6 (1) 植物体及び媒介虫の全DNA試料からMLOに特異的なプライマーセットを用いてPCR法により増幅したDNAのゲル泳動写真(矢印: 750 bp)(H: 健全試料; D: それぞれのMLOに感染した試料)

- 1 λ Hind III・EcoRI マーカー
- 2 タマネギ・ツワブキ・イネ(H)のそれぞれのPCR反応試料を混合して泳動
- 3 タマネギ(D)
- 4 ツワブキ(D)
- 5 イネ(D)
- 6 *Mycoplasma orale*
- 7 無毒ヒメフタテンヨコバイ
- 8 保毒ヒメフタテンヨコバイ
- (2) 植物体及び媒介虫の全DNA試料からユニバーサルプライマーセット及びMLOに特異的なプライマーを用いてRPCR法により増幅したDNAのゲル泳動写真(矢印上: 1370 bp; 下: 750 bp).
- 9 λ Hind III・EcoRI マーカー
- 10 タマネギ・ツワブキ・イネ(H)のそれぞれのPCR反応試料を混合して泳動
- 11 タマネギ(D)
- 12 ツワブキ(D)
- 13 イネ(D)
- 14 *Mycoplasma orale*
- 15 無毒ヒメフタテンヨコバイ
- 16 保毒ヒメフタテンヨコバイ

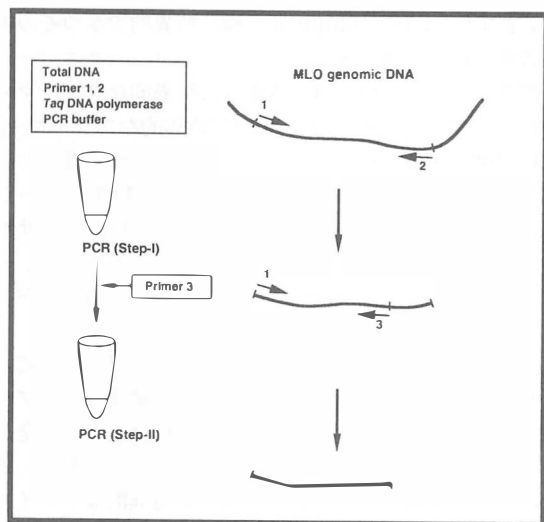


図-7 RPCR法の増幅反応の手順と原理を説明した図

の16S rRNA 遺伝子を得る便利な方法となる。本研究では、酵素処理により精製したMLO分画だけでなく、植物体より直接精製した全DNAからも、PCR法を用いることにより、容易にMLOの16S rRNA 遺伝子が増幅されることが確認された。この遺伝子はまた、媒介虫体内からも増幅され、他の共生あるいは寄生性の細菌と区別することができた。また、MLOの各群に特異的なPCRプライマーを用いることにより、それぞれの群の16S rRNA 遺伝子が特異的に増幅されることが確認された。さらに、新たに二段階PCR法を考案し、1本のチューブで複数のPCR反応を効率的にしかも経済的に行うことができ、MLOの所属群を特定することができた。この手法は、今後他の分野にも応用できるものと考えられる。なお、筆者らは現在、アジア地域におけるMLOの16S rRNA 遺伝子のデータベース化をすすめており、将来、これらの成果から、MLOの遺伝子診断や、分子分類への道が開ければと考えている (NAMBA et al., submitted)。

本研究を行うに当たり、農水省農研センターの岩波節夫、加藤昭輔、蚕昆研の佐藤 守、川北 宏の各氏には様々なご援助をいただいた。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) AHRENS, U. and SEEMÜLER, E. (1992) : *Phytopathology* 82 : 828~832.
- 2) CLARK, M. F., MORTON, A. and BUSS, S. L. (1989) : *Ann. Appl. Biol.* 114 : 111~124.
- 3) DAVIS, R. E., LEE, I. -M., DOUGLAS, S. M. and DALLY, E. L. (1990) : *Phytopathology* 80 : 789~793.
- 4) DENG, S. and HIRUKI, C. (1991) : *J. Microbiol. Methods* 14 : 53~61.
- 5) ——— (1988). マイコプラズマとその実験法 (興水ら編). 近代出版 : 287~306.
- 6) 土居養二ら (1967) : *日植病報* 33 : 259~266.
- 7) FELSENSTEIN, J. (1985) : *Evolution* 39 : 783~791.
- 8) GUTELL, R. R. et al. (1985) : *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32 : 155~216.
- 9) GÖBEL, U. B. and STANBRIDGE, E. J. (1984) : *Science* 226 : 1211~1213.
- 10) ——— et al. (1987) : *J. Gen. Microbiol.* 133 : 1969~1974.
- 11) HARASAWA, R., MIZUSAWA, H. and KOSHIMIZU, K. (1986) : *Microbiol. Immunol.* 30 : 919~921.
- 12) INNIS, M. A. and GELFAND, D. H. (1990) : *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. (eds. Innis, M. A. et al.). Academic Press, California, pp. 3~12.
- 13) 加藤昭輔・岩波節夫 (1990). *日植病報* 56 : 394 (講演要旨).
- 14) ———ら (1988) : *日植病報* 54 : 220~223.
- 15) KIMURA, M. (1980) : *J. Mol. Evol.* 16 : 111~120.
- 16) KIRKPATRICK, B. C. (1991) : *The prokaryotes* 2nd ed. (eds. BALOWS, A. et al.). Springer-Verlag Press, New York, pp. 4050~4067.
- 17) ——— and FRASER, J. D. (1988) : *Phytopathology* 79 : 1138 (abstr.).
- 18) ——— et al. (1987) : *Science* 238 : 197~200.
- 19) ——— et al. (1990) : 8th IOM Congr. : 45~46 (abstr.).
- 20) KOLLAR, A. et al. (1990) : *Phytopathology* 80 : 233~237.
- 21) KUNITA, S. et al. (1989) : *Exp. Anim.* 38 : 215~219.
- 22) KUSKE, C. R. and KIRKPATRICK, B. C. (1990) : *J. Bacteriol.* 172 : 1628~1633.
- 23) ——— (1992) : *Int. J. Sys. Bacteriol.* 42 : 226~233.
- 24) ——— et al. (1991a) : *J. Gen. Microbiol.* 137 : 153~159.
- 25) ——— et al. (1991b) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4 : 75~80.
- 26) LEE, I. -M. et al. (1990) : *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1471~1475.
- 27) ——— and DAVIS, R. E. (1986) : *Annu. Rev. Phytopathol.* 24 : 339~354.
- 28) LIM, P. -O. and SEARS, B. B. (1989) : *J. Bacteriol.* 171 : 5901~5906.
- 29) LIN, C. P. and CHEN, T. A. (1985) : *Science* 227 : 1233~1235.
- 30) LO, S. -C. et al. (1989) : *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 : 586~600.
- 31) MANILOFF, J. (1983) : *Annu. Rev. Microbiol.* 37 : 477~499.
- 32) MCCOY, R. E. et al. (1989) : *The Mycoplasmas*. Volume V. (eds. Whitcomb, R. F. et al.). Academic Press, New York, pp. 545~640.
- 33) 宮原和夫ら (1982) : *日植病報* 48 : 551~554.
- 34) NAKASHIMA, K. et al. (1992) : *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3570~3575.
- 35) 奈須壮兆ら (1967) *日植病報* 33 : 343~344 (講演要旨).
- 36) NEEFS, J. M. et al. (1990) : *Nucleic Acids Res. Seq. Suppl.* 18 : 2237~2317.
- 37) NEIMARK, H. C. and LANGE, C. S. (1990) : *Nucleic Acids Res.* 18 : 5443~5448.
- 38) RAZIN, S. (1985) : *Microbiol. Rev.* 49 : 419~455.
- 39) ROGERS, M. J. et al. (1985) : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 : 1160~1164.
- 40) SAIKI, R. K. et al. (1988) : *Science* 239 : 487~491.
- 41) SAITOU, N. and NEI, M. (1987) : *Mol. Biol. Evol.* 4 : 406~425.
- 42) SAWADA, M. et al. (1981) : *Mol. Gen. Genet.* 182 : 502~504.
- 43) SEARS, B. B. et al. (1989) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2 : 175~180.
- 44) SOMMER, R. and TAUTZ, D. (1989) : *Nucleic Acids Res.* 17 : 6749.
- 45) TABOR, S. and RICHARDSON, C. C. (1989) : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 : 4076~4080.
- 46) WEISBURG, W. G. et al. (1989) : *J. Bacteriol.* 171 : 6455~6467.
- 47) WHITCOMB, R. F. (1980) : *Ann. Rev. Microbiol.* 34 : 677~709.
- 48) WOESE, C. R. (1987) : *Microbiol. Rev.* 51 : 221~271.
- 49) ——— et al. (1980) : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 : 494~498.