

特集：線虫防除の戦略と展望〔3〕

## オリゴヌクレオチドプローブによる植物寄生性線虫の同定

農林水産省北海道農業試験場 <sup>うえ</sup>植 <sup>はら</sup>原 <sup>たけ</sup>健 <sup>と</sup>人

## はじめに

植物寄生性線虫の同定は、その生理・生態的研究を行ううえで重要であり、有害線虫を防除するうえにおいても、その診断・同定は極めて重要であることは明らかである。

線虫の分類・同定は、主に雌成虫の形態を指標として行われてきているが、分子生物学的手法を用いた同定法は、線虫の卵から雌雄成虫まですべてのステージに共通なリボゾーム DNA やミトコンドリア DNA 等の塩基配列を指標として行うものである。近年の分子生物学的手法の発達により、1980年代後半からこのような DNA を用いた同定は欧米で行われ始め (BURROWS and PERRY, 1988)、1990年代には、非放射性プローブを用いた同定法 (CHACÓN et al., 1993) や、数時間の内に目的とする遺伝子を大量に増幅する PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いた同定法 (HARRIS et al., 1990) が開発され、幼虫1頭や卵からでさえ同定が可能となってきた。

PCR法を用いた同定法については、制限酵素認識部位の塩基の変異を反映した PCR-RFLP (PCR-制限酵素断片長多型) 法 (POWERS and HARRIS, 1993; ORUI, 1996; 大類, 1997; ORUI and MIZUKUBO, 1999) や種 (species) に特異的な塩基配列から作製したプライマーを用いた同定法 (WILLIAMSON et al., 1997; UEHARA et al., 1998 a, b) など、種々の方法が考案されている。

今回紹介するオリゴヌクレオチドプローブを用いた同定法は、SAIKI et al. (1989) が開発した方法を適用したものであり、医学・食品衛生 (IIDA et al., 1993; EHRMANN et al., 1994) において使われている技術である。この方法は、ナイロンメンブレンにあらかじめオリゴヌクレオチドプローブをブロットし、標的微生物等の DNA を PCR 法で標識してハイブリダイゼーションを行うためリバースドットブロットハイブリダイゼーション法とも呼ばれている。LÉVESQUE et al. (1998) は、本法

を植物病原菌 (Oomycetes, 卵菌綱) に適用して良好な結果を得ている。本稿では、根部寄生部位周辺の組織を褐変させ、細根などを腐敗脱落させるネグサレセンチュウ (*Pratylenchus*)、なかでも農業上重要なキタネグサレセンチュウやミナミネグサレセンチュウを含む7種のネグサレセンチュウの識別を例に上げて紹介する (UEHARA et al., 1999)。

## I リボゾーム DNA とプローブ配列の選択

線虫の分子生物学的同定においてよく知られたゲノムの領域の一つに、リボゾーム DNA (rDNA) の Internal Transcribed Spacer Region (ITS) 領域がある。ITS 領域は 18 S と 5.8 S, 5.8 S と 28 S リボゾーム RNA (rRNA) 遺伝子の間に挟まれており、18 S, 5.8 S および 28 S rRNA 遺伝子のコード領域が、種を超えて相同性の高い領域であるのに対し、ITS 領域は、比較の変異性に富み、同一種内においては相同性が高く、異種間においては相同性が低い領域である。それゆえ、種に特異的な塩基配列が見いだされることが多い領域である。また、rDNA はゲノム上に多くのコピーが存在し、1頭の幼虫、成虫からの PCR 増幅を容易にする。他の真核生物においても、rDNA 領域の塩基配列のデータは系統樹の構築や分類などに使われる遺伝子マーカーとして有効性の高いものであり、この領域は線虫のみならず他の病害虫の遺伝子診断にも使用されている (KAGEYAMA, 1997 など)。

この領域を、線虫の種を超えて共通な rRNA 遺伝子の塩基配列より作製したユニバーサルプライマーで増幅し、その PCR 増幅産物中の ITS 領域を制限酵素で処理した RFLP パターンにより、2種のネコブセンチュウ (*Meloidogyne*) (キタネコブセンチュウ (*M. hapla*) と *M. chitwoodi* (日本には生息しない)) が識別できるということが報告されている (ZIJLSTRA et al., 1995)。また、シストセンチュウ (*Grobodera*, *Heterodera* など) においても、このような rDNA の PCR-RFLP 法により識別可能であると報告されており (ALLEN et al., 1997)、日本においてもジャガイモシストセンチュウ (*G. rostochiensis*) および *Heterodera* 属4種の識別が可能であると報告されている (大類, 1997)。さらに、

Identification of Plant Nematodes with Oligonucleotide Probes. By Taketo UEHARA

(キーワード：ネグサレセンチュウ, リバースドットブロットハイブリダイゼーション, 同定)

この領域のPCR-RFLP法で7種のネグサレセンチュウが識別可能である (ORUI, 1996; ORUI and MIZUKUBO, 1999)。これらについては、本誌第53巻7号の文献 (大類, 1999) を併せてご参照いただきたい。

筆者の研究室では日本産ネグサレセンチュウの7種 (キタネグサレセンチュウ (*P. penetrans*), ミナミネグサレセンチュウ (*P. coffeae*), クルミネグサレセンチュウ (*P. vulnus*), チャネグサレセンチュウ (*P. loosi*), ノコギリネグサレセンチュウ (*P. crenatus*), モロコシネグサレセンチュウ (*P. zaeae*), パイナップルネグサレセンチュウ (*P. brachyurus*) について、rDNAの塩基配列を決定し、比較を行い、7種のネグサレセンチュウそれぞれに特異的な配列を見いだした。

PCRに際しては、VRAINの18Sプライマー (VRAIN et al., 1992) とムギシストセンチュウ (*H. avenae*) の5.8SリボゾームRNA遺伝子の塩基配列 (FERRIS et al.,

1994) を基に作製したプライマー (UEHARA et al., 1998 b) を使用した。そして、ITS1領域 (18S rDNAと5.8S rDNAとの間の部分) を含む部分をPCR増幅し、その産物をプラスミドにクローニングしシーケンスを行った。その結果、18Sや5.8SのリボゾームRNA遺伝子をコードする領域は、種間においても高度に保存されていた。ITS1領域は種間での相同性は低いが、同じ種においては極めて高い相同性を示した。しかし、ITS1領域の塩基配列は、同じ種であってもわずかではあるが違いもあり、1頭の線虫であっても、そのITS1領域のコピー間で数塩基の違いが見られた。そこで、種内において保存されていると思われる塩基配列より、7種のネグサレセンチュウそれぞれに特異的なオリゴヌクレオチドプローブの配列を選択した (表-1)。

## II リバースドットプロットハイブリダイゼーション法の実際

リバースドットプロットハイブリダイゼーション法とは、一度のハイブリダイゼーションで、多くの塩基配列の変異や、微生物を検出できる技術である。その方法の概略を図-1に示した。

### 1 種特異的オリゴヌクレオチドのTテイリングとメンブランの準備

DNA鎖をナイロンメンブランに固定するために一定以上の長さが必要とされ、20 bp程度のオリゴヌクレオチドでは強固に固定できない。そこで、オリゴヌクレオ

表-1 オリゴヌクレオチドプローブの塩基配列

特異性	塩基配列
<i>P. penetrans</i>	5'-GTG TCC GCC CTG AGG GGT
<i>P. coffeae</i>	5'-ATG CGC ACA TTG GCA TTC AGC
<i>P. vulnus</i>	5'-ACC AAA TGC CAT CTG CAT AT
<i>P. loosi</i>	5'-CAG TCA GCT AGC TGC TGG AT
<i>P. brachyurus</i>	5'-CGT GCT GCA AAT GAG GAT GA
<i>P. crenatus</i>	5'-TGC GGA AAC GCA TCG TGA GTG
<i>P. zaeae</i>	5'-CAA GCG CGC TTC CAA TGC AG
ポジティブコントロール	5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT

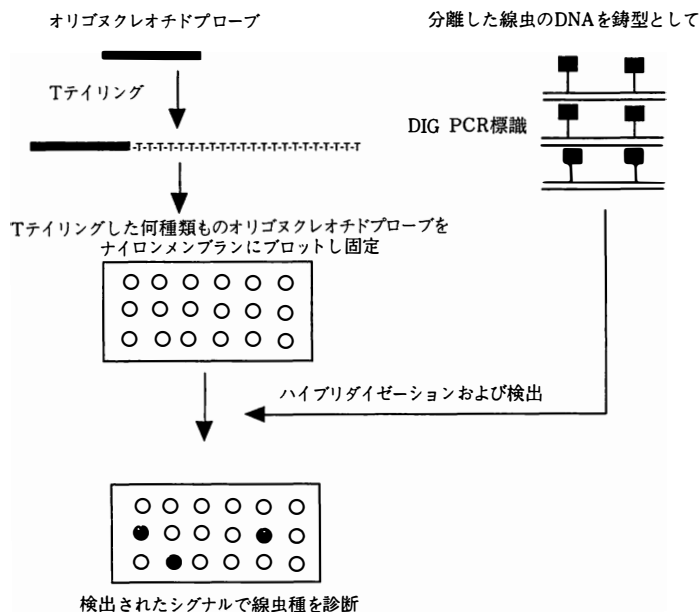


図-1 リバースドットプロットハイブリダイゼーション法の概略

チドに dTTP を数百個付加し、一定の長さにすることでナイロンメンブランにオリゴヌクレオチドプローブを固定する。すなわち、50  $\mu$ l の反応液 (100 mM sodium cacodylate, 25 mM Tris-HCl: pH 7.6, 1 mM CoCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DTT, 4 mM dTTP, 0.5 U/ $\mu$ l terminal deoxynucleotidyl transferase) に 100 pmol のオリゴヌクレオチドを加え、37°C, 2時間反応させる。そして、フェノール・クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿し、沈殿を乾燥後、20  $\mu$ l の TE バッファーに溶解する。次に、ナイロンメンブランに T ティリングしたオリゴヌクレオチドプローブを固定する。プローブを 70°C, 5 分間処理し変性させ、氷上で急冷し、1  $\mu$ l ずつメンブラン上にスポットした後、3 分間の UV 照射により、ナイロンメンブランにプローブをクロスリンクさせる。このようにして作製したメンブランは、長期間保存可能であり、使用后、リプロービングを行い再生すれば複数回は使用できる。

## 2 線虫 DNA の調製と PCR 増幅標識

線虫の DNA 診断・解析を行う場合、かつてはその抽出に多くの労力を費やしていたが、PCR 法を用いることで微量の DNA からその解析が可能となった。最近、1 頭の線虫から、簡便な調整法により得られた DNA を用いて、再現性の高い PCR 産物が得られるという報告がなされている (CASTAGNONE-SERENO et al., 1995)。これは試料として使用する DNA の純度、つまり、タンパク質や RNA 等の不純物のコンタミネーションや、使用する DNA のサイズなどが PCR 法ではあまり問題とならないことにも要因がある。その方法は、まず、1 頭の線虫を実体顕微鏡下においてタンパク質分解酵素や界面活性剤を含む 15  $\mu$ l の worm lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 60  $\mu$ g/ml proteinase K, 0.45% NP 40, 0.45% Tween 20, and 0.01% gelatin) 中で切断し、65°C で 1 時間反応を行い、その後タンパク質分解酵素であるプロテイナーゼ K を失活させるために 95°C で 10 分間処理したものをそのまま鋳型 DNA とする。この方法は、遠心操作・精製操作も省かれた極めて簡便な DNA 抽出方法といえる。

次に、この DNA を鋳型として PCR を用いて標識・増幅するわけである。標識には、従来から放射性同位元素 (RI) が多く用いられてきたが、RI の使用には施設が必要であり、取り扱いも注意を要する。最近は、非放射性化合物で核酸を標識する方法が種々開発されている。筆者の研究室では、主にジゴキシゲニン (DIG: ロシュ・ダイアグノスティクス) で核酸を標識している。

PCR を用いた DNA の標識は、25  $\mu$ l の反応液 (10

mM Tris-HCl: pH 8.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200  $\mu$ M dATP, dGTP, dCTP, and 100  $\mu$ M dTTP, 50  $\mu$ M DIG-11-dUTP, 0.2 mM primer set, 1 unit Taq ポリメラーゼ, 5  $\mu$ l 鋳型 DNA 溶液) を、95°C 7 分間、その後、熱変性 95°C 45 秒間: アニール 60°C 1 分間: 伸張反応 72°C 2 分間を 40 サイクル行い、最後の伸張反応は 7 分間行う。このようにして DIG 標識した DNA を、アガロースゲル電気泳動しチェックする。DIG を取り込むとその分子量は大きくなるため、アガロースゲル電気泳動で容易に DIG 標識されたか確認できる。DIG 標識された DNA は、精製せずにそのままハイブリダイゼーションに用いる。

## 3 ハイブリダイゼーションと検出

T ティリングしたプローブを固定したメンブランをハイブリダイゼーション溶液 (5x SSC, 0.1% sodium laurylsarcosine, 0.02% SDS, 1% blocking reagent: ロシュ・ダイアグノスティクス) に浸し、1 時間 52°C でプレハイブリダイゼーションを行った。次に、ハイブリダイゼーション溶液にあらかじめ熱湯で 10 分間処理し氷上に置いた変性 DIG 標識 DNA を 5~10  $\mu$ l 加えて、4 時間 52°C でハイブリダイゼーションを行った。その後、ハイブリダイゼーションの温度と同じ 52°C において、洗浄液 (2x SSC, 0.1% SDS) で 5 分間ずつ 2 回の洗浄を行った。

シグナルの検出には、DIG にアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を反応させ、そしてアルカリフォスファターゼの基質を処理する感度の高い発光基質である CSPD 等を用いた化学発光による検出や NBT と BCIP を用いた発色による検出法を用いることができる。ここでは、暗室等の設備の不要な発色による検出の手順を説明する。まず、メンブランを buffer 1 (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl: pH 7.5) 中で 1 分間平衡化し、buffer 2 (1% blocking reagent in buffer 1) で 30 分間ブロッキングを行う。その後アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体溶液 (buffer 2 に 150 mU/ml になるよう抗体を希釈) で 30 分間反応を行い、再び buffer 1 で 15 分間 2 回洗浄する。その後、buffer 3 (10 mM Tris-HCl: pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) で 2 分間平衡化して、発色反応基質溶液 (buffer 3 に NBT を 0.33 mg/ml, BCIP を 0.17 mg/ml の濃度になるよう溶解) で発色反応を行う。シグナルが検出されたならば、TE buffer で反応を停止させる。

キタネグサレセンチュウを供試した場合、キタネグサレセンチュウ特異的プローブと各線虫に共通のプローブ (ポジティブコントロール) の位置にのみシグナルが得

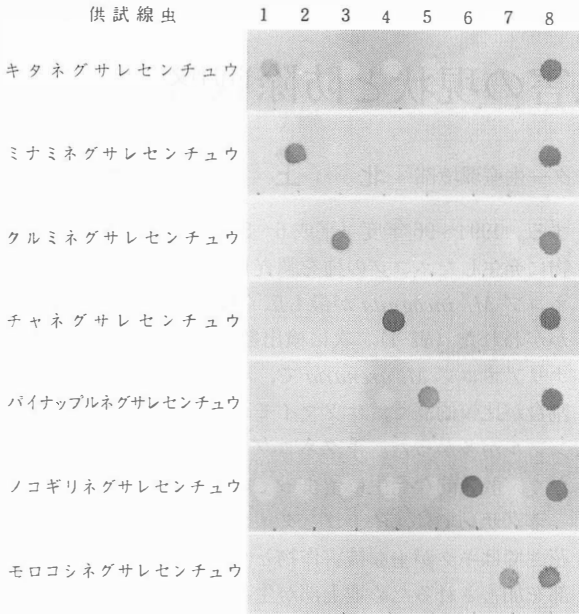


図-2 リバースドットブロットハイブリダイゼーション法による特異的シグナルの検出

プローブの位置 1:キタネグサレセンチュウ, 2:ミナミネグサレセンチュウ, 3:クルミネグサレセンチュウ, 4:チャネグサレセンチュウ, 5:パイナップルネグサレセンチュウ, 6:ノコギリネグサレセンチュウ, 7:モロコシネグサレセンチュウ, 8:共通.

られ、同様に他の線虫についても、その線虫を検出するためのプローブとポジティブコントロールにのみ反応し、7種のネグサレセンチュウが明確に識別可能であった(図-2)。

### おわりに

この方法は1回のハイブリダイゼーションで多くの種類の線虫を同定できる可能性を含んでいる。今回は7種のネグサレセンチュウについてのみであったが、今後、何十種類もの有害線虫にそれぞれ特異的なプローブを1枚のナイロンメンブレンに固定し、圃場から分離された何種類もの線虫のDNAを一度に標識し、ハイブリダイゼーションを行うことで、一度に何種類もの線虫を同定できるようになる可能性もある。紹介した方法は、

PCRを使用した同定法のほんの一例を上げたのみであるが、PCRは今や、遺伝子診断になくはならない技術であり、高度な遺伝子操作を必要としないため、DNA解析を身近なものとした。今後、線虫の遺伝子情報が蓄積され、さらに簡便で迅速な同定が可能になるかもしれない。

また、分子生物学的分類・同定法は、形態分類・同定法に相対するものではなく、むしろ、形態による分類・同定法の正確さを浮き彫りにするものであり、形態観察とも連携して、DNA塩基配列などの遺伝子情報は、今後1つの同定の指標となっていくであろうと考えている。

### 引用文献

- 1) ALLEN, L. et al. (1997): *J. Nematol.* 29: 255~267.
- 2) BURROWS, P. R. and R. N. PERRY (1988): *Revue. Nématol.* 11: 441~445.
- 3) CASTAGNONE-SERENO, P. et al., (1995): *Curr. Genet.* 28: 566~570.
- 4) CHACÓN, M. R. et al., (1993): *Fundam. appl. Nematol.* 16: 495~499.
- 5) EHRMANN, M. et al. (1994): *FEMS Microb. Letters* 117: 143~150.
- 6) FERRIS, V. R. et al. (1994): *J. Nematol.* 26: 144~151.
- 7) HARRIS, T. S. et al. (1990): *ibid.* 22: 518~524.
- 8) IIDA, K. et al. (1993): *FEMS Microb. Letters* 114: 167~172.
- 9) KAGEYAMA, K. (1997): *Plant Disease* 81: 1155~1160.
- 10) LÉVESQUE, C. A. et al. (1998): *Phytopathology* 88: 213~222.
- 11) ORUI, Y. (1996): *Appl. Entomol. Zool.* 31: 505~514.
- 12) 大類幸夫 (1997): *日線虫誌* 27: 67~75.
- 13) ——— (1999): *植物防疫* 53: 285~289.
- 14) ORUI, Y. and T. MIZUKUBO T. (1999): *Appl. Entomol. Zool.* 34: 205~211.
- 15) POWERS, T. O. and T. S. HARRIS (1993): *J. Nematol.* 25: 1~6.
- 16) SAKI, R. K. et al. (1989): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230~6234.
- 17) UEHARA, T. et al. (1998 a): *Nematologica* 44: 357~368.
- 18) ——— et al. (1998 b): *Jpn. J. Nematol.* 28: 1~7.
- 19) ——— et al. (1999): *Nematology* 1: (in press)
- 20) VRAIN, T. C. et al. (1992): *Fundam. appl. Nematol.* 15: 563~573.
- 21) WILLIAMSON, V. W. et al. (1997): *J. Nematol.* 29: 9~15.
- 22) ZIJLSTRA, C. et al. (1995): *Phytopathology* 85: 1231~1237.