

16 S リボソーム RNA 遺伝子の分子系統解析に基づく ファイトプラズマの診断同定法

独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センター 田 中 みのる 穂

はじめに

ファイトプラズマ (phytoplasma) はモリキューテス綱 (class Mollicutes) に属する原核微生物で、イネ黄萎病やキリてんぐ巢病等、多くの作物にてんぐ巢、萎黄症状を引き起こす病原体である。モリキューテス綱には人や動物に病原性のあるマイコプラズマ属 (genus *Mycoplasma*) や植物病原としても知られるスピロプラズマ属 (genus *Spiroplasma*) 等が含まれるが、病原体の大きさが数十～数百 nm と小さく (直接観察するには電子顕微鏡が必要)、細胞壁を欠き、不定形で粒子状やひも状 (スピロプラズマはらせん状) 等の多形を示すことなど、一般的な細菌 (bacteria) とは形態的に大きく異なる。ファイトプラズマは培養に成功しておらず、微生物学的特性がほとんど未解明なことから、新規の植物病原体として発見された後も分類学的所属については未詳と扱われ、その形態的特徴からマイコプラズマ様微生物 (Mycoplasma-like organism, MLO) と呼ばれてきた (土居ら, 1967)。

近年の分子生物学的アプローチにより“MLO”から“ファイトプラズマ”への変換がなされた経緯については、既に難波 (1993, 1995, 1996) によって本誌に紹介されているので詳細はそちらを参照して頂きたい。ここでは概略を述べるにとどめるが、MLO を含むモリキューテス綱に属する微生物の遺伝子解析、主として 16 S リボソーム RNA 遺伝子の分子系統解析の結果により、MLO は共通の祖先から進化した独特の微生物群であることが明らかになり、モリキューテス綱の新たな属、ファイトプラズマ属 (genus *Phytoplasma*) として分類されることとなったのである。

本稿では、これらの新たに確立された 16 S リボソーム RNA 遺伝子の分子系統解析による分類に基づいて、当研究室等で実際に行われているファイトプラズマの診断同定法について具体的な事例も交えて紹介したい。

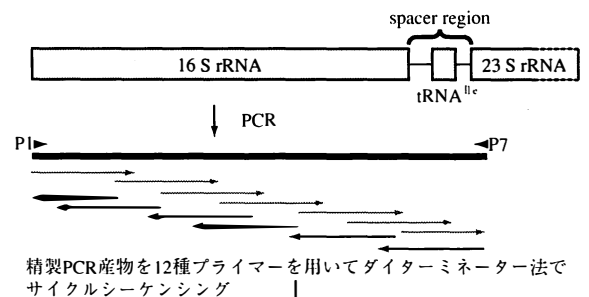
Diagnostic methods of phytoplasmas based on phylogenetic analysis of 16 S rRNA gene. By Minoru TANAKA

(キーワード: ファイトプラズマ, 16 S リボソーム RNA 遺伝子, PCR-RFLP)

I 塩基配列情報を用いた分子系統解析

現在主流となっているファイトプラズマの 16 S リボソーム RNA 遺伝子の分子系統解析法には、塩基配列情報を基にした方法と制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) を基にした方法の二つがある (SCHNEIDER et al., 1995)。塩基配列情報を基にした系統解析法は、ファイトプラズマ間の系統関係を高い精度で検討できるため、より正確かつ詳細な分子系統樹の作成が可能である。また、現時点では暫定的ではあるが“ファイトプラズマ属”およびファイトプラズマの“種”を定義する指標として 16 S リボソーム RNA 遺伝子全長の塩基配列情報に基づく分子系統解析結果が採用されており、分子系統樹で形成される主要なクラスタを暫定的に (= *Candidatus*) “種”と定義している (難波, 1996)。したがって、アジサイ葉化病 (兼平ら, 1996) の病原ファイトプラズマが分子系統解析の結果により、新種であることが明らかにされ、“*Candidatus Phytoplasma japonicum*”と命名されたように (SAWAYANAGI et al., 1999)、塩基配列情報の解析は新規に発見されたファイトプラズマが“新種”か否かを検討する際等には必須である。

当研究室では主として 16 S リボソーム RNA 遺伝子を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定している。概略を図-1 に示したが、① P1/P7



シーケンサー & コンピューター解析により全塩基配列決定

図-1 ダイレクトシーケンスによるファイトプラズマの 16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列決定

プライマー (SCHNEIDER et al., 1995) を用いて遺伝子全長を含む DNA 断片を PCR 増幅し, ②精製した DNA 断片を鋳型に正逆両方向から各 6 種のプライマーを用いてダイターミネーター法によりシーケンス反応を行う, ③蛍光式自動シーケンサーで塩基配列を読み取り, コンピューターソフトを用いて結果の統合・修正を行う, ④決定された塩基配列情報を用いて, 遺伝子データベース上で相同性検索, 分子系統樹上の位置の検討等を行う, という流れである。

II RFLP による分子系統解析

RFLP による分子系統解析では, 制限酵素分解により生じた DNA 断片(長)の電気泳動パターン (RFLP プロファイル) の差異を基に分類を行い, また各ファイトプラズマ間の RFLP プロファイルの類似性を数値化したもの (近似係数) をクラスタ解析することで系統解析を行う。

LEE ら (1998) は PCR で増幅した 16S リボソーム RNA 遺伝子内の約 1,250 塩基対からなる DNA 領域について 17 種類の制限酵素を用いた RFLP 解析を行い, 世界各地のファイトプラズマを 14 のグループ, 32 のサブグループに分類した。また近似係数により作成された系統樹では“グループ”が, 塩基配列情報による分子系統樹における主要なクラスタ (=“種”) と概ね一致することが示された。

RFLP 解析による分類には, 「一塩基の置換でも制限酵素サイトが変化すれば異なるサブグループに分類され, 逆に制限酵素サイトに関係しない塩基置換が多数生じても同じサブグループに分類される」などの問題点があり, 分子系統解析の精度の面では塩基配列情報に基づく解析に劣ると思われるが, 一方でシーケンサー等の高度な機器を必要としないこと, 操作が簡便で迅速に行え

ること, 結果 (電気泳動像) が視覚的に明瞭で評価が容易であるなどの利点があり, むしろ実用的なファイトプラズマの診断同定法として利用価値が高い。その際には 17 種すべての制限酵素を用いる必要はなく, LEE らによれば簡易同定には 6 種 (*Mse* I, *Alu* I, *Rsa* I, *Hha* I, *Hpa* II, *Taq* I) の酵素を用いれば十分とされている。

図-2 に PCR-RFLP 法による診断同定の概略を示した。ここでは nested PCR と呼ばれる 2 段階 PCR 法を採用しているが, nested には“入れ子”の意味があり, 最初の PCR で増幅された DNA 断片を 2 段階目の PCR の鋳型に用い, より内側の短い DNA 領域を PCR 増幅する手法である。2 組の異なる特異的プライマーセットを用いることでファイトプラズマ検出の信頼性が向上すること, 2 段階で PCR を行うことで検出感度 (増幅効率) が高まるため, 制限酵素処理に必要な PCR 産物が安定的に得られる, という利点がある。

III PCR-RFLP による診断同定の具体例

ここでは PCR-RFLP 法による診断同定法について, 中央農業総合研究センター谷和原圃場で発生したニンジン萎黄病 (carrot yellows, CY) の病原の同定を具体例として紹介する。ニンジン萎黄病は最初の記載ではキマダラヒロヨコバイによる媒介が示唆されているが (根本, 1966), ヒメフタテンヨコバイ媒介性ファイトプラズマによっても同様の病害が発生することも報告されている (塩見・杉浦, 1984)。ニンジン以外にもヒメフタテンヨコバイ媒介性ファイトプラズマとキマダラヒロヨコバイ媒介性ファイトプラズマのどちらの宿主にもなる植物は多く (表-1), また, これまでに我が国で発生が報告されている野菜・花き類のファイトプラズマ病

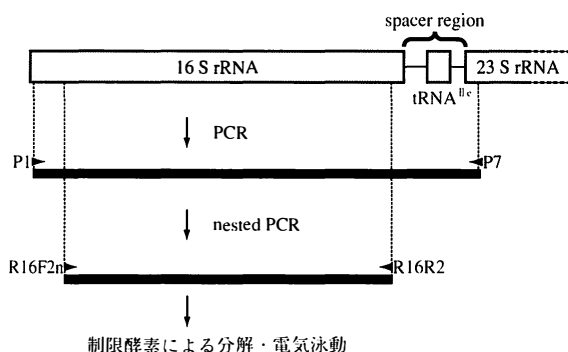


図-2 ファイトプラズマの 16S リボソーム RNA 遺伝子の PCR-RFLP 法による解析

表-1 ヒメフタテンヨコバイ媒介性ファイトプラズマとキマダラヒロヨコバイ媒介性ファイトプラズマのどちらにも感染する植物

科	植物名
アカザ科:	ハウレンソウ
アブラナ科:	カブ, タネツケバナ
フウロソウ科:	ゲンショウコ
マメ科:	エンドウ
セリ科:	ミツバ, ニンジン, チャービル, セルリー
キョウチクトウ科:	ニチニチソウ
ナス科:	トマト, ペチュニア, ダチュラ, <i>Nicotiana glutinosa</i>
ウリ科:	ニホンカボチャ
キク科:	アスター, シュンギク, レタス, コスモス
ユリ科:	ネギ, タマネギ

のほとんどがいずれかの病原によるものであることから、昆虫伝搬試験を行うことなく両ファイトプラズマを迅速簡便に識別・同定できる PCR-RFLP 法は非常に有用である。

分子系統解析による分類では両ファイトプラズマは“種”レベルで異なり、Lee らの分類法ではヒメフタテンヨコバイ媒介性ファイトプラズマは 16Sr I、キマダラヒロヨコバイ媒介性ファイトプラズマは 16Sr III に分類される。なお、今回の試験では当研究室で維持しているヒメフタテンヨコバイ媒介性のタマネギ萎黄病 (宮原ら, 1982) (onion yellows, OY)、およびキマダラヒロヨコバイ媒介性のリンドウてんぐ巣病 (塩見, 1988) (gentian witches'-broom, GW) ファイトプラズマに感

染したシュンギクを比較対照として用いた。

図-3 に示したように OY, CY, GW のいずれも P1/P7 プライマーセット (1 段階目) による PCR では約 1,800 bp, R16F2n/R16R2 (2 段階目) による PCR では約 1,250 bp の DNA 断片が増幅されており、ファイトプラズマ感染が確認された。

図-4 では OY, CY, GW それぞれの *Mse* I, *Alu* I, *Rsa* I, *Hlu* I, *Hpa* II, *Taq* I の 6 種制限酵素による RFLP プロファイルを示したが、CY のプロファイルは OY のプロファイルとほぼ一致し、GW のプロファイルとは *Taq* I 以外では大きく異なっている。CY のプロファイルの多くに OY には認められない約 150 bp の DNA 断片が認められるが、この DNA 断片は既に R16F2n/R16R2 による nested PCR を終えた時点で存在しており (図-3)、なんらかの原因による非特異的な PCR 産物と推定される。

以上の結果は供試したニンジン萎黄病の病原ファイトプラズマが 16Sr I グループに属することを示しており、ヒメフタテンヨコバイにより媒介される可能性が高いことが推定される。

おわりに

以前は病原の検出・同定、という非常に基本的なことすらも、特別な設備、多大な時間と労力を要していたことを考えると、ファイトプラズマ研究において分子系統解析の成果と PCR 技術の普及は、まさに“MLO 発見以来”の大きなインパクトをもたらしたと感ぜられる。ファイトプラズマ感染の迅速な検出が可能になり、診断同定の手法も確立されたことから、現在も世界各地から続々と新種のファイトプラズマや既知ファイトプラズマによる新病害が報告されている。さらに宿主特異性や媒介昆虫特異性といったファイトプラズマの病原性に関わ

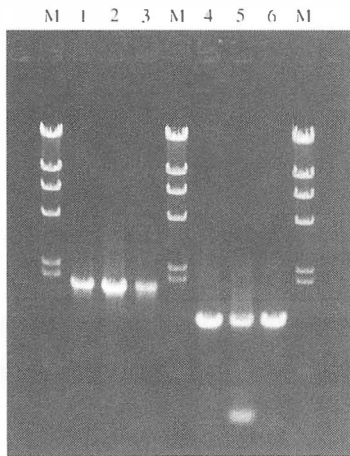


図-3 PCR によるファイトプラズマの検出
1% アガロースゲル電気泳動像, 1~3: P1/P7 プライマーセットによる PCR, 4~6: R16F2n/R16R2 プライマーセットによる nested PCR, 1, 4: OY, 2, 5: CY, 3, 6: GW, M: λ DNA の *Hind* III 分解物。

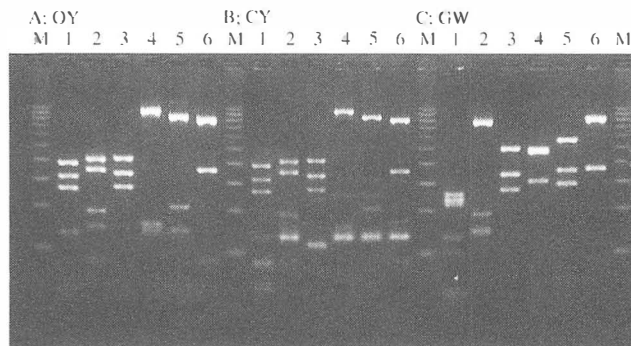


図-4 OY, CY, GW の 6 種制限酵素による RFLP プロファイル
4% アガロースゲル電気泳動像, A: タマネギ萎黄病 (OY), B: ニンジン萎黄病 (CY), C: リンドウてんぐ巣病 (GW), 1: *Mse* I, 2: *Alu* I, 3: *Rsa* I, 4: *Hlu* I, 5: *Hpa* II, 6: *Taq* I, M: 100 bp ラダーマーカー。

る特性の解明への取り組みも行われつつあり、今後の研究の展開が期待される。

引用文献

1) 土居養二ら (1967): 日植病報 33: 259~266.
 2) 兼平 勉ら (1996): 同上 62: 537~540.
 3) LEE, I.M. et al. (1998): Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1153~1169.
 4) 宮原和夫ら (1982): 日植病報 48: 551~554.
 5) 難波成任 (1993): 植物防疫 47: 86~93.

6) ——— (1995): 同上 49: 11~14.
 7) ——— (1996): 同上 50: 152~156.
 8) 根本正康 (1966): 日植病報 32: 82
 9) SAWAYANAGI, T. et al. (1999): Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1275~1285.
 10) SCHNEIDER, B. et al (1995): Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmatology. Academic Press Inc., London, pp. 369~380.
 11) 塩見敏樹 (1988): 関西病虫研報 30: 31~36.
 12) ———・杉浦巳代治 (1984): 日植病報 50: 149~157.

!発行図書!

作物の細菌病—診断と防除—

田部井 英夫 他編 A5判 本文308頁 口絵カラー16頁
定価 6,116円税込み (本体 5,825円) 送料 340円

2001年追補 (CD-ROM版: for Windows) —病徴診断と病原の同定—

西山幸司・高橋幸吉・高梨和雄 編
定価 2,100円税込み (本体 2,000円) 送料 200円

診断, 分離と同定, 生態, 発生機構, 防除法について解説した後, わが国で発生している 66 作物 115 の細菌病についてさらに詳しく解説した書です。
2001年追補では, その後の最新知見とともに病徴写真を豊富に取り入れ, 病原や病名からの検索機能も完備しております。

お申し込みは直接当協会へ, 前金 (現金書留・郵便為替) で申し込むか, お近くの書店でお取り寄せ下さい。
社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL(03)3944-1561 (代) FAX(03)3944-2103 メール: order@jppa.or.jp

■農薬に関する唯一の統計資料集 ■登録のある全ての農薬名を掲載

2001年版 (平成12農薬年度)

新刊図書

農薬要覧

- ◆ B6判・743ページ
- ◆ 定価 本体7,200円(税別)
- ◆ 送料サービス

農林水産省生産局生産資材課・植物防疫課 監修

主な目次

バックナンバー

- I 農薬の生産, 出荷—種類別生産出荷数量・金額/製剤形態別生産数量・金額/主要農薬原体生産数量/種類別会社別農薬生産・出荷数量/など
- II 農薬の流通, 消費—県別農薬種類別出荷金額/農薬の農家購入価格の推移/など
- III 農薬の輸出, 輸入—種類別輸出数量/種類別輸入数量/仕向地別輸出金額/など
- IV 登録農薬—平成12年9月末現在の登録農薬一覧/農薬登録のしくみ/など
- V 新農薬解説
- VI 関連資料—12年度農作物作付(栽培)面積/主要病害虫の発生面積・防除面積/など
- VII 付録—農薬の毒性及び魚毒性一覧表/関係機関等名簿/登録農薬索引/など

- 1999年版—7,560円 送料サービス
 - 1998年版—7,350円 //
 - 1989年版—4,485円 送料340円
- ※定価は税込価格です。

品切絶版

1963~88, 90~97, 2000年版

■ご注文は, 個人は前金 (現金・振替) で, 機関購入は後払いも可, 本会へ