

植物寄生性線虫の遺伝子解析

独立行政法人農業技術研究機構北海道農業研究センター ^{うえ}植 ^{はら}原 ^{たけ}健 ^と人

はじめに

植物寄生性線虫の系統分類は、線虫の基礎的な生理生態的研究や防除法に関する研究を含む、すべての線虫に関する研究を効果的に取り組むために重要である。また、線虫防除においては、殺線虫剤が効率的な防除法として利用されてきたが、近年、環境に対する影響から、抵抗性品種や対抗植物を含めた輪作などの耕種防除法が見直されている。このような耕種防除法は、有効である対象の線虫が特定の種類に限られており、適切な輪作体系を採らないと、逆に線虫による被害を増大させる危険性がある。よって、線虫の種を正確に同定することはますます重要となってきた。

線虫の系統分類は、種を、進化的に意味のあるように整理する分類学と線虫の種を同定する診断学の両方に関係しており、伝統的に形態的特徴を基に行われてきている。しかし、形態的特徴による同定は極めて専門的であり、熟練を要する。また、抵抗性品種に寄生できるような線虫の出現もあり、このような線虫は、形態的特徴では識別が不可能で、目的とする線虫の寄生性調査を行わなくてはならず、労力と時間を要する。そこで、線虫の形態的特徴による系統分類を補完する技術としてDNA情報を利用した線虫の種の識別、分類体系の考察、種内変異の解析等が、近年盛んに行われている。植物寄生性線虫は多くの種類が存在するが、本稿では、そのなかで農業上最も重要とされるネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウ、シストセンチュウの3属を中心に、種の識別、種内変異の解析および線虫のセルラーゼ遺伝子について紹介する。併せて、線虫の同定・分類は基本的に形態を中心としているので、上記3属の重要線虫につき主要種の形態的特徴がわかりやすく記載されている、本誌第54巻1号の文献(百田, 2000)をぜひご参照いただきたい。

I 種の識別

線虫のDNA診断を行う場合、多くの場合PCR法を

用いることが必要である。かつて、遺伝子診断は、線虫のDNA抽出に多くの時間と労力を要し、なおかつ、多量の線虫を必要とするため、単一の個体では同定できなかった。最近では1頭の線虫から、簡便な調整法により抽出したDNAを鋳型として、再現性の高いPCR産物が得られている(CASTAGNONE-SERENO et al., 1995)。その方法は、1頭の線虫を15 μ lのworm lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 60 μ g/ml proteinase K, 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95°Cで10分間処理したものをそのまま鋳型DNAとする。これは、遠心操作・精製操作も省かれた極めて簡便なDNA抽出法である。

1 PCR-RFLP法

RFLPとはrestriction fragment length polymorphismの略で、直訳すれば制限酵素断片長多型となる。PCR-RFLP法とは染色体上の特定の領域をPCR増幅し、その増幅産物を制限酵素で切断する。PCR産物内に制限酵素認識部位が存在すれば、その部位で切断され、存在しなければ切断されないのでアガロースゲル電気泳動やアクリルアミドゲル電気泳動により、サイズ分画を行った時には制限酵素認識部位の有無によって泳動パターンに差が生じる。この断片長多型から線虫を同定しようというものである。

サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*), アレナリアネコブセンチュウ (*M. arenaria*), ジャワネコブセンチュウ (*M. javanica*) やキタネコブセンチュウ (*M. hapla*) などの重要なネコブセンチュウの種の同定には、ミトコンドリアDNAのcytochrome oxidase subunit II遺伝子とlarge subunit rRNA遺伝子領域間でのPCR-RFLPが有効である(POWERS and HARRIS, 1993)。その領域を増幅するためのプライマーはC2F3: 5'-GGTCAATGTT-CAGAAATTTGTGG-3' とP1108: 5'-TACCTTT-GACCAATCACGCT-3'である。日本においても、ORUI (1998) が、サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウを含む10種類のネコブセンチュウの識別に、Ssp IあるいはVsp I+Hinf Iのどちらか1方

Genetic analysis of plant parasitic nematodes. By Taketo UEHARA

(キーワード: ネコブセンチュウ, ネグサレセンチュウ, シストセンチュウ, PCR)

と *Mse* I による上記領域の PCR 増幅産物の消化断片パターンが有効であることを示している。しかし、アレナリアネコブセンチュウについては PCR 産物の大きさが日本産とアメリカ産で異なっており (POWERS and HARRIS, 1993, WILLIAMSON et al., 1994), 日本産アレナリアネコブセンチュウについて、形態、アイソザイムパターン、DNA 塩基配列等を再考察し、分類上の位置づけを明確にすることが必要であろう。なおネコブセンチュウの同定と国内の分布については、奈良部 (1995) の報告を参照されたい。

ネグサレセンチュウは、リボゾーム DNA の ITS 領域の PCR-RFLP が種を識別するのに有効である。使用するプライマーの配列は The forward primer: 5'-CGTAACAAGGTAGCTGTAG-3' と The reverse primer: 5'-TCC'TCCGCTAAAATGATATG-3' である (FERRIS et al., 1993)。増幅された PCR 産物を制限酵素 *Alu* I, *Hha* I, *Hinf* I として *Taq* I でそれぞれ処理した時に生ずる断片パターンによりキタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus 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*) 等のネグサレセンチュウにおける重要種を含む 7 種を識別できることが報告されている (ORFEL, 1996; ORFEL and MIZUKUBO, 1999)。シストセンチュウにおいてもジャガイモシストセンチュウ (*Grobodera rostochiensis*) およびダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) を含む *Heterodera* 属 4 種において、rDNA の ITS 領域の PCR-RFLP で識別可能である (大類, 1997)。

2 種特異的プライマーによる検出

線虫の塩基配列データから、種に特異的な塩基配列をもつプライマーをデザインして、そのプライマーを用いた PCR 産物を電気泳動で検出することにより、種を特異的に同定する方法である。この方法により得られる結果は明確であり、単にバンドの有無として現れるので、バンドパターンが重要となる PCR-RFLP とは異なり、アガロースゲルやアクリルアミドゲル等のゲルの種類や泳動時間などをあまり考慮しなくていいなどの利点がある。ネコブセンチュウについては、短い塩基数のランダムプライマーを用いて解析する RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法より得られたマーカーから作成したサツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウのそれぞれの種に特異的なプライマーが報告されている (ZULSTRA et al., 2000)。また、キタネコブセンチュウに特異的プライマーも RAPD マーカーやゲノム上の繰り返り配列より作成した種特異的プライマーが報告されている

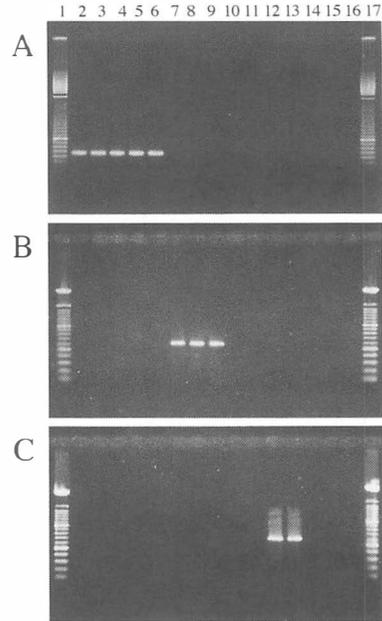


図-1 種特異的プライマーによる特異的バンドの検出

A: キタネグサレセンチュウ特異的バンドの検出

B: ミナミネグサレセンチュウ特異的バンドの検出

C: チャネグサレセンチュウ特異的バンドの検出

1 and 17: 分子量マーカー, 2~6: キタネグサレセンチュウ, 7~9: ミナミネグサレセンチュウ, 10~11: クルミネグサレセンチュウ, 12~13: チャネグサレセンチュウ, 14: バイナップルネグサレセンチュウ, 15: ノコギリネグサレセンチュウ, 16: モロコシネグサレセンチュウ

(CASTAGNONE-SERENO et al., 1995; WILLIAMSON et al., 1997)。また、ネグサレセンチュウにおいては Major sperm protein 遺伝子のイントロンより作成したキタネグサレセンチュウ特異的プライマーが報告されている (SERBERQUIST et al., 1996)。さらに、リボゾーム DNA の ITS 塩基配列を基に作製したプライマーで特異的にネグサレセンチュウの重要種を同定できる (UEHARA et al., 1998 a, b) (図-1)。キタネグサレセンチュウの特異的プライマーの配列は、さらに改良が加えられ、PP 3: 5'-GTGTCGCGCCCTGAGGGGT-3' と PP 2: 5'-CCCAACGACGGTCAAAAAGG-3' で良好な結果を得ている。また、ミナミネグサレセンチュウの特異的プライマーは PC 1: 5'-ATGCGCACATTGCATTCAGC-3' と PC 2: 5'-GAGCGAGAAACACCTCTCAC-3' であり、日本国内および南米のミナミネグサレセンチュウにおいても特異的検出が可能であった (植原, 未発表)。

また、シストセンチュウにおいてもジャガイモシストセンチュウ、ジャガイモシロシストセンチュウ (*G. pallida*) の種特異的プライマーが開発されている

(MULHOLLAND et al., 1996)。

II 種内変異

地域個体群や寄生性の異なる個体群等、同一種内での違いは形態的には識別が不可能である。そこで、分子生物学的手法を用い、これらを識別・解析する試みがなされている。そのなかでごく最近報告された、抵抗性トマトに寄生できるネコブセンチュウの研究について紹介したい。我が国で栽培されるトマトのネコブセンチュウ抵抗性品種は、米国で育成された Anahu 系統に由来し、その抵抗性は単一優性遺伝子 (*Mi*) によるものとされ、多数の品種が育成され栽培されている。この抵抗性トマトは、サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウに対し抵抗性を示すと言われている。トマトの *Mi* 遺伝子はすでに染色体歩行により単離され、感受性トマトへ *Mi* 遺伝子を導入した組換えトマトは、サツマイモネコブセンチュウに抵抗性を示すことが示されている (MILLIGAN et al., 1998)。また、この *Mi* 遺伝子の機能は詳細に解明され、植物体で発現することにより細胞死 (過敏感反応) を引き起こす (HWANG et al., 2000)。しかし、この *Mi* 遺伝子をもつトマトの抵抗性を打破するネコブセンチュウ個体群の出現が国内外で報告され、抵抗性打破個体群の出現要因の解析が行われている (奈良部・百田, 1992)。そして、これら寄生性の異なるネコブセンチュウの遺伝子解析が行われ、SEMBLAT et al. (2001) はサツマイモネコブセンチュウの near-isogenic lines (NILs) を使い、AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法で普通系統のサツマイモネコブセンチュウにのみ表れる特異的バンドを検出し解析を行い、その全長 cDNA (*map-1*) を単離した。またこの遺伝子がコードするタンパク質から抗体を作成し、ネコブセンチュウの双器口 (amphid aperture: 口腔開口部の両側に位置する) からそれが分泌されていることを突き止めた。彼らの主張では *map-1* 遺伝子がコードするタンパク質が発現していると、*Mi* 遺伝子をもつ抵抗性トマトがそのタンパク質に反応し細胞死 (過敏感反応) を引き起こし、抵抗性となると推定している。すなわち、抵抗性品種に寄生できるネコブセンチュウの打破系統は何らかの理由でこの *map-1* が変異をおこし、抵抗性トマトが線虫を認識できなくなり寄生を許してしまうということである。今後、この *map-1* 遺伝子をウイルスベクター等に組み入れ *Mi* 遺伝子を持つ抵抗性トマトの中で発現させることにより抵抗性トマトに過敏感反応を引き起こすことができるのか注目されることである。これらの研究は古くから提唱

されている遺伝子対遺伝子説 (FLOR, 1946) を、線虫において分子レベルで実証するものである。

また、Xu et al. (2001) は、ジャワネコブセンチュウの near-isogenic lines を使い、RAPD 法で抵抗性打破系統のジャワネコブセンチュウにのみ現れる特異的バンドを解析し、サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウの抵抗性打破系統にも共通に現れる打破ネコブセンチュウマーカーを開発している。抵抗性トマトに寄生できるサツマイモネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウが共通のマーカーで識別できるということは、このネコブセンチュウ3種が抵抗性トマトに寄生できる共通のメカニズムがあることが推測される。今後、これらのマーカーにより、打破系統の簡易識別ができるようになることを期待したい。

ダイズシストセンチュウにおいてもダイズ品種に対する寄生性の違い、すなわちレースとダイズの抵抗性遺伝子の解析が国内外で行われているが、ダイズの線虫抵抗性遺伝子は複数あり、また、それらが複合して働いており、極めて複雑であるが今後の解明が期待されている。

III 線虫の分泌する酵素

線虫の寄生戦略を解明するため遺伝子レベルでの解析が始まり盛んに研究されている。その中でも、本稿では線虫のセルラーゼの一つである β -1, 4-エンドグルカナーゼ (以下グルカナーゼ) 遺伝子について紹介したい。かつてより、植物寄生性線虫が植物へ寄生するためにどのような酵素を分泌しているかについては、多くの研究が行われていた (MORGAN and McALLEN 1962; MYERS 1965)。最近、SMANT et al. (1998) は線虫の食道腺の中のタンパク質を抗原として作製したモノクローナル抗体を基に獲得したタンパク質のアミノ酸配列を決定し、その配列を基にデジェネレートプライマーを作り、ジャガイモシストセンチュウとダイズシストセンチュウよりグルカナーゼ遺伝子を単離した。このグルカナーゼ遺伝子はデータベースより加水分解酵素のファミリー5に属する細菌のグルカナーゼと相同性が高かった。このタイプのグルカナーゼは今まで細菌のみから単離されていたが、単離した遺伝子にはイントロンがあり、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、食道腺で発現しており、植物寄生性線虫に内在性の酵素であることが明らかとなった。そして、このグルカナーゼがダイズシストセンチュウが植物に侵入する際、2期幼虫の口針から分泌されていることが観察された (WANG et al., 1999)。このように線虫のグルカナーゼ遺伝子が、線虫が植物に侵入する

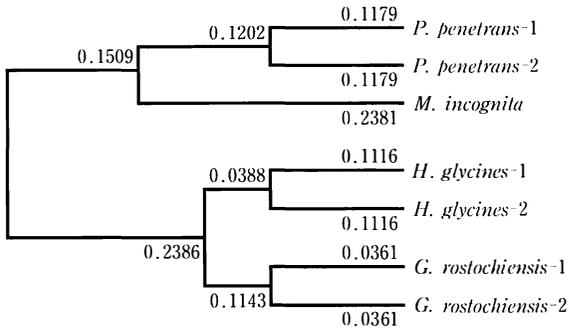


図-2 植物寄生性線虫のβ-1,4エンドグルカナーゼ遺伝子活性部位のアミノ酸配列を基にした分子系統樹

際に、分泌され、線虫が植物に寄生する際に働いていることが明らかとなってきた。

最近、同じようなグルカナーゼ遺伝子がタバコシストセンチュウ (*G. tabacum*)、サツマイモネコブセンチュウより単離された (GOELLNER et al., 2000; ROSSO et al., 1999)。シストセンチュウやネコブセンチュウとは異なった生活環を持つキタネグサレセンチュウからもグルカナーゼ遺伝子が単離され、内部寄生性線虫が一般にグルカナーゼ遺伝子を持つものと考えられるようになった (UEHARA et al. 2001)。

線虫のグルカナーゼ推定アミノ酸配列より、系統樹を作製した (図-2)。植物寄生性線虫の重要な3属、シストセンチュウ、ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウは、進化の一般的概念でシストセンチュウが一番進化していると考えられており、ネグサレセンチュウがこの中では原始的な植物寄生性線虫であるとされている。サザンハイブリダイゼーションの結果、ネグサレセンチュウがグルカナーゼ遺伝子を多くコピーしており、ネコブセンチュウ、シストセンチュウと順にコピー数が減ることが分かっている。ネグサレセンチュウは植物体内を移動し続けるため、グルカナーゼをよく分泌するが、シストセンチュウでは必要ときだけグルカナーゼを分泌するようになったのではとの推測もなされている。実際、シストセンチュウの雌成虫は、グルカナーゼ遺伝子を発現していない (deBOER et al., 1999)。また、線虫のグルカナーゼ遺伝子と細菌のそれとの相同性が高く、極めて構造が似ており、進化の過程で細菌の遺伝子が線虫へと移ってきたと推測されるほどである。今後さらに、系統分類や線虫の分泌する病原性に係わる因子の分子レベルでの

研究が行われるであろう。

おわりに

以上、植物寄生性線虫の分子生物学的手法を用いた解析について紹介してきた。形態的に似ている種の種類・同定に線虫のDNA配列情報を生かして簡便かつ迅速に判定する方法は非常に有効であり、将来的には利用されてくるのではないかと考えている。また、線虫の種内変異などの識別・系統進化の研究も盛んに行われ、今後の進展が注目される場所である。さらに、寄生性に関与する遺伝子解析なども盛んに行われるようになってきており、近い将来、線虫の寄生戦略や植物との相互関係が明らかになってくるものと期待している。

引用文献

- 1) CASTAGNONE-SERENO, P. et al. (1995): *Curr. Genet.* **28**: 566~570.
- 2) deBOER, J. M. et al. (1999): *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 663~669.
- 3) FERRIS V. R. et al. (1993) *Fundam. Appl. Nematol.* **16**: 177~184.
- 4) FLOR, H. H. (1946): *J. Ag. Res.* **73**: 335~357.
- 5) GOELLNER, M. et al. (2000): *J. Nematol.* **32**:
- 6) HWANG, C-F. et al. (2000): *Plant Cell* **12**: 1319~1329.
- 7) MILLIGAN, S. B. et al. (1998): *ibid.* **10**: 1307~1319.
- 8) MORGAN, G. T. and McAllen, J. W. (1962): *Nematologica* **8**: 209~215.
- 9) MULHOLLAND, V. et al. (1996): *Proceeding of Diagnostics in Crop Production Symposium*, pp 247~252.
- 10) MYERS, R. F. (1965): *Nematologica* **11**: 441~448.
- 11) 百田洋二 (2000): *植物防疫* **54**: 23~27.
- 12) 奈良部孝 (1995): *関東病虫研報* **42**: 9~14.
- 13) ———・百田洋二 (1992) 同上 **42**: 297~299.
- 14) ORUI, Y. (1996): *Appl. Entomol. Zool.* **31**: 505~514.
- 15) ——— (1998): *ibid.* **33**: 43~51.
- 16) ——— and T. MIZUKUBO (1999): *ibid.* **34**: 205~211.
- 17) 大類幸夫 (1997): *日線虫誌* **27**: 67~75.
- 18) POWER, T. O. and T. S. HARRIS (1993): *J. Nematol.* **25**: 1~6.
- 19) ROSSO, M-N. et al. (1999): *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 585~591.
- 20) SEMBLAT, J-P. et al. (2001): *ibid.* **14**: 72~79.
- 21) SERRERQUIST, R. A. et al. (1996): *J. Nematol.* **28**: 414~421.
- 22) SMANT, G. et al. (1998): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4906~4911.
- 23) UEHARA, T. et al. (1998 a): *Nematologica* **44**: 357~368.
- 24) ——— T. et al. (1998 b): *Jpn. J. Nematol.* **28**: 1~7.
- 25) ——— et al. (2001): *Nematology* **3**: 335~341.
- 26) WANG, X. et al. (1999): *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 64~67.
- 27) WILLIAMSON, V. M. et al. (1994): *Advances in Molecular Plant Nematology* pp 119~127.
- 28) ——— et al. (1997): *J. Nematol.* **29**: 9~15.
- 29) XU, J. et al. (2001): *Phytopathology* **91**: 377~382.
- 30) ZIJLSTRA, C. et al. (2000) *Nematology* **2**: 847~853.