

植物防疫基礎講座：植物病原菌の分子系統樹—そのシステムと見方—(2)

Pythium 菌

岐阜大学流域圏科学研究センター・植生資源研究部門 景 山 幸 二

はじめに

Pythium 属は、多種多様な機能をもつ 120 種以上を含んでいる。植物病理においては、多くの植物に種子腐敗、苗立枯れ、根腐れ、果実腐敗等を引き起こす病原菌である。*Pythium* 属菌は遊走子を形成して伝播する種があることから、特に近年、水耕栽培の導入により、本属菌による病害が増加し、これまでにない問題となっている。また、植物病原菌だけでなく、人間、動物、菌にも寄生する種や生態系の中で糖分解菌として物質循環に深くかかわっている種もある。このように重要な属であるにもかかわらず、菌学的、生理・生態学的研究は多くなく、他の菌に比較して研究が遅れている。この研究の遅れの最も大きな問題点は種の同定である。本属菌の種の同定は検索表を用いて行われており、VAN DER PLAATZ-NITERINK (1981) や DICK (1990) の検索表が使われている。しかし、実際に同定を進める中で常に問題となることは、種を絞っていくに従って形態的に非常に似た種があり、どちらにしたら良いのか判断できなくなることである。そこで、最終的にはある種の決断(独断)が必要になってくるのが現状である。そこで、この主観的判断を捨て、科学的根拠に基づいて同定を行うために分子生物学的手法が用いられるようになってきている。

さらに、分子生物学的手法は同定という基本的なものに加え、植物体あるいは土壤中に生存している *Pythium* 属菌を直接検出する試みにも応用されている。ここでは、これらの技術の原理、利用例、利点・欠点について述べる。

I 分子生物学的手法の基礎

20 年ほど前の分子生物学実験は、複雑で時間がかかり、高価なものであった。しかし、1985 年に初めてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術に関する研究論文が発表されて以来、PCR を用いた研究が飛躍的に増えてきている。なぜ PCR がこのように多く使われてきているのかは、次のような利点によっている。①短時間で目的とする遺伝子を飛躍的に増幅できる。②必要とされる DNA は極少量で十分であることから、従来多くの労力

と時間を必要とした材料からの DNA の抽出が簡単になった。③実験手順が簡易であることから、熟練を必要とせず新規に始めた研究者でもすぐに実験を始めることができる。④特別な実験室でないとできないラジオアイソトープを使った実験を必要としない。⑤再現性が高く、同じ菌株を使えば研究者による結果の差は見られない。⑥マニュアル化が容易であることから、初めての研究者でも間違えることなく結果を得ることができる。

PCR の開発のポイントとなったものが、耐熱性 DNA 合成酵素の発見である。通常 DNA は、2 本鎖であるが、94℃という高温になると 1 本鎖になる。そこに、DNA 合成の基質を加えることにより、片側に相補的な DNA が合成される。実はこのとき、単に DNA 合成酵素と基質を入れるだけでは DNA の複製は起こらず、プライマーという足場がないと DNA 合成酵素が働かない。プライマーがあると、その次の塩基配列から順番に相補的な DNA が合成されていく。このプライマーが後に述べるように、PCR のもう一つの重要なポイントになる。プライマー、基質、DNA 合成酵素を混合して、温度を調整することにより、2 本鎖 DNA ⇒ 1 本鎖 DNA ⇒ プライマーのアニリング ⇒ DNA の伸長が連続して起こりプライマー間の DNA を容易に、短時間で、大量に増幅することができる(図-1)。

プライマーは、設計する場所や方法により色々な応用が可能となる。例えば、自分の増幅したい遺伝子の前後にプライマーを設計すれば、標的遺伝子を増幅することができる。このとき、プライマーの塩基配列を前後とも 20 塩基対(bp)にすれば、DNA は四つの塩基により成り立っているので、確率的には $4^{20} \times 2$ 分の 1 の確立で同じ塩基配列がないと増幅できない。この割合は、全ゲノムの塩基配列数を超えており、理論上は目的の遺伝子だけが増幅されることになる。

II 同 定

分子生物学的手法を同定に用いることにより、次のようなことが可能となった。一つは、形態的特徴が培地・培養条件、菌株の古さなどにより変化するのに対し、再現性の高い結果が得られ、さらに遺伝学的特徴も調べることができることである。実際に、*Pythium* 属菌では形態的に類似した種がいくつかあり、例えば *P. graminicola*

How to Follow and Use Molecular Protocols in *Pythium* Species.
By Koji KAGEYAMA

(キーワード: PCR, 同定, 検出)

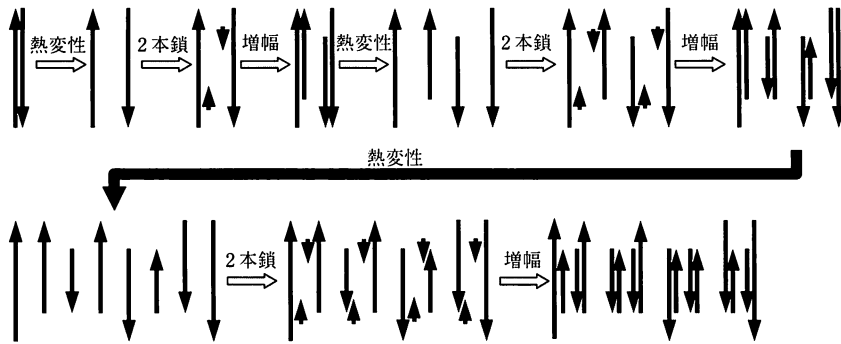


図-1 PCRの原理

とその近縁種の同定は難しく、分子生物学的手法により従来手法による同定が間違いであった例が報告されている (KAGEYAMA et al., 2005)。もう一つは、有性器官を形成しない菌株の同定である。*Pythium* 属菌の多くは、雌雄同株性で単独培養で有性器官を形成することから、容易に形態観測ができる。しかし、雌雄異株性の種は、雌株・雄株の対峙培養によってしか有性器官を形成しない。すなわち、基準菌株がないと同定ができない。さらに、対峙培養でも有性器官を形成せず、胞子のうのみを形成するものもあり、これらの菌株では同定は不可能である。そこで、分子生物学的手法の導入により同定をする試みがなされている (KAGEYAMA et al., 2003)。

分類・同定では、核にコードされているリボゾーム DNA 遺伝子中の ITS (rDNA-ITS) 領域が、標的遺伝子として多く使われている (LÉVESQUE et al., 2004)。この領域は、*Pythium* 属菌では種に特異的な塩基配列になっており、菌だけでなく植物にも利用できるプライマーが設計されている。このほかに注目されている遺伝子は、ミトコンドリア DNA にあるシトクロームオキシゲナーゼ II (coxII) 遺伝子である (MARTIN, 2000)。両遺伝子とも生物の生存にとって重要な遺伝子であることから、進化とともに変異が蓄積してきているので、種特異的塩基配列があるというだけでなく塩基配列を調べることで系統進化学的關係も分析できるという利点がある。また、rDNA-ITS 領域と coxII 遺伝子の両方を分析すれば、核とミトコンドリアという遺伝様式が異なり、進化速度も異なった部分を対象とした遺伝学的特徴を比較することができる。この実験で共通して問題となるのが、対照菌株を何にするかである。基準菌株が手元があればその菌株と比較すればよいのであるが、すべての種について基準菌株を持つことは不可能である。しかし、rDNA-ITS 領域や coxII 遺伝子に関する報告がいくつかあり、そのデータと自身のデータを比較することができる。

最近では同定のときの塩基配列の重要性から、新しい種

を記載するときには形態的特徴とともに分類によく使う rDNA-ITS の塩基配列をデータベースに登録するようになってきている (PAUL, 2001)。

1 系統樹を使った同定

系統樹を使った同定では、先に述べた rDNA-ITS 領域や coxII 遺伝子の塩基配列を調べ、この塩基配列とデータベース (日本 DNA データバンク <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) に登録されている塩基配列との類縁性を調べることによって同定することができる。最近では、形態を見ることなく rDNA-ITS 領域の塩基配列だけで同定ができるとしている論文も出てきている (MOORMAN et al., 2002)。

系統樹の作成は、コンピュータソフトを使って行い、最初にアライメントという塩基配列を比較できるようにする作業を行う。rDNA-ITS 領域は変異が大きく全長さえ種によって異なっており、どの塩基を種間で比較したらよいかを解析しなければならない。次に、塩基配列の類縁度に基づき系統樹を作成する。さらに、その系統樹の信頼度を調べるためブートストラップといわれる作業を行う。例として、図-2 では菌株 A の同定を示す。種名が書いてあるものはデータベースに登録されていた菌株、A は自分の菌株を示している。枝の上を書いてある数値は分枝の信頼度を示すブートストラップ値である。菌株 A は *P. graminicola* と同じクレードに属していることから *P. graminicola* と同定できる。

2 PCR-RFLP による同定

PCR-RFLP は、特定の塩基配列を認識してその部分を切断する制限酵素で PCR したものを切断し、切断長の多型を調べる方法である。この利点は、全塩基配列を調べなくてもよいことである。塩基配列を調べるには高価な試薬やシーケンサーを必要とするが、これらがなくても実験できる。種間で塩基配列が違えば切断部位が異なり、電気泳動することにより異なったバンドパターンとして認識できる。論文がいくつか出ているので、その

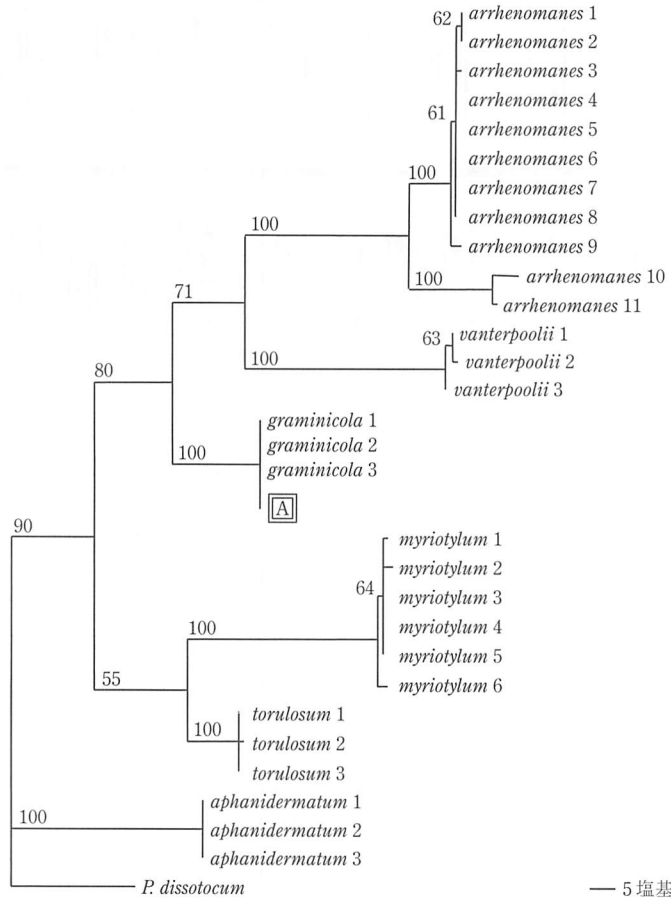


図-2 系統樹による菌株の同定

バンドパターンと比較することにより同定ができる (CHEN et al., 1992 ; WANG, 1997)。標的にするゲノム領域は系統樹と同様 rDNA-ITS 領域や coxII 遺伝子が使われている。図-3 は、有性器官を形成せず乳頭状突起をもつ胞子のうのみを形成するグループ P の菌株を同様な胞子のうを形成する *P. helicoides*, *P. oedocheilum*, *P. ostracodes* のバンドパターンと比較することにより、*P. helicoides* と同定した結果の一部である (KAGEYAMA et al., 2003)。この実験では、標的遺伝子とともに制限酵素の選択が重要である。塩基配列の違いを調べたいので、できるだけ認識塩基数が少ない 4 塩基認識のような酵素を用いるのがよい。coxII 遺伝子のように変異の少ない領域を標的としているときには、より多くの制限酵素を使ってバンドパターンに多型が見られるようにする必要がある。

III 検 出

分子生物学的手法は、菌株の同定から進んで、植物体

や土壤中の *Pythium* 属菌を PCR で検出する方法まで応用され始めている。*Pythium* 属菌では選択培地が開発されているが、属選択性であり種選択性のものではない。し

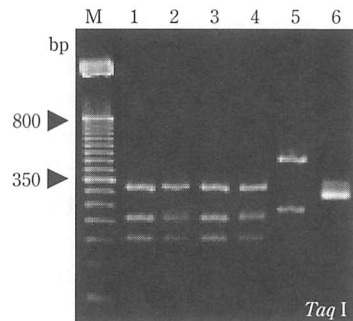


図-3 PCR-RFLP による菌株の同定

レーン M : マーカー, レーン 1, 2 : 有性器官を形成しない菌株, レーン 3, 4 : *Pythium helicoides*, レーン 5 : *P. oedocheilum*, レーン 6 : *P. ostracodes*, Taq I : 制限酵素.

かし、一般に *Pythium* 属菌は同一の土壌に複数の種が存在することが多く、目的の種のみを定量を行うためには、培地上に出現する菌をすべて純粋培養し、その後同定をしなければならない。PCR による検出では、そのような労力を必要とせず 2 日で結果が得られる。現在のところ定量まではできないが、一部の病原菌ではリアルタイム PCR という装置を使って可能となってきているので *Pythium* 属菌にも応用されることが待たれる。以下に PCR による検出で重要となる点について説明する。

1 特異的プライマーの設計

検出で最も重要な要因の一つがプライマーの設計である。*Pythium* 属は他の菌と同様、rDNA-ITS 領域からプライマーを設計した報告が多い。方法としては、系統樹のところで述べた多種を用いたアライメントで、目的の種とは異なる塩基配列になっている部分を探し、そこから設計するというのが基本的な方法である。候補にしたプライマーについてここでは詳しく述べないが、プライマーの塩基配列の GC 含量などいくつかの注意する点がある。これらの検証は、ソフト (<http://www.changbio.com/primo/index.html>) を使って行う。最終的には、他の種の DNA を使った PCR により、実際に特異性を調べる必要がある。特に土壌中には多種多様な大量の生物が生存しており、特異性は大変重要な要素となる。

通常の遺伝子はゲノム当たり 1 コピーしかないのに対し、rDNA は数十コピーあり、1 個の細胞当たりで考えるとそれだけで数十倍の感度が得られることになる。したがって、rDNA-ITS 領域を標的遺伝子にすることは検出にとって好適である。ただし、*Pythium* 属菌を扱う場合に注意しなければならないことは、*P. ultimum* のように rDNA のコピー数が菌株により異なることが知られている種もあることである (MARTIN, 1995)。この場合、菌株が異なると検出感度も異なり、定量には向かないことになる。

2 DNA 抽出

PCR による検出では、土壌から DNA を抽出する方法を確立することが重要である。土壌から DNA を簡易に抽出するキットが市販されているが、土壌中に含まれる PCR 阻害物質 (特に腐植酸) の量によって結果の良否が左右される。KAGEYAMA et al. (2003) は、PCR 阻害物質の除去法を多種組み合わせ、様々な土壌から *Pythium ultimum* が検出ができることを報告している (図-4)。

3 PCR

PCR では DNA 合成酵素の増幅間違いをできるだけ抑制するため、高温になって DNA が 1 本鎖になってから酵素が働くようにしたホットスタートの DNA 合成酵素を使うことが多い。また、特異性を高めるためプライマ

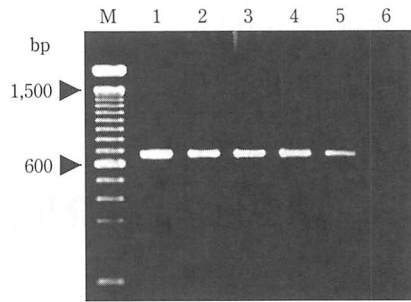


図-4 PCRによる土からの *Pythium ultimum* の検出
レーン M : マーカー
レーン 1 ~ 6 : 土壌サンプル番号.

ーと鋳型の DNA がアニーリング (2 本鎖になる) する温度を 60 ~ 65°C と高い条件にする。このとき、高温でもアニーリングするようにプライマーを設計しなければならない。

種特異的プライマーを用いた PCR は検出だけでなく、菌株の同定にも使うことができる。サンプル中に生息する目的の種の病原性など諸性質を調べるには菌株が必要となる。分離した菌株の形態による同定には労力がかかるが、種特異的プライマーを用いた PCR により目的の種であるかどうかを容易に同定することができる。

おわりに

Pythium 属菌における分類、同定、検出への分子生物学的手法の利用について述べた。現在、PCR を応用した様々な手法が開発されている。その中でも、*Pythium* 属菌の生態研究で注目されるのが個体群構造の解明である。Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) 法やマイクロサテライトマーカー法により、個体群の存在や個体群間の類縁関係分析、さらには個体識別が行われている。これが可能になれば、伝染経路が明らかになり、防除対策を考えるうえで重要な情報となる。動物や植物ではこれらの技術が利用され始めている。今後、*Pythium* 属菌にも応用されていくと思われる。

引用文献

- 1) CHEN, W. et al. (1992) : *Exp Mycol* 16 : 22 ~ 34.
- 2) DICK, M. W. (1990) : *Keys to Pythium*. University of Reading Press, Reading, UK.
- 3) KAGEYAMA, K. et al. (2003) : *J. Phytopath* 151 : 485 ~ 491.
- 4) ——— et al. (2003) : *J. Gen. Plant Path.* 69 : 153 ~ 160.
- 5) ——— et al. (2005) : *ibid.* 71 : in press.
- 6) LEVESQUE et al. (2004) : *Mycol. Res.* 108 : 1363 ~ 1383
- 7) MARTIN, F. N. (1995) : *Mycologia* 87 : 333 ~ 353.
- 8) ——— (2000) : *ibid.* 92 : 711 ~ 727.
- 9) MOORMAN, G. W. et al. (2002) : *Plant Dis.* 86 : 1227 ~ 1231.
- 10) PAUL, B. (2001) : *FEMS Microbiol. Lett.* 202 : 239 ~ 242.
- 11) VAN DER PLAATS-NITERINK, A. J. (1981) : *Study Mycol.* 21 : 1 ~ 242.
- 12) WANG, P. H. (1997) : *Physiol Mol Plant Path.* 51 : 129 ~ 143.