

タバコナジラミバイオタイプ Q の簡易識別法

—マルチプレックス PCR 法の利点—

近畿中国四国農業研究センター ^み三 ^{うら}浦 ^{かず}一 ^き幸

はじめに

タバコナジラミ *Bemisia tabaci* (GENNADIUS) は世界中に分布する大害虫であり、多くのバイオタイプが知られている (PERRING, 2001)。これらのバイオタイプは外部形態ではほとんど区別できないが、外部形態以外の生物学的特徴が異なる (PERRING, 2001)。PERRING (2001) によればバイオタイプは大きく B タイプ、Q タイプおよび非 B/Q タイプに分けられるという。非 B/Q タイプは A, K, D, E, G, H, L, M, N 等 20 以上のバイオタイプに分けられる (BURBAN et al., 1992 ; BROWN et al., 1995 ; De BARRO et al., 1998 ; PERRING, 2001)。

農業害虫の識別は効果的な防除や害虫管理の発展に重要である (PARRELLA and KEIL, 1984 ; ROSSMAN and MILLER, 1996)。しかし、タバコナジラミのバイオタイプは、前述した通り外部形態では識別は難しい。そのため、発生消長や動態の詳細な解析が難しく、的確な防除に支障をきたしている。特に、バイオタイプ Q 系統と B 系統では化学農薬に対する感受性やウイルスの媒介者としての働きが異なるため、両者を識別することは最重要課題である。

最近の分子生物学技術の進歩により、DNA 配列の解析は比較的容易にできるようになってきた。核やミトコンドリアの DNA を利用した種、系統、個体ごとの識別法も RAPD, AFLP, PCR-RFLP, マイクロサテライト, マルチプレックス PCR, LAMP 法等を利用し開発されてきている。ここでは、これまでに発表された遺伝子などの違いを利用したタバコナジラミのバイオタイプ簡易識別法を紹介する。

I DNA 以外での識別法

1 外部形態での識別

ROSSELL et al. (1997) は、タバコナジラミのいろいろなバイオタイプの外部形態を観察している。しかし、少なくとも Q 系統と B 系統を識別するほどの外部形態

的な差異を見いだしていない。

2 アイソザイム・アロザイムによる識別法

アイソザイムは同じ機能をもつがタンパク質が異なる酵素である。アロザイムは同一遺伝子座の対立遺伝子の関係にあるものを示す。DNA 解析が簡単にできる以前には、アイソザイム・アロザイムによる識別法が開発されていた (COSTA and BROWN, 1991 ; PERRING, 2001 ; PERRING et al., 2001 ; WOOL et al., 1993 ; 1994)。

この方法は酵素が異なれば染色液の組成も異なるため、1 個体で得られる遺伝子座の数が限られることが問題である。昆虫の発育段階・性によって酵素の活性が異なるため、バンドパターンが異なる可能性があるなどが指摘されている。

なお、次章に紹介する DNA による識別法は昆虫の発育段階・性による違いはない。

II DNA による識別法

1 RAPD-PCR 法

近年、Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応 : PCR) 法が開発されて手軽に DNA の解析ができるようになってきた。PCR 法は特定の遺伝子の配列を元に、その遺伝子を短時間に何十億も複製する技術である。

その PCR 法を使う Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR 法が開発された。RAPD-PCR 法はゲノムに対して非特異的に反応する短いプライマーを用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片のパターンから、用いた試料を判定・分類 (finger print) する手法である (野田, 2001)。GUIRAO et al. (1997) や LIMA et al. (2000 ; 2002) は、RAPD-PCR 法を利用してタバコナジラミ系統を識別する方法を報告した。この方法は比較的簡単で誰でもできるが、再現性に問題があり環境条件や試料により結果が異なる可能性がある。再現性に問題がある一つの理由として、細胞の DNA といっても共生微生物などの外部から侵入してきた DNA も存在するからである。例えば、タバコナジラミには共生微生物 *Wolbachia* が共生している個体も存在する (ZCHORI-Fein and BROWN, 2002 ; NIRGIANAKI et al., 2003)。同じバイオタイプでも *Wolbachia* が存在するかどうかでバンドパターンが異なってくる可能性がある。

Application of Molecular Techniques to Distinguish Among Biotypes of *Bemisia tabaci* (GENNADIUS). By Kazuki MIURA

(キーワード : タバコナジラミ, バイオタイプ, マルチプレックス PCR 法)

2 塩基配列解析

塩基配列解析は、特定の遺伝子領域の塩基配列を解読してバイオタイプを識別する方法である。この方法は最も確実な識別方法であるが、設備、時間およびコストが要するようになり簡易同定とは言い難い。

FROHLICH et al. (1999) は 16S ribosomal subunit, De BARRO et al. (2000) や WU et al. (2003) は ribosomal intergenic transcribed spacer I (ITS I) および FROHLICH et al. (1999), KIRK et al. (2000) や LUO et al. (2002) は mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) 遺伝子領域を解析してバイオタイプを識別している。特に、COI 遺伝子領域は世界中の生物を DNA の塩基配列にバーコードを付け、短い DNA 配列によって生物種を特徴付けようとする Barcode of Life プロジェクト (HEBERT et al., 2002) で用いられているように識別には有用な領域である。

例えば、COI 遺伝子領域を利用した識別のための作業は、①タバココナジラミから DNA を抽出、② COI 遺伝子領域の特異的プライマー (C1-J-2195 (5'-TTg ATT TTT Tgg TCA TCC AgA AgT-3') + R2819 (5'-CTg AAT ATC gAg gCA TTC C-3') (ZHANG et al., 2005)) を用いて PCR、③ PCR 産物をダイレクトシーケンス、という手順で行う (図-1)。解析された塩基配列を利用して GenBank で相同性の高い配列を探索し、どのバイオタイプであるかを判断する。①と②は半日ででき、③の行程ができる施設ではあと半日で COI 遺伝子領域が解析できる。③の行程ができない場合、外注に出すことが可能である (値段は受注先によって異なる)。

3 PCR-RFLP 法

Restriction Fragment Length Polymorphism (制限酵素断片長多型: PCR-RFLP) 法とは、PCR で得られた増幅産物を制限酵素で切断することによって多型を検出する方法である (野田, 2001)。制限酵素は 2 本鎖 DNA の 3 ~ 8 塩基の特異的配列を認識して切断する核酸分解酵素の総称である (野田, 2001)。PCR-RFLP 法は、既

知の特定の DNA 配列を PCR によって増幅し制限酵素で切る方法であるので再現性には問題はない。特に、すべての個体で塩基配列を決定するよりは簡便に変異を見つけれられるので種の同定などに用いられる (野田, 2001)。

ABDULLAHI et al. (2004) や上田 (2006) は、PCR-RFLP 法を利用したバイオタイプの識別法を報告している。上田 (2006) の方法は、①タバココナジラミから DNA を抽出、② COI 遺伝子領域の特異的プライマー (C1-J-2195 (5'-TTg ATT TTT Tgg TCA TCC AgA AgT-3') + L2-N-3014 (5'-TCC AAT gCA CTA ATC TgC CAT ATT A-3') (FROHLICH et al., 1999)) を用いて PCR、③ PCR 産物を制限酵素 *Sty I* または *Stu I* を用いて切断、④切断された PCR 産物を電気泳動を行い各断片の位置によりバイオタイプ識別 (制限酵素 *Sty I* を使った場合、B 系統なら 2 本および Q 系統なら 1 本のバンド: 制限酵素 *Stu I* を使った場合、B 系統なら 1 本および Q 系統なら 2 本のバンド)、という手順で行う (図-1)。

本方法は、次に紹介するマルチプレックス PCR 法と比べると、制限酵素を扱わなければならないという作業工程が一つ多くなることが欠点である (図-1)。

4 マルチプレックス PCR 法

マルチプレックス PCR 法とは、一つの PCR 反応で複数のプライマーを使用することである。トマトやナスの葉にはタバココナジラミやオンシツコナジラミが寄生している。詳細に観察すれば両者は区別できるが、通常瞬時に分けることは難しい。そこで、マルチプレックス PCR 法を利用したタバココナジラミ Q 系統、B 系統およびオンシツコナジラミを同時に識別する方法を紹介する (千吉良・三浦, 未発表)。

まず、タバココナジラミのバイオタイプ Q 系統と B 系統およびオンシツコナジラミの識別に有用な DNA の配列を探索しなければならない。そこで、GenBank を検索して配列を比較検討した結果、非常に変異が乏しかったので核とミトコンドリアの 16S ribosomal subunit (16S) と mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) 2 領域を利用することにした。設計したプライマーの配列は表-1 に示す。

(1) 手順

設計したプライマーを利用して PCR 法で識別するためには以下の手順で行う。

まず、微小な個体に対して効率的に DNA 解析を行うため、PCR 用テンプレートを作成する。0.2 ml のサンプルチューブにコナジラミを個体別に入れ、磨砕液 5% chelex 20 μ l 中でプラスチック爪楊枝により磨砕し、

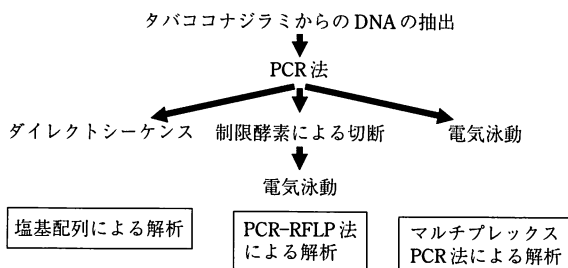


図-1 塩基配列, PCR-RFLP 法およびマルチプレックス PCR 法による識別法の手順

表-1 マルチプレックス PCR 法に利用するプライマー配列 (千吉良・三浦, 未発表)

プライマー名	配列
16S-Fsimon	5'-CCg gTT TgA ACT Cag ATC ATg T-3'
16S-FSPTV	5'-gTg ATg TTA ATT gTT ggC g-3'
16S-FSPQ	5'-ATT AAC TAA ATg ATA TTA AAT C-3'
16S-Rsimon	5'-CgC CTg TTT AAC AAA AAC AT-3'
CO1-FSPB	5'-CAC TAT AAT TAT TgC TgT TCC C-3'
L2-N-3014	5'-TCC AAT gCA CTA ATC TgC CAT ATT A-3'

表-2 マルチプレックス PCR 法試薬の分量 (千吉良・三浦, 未発表)

試薬名	10 本分の量 (μl)
GeneAmp 10 × PCR Gold Buffer ^{a)}	35.0
10 mM dNTP Blend ^{a)}	7.0
16S-Fsimon	3.5
16S-FSPTV	7.0
16S-FSPQ	14.0
16S-Rsimon	24.5
CO1-FSPB	7.0
L2-N-3014	7.0
25 mM MgCl ₂ ^{a)}	35.0
滅菌水	205.8
AmpliTaq Gold DNA Polymerase ^{a)}	1.8

^{a)} ABI の製品.

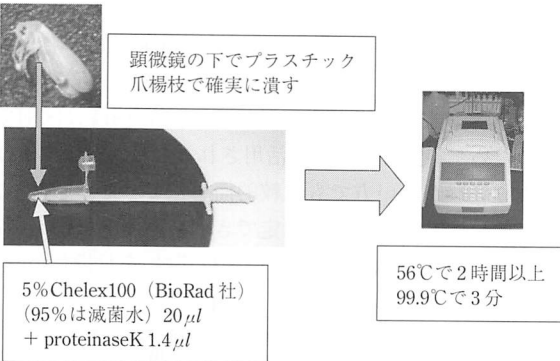


図-2 コナジラミの DNA 抽出

proteinase K を 1.4 μl 加えて 56.0℃ で 2 時間以上, 続いて 99.9℃ で 3 分処理した抽出液を PCR 法用テンプレートとして用いる (図-2)。なお, この抽出方法は塩基配列解析と PCR-RFLP 法でも利用できる。

次に, PCR 法を行う。ABI 社製の PCR 用試薬, プライマーなどを表-2 に示す割合で必要個体数分混ぜ合わせる。それを PCR 用器械で 96℃ 10 分後, 92℃ で 1 分, 46℃ で 1 分, 72℃ で 1 分 30 秒 35 回繰り返しした後, 72℃ 1 分 30 秒, 4℃ で保存する (図-3)。

PCR 法を行ったサンプルを 1% のアガロースゲルの電気泳動を行う (図-4)。タバココナジラミ Q 系統では約 530 bp と約 270 bp に 2 本, B 系統では約 600 bp と約 530 bp に 2 本, オンシツコナジラミでは約 530 bp と約 1,000 bp に 2 本のバンドが検出される (図-5)。まれに非特異的なバンドがでるが (図-5 の白い四角の位置), 基本的なバンドができれば区別ができる。

以上の方法を用いて, バンドの位置により 3 種のコナジラミを容易に区別できる。この方法で各地のコナジラミが判別可能であることを確認した。もちろん, 前述したように卵から成虫までの各ステージで判別が可能である。

現場からの標本の採集方法は, ①生きているまま持ち帰る, ②生きているものをアセトンに入れて持ち帰る,

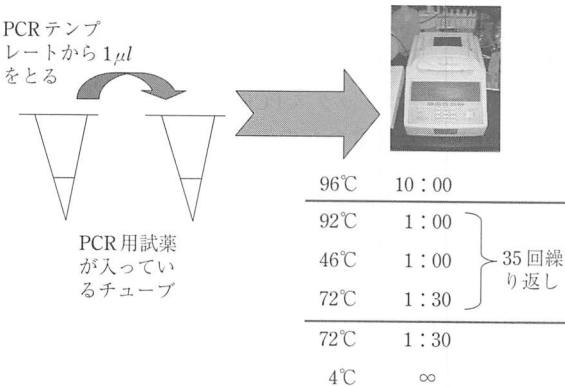


図-3 PCR 法の行程

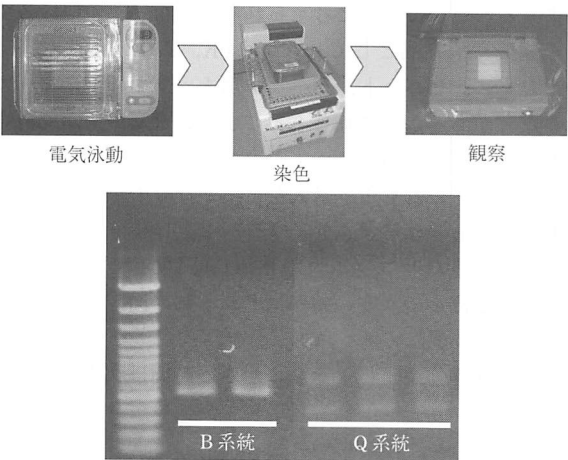


図-4 電気泳動, 染色および観察の手順

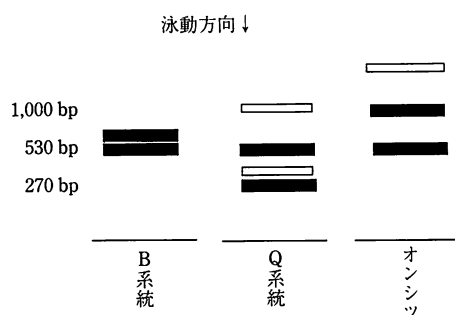


図-5 マルチプレックス PCR 法によるバンドパターン (黒バンド)

オンシツ：オンシツコナジラミ。白抜きのバンドは非特異的なバンドが出る可能性がある位置。

③ AmpliCARD にトラップまたは生きているものを潰して持ち帰る、などが考えられる。特に、AmpliCARD は小さな紙 (7.5 cm × 3.8 cm) で軽量であり比較的長くサンプルも保つようなのでこれから普及すると考えられる。

(2) マルチプレックス PCR 法利用のコストと労力

本方法に必要な主なもののコストはサーマルサイクラー (PCR 用器械) が 680,000 円 (Applied Biosystems 社製 GeneAmp® PCRSystem 2700), PCR 用試薬が 250units 分で 28,000 円 (ABI 社製), 電気泳動装置が 34,800 円 (コスモ・バイオ社製 Mupid-2, Mini Electrophoresis Unit), プライマー 6 本が約 45,000 円 (Sigma 社製 1 本当たり 0.2 μmol, カートリッジ精製, 修飾はなし), chelex100 が 59,900 円 (BioRad 社製) である。最近, 分子生物学の研究施設が増えたため, サーマルサイクラーや電気泳動装置は常備してあるか簡単に借りることができると考えられる。また, その他に必要な試薬や消耗品として *protenaseK*, TAE, 滅菌水, アガロース, ピペット, ピペット用チップや分子量マーカーなどがあるが, これらもどこかに行けばわずかであるから分譲してもらえるかもしれない。問題は Chelex100 であるが, これも 1 本購入したらかなりの年数使えらと考えられる。サーマルサイクラーなどは借りられるとして, 本方法はサンプル当たり約 60 円程度でできる。この値段が高いのか安いのかはそれぞれの同定に対する状況によって異なる。

本方法の作業工程とそれに掛かる時間は次のとおりで

ある。PCR 用テンプレートの作成に約 3 時間, PCR に約 3 時間, 電気泳動・染色・撮影に約 1 時間かかる。もし, 農家の方が AmpliCARD で標本を送ってこられた場合, AmpliCARD からの DNA の抽出時間として約 1 時間かかる。しかし, PCR 用テンプレートを作成する必要がなくなるため時間は短縮されることとなる。

ほかにマイクロサテライト法や最近活用されてきている LAMP 法などを利用する識別法などがあるがここでは省略することにする。

お わ り に

RFLP-PCR 法やマルチプレックス PCR 法は, 各地圃場に発生しているタバココナジラミバイオタイプ Q 系統や B 系統およびオンシツコナジラミが同時に区別できるため, 害虫管理に広く活用されるだろう。両方法はあまり経験がない方でも比較的簡単にできる。しかし, 将来的にはもっと簡単に同定できる技術開発 (例えば, リトマス紙のように赤色が出たら Q 系統) を目指したい。

引 用 文 献

- 1) ABDULLAH, I. et al. (2004): J. Appl. Entomol. 128: 81 ~ 87.
- 2) BROWN, J. K. (1995): Annu. Rev. Entomol. 40: 511 ~ 534.
- 3) BURBAN, C. et al. (1992): J. Appl. Entomol. 113: 416 ~ 423.
- 4) COSTA, H. S. and J. K. BROWN (1991): Entomol. Exp. Appl. 61: 211 ~ 219.
- 5) DeBARRO, P. J. et al. (1998): Aust. J. Entomol. 37: 214 ~ 218.
- 6) ——— et al. (2000): Bull. Entomol. Res. 90: 103 ~ 112.
- 7) GUIRA, P. et al. (1997): ibid. 87: 587 ~ 593.
- 8) FROHLICH, D. R. et al. (1999): Mol. Ecol. 8: 1683 ~ 1691.
- 9) HERBERT, P. D. N. et al. (2002): Proc. R. Soc. Lond. B 270: 313 ~ 322.
- 10) KIRK, A. A. et al. (2000): Bull. Entomol. Res. 90: 317 ~ 327.
- 11) LIMA, L. H. C. et al. (2000): Genet. Mol. Biol. 23: 781 ~ 785.
- 12) ——— et al. (2000): ibid. 25: 217 ~ 223.
- 13) LUO, C. et al. (2002): Acta Entomol. Sinica 45: 759 ~ 763.
- 14) NIRGANAKI, A. et al. (2003): Current Microbiol. 47: 93 ~ 101.
- 15) 野田博明 (2001): 植物防疫 55: 46 ~ 47.
- 16) PARRELLA, M. P. and C. B. KEIL (1984): Bull. Entomol. Soc. Am. 30: 22 ~ 25.
- 17) PERRING, T. P. (2001): Crop Protection 20: 725 ~ 737.
- 18) ——— et al. (1993): Science 259: 74 ~ 77.
- 19) ROSELL, R. C. et al. (1997): Ann. Entomol. Soc. Am. 90: 575 ~ 589.
- 20) ROSSMAN, A. Y. and D. R. MILLER (1996): Ann. Mo. Bot. Gard. 83: 17 ~ 28.
- 21) 上田重文 (2006): 九病虫研究会報 52: 44 ~ 48.
- 22) ZHANG, L. P. et al. (2005): J. Appl. Entomol. 129: 121 ~ 128.
- 23) ZOCHORI-FEIN, E. and J. K. BROWN (2002): Ann. Entomol. Soc. Am. 95: 711 ~ 718.
- 24) WOOL, D. et al. (1993): J. Appl. Entomol. 115: 185 ~ 196.
- 25) ——— et al. (1994): ibid. 117: 122 ~ 134.
- 26) WU, X. X. et al. (2003): Prog. Nat. Sci. 13: 276 ~ 281.