

特集：有害センチュウ類の遺伝子診断技術

ジャガイモシストセンチュウと近縁種の簡便な 遺伝子診断法

北海道農業研究センター ^う植 ^は原 ^な健 ^と人

はじめに

シストセンチュウは、雌成虫の表皮がなめし皮化し、直接体内に卵を包み込んで保護する包囊（シスト cyst）を形成することが特徴である。シストセンチュウの中には、複数の属があるが、特に *Globodera* 属と *Heterodera* 属に農業上重要な線虫種が含まれる。これら2属はシストの形で比較的容易に区別がつく。すなわち、*Heterodera* 属のシストがレモン形なのに対して、*Globodera* 属のシストは球形である。また、*Heterodera* 属に比較して、*Globodera* 属は形態的特徴が少なく種の識別には、分子生物学的手法が有効である。

国際的重要種であるジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochensis*) は、植物防疫法で特に指定されているジャガイモの重要害虫であり、海外からの侵入害虫で1972年北海道後志管内真狩村において国内で初めて発生が確認された (YAMADA et al., 1973)。北海道内では、最近でも発生地拡大が問題となっている。また、北海道以外においては、青森県、三重県および長崎県で発生が確認されている。国内には同属の近縁種としてタバコシストセンチュウ (*G. tabacum*)、ヨモギシストセンチュウ (*G. hypolysi*) の発生が確認されている。また、国内では発生が認められていないが、ジャガイモシストセンチュウ同様に国際的な検疫対象であるジャガイモシロシストセンチュウ (*G. pallida*) は、国内で育成された線虫抵抗性遺伝子 H₁ をもつ抵抗性ジャガイモ品種を加害し被害を及ぼすことが想定され、国内への侵入が警戒されている。したがって、新たな地域から *Globodera* 属特有のシストが確認された場合は、これら4種のうちいずれかであるか確認することが国内検疫および防除対策上極めて重要である。また、輸入検疫においてもジャガイモシストセンチュウを含む近縁種は、迅速で正確な診断法が求められている。本論文では、*Globodera* 属4

種 (図-1) の識別に有効である PCR-RFLP 法を中心として解説を行う。

I 寄主および形態

シストセンチュウは比較的寄主範囲が狭いことが知られており、ジャガイモシストセンチュウとジャガイモシロシストセンチュウは、ジャガイモのほかトマト、ナスに寄生する。タバコシストセンチュウはタバコ、ナス、トマトに寄生する。以上の3種はナス科植物に寄生する。一方、ヨモギシストセンチュウは、キク科植物であるヨモギに寄生する。シストセンチュウの同定にとって、特に *Globodera* 属線虫の同定では、寄主植物の確認は極めて重要である。また、線虫の分類・同定の基本は形態観察におかれている。シストセンチュウの大きな特徴はシストであり、シストの頭部の反対側である体後部 (末端域) に、*Globodera* 属では一つの円形の窓が認められ、肛門はその近くに認められる。窓縁から肛門までの距離と窓の長さの比 Granek's ratio が、シストセンチュウ同定に極めて重要な値である。さらに、2期幼虫の頭部の口針長が識別の重要な指標である。それらの計測値を表-1に示した (FLEMING and POWERS, 1992; OGAWA et al., 1983)。表に示した通り計測値には4種間で互いにオーバーラップが認められる。熟練を要するが、他の指標となる計測値や形態を参考にしつつ丹念に計測すれば4

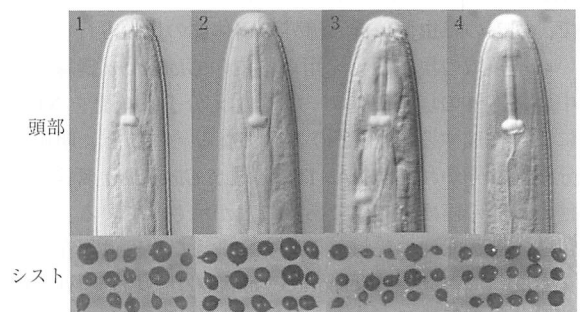


図-1 2期幼虫の頭部とシスト

1: ジャガイモシストセンチュウ, 2: ジャガイモシロシストセンチュウ, 3: タバコシストセンチュウ, 4: ヨモギシストセンチュウ。

Molecular Diagnostics of *Globodera Rostochiensis* and Three *Globodera* Species. By Taketo UEHARA

(キーワード: 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, タバコシストセンチュウ, ヨモギシストセンチュウ, PCR-RFLP 法)

表-1 診断の指標となる計測値

| 線虫種 | 口針長 μm | Granek's ratio* |
|-------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>G. pallida</i> | 21 ~ 26 (> 23) | 1.3 ~ 9.5 (> 3) |
| <i>G. rostochiensis</i> | 21 ~ 23 (22) | 1.2 ~ 3.5 (< 3) |
| <i>G. tabacum</i> | 19 ~ 28 (23 ~ 24) | 1.0 ~ 4.2 (< 2.8) |
| <i>G. hypolysi</i> | 24 ~ 25 (24.6) | 1.2 ~ 3.5 (2.1) |

()内の数値は目安となる平均的な値。

*窓縁から肛門までの距離と窓の長さの比。

種は識別可能であるが、植物検診の段階での発見では、成熟シストや2期幼虫が得られない場合がある。そのような場合や種が混在している場合などで迅速性を重視するならばPCR法を用いた遺伝子診断法が極めて有効となる。

II リボソーム DNA-ITS 領域の塩基配列と分子系統樹

ゲノム中のリボソーム RNA をコードする遺伝子領域は、線虫の系統関係推定に頻繁に使われている。この領域にはリボソーム遺伝子をコードしている領域と、スペーサーと呼ばれるリボソーム遺伝子の間の非機能領域があり、スペーサーの中でも ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域が線虫の種レベルの比較に用いられることが多い。そこで、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、タバコシストセンチュウおよびヨモギシストセンチュウの ITS1 および ITS2 を含む 18S から 28S までの領域 (rDNA-ITS 領域) の塩基配列を決定して比較を行った。その結果、ジャガイモシストセンチュウとタバコシストセンチュウおよびジャガイモシロシストセンチュウの、ナス科作物に寄生する *Globodera* 属線虫では、その領域の相同性が高く 95% 程度、ナス科寄生の *Globodera* 属線虫とヨモギシストセンチュウとの相同性は 85% 程度であった。この領域は DNA データベースにも多くの情報が登録されているので、国内の線虫個体群と海外の個体群の比較も行いやすい。本領域の塩基配列を用い国内の *Globodera* 属線虫を中心に海外の塩基配列データを加え分子系統樹を NJ 法により作成すると図-2 のようになる。種ごとに明確に分岐群は分かれ、rDNA-ITS 領域が *Globodera* 属線虫の種の識別に極めて有効であることが示されている。この領域の塩基配列の比較で矛盾するような事例は現在まで報告されていない (SUBBOTIN et al., 2000)。塩基配列の解読ができる環境であるなら、既知の塩基配列との比較により正確な種同定が可能となるだろう。実際、*G. pallida* の発生が確認されたウクライナやアメリカ合衆国では形態観察に加え、rDNA-ITS 領域の塩基配列を決定

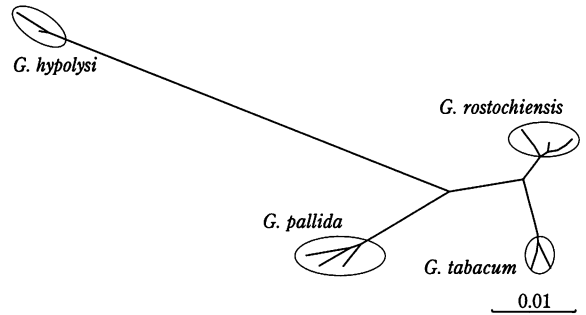


図-2 rDNA-ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統樹 NJ 法により作成。

して種を同定している (HAFEZ et al., 2007; PYLYPENKO et al., 2005)。しかし、塩基配列の解読は、3 日程度の時間を要し、シーケンサーなど高額な機器も必要であり、現場で使える簡便な診断法とは言い難い。

III PCR-RFLP 法

リボソーム DNA-ITS 領域の塩基配列が種の識別に有効であることが示され、さらに多くの国内外個体群の塩基配列データを種間で比較していくと、ある制限酵素サイトがリボソーム DNA-ITS 領域において、種ごとに特定の位置に存在したり、存在しなかったりする。そこで、PCR 法を用いてリボソーム DNA-ITS 領域を増幅して、選択された制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動を行うと、種に特異的な DNA 断片の電気泳動像が得られる。この方法は他の属の線虫の識別でも、よく使用される遺伝子診断法の一つである PCR-RFLP 法である。本方法を用いれば塩基配列を決定しなくとも簡便に線虫種を識別できる。そこで *Globodera* 属 4 種の国内外個体群の rDNA-ITS 領域における塩基配列を比較し、4 種を識別するのに有効と考えられる制限酵素を選択した。以下に、その簡便な識別法を説明する。

1 方法

実体顕微鏡下でシストをピンセットで割り 2 期幼虫を取り出す。抽出用緩衝液 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 0.01% ゼラチン, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテイナーゼ K) 15 μl をスライドガラス上に滴下し、その中に 2 期幼虫 1 頭を入れ、針先で切断し、マイクロピペットを用いてマイクロテストチューブに移し、冷凍庫で凍結した後、65°C で 1 時間、95°C で 10 分間熱処理したものを鑄型 DNA とする。温度処理は、液量が少量のため PCR サーマルサイクラーを用いると行いやすい。温度処理の後、遠心操作や不純物を除く操作は必要ない。2 期幼虫

が得られなくとも雌成虫や卵1個でもDNAの抽出は可能であるので、いままで正確な種同定が困難とされていた植物検診で発見されたシストからでも遺伝子診断を行うことは可能である。また、あらかじめ熱処理して土壌中のシスト内の卵を死滅させたサンプルでも遺伝子診断を行うことができる。

次に、PCRに用いるセンスおよびアンチセンスプライマーの配列はそれぞれ5'-CGTAACAAGGTAGCTGTAG-3', 5'-TCCTCCGCTAAATGATATG-3'である(FERRIS et al., 1993)。PCRはチューブ当たり25 μ lの容量で行い、反応液の組成は200 μ MのdNTP, 0.2 μ Mの各プライマー濃度とし、1.0 unitのTaq DNAポリメラーゼおよびTaq DNAポリメラーゼに添付の10倍濃度緩衝液を2.5 μ l加え、1反応当たり4 μ l程度の鋳型DNA溶液(2期幼虫1頭からDNAを抽出した場合)を加えて計25 μ lとする。反応は、94 $^{\circ}$ Cで3分間の後、94 $^{\circ}$ Cで30秒、50 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで1分のサイクルを40回繰り返した後、72 $^{\circ}$ Cに5分間とした。制限酵素はAluIおよびHinfIを使用することにより4種が識別できる。制限酵素処理は、PCR産物5.0 μ lと制限酵素0.5 μ l(5 unit程度)および制限酵素に添付の緩衝液を適量加えた計10.0 μ lの溶液中で行った。反応条件は37 $^{\circ}$ C, 16時間程度とした。制限酵素処理したPCR産物の電気泳動には、1.5~2.0%のアガロースゲル(Sigma Type II-A)を用い、電極用緩衝液にはTAE緩衝液を用いた。ミニサブマリン電気泳動装置を使用し、室温条件下において100V定電圧で約40分の泳動を行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液(0.5 μ g/ml)で染色し、UV照射下で検出されたバンドパターンを写真撮影した。

2 遺伝子診断結果

制限酵素処理するまえのPCR増幅産物は4種とも約1,000 bpである(表-2)。それを制限酵素AluIで処理すると図-3の1レーンと2レーンの違いのようにジャガイモシロシストセンチュウとジャガイモシストセンチュウの識別が可能である。この場合、ジャガイモシロシ

ストセンチュウとタバコシストセンチュウが識別できないので、別の制限酵素HinfIを使用するとそれらは識別可能であり、二つの制限酵素AluIとHinfIを用いた二つの電気泳動像から4種が識別可能となる(図-3)(植原ら, 2007)。国際的重要種であるジャガイモシストセンチュウとジャガイモシロシストセンチュウについては他の制限酵素AfaIやTaqIの使用も有効であると報告されている(HAFEZ et al., 2007)。

PCR-RFLP法は遺伝子診断法としては比較的簡便な方法であるが、本法を用いた種の識別は、電気泳動像から正確なDNA断片サイズを把握する必要があるため表-2に4種から得られる断片サイズをまとめた。

IV 種特異的遺伝子診断法

ジャガイモシストセンチュウやジャガイモシロシストセンチュウは、農業上の重要性から特に種を特異的に検出するようなプライマーが報告されている(MULHOLLAND, 1996; PYLYPENKO et al., 2005)。それぞれの種検出および混在確認に効果がある。ウクライナのジャガイモシロシストセンチュウ検出例では、ウクライナの各所約60地域の土壌に、ジャガイモシロシストセンチュウが生息するかを遺伝子診断で探索を行った。当初は1頭ずつ遺伝子診断で確認したが、なかなかジャガイモシロシストセンチュウにあたらない。少数のシロシストセンチュウがジャガイモシストセンチュウの中に混在している場合などが考えられるため、各地域を10か所ずつにまとめ、10か所から分離された多数のシストをまとめてDNAを抽出し、ジャガイモシストセンチュウでは428 bpのバンドが増幅され、ジャガイモシロシストセンチュウがいれば、254 bpのバンドが確認され、混在していれば2本のバンドが増幅されるようなマルチプレックスPCR法による探索を行った。その結果、ジャガイモシストセンチュウとシロシストセンチュウの二つのバンドを含む集団が検出され、その後、各地域に細分化し、さらにPCRによる診断を行い、最終的に、ある特定の地域にジャガイモシロシストセンチュウの生息を

表-2 PCR-RFLP法で確認されるDNA断片サイズ(bp)

| 線虫種 | PCR増幅断片 | 制限酵素 | |
|-------------------------|---------|-----------------------|--------------|
| | | Alu I | Hinf I |
| <i>G. pallida</i> | 1,002 | 511, 382, 97, 12 | 767, 152, 83 |
| <i>G. rostochiensis</i> | 1,001 | 381, 362, 149, 97, 12 | 918, 83 |
| <i>G. tabacum</i> | 1,003 | 511, 383, 97, 12 | 920, 83 |
| <i>G. hypolysi</i> | 1,016 | 907, 97, 12 | 1,016 |

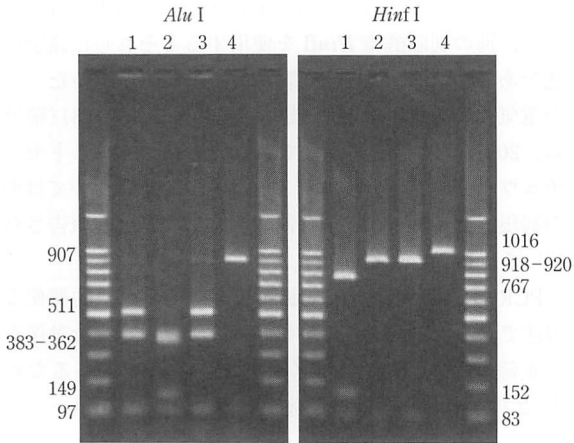


図-3 PCR-RFLPによる電気泳動像

1: ジャガイモシロシストセンチュウ, 2: ジャガイモシストセンチュウ, 3: タバコシストセンチュウ, 4: ヨモギシストセンチュウ, 両端はDNA分子量マーカー。

確認できた (PYLYPENKO et al., 2005)。特定の線虫が生息しているかを確認するには種特異的プライマーが極めて有効であると感じた。同じように、国内の代表的な発生地域である羊蹄山麓地区、道南の函館地区、道東の斜網地区のシストから、それぞれ、まとめてDNAを抽出し、マルチプレックスPCR法を用いて調査を行った。結果として、当然ながらジャガイモシロシストセンチュウの特異的なバンドは検出されなかった (図-4)。

おわりに

ジャガイモシストセンチュウを中心として近縁種の遺伝子診断法について説明した。PCR-RFLP法を用いれば、正確で迅速な診断が可能になると思われる。問題点としては、遺伝子診断法では寄生性の異なるパソタイプ

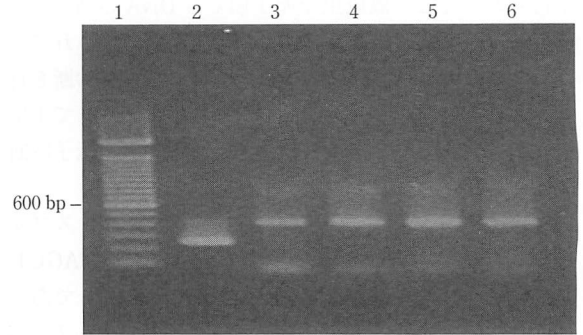


図-4 種特異的プライマーによる検出

1: DNA分子量マーカー, 2: ジャガイモシロシストセンチュウ英国個体群, 3: ジャガイモシストセンチュウ英国個体群, 4: 羊蹄山麓個体群, 5: 函館地区個体群, 6: 斜網地区個体群。

までは、現在のところ識別できない。また、正確な診断は、今後とも寄主・形態・遺伝子情報の三つを調査し判断することが望ましい。

ジャガイモシストセンチュウはジャガイモに甚大な被害を及ぼし、増殖率も高く、防除することが困難な難防除害虫である。防除対策には抵抗性ジャガイモ品種を組み入れた適切な輪作体系を採用することが重要である。

引用文献

- 1) FERRIS, V. R. et al. (1993): *Fundam. Appl. Nematol.* 1: 177 ~ 184.
- 2) FLEMING, C. C. and T. O. POWERS (1998): *Potato cyst nematodes biology, distribution and control*, CABI Publishing, Wallingford, p. 91 ~ 114.
- 3) HAFEZ, S. L. et al. (2007): *Plant Disease* 91: 325.
- 4) OGAWA, Y. et al. (1983): *Jpn. J. Nematol.* 12: 41 ~ 46.
- 5) PYLYPENKO, L. A. et al. (2005): *Euro. J. Plant Pathol.* 111: 39 ~ 46.
- 6) SUBBOTIN, S. A. et al. (2000): *Nematology* 2: 591 ~ 604.
- 7) 植原健人ら (2006): *日線誌* 36: 33 ~ 37.
- 8) YAMADA, E. et al. (1973): *Jpn. J. Nematol.* 2: 12 ~ 15.

新しく登録された農薬 (20.9.1 ~ 9.30)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、適用雑草等を記載。（登録番号：22236 ~ 22258）下線付きは新規成分。

「殺虫剤」

●ペルメトリン乳剤

22236：花ベジタ（ヤシマ産業）08/09/10

ペルメトリン：0.010%

なす：アブラムシ類：収穫前日まで

きゅうり：アブラムシ類：収穫前日まで

はくさい：アブラムシ類，アオムシ：収穫14日前まで

キャベツ：アオムシ：収穫3日前まで

かき：カキノヘタムシガ：収穫7日前まで

きく：アブラムシ類：発生初期

ばら：アブラムシ類：発生初期

つばき類：チャドクガ：発生初期

つつじ類：ツツジゲンバイ：発生初期

(14 ページに続く)