

特集：有害センチュウ類の遺伝子診断技術

リアルタイム PCR による植物寄生性線虫定量法の確立

東京農工大学 豊田 剛己・佐藤恵利華・後藤 圭太・白樫 ともあき

はじめに

リアルタイム定量 PCR (リアルタイム PCR) は、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし解析する方法であり、従来の PCR 法では困難であった正確な定量を行うことを可能とした。1990 年代終わりから、リアルタイム PCR を用いた研究が開始され、その報告例が増加している。リアルタイム PCR を線虫の数や遺伝子発現量の定量に応用する試みにも大きな関心が集まっている。

ネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウ、シストセンチュウなど植物寄生性線虫の形態に基づく同定は、熟練した研究者であれば至って簡単なことではあるが、初心者にはかなり困難である。一方、リアルタイム PCR を用いれば、DNA 抽出に 2 時間程度、PCR 反応にわずか 40 分で、標的とする線虫を定量できる。これは本手法の普及に当たって大きな魅力である。2008 年 7 月に開かれた国際線虫学会においても植物寄生性線虫の定量および診断のセッションが設けられ、5 題の関連発表があった。

筆者らは、リアルタイム PCR を用いて迅速・高感度で植物寄生性線虫を定量・評価することで、生産者が不要な殺線虫剤の使用を控えたり、最適な作物を選定するための手助けとなるような線虫診断手法の開発に取り組んでいる。本稿では、リアルタイム PCR の原理と植物寄生性線虫への適用例、本手法の注意点、将来展望について解説する。

I リアルタイム PCR

リアルタイム PCR の原理については、多くの成書で既に説明されているので、詳細はそれらを参照して欲しい (例：佐々木, 2003; 森山, 2005; 有賀, 2007)。リアルタイム PCR では、通常の PCR 反応と異なり、特定の DNA 配列のコピー数をリアルタイムでモニタリグす

Development of a Real-time PCR Method for Quantifying Plant-parasitic Nematodes. By Koki TOYOTA, Erika SATO, Keita GOTO and Tomoaki SHIRAKASHI

(キーワード：ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ、ジャガイモシストセンチュウ、ダイズシストセンチュウ、診断)

る。このとき、インターカレーター (蛍光物質：SYBR Green I が使われることが多い) を反応液に添加しておく、PCR 法によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射によって蛍光を発するようになるので、これをリアルタイムで測定する。

特定の遺伝子配列を異なる濃度で含む DNA 溶液を鋳型に PCR 反応を行った例を紹介する (図-1)。対象とする DNA 配列を有しないサンプルでは (C)、DNA は全く増幅されない。一方、対象とする DNA 配列を含む溶液では、PCR サイクル数が進むにつれて、蛍光強度が強くなる。このとき、コピー数の多いサンプル A ではコピー数の少ないサンプル B に比べて、蛍光強度の立ち上がりが早くなる。一定の蛍光強度 (図では 30 としている) を超えた PCR 反応のサイクル数を Ct 値 (threshold cycle) と呼び、この Ct 値をサンプル間で比較する。

II リアルタイム PCR の植物寄生性線虫への適用例

リアルタイム PCR を用いて植物寄生性線虫を定量する試みはジャガイモシストセンチュウ (*Globodera pallida*) およびテンサイシストセンチュウ (*Heterodera schachtii*) に対して 2005 年に最初に報告された (MADANI ら, 2005)。それ以降、*Meloidogyne chitwoodi* と

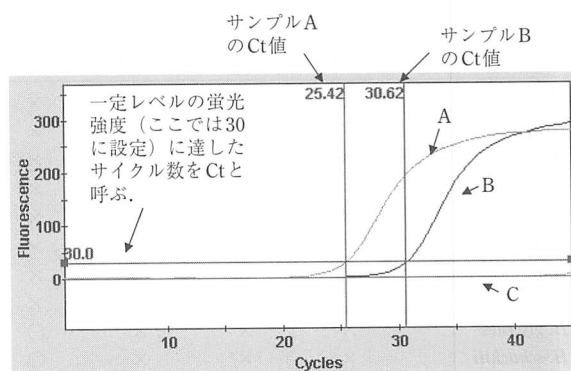


図-1 特定遺伝子を高濃度 (A) あるいは低濃度 (B) で含む、あるいは含まない溶液 (C) から抽出した DNA を鋳型にした PCR 反応における、サイクル数と蛍光強度との関係

M. fallax (ZIJLSTRA and Van Hoof, 2006), キタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus penetrans*: SATO ら, 2007), サツマイモネコブセンチュウ (*M. incognita*) とジャガイモシストセンチュウ (*G. rostochiensis*) (TOYOTA ら, 2008), ダイズシストセンチュウ (*H. glycines*: GOTO ら, 投稿中) に対して, リアルタイム PCR を用いた検出系が報告されてきた。2008 年夏に開催された国際線虫学会においては, このほかに *Phasmarhabditis hermaphrodita*, *Radopholus similis* (バナナネモグリセンチュウ) についてポスター発表がなされた。

特定の遺伝子配列をリアルタイム PCR により検出する場合, フォワードプライマーとリバースプライマーを用いて 100 ~ 200 塩基対程度の遺伝子断片を増幅する。18S rDNA や 28S rDNA 配列上では, 線虫の種間において変異が少なく識別が困難なため, ITS 領域にプライマーが設定されることが多い。我々が設計した 4 種類のプライマーもすべて ITS1 上に標的部位がある。ただし, 次項でも説明するように, サツマイモネコブセンチュウを検出するために設計したプライマー RKN の場合, サツマイモネコブ・アレナリアネコブ・ジャワネコブセンチュウの 3 種間でプライマー部分の配列が完全に一致しているため, これらの識別は不可能である (表-1)。

具体的な適用法としては, トレイ法あるいはベルマン法を用いて土壌および植物体から線虫を抽出し, その線虫溶液から抽出した DNA を鋳型にリアルタイム PCR を行う。一例を示すと, 自活性線虫のみを含む線虫溶液

から DNA を抽出しリアルタイム PCR を行った場合, Ct 値は 34.4 回であったが, 1,000 頭の自活性線虫に 1 頭のジャガイモシストセンチュウ 2 期幼虫を加えてから DNA を抽出した場合には, Ct 値が 27.6 回にまで低下し

表-1 筆者らの研究室で開発したキタネグサレセンチュウ (RLN), サツマイモネコブセンチュウ (RKN), ジャガイモシストセンチュウ (PCN), ダイズシストセンチュウ (SCN) 用リアルタイム PCR プライマーの特異性

	プライマーの種類			
	RLN	RKN	PCN	SCN
<i>P. penetrans</i>	○	×	×	×
<i>P. coffeae</i>	×	×	×	×
<i>M. incognita</i>	×	○	×	×
<i>M. arenaria</i>	×	○	×	×
<i>M. javanica</i>	×	○	×	×
<i>M. hapla</i>	×	×	×	×
<i>G. rostochiensis</i>	×	×	○	×
<i>G. pallida</i>	×	×	○	×
<i>H. glycines</i>	×	×	×	○
<i>H. schachtii</i>	×	×	×	○
<i>H. avenae</i>	×	×	×	×

P.: *Pratylenchus*, M.: *Meloidogyne*, G.: *Globodera*, H.: *Heterodera*.

○: 検出される, ×: 検出されない。

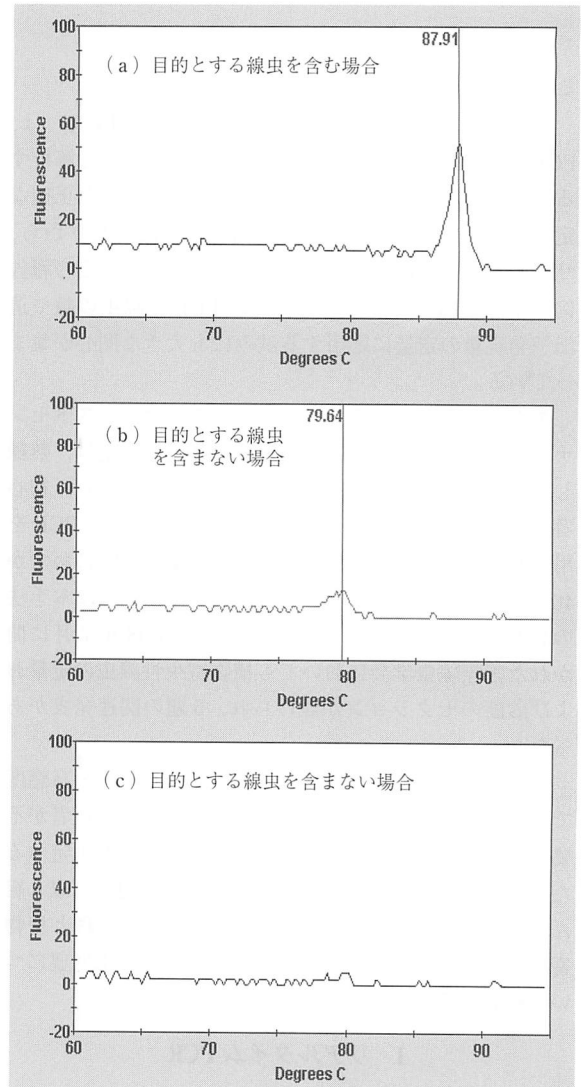


図-2 リアルタイム PCR 終了時の DNA 溶液の Tm 値—ダイズシストセンチュウの例—

ダイズシストセンチュウ用プライマー SCN を用いてダイズシストセンチュウ由来の DNA が増幅されると, その DNA 溶液は約 88°C の Tm 値*を示す (a)。標的 DNA が含まれない場合, Tm 値が検出されない (c), あるいは, 検出されても異なる Tm 値を示す (b)。* Tm 値: 2 本鎖の DNA を含む溶液において, その半量が 1 本鎖に解離する温度のこと。一般に GC 含量が高いほど Tm 値が高くなる。一定配列の DNA 溶液は一定の Tm 値を示すため, 目的とする DNA 断片が増幅されたかどうかを Tm 値から判断できる。

た(目的とする遺伝子配列を含まない場合、図-1Cのように全く蛍光強度が増加しない場合もあるが、今回のように、33～34回を超えてから増加してることがある。その場合、相対的な Ct 値の差から目的とする遺伝子の有無を判断し、Tm 値によりその確認を得ることができる(図-2))。したがって、1,000 頭に1頭しか当該線虫が含まれていなくても、リアルタイム PCR では検出できる。次いで、一定数の総線虫の中に、異なる数の植物寄生性線虫が含まれるサンプルを用意し、そこから DNA を抽出しリアルタイム PCR を行った(図-3)。サツマイモネコブセンチュウ、ジャガイモシストセンチュウ、キタネグサレセンチュウのいずれにおいてもこれら線虫の個体数と Ct 値との間に高い有意相関が認められた。したがって、これら植物寄生性線虫を含む線虫溶液から DNA を抽出し、リアルタイム PCR を行えば、未知溶液中に含まれる当該植物寄生性線虫の個体数を推定できる。

カビやバクテリアを用いたリアルタイム PCR では、目的とする微生物に対して1万倍以上の目的外微生物が存在すると検出できなくなる(LIEVENSら、2005)。したがって、検出限界は対象とする生物が全生物のバイオマス換算で0.01%以上を占めることと言える。線虫の場合、1頭の植物寄生性線虫を1万頭の線虫群の中から検出するケースは極めてまれであろうから、検出限界という点では十分な感度があると言える。ちなみに、*Caenorhabditis elegans* の雌雄同体成体の場合、959の体細胞からなり、1細胞には複数の rDNA 配列を有することから、1頭の線虫と言えども、1,000 コピー程度以上の目的とする遺伝子配列が存在する。

III リアルタイム PCR の注意点

リアルタイム PCR を用いた線虫の検出にはいくつか注意しなければならない点がある。

第1として、顕微鏡下で計数する場合には、1頭、2

頭と必ず整数であるが、リアルタイム PCR では計数する単位が対象となる遺伝子配列のコピー数になる点である。コピー数をもとに線虫数に換算するため、本来は必ず整数となるはずの線虫数が、時として1.5頭のような小数点以下を含んだ表示となる。この原因として、線虫はステージにより個体の大きさが異なるので、それに伴って細胞数も異なると予想される。キタネグサレセンチュウの例では、体長250 μm および500 μm の二期幼虫それぞれ1頭から DNA を抽出して Ct 値を比較したところ、500 μm の二期幼虫のほうが2回低くなった。つまり、細胞数が $2^2 = 4$ 倍多いと推察される。また、二期幼虫に比べると成虫では低い Ct 値となり、雄と雌を比較すると若干であるが雄のほうが低い傾向にあった。1頭当たりで比較する場合、個体の大きさに依存して Ct 値が異なると言える。したがって、図-3のような検量線を用いて、未知試料中に含まれる当該線虫数を予測するが、あくまで、その検量線作成に用いた線虫の大きさに依存した頭数であることを認識しておく必要がある。

第2に、線虫溶液から抽出 DNA の精製度合いが Ct 値に直接影響する点である。対象とする線虫溶液に目的とする植物寄生性線虫が多数含まれていても、そこから抽出した DNA の精製度が低いと、PCR 反応が阻害され、Ct 値が高くなる。そうすると、過小評価になってしまうので、通常の PCR 以上に、DNA の抽出法を工夫する必要がある。PCR-DGGE 解析に用いるために、線虫溶液からの DNA 抽出法に関する実験法が報告されているが(大場・岡田、2008)、この方法ではリアルタイム PCR に適した鋳型 DNA を抽出することができなかった。DNA 抽出にフェノール溶液が使われることが多いが、この方法も Ct 値を高くさせたため、クロロホルム抽出に変更するなど、様々な方法を試して、リアルタイム PCR に最適な鋳型 DNA の抽出法を確立した(SATOら、2007)。

第3に、表-1で既に述べたように、リアルタイム

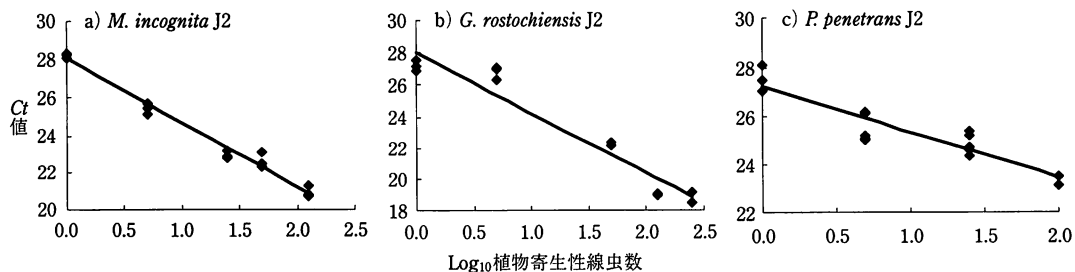


図-3 異なる数の植物寄生性線虫数 (a: サツマイモネコブセンチュウ, b: ジャガイモシストセンチュウ, c: キタネグサレセンチュウ) を含む 200～500 頭の総線虫から抽出した DNA を鋳型にした場合の Ct 値 SATO ら (2007) および TOYOTA ら (2008) から引用。

PCRに用いるプライマーの特異性の問題がある。MADANIら(2005)が報告したジャガイモシストセンチュウ用のプライマーはジャガイモシストセンチュウ由来のDNAを増幅しないが、筆者らが設計したプライマーでは両者を識別することはできない。我が国にはジャガイモシストセンチュウの報告例がないため、当面は両者を識別する必要はないと思われるが、将来、なんらかの形でジャガイモシストセンチュウが海外から持ち込まれた際には問題となる。また、ダイズシストセンチュウとテンサイシストセンチュウも識別できないため、作物の栽培履歴からどちらであるかを推定する必要がある。線虫診断の第1段階としてリアルタイムPCRを適用して、ネコブセンチュウやシストセンチュウなど植物に対して害を引き起こす有害線虫をなるべく広く検出し、もし、検出された場合には、第2段階として線虫の種を識別するPCR-RFLPなどの既存の手法を用いて詳細な同定へと進むことを想定している。

第4に、リアルタイムPCRに用いる鋳型DNAはベルマン法あるいはトレイ法により抽出された線虫群集から得ることになる点である。ベルマン法は世界中で汎用される線虫抽出法ではあるが、その抽出効率は50%程度とされる(佐野, 2004)。また、トレイ法や二層遠心浮遊法では、煩雑な操作や手間がかかる反面、ベルマン法に比べて抽出効率が高くなると言われるが、100%ではない。本来であれば、土壤中あるいは植物体中に存在するすべての植物寄生性線虫数が知りたいのであるが、それには、まず線虫を抽出しなければならない。抽出という操作が不可避である以上、あくまで抽出された線虫群集の中に、目的とする線虫が何頭存在したのかしか求めることができない。ただし、これらの問題点はリアルタイムPCRに特有ではなく、線虫抽出法に関連した課題である。この課題の克服法については岩堀らが研究中であり、筆者らの研究室でも土壤から直接植物寄生性線虫を定量する研究を開始したので、次項で紹介する。

第5に、リアルタイムPCRでは定量を目的とするため、目的とするDNA断片を増幅するだけの通常PCRとは異なる配慮が必要な点である。線虫溶液から精製したDNA抽出を用いてPCRを行った場合、目的とする線虫が存在していれば、通常PCRでバンドが得られることになる。これを3反復で行えば、すべての反復でバンドが得られる。また、PCR-DGGEでは、3反復間で全く同一のバンドパターンが得られるだろう。一方、リアルタイムPCRでは、同一のDNA抽出液から一部を取って鋳型として複数回リアルタイムPCRを行うと、Ct値で0.2~0.3回程度は異なってくる。この程度の違

いでも個体数に換算すると2~3割の違いとなる($2^1 = 2$ に対して、 $2^{1.2} = 2.3$)。通常は、線虫溶液からDNAを抽出する段階で反復を設ける。線虫溶液を2つに分け、別々にDNAを抽出し、それを鋳型にリアルタイムPCRを行うと、鋳型中に目的とする線虫が50頭程度と十分な数だけ存在していても、Ct値で0.5~1回程度の違いが生じることがあり、これを個体数換算すると4割~2倍ぐらゐの違いとなる。この程度の誤差を有する手法であることを認識しなければならない。

IV 今後の展望

上述したように、これまでのリアルタイムPCRは、土壤から抽出された線虫溶液に対して適用されてきた。国際線虫学会において、なんと20kgの土壤中のジャガイモシストセンチュウ数をリアルタイムPCRにより定量する方法が発表されたが、そこでは、あらかじめ土壤から篩い分け法によりシストを分離し、その分離したシストからDNAを抽出し、リアルタイムPCRを適用していた。つまり、土壤からシストを分離するという操作が必要であった。これに対するブレイクスルーは、土壤から直接DNAを抽出し、それを鋳型に各種の植物寄生性線虫数を定量することである。PCR反応に適したクオリティのDNAを土壤から抽出する方法に関しては、これまで数多くの研究がなされており、既に確立されたと言える(森本・星野, 2008)。しかし、土壤0.5g程度からDNAを抽出することが一般的であるため、20g土壤に数頭~数十頭が要防除水準である植物寄生性線虫を0.5gの土壤を用いて評価することが適切であると言いはない。そこで、考案したのが特製の土壤を圧密する器具である(図-4:豊田ら, 2008)。100ccの円筒コア

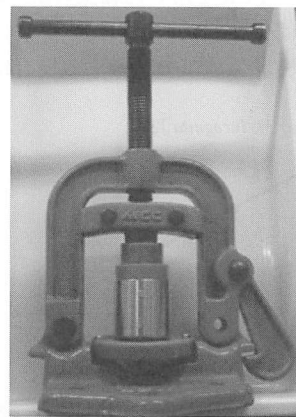


図-4 土壤を圧密し線虫を破壊するための締め器具
(大起理化学工業株式会社製)

に土壌を 20 g 程度入れ、上から圧密する。ベルマン法では 20 g 土壌を 3 反復用意することが多いため、ここでも、20 g 土壌を 3 反復供試して圧密する。この操作により土壌中に存在するすべての線虫が、二期幼虫およびシストを含めて破壊される。その後は、ブレンダーを用いて土壌をスラリー状に均一化し、常法である 0.5 g 土壌から DNA を抽出し、前述のリアルタイム PCR を行う。ダイコンのネグサレセンチュウ被害の場合、20 g 土壌に 4 頭程度が要防除水準とされるが、4 頭でも 4,000 コピー以上の標的遺伝子断片が存在する。圧密で線虫細胞がすべて破壊されたとすると、20 g 土壌に 4,000 コピーが放出されるので、ブレンダーで均一化すると、0.5 g 土壌に 100 コピーの計算となる。実際に、20 g の土壌に 4 頭のキタネグサレセンチュウ、あるいは、10 卵程度のダイズシストセンチュウ汚染土壌から、圧密法を用いて DNA を抽出し、リアルタイム PCR により両線虫を検出することに成功している。現在は、土壌から直接 DNA を抽出して植物寄生性線虫数を定量することを目指して、土壌からの DNA 抽出・精製法の最適化、リアルタイム PCR の最適化に取り組んでいる。

おわりに

我が国の主要な植物寄生性線虫である、キタネグサレセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ（アレナリアネコブ・ジャワネコブセンチュウを含む）、ジャガイモシストセンチュウ、ダイズシストセンチュウ（テンサイシストセンチュウを含む）に対するリアルタイム PCR 用プライマーを設計し、これらを定量する手法を確立した。ベルマン法等で線虫溶液を得た後、短時間で正確にこれらの植物寄生性線虫数を推定できるようになった。さらに、ベルマン法や篩い分け法を経ずに、土壌から直接定量する手法を確立中である。

今後は、この手法を用いて、フローシート（図-5）に示す新規線虫診断手法を普及させたいと考えている。ステップ 2 の精密診断は、まだまだ研究の途上であり、基礎データの蓄積が必要である。しかし、ダイコンのネグサレセンチュウ被害に対するステップ 1 の簡易診断については、この 2 年間データを積み上げてきている。その結果、作付け時の土壌（0～60 cm）中のキタネグサレセンチュウ密度と収穫時のダイコン被害度との間に高い正の相関関係があることがわかった（Sato ら、投稿中）。さらに、20 g 土壌当たり 4 頭以下の土壌では、すべて経済的な損失のないダイコンが収穫され、このレベル以下であれば、防除の必要性はないと判断された。この診断には、従来ベルマン法を用いるため、3 日間以上

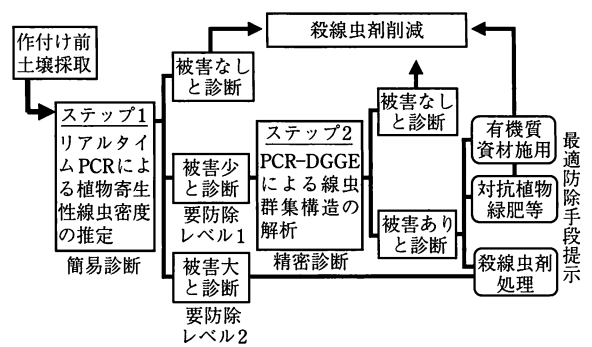


図-5 新規線虫診断のフロー

がどうしても必要とされる。しかし、開発中の圧密法を用いれば4時間で土壌中の植物寄生性線虫密度を評価できるようになる。この大幅な時間短縮は現場に普及する際に、極めて有益であると考えている。また、これ以上のレベルであれば、確率的に被害が見られることが多いため、殺線虫剤処理などの防除を施す必要があるが、若干の例では被害の生じない、いわゆる抑止土壌の存在も示唆されており、これを精密診断で予測したいと考えている。

線虫による作物被害はダイコン、サツマイモ、マメ類、ジャガイモ、トマト、イチゴ等非常に多くの種類で見られており、そのために多くの殺線虫剤が使用される。今後は、こうした殺線虫剤の使用を最少限とした環境負荷の少ない作物栽培システムが望まれる。そのためには、殺線虫剤等の防除手段の要否を判断するための、線虫被害を予測する線虫診断が不可欠である。その確立・普及に努めていきたい。

引用文献

- 1) 有賀博文 (2007) : Nippon Suisan Gakkaishi 73 : 292 ~ 295.
- 2) Goto, K. et al. : submitted.
- 3) LIEVENS, B. et al. (2005) : Environ. Microbiol. 7 : 1698 ~ 1710.
- 4) MADANI, M. et al. (2005) : Mol. Cell Prob. 19 : 81 ~ 86.
- 5) 森本 晶・星野 (高田) 裕子 (2008) : 土と微生物 62 : 63 ~ 68.
- 6) 森山達哉 (2005) : 検出と定量のコツ, 羊土社, 東京, p. 120 ~ 126.
- 7) 大場広輔・岡田浩明 (2008) : 土と微生物 62 : 69 ~ 73.
- 8) 佐野善一 (2004) : 線虫学実験法, 日本線虫学会, つくば, p. 86 ~ 88.
- 9) 佐々木博己 (2003) : PCR 最新活用マニュアル, 羊土社, 東京, p. 154 ~ 159.
- 10) SATO, E. et al. (2007) : Jpn. J. Nematol. 37 : 87 ~ 92.
- 11) ——— et al. : submitted.
- 12) 佐藤恵利華・豊田剛己 (2006) : 日本土壤肥料学会誌 77 : 157 ~ 163.
- 13) TOYOTA, K. et al. (2008) : Soil Sci. Plant Nutr. 54 : 72 ~ 76.
- 14) 豊田剛己ら (2008) : 特願 2008-039438.
- 15) ZULSTRA, C. and R. A. Van Hoof (2006) : Phytopathology 96 : 1255 ~ 1262.