

特集：有害センチュウ類の遺伝子診断技術

ネコブセンチュウ幼虫1頭からのミトコンドリア DNA 抽出法と PCR 増幅効率の検討

農林水産省横浜植物防疫所 ^{さか}酒 ^い井 ^{ひろ}啓 ^{みち}充

はじめに

ネコブセンチュウ (root-knot nematodes) は *Meloidogyne* 属に属する植物寄生性線虫であり、農業上最も重要な線虫の一つである。寄主植物の根に寄生しゴール (こぶ) を形成し、植物体の生育を阻害する。一般に、植物寄生性線虫の防除には抵抗性品種の利用や輪作などの耕種的防除法が有効であるが、適切な防除体系を築くためには、種によって異なる寄主範囲を把握するために圃場に発生している線虫の種を同定することが重要である。ネコブセンチュウの識別には、他の線虫同様、光学顕微鏡を用いた形態観察による方法が基本となるが、記載種が増加している一方で形態観察には熟練を要するため、種の識別がますます困難になってきている。また、ネコブセンチュウは輸入植物検疫において発見頻度の最も高い植物寄生性線虫であるが、検疫で発見される場合においても、得られる個体数が少ない場合や同定の基本となる成虫ではなく幼虫しか発見されない場合があり、識別に苦慮することがある。

PCR法の普及により、DNA情報を利用した種の識別法の開発が進んできている。ネコブセンチュウについては、種の識別に利用されてきた代表的な遺伝領域の一つがミトコンドリアDNAである。HARRIS et al. (1990) の報告以来情報が蓄積してきており、今後のさらなる利用が期待される場所であるが、ネコブセンチュウ幼虫1頭を用いて実施した場合のミトコンドリアDNAのPCR増幅の成功率には問題があった。このことは、この手法をルーチンワークとして採用する際の障壁となるため、筆者らは手法の問題点について検討した (酒井ら, 2007)。幼虫1頭からのPCRは、①DNAの抽出と②その抽出液を用いたPCRの大きく二つの過程から成り立っているが、これらの過程を検討した結果、DNAの抽出方法とPCR反応条件の両方において改善の余地があ

ることがわかった。ここでは、DNA抽出液の構成要素の一つである界面活性剤の重要性を中心に、得られた知見の一部を紹介したい。

I DNA抽出

PCR法により特定のDNA断片を増幅させるためには、元となるDNA (鋳型DNA) が反応に参加できる状態にしておく必要がある。対象とするDNAは細胞内に存在しているが、動物細胞からのDNA抽出には、概して、細胞膜の溶解、ヒストンなどのDNA結合タンパク質の分解並びにPCR阻害物質等の除去 (精製) が必要である。しかし、体長が1mmに満たないネコブセンチュウ幼虫1頭からDNAを抽出する場合、精製の過程でDNAの目減りが懸念されることや、精製を経なくてもPCRは阻害されないことなどから、精製を行わずにDNA粗抽出液を直接PCRに使用することが一般的である。

DNAの抽出には、①線虫虫体の物理的破壊と②化学的処理の二つの過程を経る。

(1) 物理的破壊

虫体を物理的に破壊しておくことは、組織・細胞から短時間にかつ確実にDNAを抽出するために重要である。ネコブセンチュウのミトコンドリアDNAの場合、水滴中で線虫虫体を破碎しただけの溶液を用いてもPCR増幅に成功することがあるが、結果が不安定である。このため、次の化学的処理と併せて行うほうが確実にDNAの抽出ができる。線虫の体皮を破壊し、ある程度の組織・細胞が露出できれば十分と考えられる。

虫体の破壊については、マイクロピペットのチップ先端や針などを用いる方法が多く報告されているが、筆者はより簡便な方法である「ろ紙法」を採用している (IWAHORI et al., 2000)。この方法は、スライドガラス上に滴下した微量の滅菌水中に幼虫1頭を入れ、虫体周囲の水分がほぼなくなったところで、ピンセットで上部をつまんだろ紙片 (硬めのタイプで、約1.5mm四方に切り分けたもの) で虫体を押しつぶすというものである (図-1)。作業は実体顕微鏡下で行う。ろ紙片は大量に作製してガラスシャーレなどに入れ、オートクレーブ滅

Problems and Improvements of DNA Extraction and PCR Amplification for Mitochondrial DNA from Single Juvenile of Root-knot Nematodes. By Hiromichi SAKAI

(キーワード: ネコブセンチュウ, PCR, ミトコンドリアDNA, 幼虫, 界面活性剤)

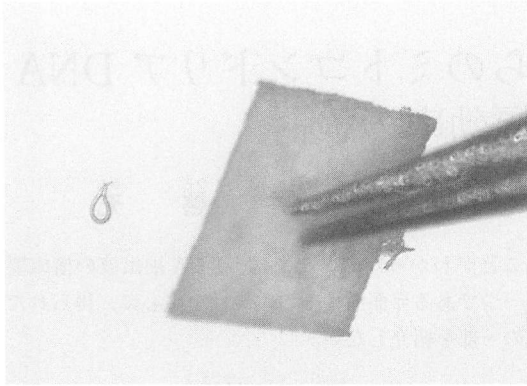


図-1 ろ紙法による幼虫の物理的破壊

菌した後乾燥させておく。つぶれた虫体が付着したろ紙片をそのまま 0.5 ml プラスチックチューブに入れた抽出液の中へ入れる。

本方法は、幼虫虫体の破壊と回収を比較的簡単かつ確実に行うことができる。筆者の経験では、次の化学的処理を適切に行えば、DNA の抽出効率に問題はない。ピペットチップを用いた破壊方法などでは、虫体破砕液をマイクロピペットで回収しなければならず、またプラスチック製のピペットチップ内壁には線虫体皮が付着しやすいため、破砕物の回収が不十分となる場合もありうる。

凍結処理が DNA 抽出効率を高める場合がある。このため、抽出過程において凍結処理を組み込んでいる研究者も多い。これは、細胞液の凍結により細胞膜が破壊されることが寄与していると考えられる。しかし、筆者の経験では、凍結処理による DNA 抽出効率の改善はわずかなものであり、あくまで補助的な操作と考えている。実際には、次の化学的処理の条件を最適化することによって DNA 抽出効率あるいは PCR の成否は劇的に改善されるため、必ずしも凍結処理は必要ではない。

(2) 化学的処理

幼虫虫体の破砕物を DNA 抽出用緩衝液に入れて一定の温度で処理することにより、DNA を PCR に利用できる状態にする。ネコブセンチュウに限らず、線虫 1 頭のみを用いて PCR を行うための DNA 抽出用緩衝液が様々に報告されているが、その構成は大きく異なることはなく、①緩衝剤、②タンパク質分解酵素、③界面活性剤などからなる。抽出用緩衝液は通常、小分けにして -20°C で凍結保存したものを使用前に室温で融解して使用することが多い。

1) 緩衝剤

Tris-HCl が常用されている。10 mM Tris-HCl (pH 8.0) がほぼ標準的な用法である。言うまでもなく、pH の急激な変化を抑えるために必要である。緩衝剤を用いなくとも以後の反応に問題がない場合もありうるが、特別な事情がない限り、使用したほうが無難である。

2) タンパク質分解酵素

汎用的な酵素である Proteinase K が常用されている。細胞膜の膜タンパク質やヒストンなどの DNA 結合タンパク質を分解させるために用いる。ただし、ネコブセンチュウ幼虫 1 頭を用いてミトコンドリア DNA を抽出する場合は、タンパク質分解酵素はそれほど寄与していないのではないかと筆者は考えている。逆に、核ゲノム DNA を抽出する場合には必須である。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ がほぼ標準的な用法だが、筆者は 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用している。

3) 界面活性剤

界面活性剤は、簡単に言えば洗剤である。分子中に親水部分と疎水部分をもつ。細胞膜を可溶化させるために用いられる。生化学的手法において頻用される SDS は強力な細胞膜可溶化能を有するイオン性界面活性剤であるが、PCR 反応を強力に阻害するため、線虫 1 頭からの DNA 抽出液を精製をせずに PCR に直接使用される場合には、SDS が通常用いられることはない。

このため、膜可溶化物質として PCR を阻害しない非イオン性界面活性剤が用いられている。Tween 20 や NP-40 などが用いられている。1% 以下の濃度で用いられることが多い。

4) その他に加える物質

上記のほかに、研究者によって様々な物質が加えられているが、抽出液に追加して加えておくべき物質として筆者が考えているのは、EDTA のみである。EDTA は DNA 分解酵素の働きを阻害するため、特別な事情がない限り添加しておくことが推奨される。終濃度 1 ~ 10 mM の範囲で加えておく。

5) 反応条件

5 ~ 20 μl の抽出液をプラスチックチューブ（筆者は 0.5 ml チューブを使用）に入れ、線虫を押しつぶしたろ紙片をその中に入れてフタを閉じる。ろ紙片がチューブの壁面に付いてしまった場合は、チューブの底を指で軽くたたき（タッピング）ことによって、ろ紙片が液面に落ちる。液面に落ちたろ紙片は、すぐに液中の底に沈む。このチューブを温度処理して反応させる。

抽出液の処理温度は、Proteinase K の反応温度を反映

させている。55～65℃で反応させることが多く、時間は1時間が標準的である。処理の最後には必ず、95℃・10分間の処理を行う。これは、その後のPCRにおいて必要なDNA合成酵素を液中に残ったProteinase Kが分解しないように、熱変性により失活させるために必要である。

温度処理を終えると、DNA抽出液の完成である。この抽出液を用いてPCR法を行うことになる。

II PCR法

国内産ネコブセンチュウについてミトコンドリアDNAのPCR法による識別法が報告されているが(ORUI, 1998), そこで用いられているのと同じPOWERS and HARRIS (1993)のプライマーによるPCRを検討した。ここで紹介する内容については, HARRIS et al. (1990)のPCR反応サイクルを用いているが, その後の検討においてPOWERS et al. (2005)の反応サイクルがより短時間で有効であることを確認したので興味のある方は参照されたい。

III 界面活性剤への着目と用法の検討

ネコブセンチュウ幼虫1頭からのPCRについて, DNA抽出時の凍結処理の組み合わせ方やProteinase Kの使用濃度などを中心に検討を行ってきたが, 結果としてたいした改善にならなかった。そこで, 界面活性剤について着目した。界面活性剤は細胞膜の可溶化という重要な役割を担っているにもかかわらず, その用法については十分最適化されていないのではないかと考え, 従来法よりも高濃度の界面活性剤の使用を検討することとした。直接PCRに用いるため, PCRを阻害しない非イオン性界面活性剤について検討した。この過程で一つ気が付いたのが, 非イオン性界面活性剤溶液を一定温度以上に温めると, 溶液が白く濁り, 最終的には2層に分離してしまうことであった。この温度は「くもり点」と呼ばれるもので, 非イオン性界面活性剤はそれぞれ特有のくもり点を有している。例えば, 筆者の用いた非イオン性界面活性剤IGEPAL CA-630 (Sigma社; NP-40アナログである)は, 1%水溶液の場合, そのくもり点は63～67℃である。くもり点以上の温度になると層分離を引き起こし, 水層部分の界面活性剤の濃度は著しく低下するため, そのような温度では非イオン性界面活性剤はDNA抽出にそれほど寄与しないことが考えられる。したがって, DNA抽出時の65℃という処理温度は高すぎる可能性がある。このため, 筆者はDNA抽出時の処理温度を50℃とした。処理時間は従来どおり1時間とし

た。また, SDSが低温で析出することはよく知られているが, 程度の差はあるものの, 非イオン性界面活性剤であっても特に凍結などの低温処理を経れば, 溶液の不均一を生じかねないと考えられた。このため, DNA抽出用緩衝液は使用前に調製してから反応に供することとし, 調製済凍結ストックは使用しなかった。

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 500 μg/ml Proteinase Kを含む溶液にIGEPAL CA-630をそれぞれ1%, 5%, 9%加えたDNA抽出用緩衝液を作製し, サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) 幼虫1頭からDNAを抽出した。その結果, 5%以上の濃度の界面活性剤を用いた場合に, PCRによる増幅が良好であった(図-2)。なお, このときのPCR1反応当たりのDNA抽出液の供試量は, 抽出全量(幼虫1頭分)の1/10であった。従来法のPCR1反応当たりの抽出

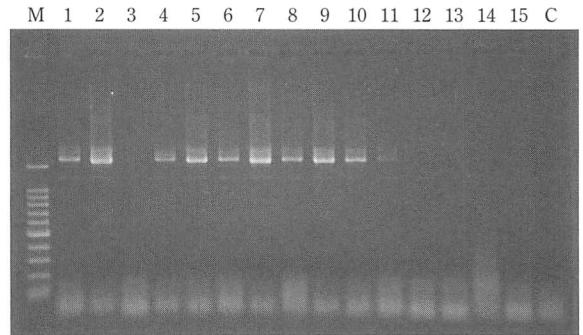


図-2 IGEPAL CA-630の濃度を変えたサツマイモネコブセンチュウ幼虫1頭からのDNA抽出液1/10量を用いたPCR

1～5:9%, 6～10:5%, 11～15:1%, M:分子量マーカー, C:対照区。

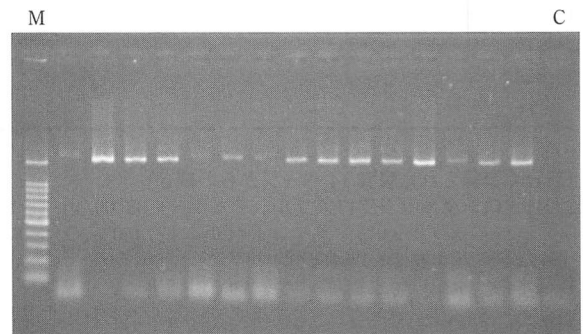


図-3 5% IGEPAL CA-630を含むサツマイモネコブセンチュウ幼虫1頭からのDNA抽出液1/20量を用いたPCR

M:分子量マーカー, C:対照区。

DNAの供試量は抽出全量(幼虫1頭分)の1/4~全量であるため、この結果は界面活性剤の濃度がDNA抽出効率ないしはPCR増幅効率に大きな影響を与えることを示している。

次に、良好な結果が得られた5% IGEPAL CA-630抽出液を用いて、DNA抽出液の供試量を半分(抽出全量の1/20量)にし、かつPCRの増幅サイクルを35サイクルから30サイクルに減らしてPCRを行ったところ、おおむね良好なPCR増幅が見られた(図-3)。このことから、界面活性剤の濃度を上げることによって、大幅な効率の向上が見込めることが期待された。

IV 高濃度界面活性剤溶液の問題点

上述のとおり、DNA抽出用緩衝液中の界面活性剤の濃度を5%以上にすることで、より効果的なPCRが行えるが、5%は濃度としては結構高いものである。高濃度の界面活性剤は言い換えればしゃぼん液のようなものであるから、PCRを阻害することはないものの、次のような扱い上の問題が生じる。

第一に、界面が活性化されて表面張力が弱まっているのに加え、気泡を生じやすくなっている。マイクロピペットによる溶液の分注や混合が難しくなり、分注量はもはや正確ではなくなり、チューブ内やピペットチップ内部が泡だらけになることもしばしばである。また、PCR産物を泳動する際も、泳動像に重大な影響はなさそうではあるが、泳動バッファーが泡立ってしまう。

第二に、低温保存に著しく不向きである。PCRの結果が良好であったDNA抽出液を再度使用するために凍結保存しておく、次回のPCRでは全く増幅が見られなくなってしまうことが往々にしてある。おそらく、低温保存の結果、溶液が不均一になっていることが原因であろう。加温していいいに再混和させれば均一になる可能性もあるが、手間がかかるうえに結果の保証がな

い。このため、5%程度の高濃度界面活性剤を用いる場合には、低温保存せずに使い切るべきである。

高濃度界面活性剤に関連して、興味深い現象を一つ紹介しておきたい。SDSは強力にPCR反応を阻害するため通常は用いられないが、SDSを含む溶液でもPCRを可能にする方法が存在する。PCR反応液中のSDSの濃度に対して50倍程度の濃度の非イオン性界面活性剤が加えられていれば、PCR反応が阻害されない(GELFAND, 1989)。DNA抽出用緩衝液には、0.1~0.5%のSDSを用いればよい。PCR反応溶液中の界面活性剤濃度は高くなってしまいが、PCR増幅には効果的であるので興味のある方は試してみるとよい。

おわりに

ここで紹介した内容は、手法改良の糸口を示しているに過ぎず、より実用的な手法を開発していく必要がある。筆者らは最近、この問題の一つの答えとして、0.1% SDSを用いたネコブセンチュウ幼虫1頭からの効果的なPCR法を考案しており(酒井ら, 2008)、現在投稿準備中である。この方法は、DNA抽出時にSDSを用いるが、DNA抽出液を精製せずに直接PCR反応に供することができ、凍結保存してもPCR増幅が安定している方法である。今後、筆者らの手法を含め、さらに多くの手によって手法が洗練されていくことを期待したい。

引用文献

- 1) GELFAND, D. H. (1989): PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, NY, p. 17 ~ 22.
- 2) HARRIS, T. S. et al. (1990): J. Nematol. 22: 518 ~ 524.
- 3) IWAHORI, H. et al. (2000): For. Path. 30: 157 ~ 164.
- 4) ORUI, Y. (1998): Appl. Entomol. Zool. 33: 43 ~ 51.
- 5) POWERS, T. O. and T. S. HARRIS (1993): J. Nematol. 25: 1 ~ 6.
- 6) ——— et al. (2005): ibid. 37: 226 ~ 235.
- 7) 酒井啓充ら (2007): 日線虫誌(講要) 37: 116.
- 8) ———ら (2008): 第52回応動昆虫大会講要: 164.

(新しく登録された農薬 14 ページからの続き)

22241: ロングキックフロアブル(デュボン) 08/09/10
クロメプロップ: 9.0%, フェントラザミド: 6.0%, ベン
スルフロンメチル: 1.4%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ,
ミズガヤツリ(東北), ヘラオモダカ, ヒルムシロ, セリ,
アオミドロ・藻類による表層はく離(北海道)

●クロメプロップ・フェントラザミド・ベンスルフロンメ
チル粒剤

22242: ホクコーロングキックジャンボ(北興化学工業)
08/09/10

22243: ロングキックジャンボ(デュボン) 08/09/10

クロメプロップ: 9.0%, フェントラザミド: 6.0%, ベン
スルフロンメチル: 1.5%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ,
ミズガヤツリ(東北), ヘラオモダカ, ヒルムシロ, セリ,
アオミドロ・藻類による表層はく離(北海道)

●クロメプロップ・フェントラザミド・ベンスルフロンメ
チル粒剤

22244: ホクコーロングキック 1 キロ粒剤 51(北興化学工業)
08/09/10

(30 ページに続く)