

特集：QoI 剤耐性菌の発生状況とその対策（水稻編）

点変異検出技術－イネいもち病菌の QoI 剤耐性変異の「1秒 PCR」による検出

農研機構 中央農業総合研究センター ^{はやし}林 ^{けいこ}敬子・^{はやの}早野 ^{ゆりこ}由里子

はじめに

殺菌剤などの農薬は病原菌の防除に有効である一方、使用薬剤に対する耐性菌出現のリスク管理を必要とする。それ故、薬剤耐性菌の発生を迅速に確認する手段の確立はリスク管理の第一ステップとして重要である。従来法である生物的検定方法は、薬剤を含む培地での培養により当該病原菌の薬剤耐性の有無を判断する直接的かつ確実な方法であるものの、培地作成や培養等、判定までに多くの時間を要する。近年では、病原菌から DNA を抽出し、耐性菌特有の DNA 配列（遺伝子型）を識別する DNA マーカーによる Polymerase chain reaction (PCR) を用いた遺伝子診断法が初動検出法として主流となってきている。耐性菌出現の原因となる蛋白質の遺伝子の変異箇所が確定している、もしくは予想できる場合には、その変異配列の遺伝子型を DNA マーカーで解析することにより、耐性の有無を迅速に検定することができる。ストロピルリン系殺菌剤（QoI 剤）耐性獲得のように、遺伝子の点変異（一塩基の違い）により蛋白質の変異を引き起こす場合がある。PCR ベースの DNA マーカーでこの一塩基の違い（点変異多型もしくは一塩基多型：SNP）を安定的に検出するには、DNA の抽出法を含め厳密な実験条件が要求される。一方で、薬剤耐性菌の遺伝子診断のように多検体を迅速に検定することが求められる場面においては、過度に厳密な検出条件では DNA マーカー利点を十分に活かすことができない。したがって、点変異を検出する DNA マーカーは、確実性に加え、検出手順の簡略化に耐えうる設計であることが必要となる。本稿では、イネいもち病菌の QoI 剤耐性菌を例に、一塩基多型（SNP）を識別する 2 種類の DNA マーカー（SNP マーカーおよび dCAPS マーカー）の構築方法とその特性について概説する。なお、本稿に掲げたマーカーの配列情報など詳細は HAYASHI et al.

(2015) を参照いただきたい。

I 開発に先立って

QoI 剤は、病原菌の呼吸器系を阻害する殺菌剤の一つで、ミトコンドリア電子伝達系複合体のチトクローム *b* の Qo 部位に作用する。病原菌は、その作用点であるミトコンドリアゲノムにコードされるチトクローム *b* 遺伝子の変異による蛋白質の構造の変化により、QoI 剤耐性を獲得することが知られている。日本で分離されたイネのいもち病菌は、チトクローム *b* の 428 番目の塩基が G（グアニン）から C（シトシン）に変異した結果、143 番目のアミノ酸であるグリシンがアラニンに変化し、感受性（野生型）菌が耐性菌へ変化することが報告されている（BARTLETT et al. 2002；KIM et al. 2003；ISHI 2012, 図-1）。今回は、このアミノ酸変異（G143A）にかかわるチトクローム *b* 遺伝子 428 番目の一塩基多型を検出ターゲットとした。

一般に、モニタリングやスクリーニングといった大量の検体の解析作業においては、DNA 抽出から判別までの一連の作業を簡略化することは、作業全体の効率化と同時に、操作上の人為的なミス軽減にも寄与する。そこで、今回の QoI 剤耐性検出 DNA マーカーの開発にあたっては、以下の点に留意して検出系の構築を行った。

- ①簡易 DNA 調整法により抽出した鋳型 DNA の利用
- ②汎用性の高いアガロースゲル電気泳動による検出
- ③ PCR 時間と回数の短縮
- ④消耗品（チューブや反応液）コストの削減

①の DNA 抽出法は作業全体のスピードを大きく左右する。いもち病菌についても簡易 DNA 調整法が数例報告されている。今回は、Paper-Disc 法（早野ら, 2015）により調整した DNA を基本鋳型として検討を重ねた。一般に、簡易抽出法により調整された DNA は低収量であることに加え、断片化や PCR 反応に悪影響を及ぼす夾雑物の混入など、低品質である。そのため、市販の抽出キットなどにより調整された DNA に比べ、簡易抽出法による DNA を用いた PCR では目的断片の増幅が悪い。目的断片が長くなるほどその傾向は顕著となる。そこで、簡易調整法による DNA を鋳型とした場合でも、

“One-sec PCR Method” for a Detection Technique of SNP in QoI-Resistance of the Rice Blast Fungus. By Keiko HAYASHI and Yuriko HAYANO-SAITO

（キーワード：イネいもち病菌，QoI 剤耐性，PCR，検出）

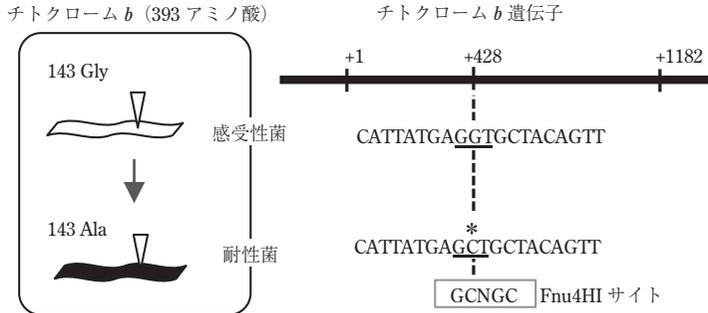
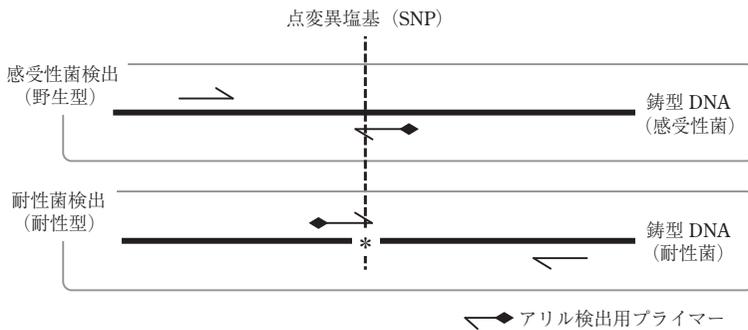


図-1 QoI 剤耐性にかかわるチトクローム *b* の変異 (アミノ酸変異と塩基変異)

a. 点変異塩基検出マーカーの設計



b. 検出パターンの模式



図-2 点変異塩基検出マーカーの設計とその検出パターンの様式

耐性菌検出パターンを例示. 耐: 耐性菌, 感: 感受性. 感受性菌検出プライマーを用いた場合, パターンは逆パターンになる.

目的断片の増幅が安定であること, かつ, 一般的で扱いやすい 2% (w/v) 前後のアガロースゲル電気泳動による検出が可能となるよう, 目的断片の長さを 100 ~ 200 bp 程度に設定することとした。さらに, 検定全体にかかわるコストダウンのため, PCR 操作や反応時間の短縮, 使用する酵素類にも考慮した。

II DNA マーカーの開発

一塩基多型 (SNP) を PCR により検出するには, 遺

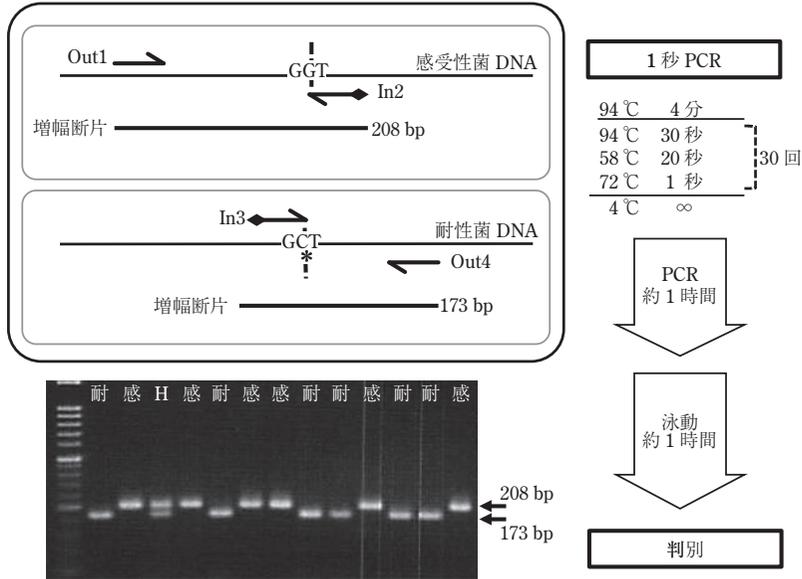
伝子型に特異的な検出プライマー (アリアル特異的プライマー) の 3' 末端が, 多型となるそれぞれ遺伝子型の一塩基に対応するように設定する (QoI 耐性菌における C と感受性菌における G: 図-2 a)。理論的には耐性菌型と感受性菌型検出プライマーはそれぞれ対応した菌の DNA を鋳型とした場合においてのみ PCR 増幅断片が得られるはずである (図-2 b)。実際には, PCR で利用される酵素 (DNA ポリメラーゼ) の誤認識により, 対応しない菌の鋳型から増幅が見られる場合 (非特異的増幅)

がある。純度、濃度とも高い DNA については、非特異的増幅を抑制する PCR 条件を比較的容易に構築することができる。しかし、DNA の質や量のばらつきが見られる簡易抽出法による鋳型 DNA では、検体すべてに適

した PCR 条件を設定することが難しく、その結果、非特異的増幅が生じ、検定結果を誤る可能性が高い。

このような非特異増幅を抑制するために、①校正（ブ

a. B428gS マーカー (SNP)



b. B428gDC マーカー (dCAPS)

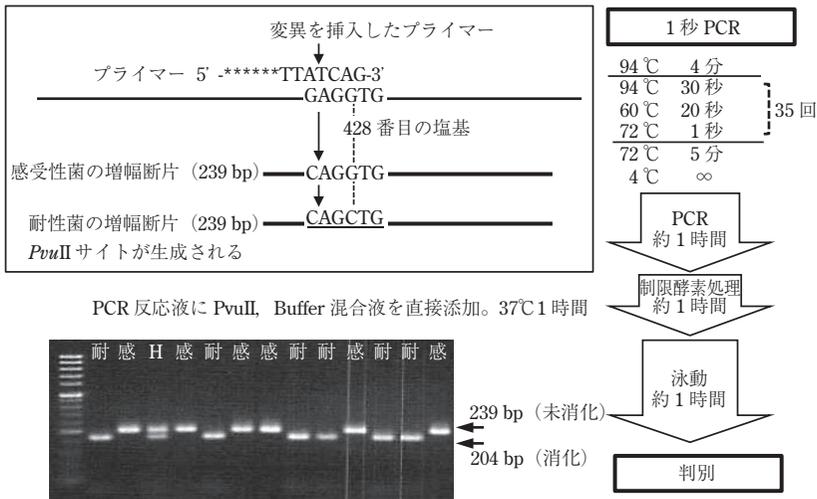


図-3 DNA マーカーと検出の流れ

a. B428 gS マーカー.

b. B428 gDC マーカー.

ともに、検出は2% (w/v) アガロース電気泳動による。

用, ②プライマーの Tm 値に対しやや高いアニーリング温度の設定, ③ PCR の伸長反応時間を短くする, 等の綿密な検討を行い, PCR 条件を最適化した。

1 SNP マーカー B428gS

上記の点に留意してプライマーの設定および PCR 条件を検討し, 耐性菌および感受性菌のそれぞれの SNP を検出する 2 マーカー (感受性菌型 Out1/In2 と耐性菌型 In3/Out4, 図-3) を設定した。In2 が耐性菌型, In3 が感受性菌型アレル特異的プライマーである。2 マーカーを独立に用いる場合, 1 検体につき PCR から検出までの作業をマーカーごとに行うため, 作業性が悪い。そこで, 1 回の PCR により両菌型の判別が可能となるようにマーカーを組合せ, 4 プライマー (Out1/In2/In3/Out4) からなる duplex マーカー B428 gS とした。

B428 gS は, 感受性菌から 208 bp, 耐性菌から 173 bp の断片を増幅する (図-3 a)。一般に, 二つの目的断片の長さの差がある程度大きいとアガロースゲル上の識別は容易になる。が, その一方, 増幅バランスが崩れ, 安定したバンドパターンを得られなくなることが考えられる。そこで, B428 gS による断片の増幅効率を同程度に保ちつつ, 2% 前後のアガロースゲル上で識別できるよう, 断片の長さの差を 30 ~ 50 bp 前後となるよう設計した。さらに, PCR の伸長反応時間を 1 秒と極端に短く設定した「1 秒 PCR」により, 非特異的増幅を抑えるだけでなく, Out1 と Out4 から増幅がされる断片 (321 bp) を抑えることに成功した。その結果, B428 gS は, 1 検体につき 1 回の, 約 1 時間 (使用機種により若干異なる) の PCR で感受性菌型と耐性菌型の両遺伝子型を泳動パターンの違いで判別できる。

2 dCAPS マーカー B428gDC

塩基変異により制限酵素認識配列の消失もしくは生成がある場合は, PCR に続き, 制限酵素処理を行い, 増幅断片の切断の可否から変異の有無を判断する CAPS マーカーの構築が可能である。変異部位と制限酵素認識配列が重複する確率は低いものの, CAPS マーカーは確実な判定結果が期待できる。イネいもち病菌では G143A 変異により耐性菌に Fnu4HI の認識配列 (GC[^]NGC) が生成される (図-1)。Fnu4HI は比較的高価で, 大量使用にはコスト負担が大きい。また, PCR 後の制限酵素処理には, PCR 反応液と制限酵素の至適塩濃度が異なる場合, PCR 後に反応液のバッファー交換作業を行って, 塩濃度を調整する必要がある。そこで, 変異部位において比較的安価で, かつ, 塩濃度調整が不要な制限酵素 (PvuII) 認識配列が生成するようプライマーに人工変異を加えた dCAPS マーカー B428 gDC を構築した (図-

3 b)。B428 gDC を用いた PCR の後 PvuII 処理を行う。両遺伝子型ともに 239 bp 断片が増幅するが, 感受性型は切断されないのに対し, 耐性菌型は 204 bp および 35 bp に切断される。B428 gDC による検出作業では, PCR 後の塩濃度調整を要せず, PCR 終了後チューブに直接 PvuII 酵素液を添加するだけで制限酵素処理反応に進めることができる。B428 gS の場合と同様に, 切断後の断片長をアガロースゲル電気泳動での判別に適した長さになるように設定した。

3 B428gS と B428gDC の利用法

B428 gS は約 1 時間程度の PCR 反応のみでアガロース電気泳動作業へ進められる。前述の通り, 非特異的断片増幅のために判定に不安がある場合や B428 gS による結果の確認には, B428 gDC を用いることを推奨する。B428 gDC は, B428 gS を用いた場合よりも制限酵素処理に約 1 時間を要するものの, 判別の精度は高まる。このように, SNP 認識メカニズムが異なる 2 種類のマーカーを使い分けることで, PCR を用いても, 確実な検定が可能となる。両マーカーによる基本的な作業はほぼ同じであり, PCR についても伸長反応時間を 1 秒に設定することで, 目的配列を確実に増幅させつつ PCR 時間は約 1 時間に短縮している。

III その他の QoI 剤耐性変異の検出に向けて

他の植物病原菌においてもチトクローム *b* の変異により QoI 剤耐性が付与されている。これまでに耐性菌の発生が報告されている病原菌 25 種類のうち, 19 種類は G143A 変異により耐性を獲得している (FRAC, 図-4)。G143A 変異のほかに, 129 番目のフェニルアラニンからロイシンへの変異 (F129L, シトシンからグアニンへの一塩基置換) や 137 番目のグリシンからアルギニンへの変異 (G137R, グアニンからアデニンへの一塩基置換) の, 一塩基置換による 2 種の報告がある (FRAC)。チトクローム *b* 遺伝子のデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 検索から, G143A 変異周辺の 9 塩基については, いもち病菌を含め多数の菌種において保存性が認められることが示されている。このことから, 今回紹介したマーカーのプライマー配列を対象病原菌の遺伝子配列に合わせ修正することにより, 対象病原菌の耐性株の検出用マーカーが容易に設計できるものと推測される。F129L 変異や G137R 変異についても, 本マーカーの開発と同様に検討すれば, 検出マーカーの作製は可能と考える。

イネいもち病菌には, G143A 変異以外に起因する QoI 剤耐性獲得の報告はまだない。しかし, シバいもち病菌

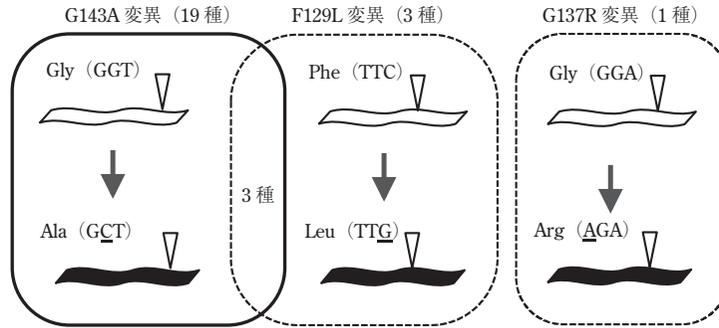


図-4 報告されている植物病原菌の QoI 剤耐性変異とその菌種数

では F129L 変異も見つかっており (VINCELLI and DIXON, 2002), F129L および G137R 変異の検出についても備える必要はあろう。遺伝子の配列から、これらの変異についても dCAPS マーカーの設定は可能である。ただし、F129L 変異については、既報の F129L 変異と同様にシトシンからグアニンへの塩基置換が生じた場合、野生 (感受性) 型菌の AvrII (BlnI) 認識配列が消失することが推測される。B428 gS を用いた PCR 液を AvrII 処理したところ、感受性型断片 (208 bp) が切断されることは確認している (未公表)。F129L 変異イネいもち病菌 QoI 耐性株は見つかっていないため、実証はできていないが、B428 gS は、F129L 変異検出のための CAPS マーカーとして利用可能であることが推測される。

おわりに

本稿では、一塩基置換により生じる QoI 剤耐性菌を検出する 2 種類の DNA マーカーおよびその開発について紹介した。本方法のターゲットであるミトコンドリア DNA はコピー数が多い。そのため、簡易法によって抽出した DNA を鋳型に用いた場合でも、非特異的増幅の抑制に求められる PCR 条件に適した十分な鋳型量を確保できた可能性が高い。アレル特異的マーカー (SNP

マーカー) は、SNP 認識メカニズムの性質上、PCR 条件の改変だけで安定な検出結果が得られない可能性がある。その場合は、抽出方法を改良し鋳型 DNA の質を向上する、または、PCR 条件の緩和に加え検出プライマーの 3' 末端近傍に人工的な変異を入れて非特異的増幅を抑制する (HAYASHI et al. 2004) などの工夫が必要となる。SNP の検出は、耐性菌検定に限らず、遺伝解析においても安定的な検出が難しい多型の一つである。したがって、確実性と安定性を十分に兼ね備え、ハイコストパフォーマンスで、かつ、汎用性の高い DNA マーカーの構築法を確立することは難しい。点変異多型の検出系の構築には、利用目的の明確化はもちろんのこと、重点および妥協可能点を整理したうえで取り組むことが求められる。

引用文献

- 1) BARTLETT, D. et al. (2002): *Pest Manag Sci* **58**: 649 ~ 662.
- 2) Fungicides resistance action committee (FRAC): <http://www.frac.info/working-group/qol-fungicides>
- 3) 早野由里子ら (2015): *日植病報* **81**: 141 ~ 143.
- 4) HAYASHI, K. et al. (2004): *Theor Appl Genet* **108**: 1212 ~ 1220.
- 5) HAYASHI, K. et al. (2015): *JGPP* **81**: 131 ~ 135.
- 6) ISHII, H. (2012): Thind TS (ed) *Fungicide resistance in crop protection: risk and management*, CABI, Wallingford, UK, p. 223 ~ 234.
- 7) KIM, Y.-S. et al. (2003): *Phytopathology* **93**: 891 ~ 900.
- 8) VINCELLI, P. and E. DIXON (2002): *Plant Dis* **86**: 235 ~ 240.