

Paper-disc 法：PCR のためのイネいもち病菌 DNA の簡易調整法

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

はじめに

現在は、イネいもち病菌の個体識別や薬剤耐性菌の遺伝子診断等の場面では、少量の DNA を鋳型にした Polymerase chain reaction (PCR) による検出法が主流となっている。遺伝子増幅酵素の改良が進む一方で、DNA の抽出法の簡略化もすすめられている。本病菌では、菌体や培地成分から溶出される PCR 反応阻害物質の影響などが不明であることから、市販のキットによる抽出が一般的である。しかし、市販キットの使用により、収量、質ともに安定した DNA が得られるが、時間とコストを要することから簡便な抽出法とは言い難い。つまり、強固な細胞壁を有する菌体からの DNA 抽出は、キットを用いても簡易には行えず、また、数回の PCR のためだけに、キットを用いることは経済的であるとは言い難い。特に、モニタリングやスクリーニングのように多検体を扱う場合は、キットを用いない簡易な DNA 調整法を開発することがコスト削減のために不可欠である。筆者らは、PCR 反応に利用可能なイネいもち病菌 DNA の簡易調整法「Paper-disc 法」を開発した（早野ら、2015）。本稿では Paper-disc 法による DNA 調整の概要およびその注意点等について概説する。

I 開発のポイント

PCR 反応液調整や電気泳動の操作段階における大幅な簡略化は難しいことから、PCR において最も重要なステップの一つが、DNA 抽出（調整）手順を効率化することである。DNA 抽出作業は対象生物である菌の特性や状態等に左右されるため、その調整には細心の注意を払う必要がある。しかし、この点をクリアできれば大幅な簡略化が可能となる。イネのいもち病菌を採取～利用するまでの一般的な作業では、①圃場から病斑を採取、②単胞子を分離、③培養・増殖、④分離菌株として保存、そして、分離菌株としてのち、様々な解析が行わ

れる。菌株の保存方法であるろ紙法は、ろ紙片を置いた寒天培地でいもち病菌を培養し、菌が付着したろ紙片を回収・乾燥、凍結させて保存する。本方法は長期間よい状態で菌を保て、検体の取り扱いや運搬等も容易である。そこで、保存用に作製される培養乾燥ろ紙片を利用し、簡便かつ安定に、多検体処理にも適した抽出方法について検討を行った。

II DNA 調整手順

Paper-disc 法による簡易 DNA 調整の操作工程は以下の通りである（図-1）。

- ①複数の滅菌ろ紙片（No.1, ϕ 6 mm, アドバンテック 東洋）を載せた 0.5% ショ糖加用オートミール寒天培地（ ϕ 60 mm）を作成する。
- ②いもち病菌片を培地の中央部に静置後、26°C で 7 日間培養する。
- ③菌体が付着したろ紙片（培養ろ紙片）を回収する。
- ④培養ろ紙片は、シリカゲル入り密閉容器もしくはデシケーター内で乾燥する。
- ⑤乾燥した培養ろ紙片を 1.5 ml マイクロチューブに入れる。
- ⑥ TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）200 μ l を添加チューブに添加する。
- ⑦遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 30 分間）する。

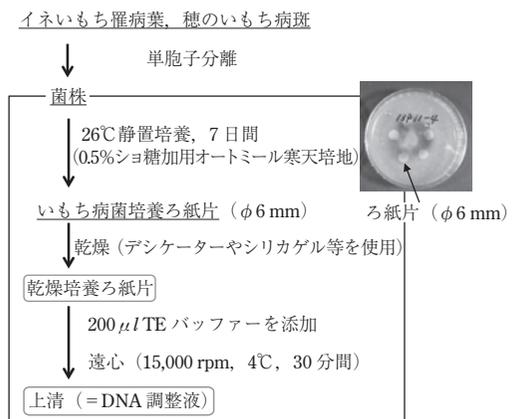


図-1 Paper-disc 法による DNA 液の調整手順

Paper-disc Method: Rapid DNA Preparation for PCR from Rice Blast Fungus. By Yuriko HAYANO-SAITO and Keiko HAYASHI

(キーワード: イネいもち病菌, DNA, 簡易調整法, PCR, Paper-disc 法)

⑧遠心上清をDNA調整液とする。

III PCR 利用への確認

Paper-disc 法により得た DNA の PCR 利用への適否についての検討結果は以下の通りである (早野ら, 2015)。すなわち, 2011 年秋田県産のイネ種子より分離されたもち病菌 6 菌株の培養ろ紙片から Paper-disc 法に従い DNA 液を調整し, PCR の鋳型とした。単コピーのシタロン脱水素酵素遺伝子 (*SDH*, Motoyama et al. 1998), 多コピーの転移因子 *Pot2* (Kachroo et al. 1994), 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 *cytb* (Wei et al. 2009) の増幅はいずれも良好であり, 本法は PCR 反応に十分な鋳型 DNA を調整できることが示された。

IV 本法のポイント

本法において重要となるポイントおよび留意点を以下にあげる。

1 培養期間と乾燥

ろ紙回収までの培養期間 (7, 10, 13 日間) を検討したところ, *Pot2* 因子, *SDH* 遺伝子ともに, DNA 調整液

として培養日数 7 日および 10 日間のものを用いた PCR では, 13 日間培養したものに比べて, より良好な増幅が見られた (図-2 a)。このことは, 培養 7 日目のろ紙における菌の状態は, 菌糸の表面は滑らかで胞子形成はほとんど認められなかった (図-2 b) のに対し, 13 日間の培養では, 多数の胞子が形成されていた。このため, 本法に用いるろ紙片は菌糸の老化が進行していない培養期間内に回収することが重要である。

また, 未乾燥培養ろ紙片より調整した DNA 液を用いた場合, 単コピーの *SDH* 遺伝子はすべての試料において増幅されなかった (図-2 a)。多コピーの *Pot2* 因子においても, 培養 7 日間の試料のみから良好な増幅が得られた。これらのことから, 筆者らの行った培養条件の場合, 7 日間程度の培養期間が適当であるとした。培養

a. TE バッファー量

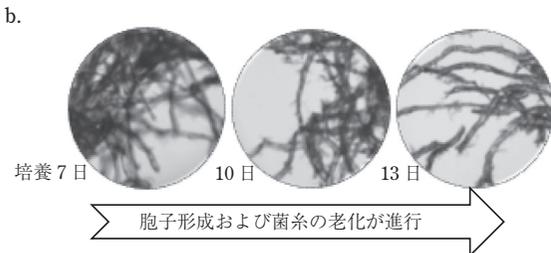
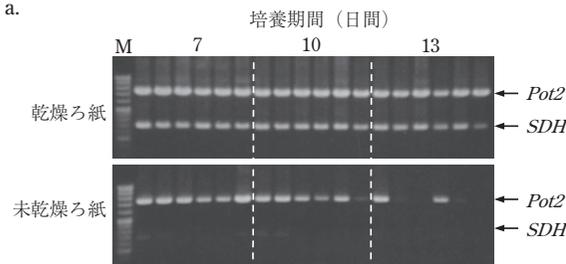
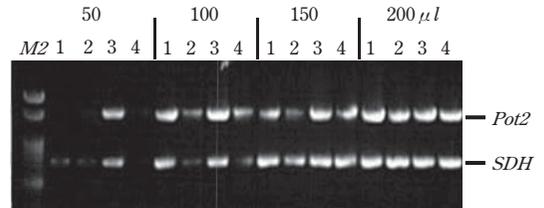
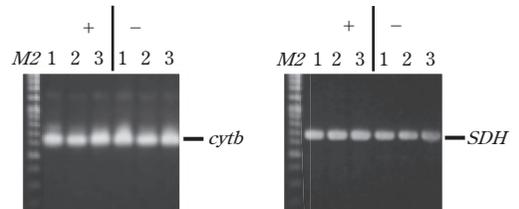


図-2 a. Paper-disc 法により調整した DNA による PCR 産物の電気泳動。各レーン異なる菌株を示す。未乾燥ろ紙では, 単コピーの *SDH* (約 0.8 kb) は全く増幅が見られず, 多コピーの *Pot2* (約 1.5 kb) も培養期間が長くなると増幅しない試料が見られる。乾燥ろ紙では, DNA 断片の増幅は安定している。M は 100 bp ラダーサイズマーカー。ゲルは 1.5% アガロース。

b. 光学顕微鏡による未乾燥ろ紙片上の菌糸の観察。

b. 遠心



c. 4°Cでの保存性

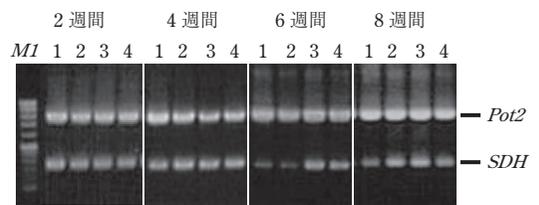


図-3 PCR 対象遺伝子, *SDH*: シタロン脱水素酵素遺伝子 (Motoyama et al., 1998: accession No. AB004741), *Pot2* (Kachroo et al., 1994: accession No. Z33638), *cytb*: チトクローム *b* 遺伝子 (Wei et al., 2009: accession No. AY245424)。+: 遠心有り, -: 遠心なし。

ろ紙片を乾燥することにより、10, 13 日間といった、より培養期間が長い試料においても目的断片の増幅が改善することから、本法において乾燥は必須の工程である。

2 TE バッファー量

調整に用いる TE バッファー量は 200 μ l が望ましい (図-3 a)。このことは 150 μ l 以下の液量では、DNA 断片の増幅は安定しなかった。抽出液量 200 μ l は、1.5 ml マイクロチューブに入れた場合、培養ろ紙片が十分に抽出液に浸漬する液量であり、使用する器具 (チューブ) において培養ろ紙片が十分に浸る液量とすることが重要である。

3 遠心

PCR 検討対象とした遺伝子の増幅は、遠心分離を省略しても可能であった (図-3 b)。しかし、遠心分離は、ろ紙からの不純物の混入を低減するために必要な工程と考えている。遠心分離を省略した場合、単コピーの *SDH* 遺伝子ではバンドが薄いことから、何らかの夾雑物の混入の影響が推測され、老廃物の少ない比較的若い菌糸状態 (7 日間培養) が適当であったことから、夾雑物の低減と除去は PCR の安定性および DNA 調整液の保存性を高めるためにも遠心分離を行うことが望ましい。

4 保存性

本法で得た DNA 液は 4℃ で 8 週間保存した場合においても、ターゲット遺伝子 *SDH* および *Pot2* の鋳型として PCR に利用することが可能である (図-3 c)。また、調整後直ちに -25℃ で凍結保存し、1 年を経過した DNA 液を用いた PCR でも、調整時と同様な良好な増幅が認められている。長期保存を望む場合は、調整後直ちに小分けにして冷凍 (-25℃) にすることを推奨する。

V そ の 他

1 多検体解析への適用

本法は、当研究チームで現在進めている SSR マーカーを利用したいもち病菌個体群動態の解析 (SSR マルチプレックス) に実際に使用している技術である。当研究チームでは、液体培養菌体から市販のキット (Ultra Clean Microbial DNA isolation kit, MO Bio 社 ; DNeasy plant mini kit, QIAGEN 社等) により DNA の調整を行ってきた。しかし、Paper-disc 法開発後、現在までに数 100 検体の DNA を調整・解析しているが、市販のキットを用いた場合と同等の解析結果を得ており、解析に支障はない。本法では、乾燥菌体培養ろ紙片さえ整っていれば、96 マイクロプレート (Assay Block 0.5 ml, コーニングジャパン) による多検体の DNA 調整も約 1 時間で終了することが可能である。

2 フィンガープリンティングへの適用

SSR マルチプレックスのほかに、rep-PCR 法 (Suzuki et al. 2006) についても、パターンが異なる 6 菌の DNA 液を調整し検討した。その結果、4 kb 以上の断片の増幅は不安定で、パターン解析に耐えるレベルにはなかった。また市販のフィルターを用いて DNA 精製やタンパク質除去を行い、DNA の純度を高めても、目覚しい改善は見られなかった。一方、すべての菌株において低分子断片 (< 3 kb) の増幅は安定していた。このため Paper-disc 法は、比較的短い断片 (< 3 kb) の増幅には適していると言える。しかし、4 kb 以上の PCR 断片を一度に複数増幅する rep-PCR 法のようなフィンガープリンティングへの適用には、さらなる検討が必要である。

3 Paper-disc 法に用いる培養ろ紙片の菌株保存性

今回提示した 7 日間の培養期間は、当研究チームで通常行っている菌株保存を目的とした場合に比べやや短い。しかしながら、培養 5 ~ 7 日間の乾燥培養ろ紙片においても菌体の保存性に問題がないことを培養により確認している。ろ紙の乾燥は、菌株保存と同様に行えばよく、特別の機材や過程を要しない。現在、菌株保存と同条件で乾燥・低温保存した乾燥培養ろ紙片 (4℃ で約 3 か月および -25℃ 約 1 年保存) を用いた場合においても PCR に問題は見られておらず保存性は高い。本法に用いる乾燥培養ろ紙片は、一般的な菌株保存作業と同条件で作製することができ、作業の効率性は高いと考える。

4 イネ葉の病斑への適用

乾燥培養ろ紙片を、イネ葉のいもち病斑に変えて検討したところ、新鮮な病斑を乾燥させたのち、本法に適用し得られた DNA 調整液は、目的断片の良好な増幅を示した。培養期間 7 日間のろ紙において観察された菌糸状態が良好な結果を示したこと、孢子には本法が適用できなかったことと合わせると、本法においては、乾燥前の菌糸状態が重要であることが推察される。本法をイネ葉の病斑に適用する際は、新鮮なものがよいと思われる。しかし病斑を直接用いた場合は、不安定要因が多くなることに留意する必要がある。

おわりに

本方法はいもち病菌が付着したろ紙片を TE バッファーに浸すだけという非常にシンプルな方法であるが、何故この方法で DNA が抽出可能なのだろうか？ 植物の場合、細胞壁を壊し、核内のゲノム DNA を溶出させるために、凍結融解やアルカリ処理を行うことにより、PCR の鋳型に必要な DNA を調整できる。本法の場合、ろ紙を培地から引きはがす際、いもち病菌の菌糸が切断さ

れ、その切断部組織から DNA が流出するのではないかと考えられる。気中菌糸や液体培養菌体をすりつぶし、本法に供試した場合、PCR の安定性が大幅に下がることから、菌体にダメージを与えすぎると DNA の収量は高まっても夾雑物による PCR 反応阻害や DNA の損傷が生じると考えられる。これに対して本法のような菌糸の部分的切断という比較的弱いダメージは、夾雑物の流出を低減しつつ PCR に必要な鋳型 DNA の確保を可能としたと考えられる。また、気中菌糸や液体培養菌体を試料とする場合に比べ、培養条件が齊一な培養ろ紙片を試料とすることは、供試菌量のばらつきを小さくしてい

るのではないかと推測され、これらの点が安定した PCR に寄与していると考えている。本法の操作性、得られた DNA 調整液の PCR の安定性および保存性は、いもち菌を用いた研究・事業に広く貢献できるものと考ええる。

引用文献

- 1) 早野由里子ら (2015): 日植病報 **81**: 141 ~ 143.
- 2) KACHROO, P. et al. (1994): Mol. Gen. Genet. **245**: 339 ~ 348.
- 3) MOTOYAMA, T. et al. (1998): Biosci. Biotechnol. Biochem. **62**: 564 ~ 566.
- 4) SUZUKI, F. et al. (2006): J. Gen. Plant Pathol. **72**: 314 ~ 317.
- 5) WEI, C. Z. et al. (2009): Pest Manag Sci **65**: 1344 ~ 1351.

登録が失効した農薬 (27.7.1 ~ 7.31)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

「殺虫剤」

- クロラントラニプロール水和剤
22414: デュボン アセルプリン (シンジェンタジャパン)
15/7/22

「殺虫・殺菌剤」

- BPMC・MEP・トリシクラゾール粉剤
21737: ST ビームスミバッサ粉剤 3DL (住友化学) 15/7/19

「除草剤」

- メトスルフロメチル水和剤
18763: 丸和サーベル DF (丸和バイオケミカル) 15/7/25

● イソウロン・DBN 粒剤

- 21744: キレイジャン粒剤 (日本農薬) 15/7/31

「植物成長調整剤」

- デシルアルコール・プトルアリン乳剤
22413: ニューファムイエローリボン (ニューファム)
15/7/22

「殺そ剤」

● リン化亜鉛粒剤

- 15142: ラテミンブロック (大塚薬品工業) 15/7/30