

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 林 敬子・早野 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；ISHII 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）