

植物防疫基礎講座：

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル 2016

(3) イネいもち病菌

—QoI 剤 (遺伝子検定法)—

農研機構 中央農業研究センター ^{すずき}鈴木 ^{ふみひこ}文彦・^{はやの}早野 ^{ゆりこ}由里子・^{はやし}林 ^{けいこ}敬子

はじめに

QoI 剤 (ストロビリリン系殺菌剤) 耐性イネいもち病菌は、2012年に国内で初めて発生が確認され、これまでにその分布域が九州から東北地方まで拡大している (宮川・富士, 2013; 石井, 2015b; 稲田・菖蒲, 2015; 櫻田, 2016)。QoI 剤の耐性菌発生リスクが高いことは以前から知られていたが、特に長期持続型の箱処理剤の普及が耐性菌の発達を速めた可能性が高い (石井, 2009; 2014; 2015a; 鈴木・早野, 2016)。本耐性菌に対する既存の遺伝子診断法 (たとえば制限酵素 Fnu4HI の消化による PCR-RFLP 法) (Kim et al., 2003; 宮川・富士, 2013) は、信頼性も高く十分に確立された技術であるが、作業効率やコスト等の面ではまだ改良の余地があると考えられた。そこで、筆者らは QoI 剤に対する耐性変異の 1 塩基多型 (SNP) を識別できる 2 種類の遺伝子診断マーカー (B428gS および B428gDC) を新たに開発した (HAYASHI et al., 2015)。

これらのマーカーの特徴の一つは、伸長反応を 1 秒まで短縮した「1 秒 PCR」であり、簡易調製法の一つである Paper-Disc 法により調製された DNA を基本鋳型として設計した。本稿では、B428gS および B428gDC の設計における考え方とその使用方法を中心に紹介する。

I 遺伝子診断マーカーの設計および検出法

国内で確認された QoI 剤耐性イネいもち病菌は、ミトコンドリアのチトクローム *b* 遺伝子の 428 番目の塩基が G (グアニン) から C (シトシン) に変異し、その結果として 143 番目のアミノ酸がグリシンからアラニンに置換 (G143A) することで耐性を獲得していた (図-1) (宮川・富士, 2013)。

Molecular Diagnostic Methods for QoI Fungicide Resistance in the Rice Blast Pathogen. By Fumihiko SUZUKI, Yuriko HAYANO-SAITO and Keiko HAYASHI

(キーワード: *Pyricularia oryzae*, 殺菌剤耐性菌, 遺伝子診断法, QoI 剤耐性)

したがって、既存法と同様に、この 428 番目の SNP を識別することがマーカー開発の目標となる。

1 duplex マーカー B428gS

チトクローム *b* 遺伝子の 428 番目の塩基を標的として、耐性菌および感受性菌のそれぞれの SNP を検出する二つのマーカー (感受性菌型 Out1/In2 と耐性菌型 In3/Out4) を設計した (図-1)。In2 は耐性菌型アリルに、In3 は感受性菌型アリルにそれぞれ特異的なプライマーである。今回、4 本のプライマー (Out1/In2/In3/Out4) をすべて組合せた duplex マーカー (B428gS) にすることで、1 回の PCR で判定することに成功した (HAYASHI et al., 2015; 林・早野, 2015)。

(1) 反応条件

PCR 反応には、ブルーフリーディング機能を有さない DNA ポリメラーゼの使用を推奨する。筆者らは、TaKaRa Taq Hot Start Version (TaKaRa Taq HS, タカラバイオ) を使用している。1 検体当たりの反応溶液の総量を 10 μ l として、10x PCR buffer を 1 μ l, 200 μ M dNTPs, 0.25U TaKaRa Taq HS, 1 μ l の鋳型 DNA (約 0.5 ~ 1 ng 程度)、4 種類のプライマー (Out1, In2, In3, Out4) をそれぞれ

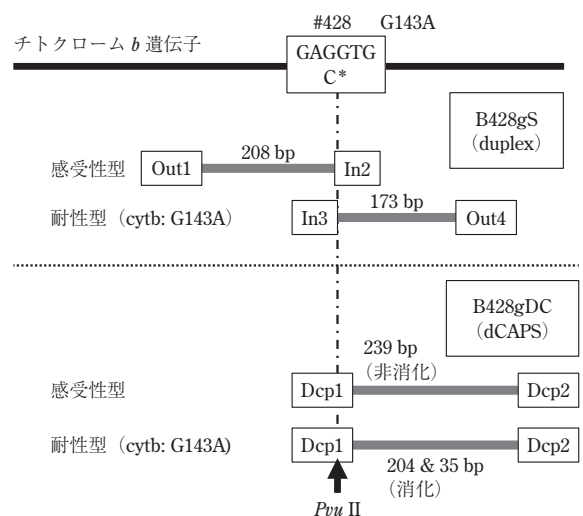


図-1 イネいもち病菌の QoI 剤耐性菌検定マーカーの設計 duplex マーカー B428gS (上) と dCAPS マーカー B428gDC (下)。

200 nM の最終濃度となるように調製する。4 種類のプライマーの配列は、Out1 (5'-ACATAGTAATACAGCTTCTGC-3'), In2 (5'-AAGATTAGTAATAACTGTAGCAC-3'), In3 (5'-GGACAGATGTCATTATGAGC-3'), Out4 (5'-ACTAAAGCAGCTAATACAAAAG-3') である。参考までに 1 検体当たりの反応溶液の調製例を表-1 に示した。

サーマルサイクラーの設定は、サイクル前熱変性 94°C・4 分に続き、熱変性 94°C・30 秒、アニーリング 58°C・20 秒、伸長反応 72°C・1 秒の 3 ステップを 30 サイクルとする。

PCR 増幅産物のサイズ確認は、0.5xTBE バッファーを用いた 2% アガロースゲル電気泳動によって行う。筆者らは、電気泳動装置 Mupid-exU を使用し、100 V で 1 時間を目安に電気泳動を行っている。電気泳動後、ゲルをエチジウムプロマイド等で染色してバンドを検出する。

(2) 判定方法

B428gS を用いた場合、感受性菌からは 208 bp、耐性

表-1 PCR 反応溶液の調製例 (10 μ l 当たり)

10 x Taq buffer	1.0 μ l
2.5 mM dNTPs	0.8 μ l
TaKaRa Taq HS (5U/ μ l)	0.05 μ l
10 μ M Primer	各 0.2 μ l
DNA	0.5 ~ 1 ng
滅菌蒸留水	up to 10 μ l

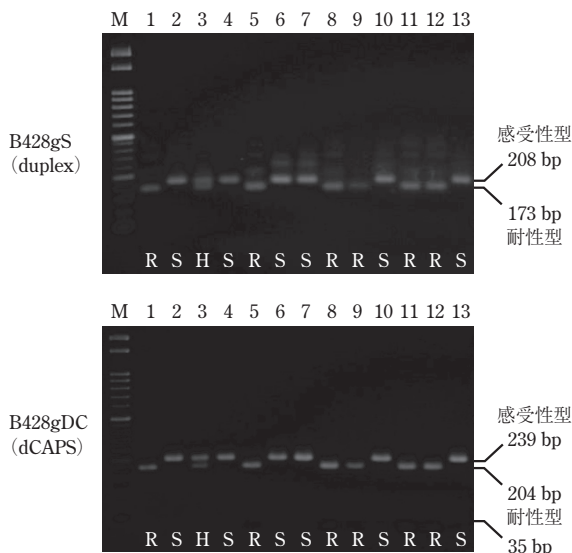


図-2 duplex マーカー B428gS と dCAPS マーカー B428gDC による遺伝子診断例

R: 耐性菌, S: 感受性菌, H: 耐性菌と感受性菌を 1:1 で混合。

菌からは 173 bp の断片が増幅される (図-2)。断片長の差を 30 ~ 50 bp 前後と比較的小さく設計することで、各断片の増幅効率を同程度に保ちつつ、一般的に用いられている 2% 前後のアガロースゲル上でも識別できる。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」によって、非特異的増幅や Out1 と Out4 から増幅される断片 (321 bp) も抑制できた。反応時間の短縮によって、B428gS を用いた PCR に要する時間は約 1 時間となり、電気泳動を含めた作業時間としても約 2 時間である。

2 dCAPS マーカー B428gDC

SNP の判定法としては、PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素によって切断し、その切断長から変異の有無を判断する CAPS (PCR-RFLP と呼ばれる) マーカーの構築が可能である。CAPS マーカーの利用には、制限酵素処理に手間が掛かるが、確実な判定結果が期待できる。イネいもち病の QoI 剤耐性菌では、G143A 変異によって制限酵素 Fnu4HI の認識配列 (GC^NGC) が生成されるため、現在は Fnu4HI を用いた遺伝子診断技術が普及している。しかし、Fnu4HI は比較的高価で、大量するにはコスト負担が大きい。また、PCR 反応液と Fnu4HI の至適塩濃度が異なるため、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った。そこで、G143A 変異部位において、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 B428gDC を構築した (図-1)。PvuII は比較的安価で、PCR 後の塩濃度調整を要せず、PCR 終了後のチューブに直接 PvuII 酵素液を添加して制限酵素処理に進むことができる。なお、dCAPS 法は duplex 法の再現性を確認したい場合に用いることを推奨する。

(1) 反応条件

反応液組成は、プライマーを除いては上述の B428gS と同様である。Dcp1 (5'-TTATGTTTTACCTTATGGACAGATGTCATTATCAG-3') および Dcp2 (5'-GAGGATTGCTTGAACCAGC-3') の 2 種類のプライマーを最終濃度 200 nM になるように調製する。

サーマルサイクラーの設定は、サイクル前熱変性 94°C・4 分に続き、熱変性 94°C・30 秒、アニーリング 60°C・20 秒、伸長反応 72°C・1 秒の 3 ステップを 35 サイクル、サイクル後伸長反応 72°C・5 分とする。

制限酵素処理は、PCR 増幅サンプルに対して 1 μ l の PvuII 酵素液 (1 \times 酵素添付バッファーで 1 U/1 l に希釈) を添加し、37°C で 1 時間処理する。

制限酵素処理後のサイズ確認は、0.5xTBE バッファー

を用いた2%アガロースゲル電気泳動によって行う。電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド等で染色してバンドを検出する。

(2) 判定方法

B428 gDC のプライマーを用いた PCR では、いったんは感受性菌および耐性菌の両遺伝子型とも 239 bp の断片が増幅されるが、PvuII 処理によって感受性菌は切断されないのに対し、耐性菌は 204 bp および 35 bp に切断される (図-2)。切断後の断片長の差異は、2%アガロースゲル電気泳動で十分に判別できる。B428gDC では、PCRに要する時間は約1時間、制限酵素処理に約1時間、電気泳動を含めた作業時間としては約3時間である。

3 Fnu4HI 消化による PCR-RFLP 法 (既存法) などの遺伝子検定法

日本でのイネいもち病菌の QoI 剤耐性菌の初確認は 2012 年であるが、シバいもち病菌においては、2000 年に同耐性菌の発生が米国で確認されている (VINCELLI et al., 2001; KIM et al., 2003)。これまで、イネいもち病菌ではチトクローム *b* 遺伝子の G143A の変異菌のみ検出されているが、シバいもち病菌では F129L と G143A の二つのタイプの変異菌が検出されており、F129L よりも G143A を持つ菌の耐性レベルが高い (KIM et al., 2003)。

両菌は遺伝的に近縁であることから、シバいもち病菌で報告のある PCR-PFLP 法を参考にして、イネいもち病菌の QoI 剤耐性菌の遺伝子診断も実施可能であった。本法では、G143A 変異により生成される制限酵素 Fnu4HI の認識配列を利用し、切断パターンから変異の有無が判定できる (KIM et al., 2003)。本法のプライマー配列などの情報については、「植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II」(日本植物防疫協会)でも紹介しているので参考にされたい (中村, 2009)。なお、同じ Fnu4HI による PCR-RFLP 法としては、BASF 社が開発した方法も利用できる (宮川・富士, 2013)。

Fnu4HI による PCR-RFLP 法は、いもち病菌に限らず多くの植物病原糸状菌や卵菌で採用されており、その実績から信頼性は高いと思われるが、難点としては、制限酵素処理に手間がかかること、制限酵素 Fnu4HI が高価であること等があげられる。

PCR-RFLP 法以外では、変異部位に特異的な蛍光標識プローブを用いた PCR-Luminex 法 (WEI et al., 2008) やパイロシーケンシング法 (STAMMLER et al., 2007) などの診断法も報告されている。なお、これらの方法を採用する際には専用の検出用機器を必要とする。

II PCR 用テンプレート DNA の調整方法

遺伝子診断における PCR 用テンプレートの調整法としては、市販のキットを用いれば確実であるが、一方でコストや作業時間等を考慮した簡易な方法も多数開発されている。例えば、いもち病菌の耐性菌診断用としては、PEX 法 (NAKAHARA et al., 1999)、マイクロウエーブ法 (GOODWIN and LEE, 1993; TENDULKAR et al., 2003; 高垣・相原, 2003)、paper-disc 法 (早野ら, 2015; 早野・林, 2015) 等の簡易法が用いられている。筆者らは、paper-disc 法を採用して作業の効率化を図っている。本法の利点は、病斑から単孢子分離によって取得した菌株の保存作業と耐性菌検定作業を並行して実施できるところである。培養ろ紙片を培地検定に用いることもできるうえ、試薬には TE バッファーしか必要としない。

留意点として、培養期間が長くなりすぎると DNA の抽出効率が低下するので、ろ紙片に菌糸が十分に行き渡るころ (目安は 7~10 日間程度) で回収する。また、

イネいもち罹病葉、穂のいもち病斑

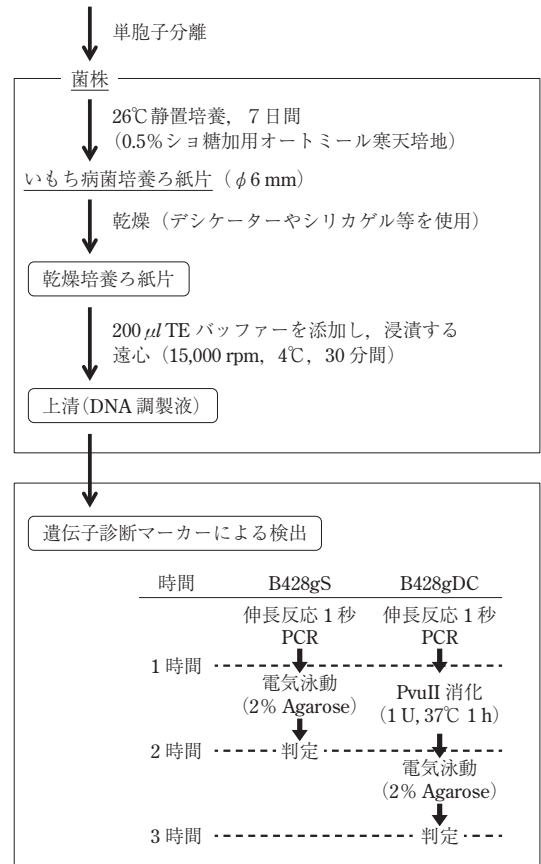


図-3 遺伝子診断作業の流れ (参考)

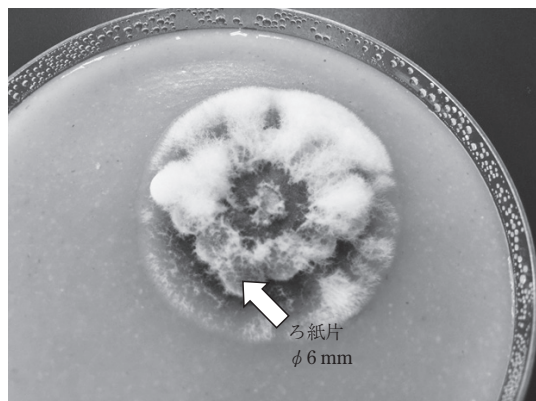


図-4 DNA抽出 (paper-disc 法) に使用する菌体培養ろ紙片写真はオートミール寒天培地 (日本 BD) を使用し、25℃で8日間培養した場合。

ろ紙は十分に乾燥してから TE バッファーを添加する。本法で調製した DNA で増幅できるバンドサイズは、2 kb 程度までである。なお、図-3 には本書で紹介した DNA 調製から遺伝子診断までの作業の流れを示した。

【DNA 調製手順 (paper-disc 法)】

- ①複数の滅菌ろ紙片 (No.1, φ6 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を作製する。
- ②いもち病菌の菌糸片を培地の中央部に静置後、26℃で7～10日間培養する (図-4)。
- ③菌体が付着したろ紙片 (培養ろ紙片) を回収する。
- ④培養ろ紙片は常法に従い、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。
- ⑥TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 200 μl を添加チューブに添加する。
- ⑦遠心分離 (15,000 rpm, 4℃, 30 分間) する。
- ⑧遠心上清を DNA 調製液とする。

III 今後の展開

耐性菌管理を実践するうえで、モニタリングの作業効率の向上は重要な課題であるが、QoI 剤と MBI-D 剤の2剤に対する耐性菌の同時判定技術が開発できればその波及効果は極めて大きい。筆者らは、野生菌型、MBI-D 剤耐性菌型 (V75 M 変異)、QoI 剤耐性菌型 (G143A 変異) の3遺伝子型を1回の PCR により判別できる

multiplex マーカーの開発を進めている (鈴木・早野, 2016)。これまでの検討では良好な判別結果が得られており、PCR の反応開始から判別までに要する平均作業時間は約2時間である。この同時判定マーカーについては、なるべく早く情報提供できるように確認作業を進めたい。

QoI 剤耐性にかかわるチトクローム *b* 遺伝子のアミノ酸変異としては、G143A 以外にも F129L, G137R が知られている (FRAC)。今回紹介した遺伝子診断マーカーは、G143A のみを対象としたが、今後、イネいもち病菌で F129L の耐性菌が発生する可能性も高いと考えられる。実際に変異菌を用いないと確認できない部分はあるが、G143A と同様の設計手法で新たなマーカーを提案できるように準備している。

DNA の調製法に関しては、今回は培養菌体を用いる実験系を基本に紹介しているが、病斑部からダイレクトに鑄型調製するなど、より迅速な遺伝子診断法の利用場面も想定される。その場合、用いる組織、葉齢、病斑のタイプ等にも DNA の抽出効率が大きく左右されるため、今後さらに検討を要する課題と考えている。

引用文献

- 1) Fungicide Resistance Action Committee (FRAC): <http://www.frac.info/working-group/qoi-fungicides>
- 2) GOODWIN, D. C. and S. B. LEE (1993): *Biotechniques* **15**: 438～444.
- 3) 早野由里子ら (2015): *日植病報* **81**: 141～143.
- 4) ————・林 敬子 (2015): *植物防疫* **69**: 569～572.
- 5) 林 敬子・早野由里子 (2015): 同上 **69**: 558～562.
- 6) HAYASHI, K. et al. (2015): *JGPP* **81**: 131～135.
- 7) 稲田 稔・菖蒲信一郎 (2015): *植物防疫* **69**: 545～548.
- 8) 石井英夫 (2009): 第19回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集, p.62～69.
- 9) ———— (2014): *日本農薬学会誌* **39**: 53～57.
- 10) ———— (2015 a): *植物防疫* **69**: 469～474.
- 11) 石井貴明 (2015 b): 同上 **69**: 549～550.
- 12) Kim, Y. S. et al. (2003): *Phytopathology* **93**: 891～900.
- 13) 宮川典子・富士 真 (2013): 第23回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集, p.25～36.
- 14) NAKAHARA, K. et al. (1999): *J. Virol. Methods* **77**: 47～58.
- 15) 中村亘宏 (2009): *植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II*, 日本植物防疫協会, p.14～16.
- 16) 櫻田史彦 (2016): 第26回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集, p.12～17.
- 17) 鈴木文彦・早野由里子 (2016): 第26回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集, p.27～36.
- 18) STAMMLER, G. et al. (2007): *J. Pestic. Sci.* **32**: 10～15.
- 19) 高垣真喜一・相原 穂 (2003): 第13回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集, p.49～57.
- 20) TENDULKAR, S. R. et al. (2003): *Biotechnol. Lett.* **25**: 1941～1944.
- 21) VINCELLI, P. et al. (2001): *Plant Dis.* **86**: 235～240.
- 22) WEI, C.-Z. et al. (2008): *Pest Manag. Sci.* **65**: 1344～1351.