

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14859

研究課題名(和文) 希少さび病菌標本の遺伝子修復と次世代シーケンサーによる時空間的遺伝子動態解析

研究課題名(英文) DNA preservation and spatio-temporal genetic analysis of rare rust fungus specimens

研究代表者

平塚 和之 (Hiratsuka, Kazuyuki)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：30202279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：さび病菌の多くは絶対寄生菌であり、試験管内培養は殆ど不可能であるため、分子遺伝学的なアプローチが困難で、植物病原体としての重要性に比して、遺伝子レベルでの研究は進んでいない。一方、多くのさび病菌は古くからさく葉標本として保存されており、それらから遺伝情報を抽出し、解析することが出来れば有用な多くの知見が得られることが期待できる。本研究では比較的菌体を得やすく、経年標本が揃っている *Stereostratum corticioides* (メダケ赤衣病菌) を用いて、DNAおよびRNA試料の抽出を試み、条件検討を詳細に行い、次世代シーケンサーを用いた大量解析に適した長鎖DNAの調製方法の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Although the importance as plant pathogens application of molecular genetics in rust fungus research has been rather limited because of the difficulties in axenic culture. On the other hand, numerous number of historical specimens of rust fungi are readily available as dried samples and the use of the dried specimens as resources of genetic information is a promising approach toward the genetic studies of rust fungus species. In this project, I selected *Stereostratum corticioides* (bamboo culm rust) because of its availability of the samples. To prepare DNA and RNA samples suitable for the mass-analysis of next-generation sequencers, I investigated the protocols and conditions for extraction methods to obtain long double-stranded DNA samples from teliospores of *S. corticioides*.

研究分野：植物病理学

キーワード：担子菌 さび病菌 遺伝子解析 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

さび病菌群は様々な高等植物の重要病原菌であり、各植物種に固有のさび病菌が寄生し、これまでに約6千種が知られている。しかし、さび病菌は培養困難な絶対寄生菌であるために、研究対象として扱いにくく、近年の分子遺伝学的手法の導入による急速な研究展開に取り残された状況となっている。申請者が所有しているさび病菌標本は、明治時代後期に平塚直治(1872-1943)によって創始された「The Hiratsuka Herbarium」所蔵のもので、その後、平塚直秀と平塚利子、さらに申請者らにより所蔵標本は逐次増補、管理され、今日に至っている。標本点数は海外産さび病菌標本約8千点と、日本列島産さび病菌約6万点にも及び、植物寄生菌類標本コレクションとしては世界的にも屈指のものであると思われる。各標本には採集場所と日時、宿主植物に関する情報が記録され、分類群ごとに保存されている。

これらの標本は、可能な範囲で貸し出し等を行い、研究者に活用されているが、その利用範囲はさび病菌分類学に留まっているのが現状である。しかし、今日の技術ではそれらの乾燥標本からDNAあるいは2本鎖RNAの抽出は可能であり、条件を検討すれば、塩基配列を解析することが可能となる。また、さび病菌標本は宿主植物体とともに保存されるので、それらの乾燥標本は、寄生菌と宿主植物の時間的・空間的な情報を伴った遺伝情報が包埋された極めて貴重な試料であると考えられる。特に、100年以上の長期間に及び時間軸を持った植物病原菌試料はさび病菌以外には殆ど存在しないと思われる。

申請者は、さび病菌の採集と分類に関する背景を有すると同時に、分子生物学実験技術に関する知見と実績を有している。さらに、さび病菌のウイルスあるいは2本鎖RNAの検出等にも過去の実績があり^{1,2)}、当該研究を実施するには最適任であると認識している。そこで、研究材料として希少価値の高い標本コレクションを有効に活用することにより、諸外国の研究者に先駆けて希少乾燥標本の遺伝子解析技術を確立し、当該分野における基礎的・先導的な研究基盤を構築したいと考えるに至った。また、研究の実施にあたっては、希少試料を供試する必要があることから、さび病菌標本の処遇に関して裁量権があり、全面的に責任を負うことが出来る立場の研究者である必要がある。従って、申請者以外に関連研究を実施し得る状況には無いと考えられる。以上の状況に鑑み、当該研究テーマを着想した。

2. 研究の目的

さび病菌は代表的な絶対寄生菌として広範囲に分布し主要植物病害として広く認識されている。しかし、殆どの場合、それらの培養が不可能であることから、分子遺伝学的方法の適応が困難であった。一方、申請者は乾

燥試料として保存されている、過去100年以上にわたる期間に及び膨大な数のさび病菌の罹病植物標本を所蔵している。本研究では、それらの乾燥標本に包埋された寄生菌と宿主植物の遺伝情報を最新のDNA修復技術、解析技術を駆使して回収・解析する手法を確立し、宿主と病原体の遺伝子動態に関する新知見を得ることを目的とする。

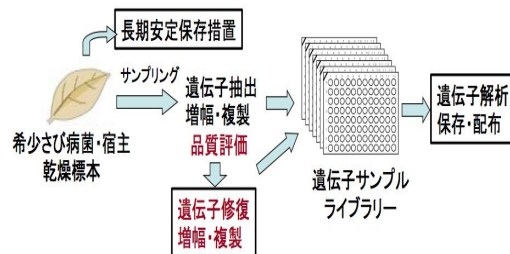
3. 研究の方法

当初の研究実施内容と目的、研究の流れは以下の通りである。

- ・さび病菌および宿主植物の希少乾燥標本試料からの遺伝情報抽出・解析技術・保存に関する知見を集積する。特にDNA損傷が顕著な経年劣化した希少標本の遺伝子情報修復を試みる。

- ・次世代シーケンサー等を駆使し、さび病菌と宿主の時間的・空間的な変異状況を解明する。

- ・国内のさび病菌研究者と連携し、さび病菌標本類を整理し、可能な限り分割して、大学、博物館等の国内関連機関に移管し保存、有効活用する。



平成28年度

1) 核酸抽出とDNA修復方法の検討

当初計画では、比較的新しいイネ科作物の赤さび病菌(*Puccinia recondita*)、ススキさび病菌(*P. miscanthi*)等入手容易なさび病菌の各種標本の菌体部分を微量量取得し顕微鏡下で破砕し、プロテイナーゼ処理と有機溶剤抽出により粗核酸抽出物を得て、さらにゲル濾過とアフィニティカラムにより精製2本鎖核酸画分を得ることを企図した。続いて、既知のリボソームRNA遺伝子の塩基配列情報に基づいて設計したPCRプライマーを用い、Nested-PCR法によりDNA増幅を行う。一連の方法は、既報の手法を踏襲するが、適宜改良する。この段階で、試料の保存状態と核酸抽出効率に関する情報が得られるものと考えられる。次に、さび病菌標本を年代別に選別し、それぞれのDNAおよび2本鎖RNA抽出を試みる。一方、DNA試料の損傷が激しいサンプルについてはDNA修復酵素を用いた系により対応する。

全く新しい着想として、相同組換え修復の仕組みを利用した、損傷DNAサンプルの修復とゲノムDNAの点変異検出を同時に行うという試みがある。これには、DNAポリメラーゼに加えて申請者らが組換えタンパク質として

現有する RAD51 および DMC1(シロイヌナズナ由来)または大腸菌 RecA を用いる。具体的には、新鮮な試料から調製した DNA を損傷が激しい乾燥標本由来の DNA サンプルに加え、上記の相同組換え酵素と補助因子の存在下で反応させ、損傷の激しい DNA サンプルを相同組換え修復させた後、PCR 反応で目的領域を増幅させる。変異点はミスマッチ塩基の検出で行う。この方法を用いれば DNA 損傷で多くの不連続点が生じているサンプルにも対応可能である。この試みが失敗に終わった場合は、DNA ポリメラーゼと DNA ligase を用いた DNA 修復系の最適化について検討を行う。

2) 2本鎖 RNA 検出法の検討

さび病菌の染色体外遺伝因子であるウイルス由来 2本鎖 RNA については塩基配列情報データは未報告である。そこで、比較的菌体を収集しやすいメダケ赤衣病菌 (*Stereostromatium corticioides*) のウイルス (Hiratsuka, et al., 1987) を抽出し、2本鎖 RNA を抽出して cDNA を合成、クローニングして塩基配列を決定する。得られた塩基配列情報を基にして PCR プライマーを設計し、RT-PCR 法により当該 2本鎖 RNA が検出できることを確認する。検出レベルを上昇させるために詳細な条件検討を行う。

Hiratsuka, K. et al., Physicochemical and serological properties of viruses from bamboo culm rust, *Stereostromatium corticioides*. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 53, 598-605. 1987

3) 標本の保存措置に関する配慮

核酸試料抽出のために希少標本を「消費」してしまうことが大きな問題点となる。そこで、いかなる場合においても供試材料は標本の最大 25% 以下にとどめ、残りは適切な保存措置を講じて現状を維持することにする。保存場所は湿度制御可能な、横浜国立大学・総合研究棟に設置した種子標本保存室とする。

平成 29 年度

1) 希少乾燥標本からの核酸抽出方法の検討
採集後 70 年程度以上経過した、比較的古いさび病菌標本を用いて核酸抽出と PCR 増幅、RT-PCR 等を実施し、さらに DNA 修復系による希少微量サンプルの増幅を試みる。前年度に検討した方法で満足な結果が得られない場合には、新たな実験手法についても検討する。

2) 試料による抽出効率、核酸試料の保存程度に関する調査

20 種類程度のさび病菌保存標本を用いて、染色体 DNA および 2本鎖 RNA の検出を試みる。核酸抽出、PCR 増幅の効率に関するデータをさび病菌標本の種類別、年代別に収集する。一連の作業は、研究支援者との共同作業により実施する。

3) 次世代シーケンサー等による塩基配列情報の取得

良好な DNA を準備できた試料(修復・増幅 DNA)は次世代シーケンサーによる、大量塩基配列決定を行う。変異検出法には修復 DNA 試料、PCR 産物のダイレクトシーケンス法によるほか、一部は次世代シーケンサーによる未増幅試料からの配列情報取得、DNA のミスマッチを認識し切断する Cell endonuclease 処理によるハイスループット変異検出システムを用いる。一連の作業は、研究支援者との共同作業により実施する。

当初は、上記の様な研究手法を用いることを企図したが、DNA シーケンサーの方法論のアップデートにより、PCR 増幅を経ない長鎖 DNA を用いる方法が、より優れており、本研究の関連研究においても、長鎖 DNA を用いる方法が望ましいと判断した。そこで、本研究では直接 NGS 解析に持ち込める質の高い長鎖 DNA の取得を目指すこととした。基本的な抽出方法は変わらないが、実験手順において、長鎖 DNA の断片化を避けることに留意して、剪断力の発生回避に配慮した操作を行った。

4) 希少標本の保存方法、DNA データおよび DNA 試料の取り扱いと運用方法に関する検討

乾燥標本に関しては、従来の紙パウチャーを用いた方法は現状保持しつつ、分割可能な試料に関しては、より長期にわたる保存に対応可能な方法について検討する。具体的には、乾燥・嫌気密封あるいは密封凍結保存などを試みる。一方、各種データの取り扱いに関しては、学内の専門家に助言を仰ぎ、GIS 化等も含めてデータベース化し、当該研究の今後の展開に備えるとともに、他の研究者に対して暫時公開する。一連の作業は、研究支援者との共同作業により実施する。

4. 研究成果

平成 28 年度においては、比較的材供給に余裕があるメダケ赤衣病菌 (*Stereostromatium corticioides*) を用いた微量サンプルからの効率よい核酸抽出方法について検討した。具体的にはシリコンコートしたカバーグラス中に抽出用緩衝液と胞子を混合し、顕微鏡で検鏡しつつ圧着し対象をつぶす操作により、微量サンプルからの核酸抽出を行った。その結果、PCR 増幅可能な DNA サンプルを得ることが出来た。しかし、この方法では、得られる DNA の量にばらつきが大きいことが判明し、その解消のためにはさらなる検討が必要であると思われた。一方、染色体外遺伝因子として重要なウイルス由来の二本鎖 RNA の検出を試みたところ、新鮮なサンプルからは期待通りの分子が回収されたが、古い乾燥標本からの抽出は十分なサンプル量をもちいたにもかかわらず成功せず、それは極めて困難であると思われた。今後は抽出方法や緩衝液系を十分検討し、改良する必要がある。当年度の実験では当初予定していたイネ科

植物のさび病菌サンプルの確保が困難であることが判明したため、メダケ赤衣病菌を中心として検討したが、DNA 試料の確保はほぼクリアできたと判断した。一方、乾燥標本の維持と整理も重要な問題となるが、よりコンパクトに長期間の保存に耐える方法について検討を開始した。残念ながら、最適な方法を決定するには至らなかったが、将来的にも数十年以上の劣化に対応する必要があることは明らかなので、今後も引き続き保存方法に関する情報収集を継続して行うべきであると考えられた。

平成29年度は、昨年度に引き続き、比較的材料供給に余裕があるメダケ赤衣病菌 (*Stereostromum corticioides*) を用いた微量サンプルからの効率よい核酸抽出方法について検討するとともに、次世代シーケンサー (NGS) を用いた DNA 解析に必要とされる、長鎖 DNA の取得方法について集中的に検討を加えた。当年度採集した、比較的 新鮮なメダケ赤衣病菌の冬胞子を用い、ガラスホモジナイザーによる磨砕、あるいは乳鉢による磨砕で、SDS と Proteinase K を含む抽出緩衝液による DNA 抽出を試み、それらの収量と品質についてアガロースゲル電気泳動を用いて調査した。その結果、ガラスホモジナイザーを用いた場合では DNA の断片化が顕著であり、望ましい品質の DNA 試料を得ることは困難であること。乳鉢を用いた方法では効率良い DNA 抽出は難しく、DNA の収量はガラスホモジナイザーを用いた場合と比較して著しく劣ることなどが判明した。DNA 抽出効率が悪いのは乾燥標本で顕著であり、PCR 増幅無しで NGS を用いた解析を実施するのは極めて困難であると考えられた。今後は抽出緩衝液の組成と、破砕方法について十分な検討が必要であり、穏和な冬胞子の破砕方法の開発が必須であることが認識された。昨年度に検討した、染色体外遺伝因子として重要なウイルス由来の二本鎖 RNA の検出を試みたが、今年度採集したサンプルからはアガロースゲル電気泳動では明瞭なバンドが確認できず、予想外の結果となった。過去の研究結果 (1985-1990 年に本研究代表者が実施) では日本国内で採集された全てのメダケ赤衣病菌から ウィルス粒子が検出されており、それらの分布は普遍的であると思われたが、本年度の標本からは検出出来なかった。今後引き続き調査を続け、ウィルスの在否とそれらの分布について調べることで、本菌のウィルスに関する新知見も得られる可能性がある。

以上を要するに、本研究では、当初想定していた実験は成功したとは言えず、技術的打開に関する問題点を明らかにするに留まり、期待した成果を得ることは出来なかった。しかし、本研究課題の実施により、さび病菌標本の取り扱いと、顕微鏡装置等の整備が進み、今後のフォローアップ研究の基盤形成には大きく貢献することが出来た。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.plantech.ynu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 和之 (HIRATSUKA, Kazuyuki)

横浜国立大学大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：30202279

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし