

植物共存糸状菌の群集構造解析法の確立に向けた

選択的遺伝子増幅法に関する研究

池永 誠¹, 田淵 雅和², 赤木 功¹, 境 雅夫¹

1) 鹿児島大学 農学部 生物資源化学科

2) 鹿児島大学 大学院農学研究科 生物資源化学専攻

〒890-0065 鹿児島県郡元 1-21-24, ☎ 099-285-8660

要旨

糸状菌の群集構造を迅速かつ簡便に解析する方法は未だ確立されておらず、その活用研究は遅れている。特に植物共存糸状菌の DNA を PCR して群集構造を解析する分子生態学的研究では、宿主植物の DNA が過剰に増幅され、群集構造が過小評価される重大な問題が存在する。本研究では、この問題に対して突破口となり得る技術を Locked Nucleic Acid (LNA) 技術を用いて開発し、植物共存糸状菌の群集構造を正しく評価する研究手法の確立を目的とした。手法の確立に際して本研究では、糸状菌に特異的な LNA プライマーと、LNA オリゴヌクレオチドを用いて植物遺伝子の増幅を抑制する PCR クランプ法を適用した。糸状菌に対してカバー率の高いプライマーを検討した結果、フォワード側では ITS1F が LNA プライマーとして、リバース側では ITS4 と競合する位置に LNA オリゴヌクレオチドを設計できる事がわかった。次に、植物共存糸状菌の ITS 領域を増幅したところ、従来の増幅法では宿主植物の ITS 領域が主要な産物がであったのに対し、設計したこれらを用いる事で、宿主植物の増幅を抑制し、糸状菌の選択的な増幅が可能となった。本研究の成果は、植物共存糸状菌の群集構造を正しく評価する有効な手法として、積極的な活用が期待される。

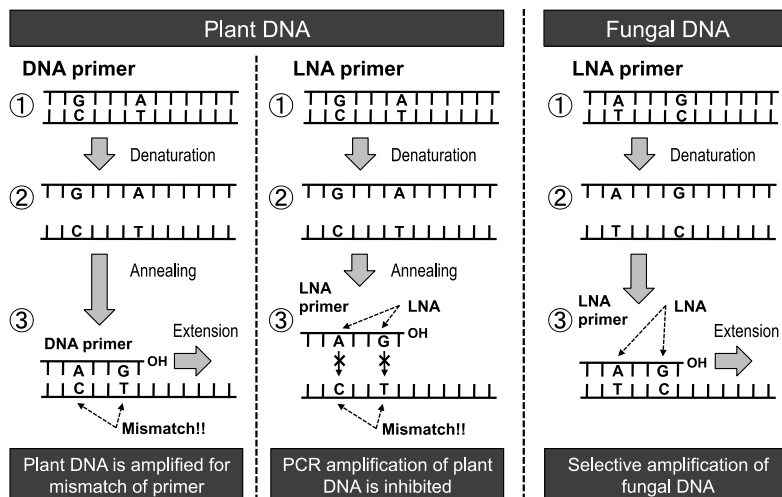
1 緒言

植物共存糸状菌が、植物の生育に対して重要な働きをしていることは古くから知られている。植物共存糸状菌の機能には、病原抵抗性の賦与、可吸態窒素の供給、リンの可溶化、重金属耐性の賦与などが報告されており、こうした有益な機能を植物栽培に農業利用するためには、その群集構造を把握する事が不可欠である。糸状菌の群集構造解析には、これまで主に培養法が用いられてきた。しかしながら、糸状菌には培養困難なものが大半を占める他、生育速度の速い糸状菌のコロニーに培地表面が覆われて他の糸状菌の生育が抑制されてしまい、群集構造が過小評価される問題が存在していた。他方、培養法に依存しない分子生態学的手法は、植物試料から直接 DNA を抽出して標的遺伝子の PCR 増幅を行った後、群集構造解析を行うため、培養法のような制限がかからず、近年の群集構造解析に威力を発揮している¹⁾。

分子生態学的手法による糸状菌の群集構造解析には、Small Sub-Unit (SSU) rRNA 遺伝子と (Large Sub-Unit) LSU rRNA 遺伝子の間に存在する Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域がバーコード領域として利用されている²⁾。ところが、植物試料由来の抽出 DNA を PCR に用いた場合、糸状菌以外に宿主植物の DNA が過剰に含まれているため、プライマーのミスマッチによって宿主植物の ITS 領域が過剰に増幅される重大な問題が存在する³⁾。従って、宿主植物の ITS 領域の PCR 増幅を抑制する一方で、植物共存糸状菌の ITS 領域を選択的に増幅する事ができれば、群集構造解析法の確立に向けた画期的な突破口となり得る。そこで本研究では、この問題点を考慮し、次の理論で説明する LNA プライマーと LNA オリゴヌクレオチドを用いた PCR クランプ技術を適用し、植物共存糸状菌の ITS 領域の選択的な PCR 増幅法の開発を試みた。

2 理論

Locked nucleic acid (LNA) は、核酸の糖分子内に架橋構造を持つ人工核酸である。通常の核酸は化学構造上の自由度が大きいため、DNA/DNA の二重鎖形成において熱力学的に不利になっている。他方、LNA は自由度を架橋で拘束しているため、LNA プライマーや LNA オリゴヌクレオチドは、通常のそれに比べ、1) *Tm* 値が高く、2) LNA 塩基に対して相補的な塩基がミスマッチしているとアニーリングしない、という特徴を示す⁴⁾。従って、ミスマッチが生じる塩基を LNA に置換して LNA プライマーを設計する、或いは、プライマーのアニーリング部位と競合する位置に宿主植物に



特異的な LNA オリゴヌクレオチドを設計し、高温でプライマーよりも先にアニーリングさせてブロックすれば、Fig. 1 及び Fig. 2 に示した理論により、植物共存糸状菌の ITS 領域の選択的な PCR 増幅が可能となる。

Fig. 1 Mechanism of selective amplification of fungal DNA (ITS region) by LNA primer

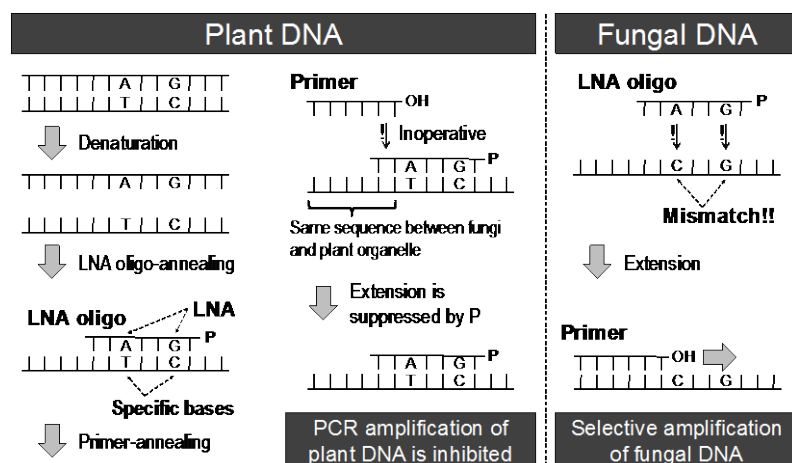


Fig. 2 Mechanism of selective amplification of fungal DNA (ITS region) by LNA oligonucleotide – PCR clamping technique

3 実験

3-1: 供試試料の調整および DNA 抽出

供試試料として主要作物の一つであるコムギ (*Triticum aestivum* cv. Chikugoizumi) を用いた。土壌 1kg あたり、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 2g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ を 2g、KCl を 0.8g 化学肥料として加えた土壌を 1/5000a のポットに 3kg 詰め、発芽した種子を植え付けた。5 日間栽培し、約 20 本分の植物根を採取した。採取後、0.05% SDS 及び滅菌水で根を洗浄し、乳鉢と乳棒を用いて磨り潰した。DNA 抽出には、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon OH, USA) を用い、抽出 DNA は Power Clean DNA Clean-UP Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) を用いて精製した。

3-2: LNA プライマーおよび LNA オリゴヌクレオチドの設計可能な部位の検討

糸状菌の ITS 領域を選択的に PCR 増幅するため、フォワード側では、ITS9mum、NS1、ITS1F、ITS5 および ITS1 の 5 種のプライマーを検討した。また、リバーズ側では、ITS4S、ITS4、LR1、ITS4A、ITS4B、ITS8mum、R377 および LR2 の 8 種のプライマーを検討した。これらのプライマーと NCBI の DNA データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からダウンロードした当該箇所を含む糸状菌とコムギの配列を、CLUSTAL W version 1.7 を用いてアライメントし、BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) でギャップを取り除いて編集後、LNA プライマーおよび LNA オリゴヌクレオチドの設計可能な部位を検討した。

3-3: LNA プライマーおよび LNA オリゴヌクレオチドの設計

アライメントの結果、LNA プライマーが設計可能な場合、即ち、プライマーのアニーリング部位の配列において糸状菌とコムギで異なる塩基が数カ所ある場合は、糸状菌に特異的な塩基を LNA に置換して LNA プライマーを設計した。その際、LNA に置換する塩基は、5'末端や 3'末端に偏らず、均等に分布するように配置した。LNA オリゴヌクレオチドの設計に関しても同様に、アライメント後、プライマーのアニーリング部位から伸長方向にシフトした位置の配列において糸状菌とコムギで異なる塩基が数カ所ある場合、コムギに特異的な塩基を LNA に置換して LNA オリゴヌクレオチドを設計した。その際、LNA プライマーと同様に、LNA に置換する塩基は均等に分布するように配置した。また、PCR 中に伸長反応が生じないようにするため、3'末端をリン酸化した。

3-4: ITS 領域の PCR 増幅

LNA プライマーと LNA オリゴヌクレオチドの設計に用いた当該プライマーを用いて PCR 増幅を行った。PCR 増幅には、当該プライマーのみと、LNA プライマー及び LNA オリゴヌクレオチドを適用したケースを用意し、植物共存糸状菌 ITS 領域の選択的な PCR 増幅の効果を比較・検討した。PCR 条件は次の通りである；94 °C分 (プレラン) を 1 サイクル、94 °C分 (熱変性) 70 °C分 (LNA オリゴヌクレオチドのアニーリング) 55 °C分 (プライマーのアニーリング) 72 °C分 (伸長) を 40 サイクル、72 °C分を 1 サイクル。PCR 後、増幅産物の一部を 1.5% アガロースゲルに電気泳動し、UV 照射下で泳動結果を写真撮影した。

4 結果および考察

4-1: プライマーのカバー率の比較

分子生態学的手法を用いて群集構造解析を行う際は、通常、カバー率の高いプライマーを使用する必要がある。このため、糸状菌の群集構造解析によく用いられているプライマーを取り上げ、そのカバー率を調べた。フォワード側において ITS9mum、NS1、ITS1F、ITS5 および ITS1 の 5 種のプライマーを調べた結果、ITS9mum は 99.0%、ITS1F は 89.8% と他のプライマーに比べ高いカバー率を示した⁵⁾。また、リバーズ側で ITS4S、ITS4、LR1、ITS4A、ITS4B、ITS8mum、R377 および LR2 の 8 種のプライマーを用いて調べたところ、比較的高いカバー率の高かったものは ITS4 と ITS8mum で、それぞれ ITS4 は 97.2%、ITS8mum は 62.4% であった⁵⁾。

フォワード側の ITS9mum は ITS1F に比べカバー率が高かったものの、Fig. 3 に示したように、ITS9mum は糸状菌とコムギで配列に違いが認められず、LNA プライマーの設計は困難であった。また、伸長方向側にシフトした位置の配列においても違いは 1 塩基のみであったため、LNA オリゴヌクレオチドの設計は困難と考えられた。一方、ITS1F は糸状菌に対して特異性の高くなるように設計されており、Fig. 4 に示したように、プライマーのアニーリング部位において糸状菌とコムギの配列を比較したところ、糸状菌に特異的な塩基が数箇所認められた。伸長方向側の配列は他のプライマーを設計している領域でもあり、配列の保存性が高いことから、LNA オリゴヌクレオチドの設計は困難であった。以上より、フォワード側では、ITS1F の配列を用いて糸状菌に特異的な塩基を LNA に置換し、LNA プライマーを設計するのが妥当と判断された。

ITS9mum		TGTACACACCGCCCGTCG	↓ Specific for Plant
Wheat	AY049040	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> CCTACCGATTG	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KJ806314	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> ACTACCGATTG	Sequences are divergent here
<i>Aspergillus oryzae</i>	KJ814466	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> ACTACCGATTG	
<i>Fusarium graminearum</i>	XR_893049	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> ACTACCGATTG	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	JN939440	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> ACTACCGATTG	
<i>Puccinia graminis</i>	AY125409	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> ACTACCGATTG	
<i>Glomus macrocarpum</i>	KC182043	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> ACTACCGATTG	
<i>Acaulospora laevis</i>	FM876783	<u>TGTACACACCGCCCGTCGCT</u> ACTACCGATTG	

Fig. 3 Alignment data of ITS9mum and relevant sequences of wheat and representative fungi.


ITS1F		 CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Specific for Fungi, Converted to LNA bases to design LNA primer
Wheat	HG670306	<u>CTTATCATTAAGTGGAAAGGAG</u> AATTCGTAATAAGGTTCCGTAGGT	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GQ458028	<u>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA</u> AAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGT	
<i>Aspergillus oryzae</i>	EU301638	<u>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA</u> AAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGT	
<i>Fusarium graminearum</i>	KJ017740	<u>CTCGGTCATTTAGAGGAAGTAA</u> AAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGT	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	JN939495	<u>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA</u> AAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGT	
<i>Puccinia graminis</i>	EU014046	<u>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA</u> AAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGT	
<i>Glomus macrocarpum</i>	KC182043	<u>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA</u> AAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGT	
<i>Acaulospora laevis</i>	FN547509	<u>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA</u> AAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGT	

Fig. 4 Alignment data of ITS1F and relevant sequences of wheat and representative fungi.

リバーズ側については、Fig. 5 及び Fig. 6 に示したように、ITS4 と ITS8mum のアニーリング部位は、いずれも糸状菌とコムギで特異的な塩基が認められず、LNA プライマーの設計は困難であった。しかしながら、ITS4 については、伸長方向側のシフトした位置の配列においてコムギに特異的な塩基が存在しており、LNA オリゴヌクレオチドの設計が可能であった (図 5)。ITS4 は ITS8mum よりもカバー率が高く、その値も十分であった事から、リバーズ側において ITS4 と競合する位置にコムギに特異的な LNA オリゴヌクレオチドを設計する事にした。

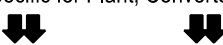
ITS4		Specific for Plant, Converted to LNA bases to design LNA oligo
ITS4 LNA oligonucleotide		 GGCTACCCGCTGAGTTTAAAG
Wheat	AY04904	<u>GGCTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</u>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KM029995	<u>GGAGTACCCGCTGAAC</u> TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
<i>Aspergillus oryzae</i>	KP256849	<u>GGGATACCCGCTGAAC</u> TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
<i>Fusarium graminearum</i>	KM056322	<u>GGAA</u> TACCCGCTGAAC <u>TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</u>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	KM085009	<u>GGGCTACCCGCTGAAC</u> TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
<i>Puccinia graminis</i>	KC853413	<u>GGACTACCCGCTGAAC</u> TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
<i>Glomus macrocarpum</i>	KC182043	<u>AGAA</u> TACCCGCTGAAC <u>TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</u>
<i>Acaulospora laevis</i>	KM078598	<u>AGAA</u> TACCCGCTGAAC <u>TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</u>

Fig. 5 Alignment data of ITS4 and relevant sequences of wheat and representative fungi.

ITS8mun	No specific bases between wheat and fungi	TAGTAACGGCGAGTGAAG
Wheat	AY04904	AAGAACTAACAAGGATTCCCT <u>TAGTAACGGCGAGCGAAC</u>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KM029995	AAGAAACCAACCGGGATTGCCT <u>TAGTAACGGCGAGTGAAG</u>
<i>Aspergillus oryzae</i>	KP256849	AAGAAACCAACCGGGATTGCCT <u>CAGTAACGGCGAGTGAAG</u>
<i>Fusarium graminearum</i>	KM056322	AAGAAACCAACAGGGATTGCCCT <u>TAGTAACGGCGAGTGAAG</u>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	KM085009	AAGAACTAACAAGGATTCCCT <u>TAGTAACGGCGAGTGAAC</u>
<i>Puccinia graminis</i>	KC853413	AAGAACTAACAAGGATTCCCT <u>TAGTAACGGCGAGTGAAG</u>
<i>Glomus macrocarpum</i>	KC182043	AAGAAAATAACAATGATTCCCT <u>TAGTAACGGCGAGCGAAG</u>
<i>Acaulospora laevis</i>	KM078598	AAGAACTAACAAGGATTCCCT <u>CAGTAACGGCGAGTGAAC</u>

Fig. 6 Alignment data of ITS8mum and relevant sequences of wheat and representative fungi.

4-2: LNA プライマーおよび LNA オリゴヌクレオチドの設計

Fig. 4 のアライメントの結果より、ITS1F のアニーリング部位において、5'末端から 2 番目、4 番目、5 番目、14 番目、20 番目、22 番目の塩基が、糸状菌とコムギで異なっていた。そこで、糸状菌に特異的な方の塩基を LNA に置換して LNA プライマーを設計した。設計した LNA プライマーは ITS1F LNA プライマーと名付け、配列は次の通りであった；5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'（下線部は LNA に置換した塩基）。

他方、LNA オリゴヌクレオチドの設計については、Fig. 5 に示したように、ITS4 の伸長方向側にシフトした位置の配列において、左から 3 番目、4 番目、15 番目、16 番目の塩基がコムギと糸状菌で異なっていた。従って、コムギに特異的なこれらの塩基を LNA に置換して、LNA オリゴヌクレオチドを設計した。設計した LNA オリゴヌクレオチドは ITS4 LNA オリゴヌクレオチドと名付け、配列は次の通りであった；5'-CTTAAACTCAGCGGGTAGCCp-3'（下線部は LNA に置換した塩基で、p はリン酸化）。また、 T_m 値は 71°C で、ITS1F LNA プライマーと ITS4 プライマーの T_m 値（いずれも 60°C）よりも高かったため、プライマーが機能しない温度でのアニーリングが可能と判断された。

4-3: 植物共存糸状菌 ITS 領域の選択的 PCR 増幅

コムギ根から抽出した DNA を用いて PCR 増幅を行った。なお増幅の際、設計した LNA プライマーと LNA オリゴヌクレオチドによる PCR クランプ技術の効果を比較するため、これらを使用しない従来通りの PCR も併せて行った。Fig. 6 の電気泳動の結果、従来通りの PCR 法では、糸状菌の ITS 領域の PCR 産物が得られたものの、宿主植物のそれが主要な産物として検出された（レーン 1）。ITS1F は糸状菌に特異的なプライマーとして設計されているにも関わらず、宿主植物の ITS 領域が主要な PCR 産物として得られた結果は、ミスマッチによって抽出 DNA 中に含まれる宿主植物の DNA が過剰に増幅されていることを意味している。他方、LNA プライマーと LNA オリゴヌクレオチドによる PCR クランプ技術を適用した場合には、宿主植物の ITS 領域に由来する増幅産物は確認されず、糸状菌の増幅産物のみが検出された（レーン 2）。以上の結果より、本研究で確立した技術を植物共存糸状菌の群集構造解析に適用する事によって、これまで困難であった糸状菌 ITS 領域の選択的な PCR 増幅が可能となった。

今後は、この選択的に増幅した PCR 産物を DGGE 法や次世代シーケンスなどの群集構造解析に用いる事により、群集構造を正しく評価できるようになると考えられる。また、今回使用した植物はコムギのみであったため、本手法の適用範囲を広げるため、種々の植物に適用可能な LNA オリゴヌクレオチドを設計する必要があると考えられる。

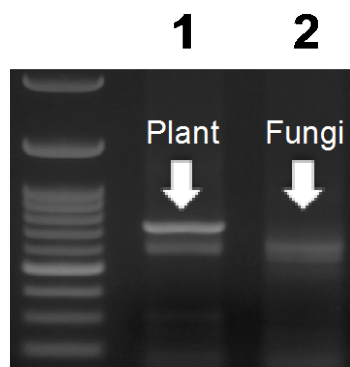


Fig. 6 Selective PCR amplification of ITS regions of plant-associated fungi. Lane 1; PCR product amplified with conventional procedure. Lane 2; PCR product amplified using LNA primer and oligonucleotide-PCR clamping technique.

5 結論

分子生態学的手法を用いた植物共存糸状菌の群集構造解析においては、宿主植物の DNA が過剰に PCR 増幅され、群集構造が過小評価される問題が存在する。本研究では LNA プライマーと LNA オリゴヌクレオチドによる PCR クランプ技術を適用し、宿主植物（コムギ）の DNA（ITS 領域）の PCR 増幅を抑制する一方で、植物共存糸状菌 DNA（ITS 領域）の選択的 PCR 増幅法の確立を試みた。その結果、開発した手法を用いる事で、従来の PCR 法では困難であった選択的な植物共存糸状菌 DNA（ITS 領域）の増幅が可能となった。本研究で確立した成果は、植物と微生物の相互関係を解明する端緒を開く研究として、当該分野の研究に広く活用される事が期待される。

6 謝辞

本研究を実施するにあたり、研究費を支援して頂いた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深く感謝致します。

7 引用文献

- 1) M Ikenaga, S Asakawa, Y Muraoka and M Kimura (2003) Bacterial communities associated with nodal roots of rice plants along with the growth stages: estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Soil Science and Plant Nutrition*, **49**, 591-602.
- 2) CL Schoch, KA Seifert, S Huhndorf, V Robert, JL Spouge, CA Levesque and W Chen (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 6241– 6246.
- 3) TR Horton and TD Bruns (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, **10**, 1855-1871.
- 4) M Ikenaga and M Sakai (2014) Application of locked nucleic acid (LNA) - PCR clamping technique to selectively PCR amplify the SSU rRNA genes of bacteria in Investigating the plant-associated community structures. *Microbes and Environments*, **29**, 286-295.
- 5) H Toju, AS Tanabe, S Yamamoto and H Sato (2012) High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, **7**, e40863.

Selective PCR amplification of fungal Internal Transcribed Spacer (ITS) Regions in Investigating the Plant Associated Community Structures

Makoto IKENAGA¹, Masakazu TABUCHI², Isao AKAGI¹ and Masao SAKAI¹

1) Laboratory of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

2) Laboratory of Soil Science, Graduate School of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

Simultaneous extraction of plant DNA during extraction step is major limitation in investigating the community structures of plant-associated fungi. This is because the sequences of primer-annealing positions are nearly homologous between fungi and host plants. Although fungal specific primers were designed, there still observed the phenomena that the plant DNA was excessively amplified by PCR, resulting in the underestimation of community structures. To solve the limitation, locked nucleic acid (LNA) primer and LNA oligonucleotide-PCR clamping technique (LNA techniques) were applied to selectively amplify the fungal internal transcribed spacer (ITS) regions. LNA primer was designed by converting DNA into LNA, which were specific to

fungi, at forward primer side. Meanwhile LNA oligonucleotide, whose sequence was complementary to host plant was designed by overlapping one base with annealing position of reverse primer and by converting the plant specific bases into LNA, at shifted region from 3' end of primer-binding position. PCR with LNA techniques selectively amplified the fungal ITS regions, while those of host plant were predominantly detected in the products amplified without LNA techniques. Thus, application of LNA primer and LNA oligonucleotide-PCR clamping techniques was considered effective to widen the scope for the community analysis of plant-associated fungi.