

日本産ヨモギツブセンチュウのITS1-5.8SrDNA-ITS2領域の塩基配列の解析

誌名	Nematological research
巻/号	442
掲載ページ	p. 49-53
発行年月	2014年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



[原著論文]

日本産ヨモギツブセンチュウの ITS1-5.8SrDNA-ITS2 領域の塩基配列の解析

大胡聖嗣^{1,2,*}・竹内智昭¹・菊地泰生³・小倉信夫¹

The nucleotide sequence analysis of ITS1-5.8SrDNA-ITS2 region of *Subanguina moxae* collected in Japan. Kiyotsugu Daigo^{1,2,*}, Tomoaki Takeuchi¹, Taisei Kikuchi³ and Nobuo Ogura¹

Subanguina moxae has a scattered distribution in very limited areas in Japan. To know whether or not there exist any nucleotide sequence differences among the *S. moxae* collected from the different sampling places, the sequences of the ITS1-5.8SrDNA-ITS2 region of rDNA for 7 Japanese isolates (Tsukuba, Otsuki, Azumi, Shimashima, Azusagawa, Yuza and Fujikawa) were investigated. The sequence identity among the 7 Japanese isolates was over 99.7% (672 ~ 674/674bp) and that among Tsukuba, Yuza and Fujikawa isolates was 100%. The sequence identity between the 7 Japanese isolates and Russian Primorsky Territory isolate (Genbank, AF396314) was 99.7~100% (672 ~ 674/674bp) and that between the 7 Japanese isolates and China Yunnan Province isolate (JN865234) was 99.1~ 99.4% (668 ~ 670/674bp). Rather large nucleotide sequence differences in rDNA, such as those found between Japanese and China isolates, were not found among the 7 Japanese isolates. Nematol. Res. 44(2), 49-53 (2014)

Keywords: identification, ITS-rDNA, *Subanguina moxae*, DNA analysis, scattered distribution.

緒 言

ヨモギツブセンチュウ *Subanguina moxae* (Yokoo and Choi) Brzeski はヨモギ属 (*Artemisia*) 植物の葉や頭花に寄生してゴールを形成する植物寄生性線虫である。本線虫の寄主植物として、ニシヨモギ *Artemisia asiatica*、ヨモギ *A. princeps* およびヤブヨモギ *A. rubripes* が知られている (Yokoo and Choi, 1968 ; 平田, 1990 ; Subbotin *et al.*, 2004)。本線虫は、朝鮮半島、ロシア連邦沿海地方、中国雲南省および本邦で分布が確認されており、本邦ではこれまでに長野県松本市安曇一帯、山梨県大月市雁ヶ腹摺山・南巨摩郡富士川町、茨城県つくば市筑波山および山形県飽海郡遊佐町で採集されている (Yokoo and Choi, 1968 ; Krall, 1991 ; Yao and Hu, 2012 ; 平田, 1990 ; 大胡ら, 2007 ; 大胡ら, 2013)。本邦では、寄主植物であるニシヨモギは本州中国地方以西に、ヨモギは本州、四国および九州地域に、ヤブヨ

モギは北海道および九州地域に自生しているにもかかわらず (笠原, 1968 ; 大場, 2003)、これまでに報告されている本線虫の採集地は、長野県、山梨県以北の山地や東北地方の比較的冷涼な地に点々と分布している。

ヨモギツブセンチュウの遺伝子研究ではロシア連邦沿海地方産の線虫において ITS1-5.8SrDNA-ITS2 (以降 ITS 領域と略す) の塩基配列の解析 (Subbotin *et al.*, 2004)、中国雲南省産の線虫において ITS 領域および 28S rDNA D2 / D3 領域の塩基配列の解析 (Yao and Hu, 2012) がなされている。両者の ITS 領域の比較では、塩基配列の同一性が 99.4%であった。そこで、本論文では、茨城県、山梨県、長野県および山形県の 7 地点で採集したヨモギツブセンチュウの ITS 領域の塩基配列を調べ、地理的な生息地の違いが ITS 領域の塩基配列の違いとして本邦産個体群間、本邦産とロシア連邦沿海地方産および本邦産と中国雲南省産の線虫間に生じているか調査した。

材料および方法

1. 供試線虫

ヨモギ属植物より 2006 年 4 月茨城県筑波山山頂、2007 年 8 月山梨県雁ヶ腹摺山山頂、2007 年 8 月長野県安曇・安曇島々・梓川上野、2010 年 6 月山形県遊佐町および 2011 年 8 月山梨県富士川町で採集したヨモギツブセンチュウを供試した (Fig.1)。それぞれの採集地の線虫を、順につくば、大月、安曇、島々、梓川、遊佐および富士川と略すこととする。これらは、形態および形態計測値に基づきヨモギツブセン

¹ 〒 214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1 明治大学農学部農学科植物線虫学研究室 (School of Agriculture, Meiji University, 1-1-1 Higashi-Mita, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa 214-8571, Japan)

² 〒 103-0016 東京都中央区日本橋小網町 1 番 8 号 住化グリーン株式会社 (Sumika Green Co. LTD, 1-8 Nihonbashi Koamicho, Chuo-ku, Tokyo, 103-0016, Japan)

³ 〒 889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原 5200 宮崎大学医学部感染症学講座寄生虫学分野 (Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki City, Miyazaki, 889-1692, Japan)

* 責任著者 (Corresponding author), e-mail: k.daigo@sg.ssspro.ne.jp

チュウと同定した個体群である。

2. 本邦産ヨモギツブセンチュウの ITS 領域の塩基配列の解析

ヨモギツブセンチュウの DNA 抽出には、各採集地のヨモギの複数のゴールより分離した幼虫 10 個体を用いた。幼虫は採集地ごとに 100% エタノールに浸漬して、フリーザー (-20°C) に保存し、必要に応じて DNA 抽出に使用した。

1) ゲノム DNA の抽出

容量 200 μ l の殺菌済みマイクロチューブに超純水を 2.0 μ l 加え、100% エタノールに浸漬しておいた幼虫 1 頭をチューブの中に入れて、実体顕微鏡下で有柄針を用いて破碎した。この線虫破碎液に濃度 10mg/ml に調整したプロテイナーゼ K (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 1.0 μ l を入れ、65°C で 30 分間、94°C で 10 分間熱処理した。

2) PCR 法による DNA の増幅

プライマーは、ITS 領域と 18SrDNA および 28SrDNA の一部を増幅する 18SF と 28SR を用いた (Table 1)。DNA 抽出液 3 μ l へ、濃度 2pmol/ μ l に調整した各プライマー 1.25 μ l および Taq PCR Master Mix Kit 250 units (QIAGEN, Ltd.,

Tokyo, Japan) 5 μ l を加えて、PCR 反応液とした。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700) を用い、初期熱変性 (94°C、2 分) を行った後、変性 (94°C、1 分)、アニーリング (53°C、1 分) および伸長 (72°C、2 分) を 35 サイクル繰り返し、最終伸長 (72°C、5 分) を行った。

3) PCR 産物の精製

PCR 産物は 3.5% アガロースゲル (NuSieve GTG agarose, CAMBREX) を用いて電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液 (1 μ g/ml) で染色し、UV 照射下で DNA バンドを切り出し、各採集地ごとにまとめた。ゲルからの DNA 回収には QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いた。

4) PCR 産物の塩基配列解析

DNA シーケンシング反応は、BigDye Terminator v3.0 (ABI) を用い、前述の 2 種類のプライマーの他に、インナープライマー IKF1 および IKF2 (Table 1) を使用して行った。塩基配列の解析は、PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

5) 本邦産間および本邦産と外国産ヨモギツブセンチュウ間の塩基配列の比較



Fig. 1. Map showing seven collection sites of *Subanguina moxae* in Japan.

Table 1. Primers for amplification of genes for ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region.

Primer name	Sequence(5'→3')
18SF ¹	5'-CGTAACAAGGTAGCTGTAG-3'
28SR ¹	5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'
IKF1 ²	5'-GGTTCGATGAAGAACGCAG-3'
IKF2 ²	5'-CTGCGTCTTCATCGACC-3'

¹ Vrain *et al.*,1992.

² Iwahori *et al.*,1998.

得られた塩基配列は、遺伝子配列解析ソフト Vector NTI (ver. 10.3.1, Invitrogen) を用いて編集および連結を行った。シーケンスアラインメント作成には、ClustalW (Thompson *et al.*, 2002) を、アラインメントの比較には MEGA3 (Kumar *et al.*, 2008) を使用して行った。外国産ヨモギツブセンチュウとの比較では、国際塩基配列データベース (GenBank) に登録されているロシア連邦沿海地方産 *Mesoanguina moxae* (Accession No ; AF396314) および中国雲南省産 *Subanguina moxae* (JN865234) の塩基配列を用いた。なお、*Mesoanguina* は *Subanguina* のシノニムである (Chizhov and Subbotin, 1985 ; Siddiqi, 2000)。

結 果

本邦の各採集地産、ロシア連邦沿海地方産および中国雲南省産ヨモギツブセンチュウの ITS 領域の塩基配列の相違箇所を Table 2 に示す。つくば、遊佐、富士川および梓川産個体群内のそれぞれ 10 個体の調査では塩基配列の不一致が見られなかった。同じく 10 個体の調査で大月および鳥々個体群内では 1 塩基の不一致、安曇個体群内では 2 塩基の不一致が見られた。ITS 領域の塩基配列は、本邦の 7 採集地産の個体群については、同一性が 99.7 ~ 100% (672 ~ 674/674 塩基) であった。つくば、遊佐および富士川産の個体群は配列が完全に一致した。つくば、遊佐および富士川産個体群は、大月、鳥々および梓川産個体群との間で 1 塩基の置換、安曇産個体群との間で 2 塩基の置換が起きていた。これらの塩基の置換は全て ITS2 領域でみられた。

本邦の個体群とロシア連邦沿海地方産線虫との間では、同一性が 99.7 ~ 100% (672 ~ 674/674 塩基) であった。つくば、遊佐および富士川産個体群とロシア連邦沿海地方産線虫の間では、同一性が 99.1 ~ 99.4% (668 ~ 670/674 塩基) であった。つくば、遊佐および富士川産と中国雲南省産との間では 4 塩基の置換、大月、鳥々および梓川産と中国雲南省産との間では、5 塩基の置換が見られた。比較した地点間で最大の置換数は、安曇産と中国雲南省産との間でみられ、6 塩基の置換であった。

Table 2. Representative nucleotide sequences of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region (674bp) from *Subanguina moxae* collected in Japan, Russia and China.

Nematode isolates	ITS1										5.8S rDNA										ITS2							
	1 ¹	2	~	13	~	321	~	326	327	328	329	~	432	~	484	485	486	487	~	502	~	594	~	644	~	673	674	
Tsukuba	T	C		A		A		T	T	C	T		G		A	A	A	T		A		T		A		T	C	
Yuza
Fujikawa
Otsuki		R ²	.	.	.
Azumi		R	~	.	.
Shimashima		R	~	.	.
Azusagawa		R	~	.	.
Russia(Primorsky Territory) ⁴
China(Yunnan Province) ⁵	.	.		G		G			A	

¹ Number is base of ITS sequence.

² It indicates Adenine or Thymine.

³ It indicates Adenine or Guanine.

⁴ GenBank Accession No ; AF396314, *Mesoanguina moxae*.

⁵ GenBank Accession No ; JN865234, *Subanguina moxae*.

考 察

メロイドギネ科 (*Meloidogynidae*) の場合、アレナリアネコブセンチュウ *Meloidogyne arenaria* Neal (Accession No; U96301)、サツマイモネコブセンチュウ *M. incognita* (Kofoid and White) Chitwood (U96304) およびジャワネコブセンチュウ *M. javanica* (Treb) Chitwood (U96305) のそれぞれの種間では、ITS 領域の配列の同一性が 99.4 ~ 99.8% とかなり高く、480 塩基のうち塩基の置換が最大でも 3 塩基しかみられない (Powers *et al.*, 1997)。一方、アングイナ科 (*Anguinidae*) においては、ヨモギツブセンチュウ *Mesoanguina moxae* (AF396314) とベントグラスセンチュウ *Anguina agrostis* (Steinbuch) Filipjev (AF396339, AF396344, AF396342, AF396338) との種間で、ITS 領域の同一性は 84.5 ~ 84.6% で、676 塩基のうち 104 ~ 105 塩基が変異している (Subbotin *et al.*, 2004)。 *Mesoanguina* 属内においては、ヨモギツブセンチュウ (AF396314) と *M. millefolii* (Low) Chizhov and Subbotin (AF396313, AF396312) との種間で、ITS 領域の同一性は 93.6% ~ 94.1% で、674 塩基のうち 40 塩基 ~ 43 塩基が変異している (Subbotin *et al.*, 2004)。つぎにベントグラスセンチュウ *A. agrostis* 種内では、USA 産 (AF396339)、ロシア産 (AF396344)、ニュージーランド産 (AF396342) およびベルギー産 (AF396338) の間で同一性は 99.7 ~ 99.9% (671 ~ 672/673 塩基) である。また、*M. millefolii* の種内では、トルクメニスタン産 (AF396313) とロシア産 (AF396312) の間で同一性は 99.6% (669/672 塩基) である。さらに、アングイナ科 (*Anguinidae*) の *Heteroanguina graminophila* の種内で 2 つのロシア産 (AF396315 と AF396318) の間で、同一性は 99.0% (667/674 塩基) であった (Subbotin *et al.*, 2004)。これらのことから、ヨモギツブセンチュウの属するアングイナ科では、ITS 領域の塩基配列の同一性は種間でおおよそ 94% 以下であり、種内では 99% 以上と推察できる。このことは、アングイナ科の線虫を同定する際に、ITS 領域の塩基配列の同一性が、有力な判断材料の一つになりうることを示唆している。

今回の我々の解析では、本邦の 7 地点より採集したヨモギツブセンチュウの ITS 領域の塩基配列の同一性は 99.7% 以上という高い値であった。また外国産との比較では、本邦産とロシア連邦沿海地方産の線虫の同一性は、99.7% 以上であった。本邦産および中国雲南省産の線虫での比較では、同一性は 99.1 ~ 99.4% であった。ロシア連邦沿海地方産および中国雲南省産の線虫間では、同一性は 99.4% であると報告されている (Yao and Hu, 2012)。このように産地間に差はあるものの、同一性は 99.1% 以上という値が示された。従って、本邦においてヨモギの葉に寄生する線虫を形態観察および形態計測値に基づいてヨモギツブセンチュウであると同定した報告 (平田, 1990 ; 大胡ら, 2007) は、DNA 解析からもその結果が支持されるといえる。

ヨモギツブセンチュウの産地間での ITS 領域の同一性は、

本邦産とロシア連邦沿海地方産の線虫の間よりも、本邦産と中国雲南省産の間やロシア連邦沿海地方産と中国雲南省産の間のほうが低かった。この結果は、今回比較した海外との線虫間においてその同一性が生息地の存在する地域間の直線距離が短いほど高く、長いほど低いことを示している。したがって、中国雲南省のヨモギツブセンチュウは本邦産やロシア連邦沿海地方産とは時間的に異なる時点で分岐し、距離が離れていった可能性があるが、更に各地点の中間地点およびその他の国でヨモギツブセンチュウの分布調査を行い、解析を行う必要がある。また、つくば、遊佐および富士川産とロシア連邦沿海地方産線虫の ITS 領域の塩基配列が完全に一致したことや、本邦での各採集地における個体群間の ITS 領域の塩基配列の同一性と採集地間の直線距離に一定した関連がみられなかったことから、本邦とロシア連邦沿海地方を含む地域内での地理的な生息地の違いは、少なくとも ITS 領域の塩基配列の違いとして現れていない、ということができる。

本邦でのヨモギツブセンチュウの採集地は、道路から脇道に至るコンクリート舗装道路の路肩 (つくば、島々)、登山者が休息できるように整備された山頂 (大月)、道路で車が一時停留できるように造られた路肩 (安曇)、川岸縁の樹木や雑草が生茂る側の歩道 (梓川)、海岸松林内の歩道 (遊佐) および北山林道 (富士川) 等、人の手より開発された場所であり、各採集地ではヨモギにヨモギツブセンチュウによる特徴的なゴールが複数形成されていて、線虫の存在が確認しやすい状態であった。但し採集地周辺では、ヨモギは自生していたが、ゴールは発見できなかった。特に、つくばでは筑波山の朝日峠付近のヨモギの自生地 7 地点のうち 1 地点のみ、大月では雁ヶ腹摺山の登山道の入口周辺、登山道および山頂のヨモギ自生地のうち山頂のみで、ゴールが発見された。このような発見状況であったが、つくば、遊佐および富士川と距離が離れた場所で採集された個体群間で ITS 領域の配列が一致した一方で、安曇、島々および梓川と比較的近い距離の個体群間で最大 2 塩基の違いが見られた。このことが何を示唆しているのか、ITS 領域の調査だけでは不明である。今後は、本邦の生息地の異なる個体群の間に遺伝的な変異が生じているかどうかを明らかにするために、更に多くの採集地の個体群を用いての同様の研究および進化速度の速い領域や mtDNA の塩基配列の解析が必要であろう。

摘 要

本邦でのヨモギツブセンチュウ *Subanguina moxae* の生息地は点在している。そこで、7 か所の採集地 (つくば、大月、安曇、島々、梓川、遊佐および富士川) の個体群において地理的な生息地の違いが塩基配列の違いとして ITS1-5.8SrDNA-ITS2 領域に生じているかを調査した。また、本邦産とロシア連邦沿海地方産および中国雲南省産の同部位の塩基配列を比較した。その結果、本邦の各採集地の個体群間では塩基配列の同一性は 99.7 ~ 100% (672 ~ 674/674

塩基)であり、3地点(つくば、遊佐および富士川)の個体群の塩基配列が完全に一致した。本邦産とロシア産との比較では、99.7~100%の同一性であった。本邦産と中国産との比較では、同一性は99.1~99.4%(668~670/674塩基)であった。本邦産とロシア連邦沿海地方産および本邦産と中国雲南省産との間のITS領域の同一性は、それぞれの直線距離が短いほど高くなり、距離が長いほど低くなった。しかし、つくば、遊佐および富士川産とロシア連邦沿海地方産の線虫のITS領域の塩基配列は完全に一致した。また、本邦での各採集地における個体群間のITS領域の同一性の高さや採集地間の直線距離に一定した関連がみられなかった。したがって、中国雲南省のヨモギツブセンチュウは本邦産やロシア連邦沿海地方産とは時間的に異なる時点で分岐し、距離が離れていった可能性があるが、更に各地点の中間地点およびその他の国でヨモギツブセンチュウの分布調査を行い、解析を行う必要がある。

引用文献

- Chizhov, V. N. and Subbotin, S. A. (1985) Revision of the nematode subfamily Anguininae (Nematoda: Tylenchida) on the basis of their biological characteristics. *Zoologicheskyy Zhurnal*, 64, 1476-1486. (in Russian).
- 大胡聖嗣・菊地泰生・小倉信夫 (2013) 日本産ヨモギツブセンチュウのITS1-5.8S rDNA-ITS2領域の塩基配列に基づく個体群解析. 第21回 日本線虫学会大会, 203.
- 大胡聖嗣・榎原寛・小倉信夫 (2007) 筑波山のヨモギから見出されたヨモギツブセンチュウについて. 明治大学農学部研究報告 56, 237-243.
- 平田賢司 (1990) ヨモギツブセンチュウ (*Anguina moxae*) について. 第34回 日本応用動物昆虫学会大会, 207.
- Iwahori, H., Tsuda, K., Kanzaki, N., Izui, K. and Futai, K. (1998) PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. *Fundamental and Applied Nematology* 21, 656-666.
- 笠原安夫 (1968) 日本雑草図説—種子, 幼植物および成植物. 養賢堂, 東京, 11.
- Krall, E. L. (1991) Wheat and grass nematodes: *Anguina*, *Subanguina* and related genera. In: Nickle, W. R. (Ed.), *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 746.
- Kumar, S., J. Dudley, M. N. and Tamura K. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299-306.
- 大場秀章 (2003) 日本の帰化植物. 清水建美編, 平凡社, 東京, 219.
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C. B., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., Adams, B. A. and Harris, T. S. (1997) The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for Nematodes. *Journal of Nematology* 29 No.4, 441-450.
- Siddiqi, M. R. (2000) *Tylenchida Parasites of Plants and Insects*. CABI Publishing, New York, 225-241.
- Subbotin, S. A., Krall, E. L., Riley, I. T., Chizhov, V. N., Staelens, A., De Loose, M. and Moens, M. (2004) Evolution of the gall-forming plant parasitic nematodes (Tylenchida: Anguinidae) and their relationships with hosts as inferred from Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30(1), 226-235.
- Thompson, J. D., Gibson, T. and Higgins, D. G. (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics* 2-3.
- Vrain, T. C., Wakarchuk, D. A., Levesque A. C. and Hamilton, R. I. (1992) Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 563-573.
- Yao, R. Y. and Hu, X. Q. (2012) First Report of *Subanguina moxae* infecting mugwort in Yunnan, China. *Plant Disease* 96(8), 1232.
- Yokoo, T. and Choi, Y. E. (1968) On a new species of Shoot gall Nematode (*Tylenchidae: Anguina*) found from the galls on the leaves of Moxa (*Artemisia saiatica* Nakai). *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University* 26, 1-7.

受領: 2014年6月2日