

リボソーム RNA 解析と植物病原細菌の分類

農林水産省果樹試験場安芸津支場
東京大学農学部土壌学研究室

さわ だ ひろ ゆき
お 柳 づ 宏 之
小 津 ひろ し
志

はじめに

細菌の形態は非常に単純であるため、分類指標としての有用性は限られている。また、高等生物のような有性生殖を行わない上、化石からの情報もほとんど得られない。したがって、植物病原細菌の分類では、主に生理・生化学的性質や病原性などの表現形質が指標として利用されてきた。しかし、表現形質の組合わせのみに基づいて分類体系が築かれた場合、主観的、恣意的な傾向が完全には排除しきれないことも指摘されている。そのため、より客観的な系統分類を目指して、表現形質以外のさまざまな指標を利用することも試みられている。

近年、各種の情報高分子(タンパク質、RNAあるいはDNA)に関する研究が進み、アミノ酸や塩基の配列が生物間で詳しく比較されるようになってきた。その結果、生物間でアミノ酸や塩基が違っている数と、進化の上で互いに分岐してからの経過時間との間に近似的に比例関係の成り立つことが明らかになり(木村, 1984)、これら情報高分子は「分子進化時計」あるいは「分子時計」と呼ばれるようになってきた。そして、分子時計に記録された時間の経過を読み取れば、生物を系統進化の道筋に沿って整理できるのではないかの期待が生まれてきた(WOESE, 1987)。

いろいろな分子時計が分類指標の候補として考えられてきた。初期の研究ではヘモグロビンやチトクロームcが使われたが、細菌を含めた全生物に分布しているわけではないという問題がある。また、分子時計によってそれぞれ固有の進化速度があることも明らかとなってきた。したがって、研究の対象や目的に応じて、適当な分子時計を選ぶことが必要となる。

広範な生物間の比較に適した分子時計として、リボソーム RNA (rRNA) が最近注目されている。rRNA はすべての生物が持っており、全生物を通じて構造上も機能上も大きな変化がないこと、進化速度が遅いため遠縁のものとの比較も可能であること、分析が比較的簡便であることなどがその理由である(WOESE, 1987)。rRNA は

タンパク質合成装置であるリボソームの構成成分であり、原核生物(真正細菌及び古細菌)には 23 S, 16 S 及び 5 S の三つの大きさのものが含まれている(図-1)。

Escherichia coli で 5 S rRNA の配列が報告されて以来、多くの生物の 5 S rRNA の配列が決められており、その情報に基づいて系統が論じられている(HORI, 1975; HORI and OSAWA, 1987)。しかし、塩基配列決定の技術が進歩するとともに、より情報量の多い 16 S rRNA が細菌分類学の分野で広く利用されるようになってきた(WOESE, 1987; MURRAY et al., 1990; GRAHAM et al., 1991)。

表現形質が主役となっている植物病原細菌の分類に対して、rRNA に記録された系統進化に関する情報を補え

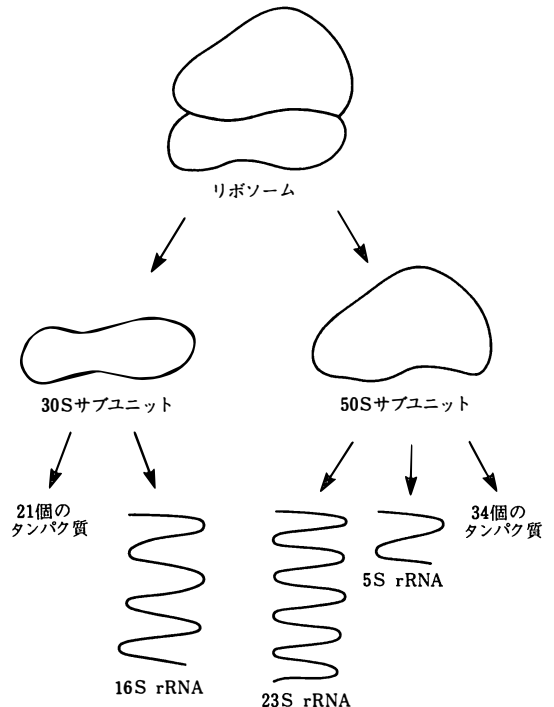


図-1 原核生物のリボソームの構成

50 S と 30 S の二つのサブユニットからなるタンパク質-RNA 複合体である。

ば、分類学上の問題点をより明確にできるのではないだろうか。こういった期待のもとに、筆者らは、分類学的に混乱している *Agrobacterium* とその近縁細菌の 16 S rRNA の全塩基配列を決定し、これらを進化の道筋に沿って整理することを試みてきた (SAWADA et al., 1992 b; 澤田ら, 1992)。本稿では、rRNA (23 S, 16 S 及び 5 S rRNA) 解析の現状について概略を述べた後、筆者らの 16 S rRNA に関する解析例を簡単に紹介することとしたい。具体的な実験手法については本誌次号の難波による解説を参照されたい。

I リボソーム RNA 解析と系統分類

rRNA (23 S, 16 S 及び 5 S rRNA) に記録された系統進化に関する情報を読み取るために、いろいろな手法が考案されてきた。そのうちの主なものについて簡単に紹介したい。なお、RFLP (制限酵素断片長多型性) 解析については、平八重ら (1992) による詳しい総説があるので、ここでは省略した。

1 DNA-rRNA 交雑法

rRNA の塩基配列を決定するには時間を要する上に、一度に多くのサンプルを処理できないことから、配列を決定せずに情報を引き出す方法がこれまでいろいろと工夫されてきた。本法もその一つであり、binding value を測る手法と形成されたハイブリッドの熱安定性を測る手法とがある。De Ley らのグループは、後者の手法に基づいて種々の細菌の類縁関係を明らかにしている。彼らは、参考菌株から抽出した 23 S rRNA あるいは 16 S と 23 S rRNA を標識した後、メンブランフィルター法を用いて被検菌株の DNA と交雑させた。そして、形成されたハイブリッドを加熱して全体の半分が解離する温度 (T_m) を求め、これを類似度として菌株間の比較を試みている。この手法に基づいて、多くの真正細菌 (eubacteria; 古細菌を除いた原核生物) の類縁関係が検討され、“superfamily” という数個のグループに類別できることが明らかにされた (表-1) (De Vos et al., 1989; Van Landschoot et al., 1986)。ただし、彼らは superfamily をどういった分類階級に位置づけ、いかに命名するかについては提案を行っていない。また、この手法によって、多くの植物病原細菌が含まれている *Pseudomonas* 属が、系統的にはきわめて不均質であり (表-1)、分類体系の見直しが必要であることが指摘されている (De Vos et al., 1989; Willems et al., 1992)。

2 5S rRNA の塩基配列

さまざまな生物の系統関係が 5 S rRNA の配列に基づいて論じられている (Hori, 1975; Hori and Osawa,

1987)。真正細菌に関しては、三つのグループに大別できることが報告されている。すなわち、(1) 120 塩基を持つグラム陰性細菌 (120-N 型)、(2) 116 塩基を持つグラム陽性細菌 (116-N 型)、(3) 118 塩基を持ち、116-N 型と 120-N 型の中間に当たる放線菌グループ、の三つが認められている。しかし、5 S rRNA は約 120 塩基と小さいことから、細菌の分類ではより情報量の多い 16 S rRNA (約 1500 塩基) が活用されるようになってきた (Murray et al., 1990; Graham et al., 1991)。

3 16S rRNA の塩基配列

(1) カタログ法

16 S rRNA の全塩基配列を分析することが技術上困難であった 1970 年代に考案された手法であり、真正細菌の系統分類において大きな役割を果たしてきた (Fox et al., 1977; Woese and Fox, 1977)。分析方法の原理は以下のとおりである。すなわち、16 S rRNA を RNase T₁ を用いて部分分解し、その結果生じるオリゴヌクレオチドについて比較を行い、同じものがどの程度生物間で共有されているかで類似度を探るというものである。Woese らのグループによってこれまでに 500 以上の細菌に関するデータが蓄積されており、主にそれを基礎として真正細菌が 10 個の系統に類別されている (表-2, 図-2) (Woese et al., 1985; Woese, 1987)。そして、このうちの光合成紅色細菌を、“*Proteobacteria*” という新しい綱 (class) としてまとめることが提案されている (Stackebrandt et al., 1988 a)。多くの植物病原細菌が *Proteobacteria* に含まれている (表-2)。また、この研究グループによって、メタン生成細菌が真正細菌や真核生物とは異なる第 3 の kingdom を構成することが明らかにされ (図-2)、古細菌 (archaeobacteria) としてまとめられた (Woese and Fox, 1977)。

(2) 部分塩基配列

逆転写酵素を利用して 16 S rRNA の部分塩基配列を

表-1 superfamily と主な植物病原細菌^{a)}

superfamily	植物病原細菌
I	<i>Erwinia</i>
II	<i>Pseudomonas fluorescens</i> などのグループ <i>Xanthomonas</i>
III	<i>P. avenae</i> などのグループ <i>P. solanacearum</i> などのグループ <i>Xylophilus</i>
IV	<i>Agrobacterium</i> (<i>Rhizobium</i>)

^{a)} WILLEMS ら (1992) 及び De Vos ら (1989) に基づいて作成した。

迅速に決定する方法が考案された (LANE et al., 1985)。すなわち、16S rRNA の保存性の高い部分に相補的なプライマー (ユニバーサルプライマー) と逆転写酵素を用い、RNA を鋳型としてジデオキシ法を行うというものである。LANE ら (1985) の報告以降、多くのデータが蓄積され、部分配列に基づいた系統樹の作成も試みられて

いる (GIOVANNONI et al., 1990)。しかし、16S rRNA のごく一部分の情報しか利用していないことから、より信頼性の高い系統樹を得るためには、次項で紹介するように全塩基配列に基づいて検討することが必要であるとされている。

(3) 全塩基配列

塩基配列を決定するための技術が進むにつれ、全塩基配列の情報が系統分類において大きな役割を果たすようになってきた。全塩基配列に基づいて系統を論ずるためには、配列の決定、置換塩基数の推定及び系統樹の作成という三つのステップを踏むことが必要であるが、そのいずれについてもさまざまな手法が考案されている。

1) 塩基配列の決定

(i) クローニング法

λファージを用いてクローニングした後、M13などにサブクローニングして配列を決定する方法である。大変煩雑であるために全配列を決定するまでに数カ月が必要となる、一度に多くのサンプルを処理できないなどの欠点が指摘されている。しかし、全塩基配列を決定するためには最も確実な方法であり、本法によって先駆的な研究が数多くなされてきた (OYAZU and WOESE, 1985; YANG et al., 1985 a)。

(ii) 逆転写酵素による方法

多数のプライマーを用いて、部分塩基配列の項で述べたLANE ら (1985) のやり方で全配列を決定する方法であ

表-2 WOESE らによる真正細菌の類別と主な植物病原細菌^{a)}

系統 ^{b)}	植物病原細菌
光合成紅色細菌群 (Proteobacteria)	<i>Agrobacterium</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> , (<i>Rhizobium</i>), <i>Xanthomonas</i> , <i>Xylella</i> , <i>Xylophilus</i>
グラム陽性細菌群	
GC 含量の高い群	<i>Corynebacterium</i> ^{c)} , <i>Streptomyces</i>
GC 含量の低い群	<i>Spiroplasma</i>
シアノバクテリア群	
スピロヘータ群	
緑色イオウ細菌群	
緑色非イオウ細菌群	
Bacteroides-	
Flavobacterium 群	
Planctomyces 群	
クラミジア群	
放射線抵抗性細菌群	

^{a)} WOESE (1987) 及び STACKEBRANDT ら (1988 a) より作成した。

^{b)} これらの系統関係は図-2 に示した。

^{c)} “plant associated *Corynebacterium*” として記載されている (WOESE, 1987)。

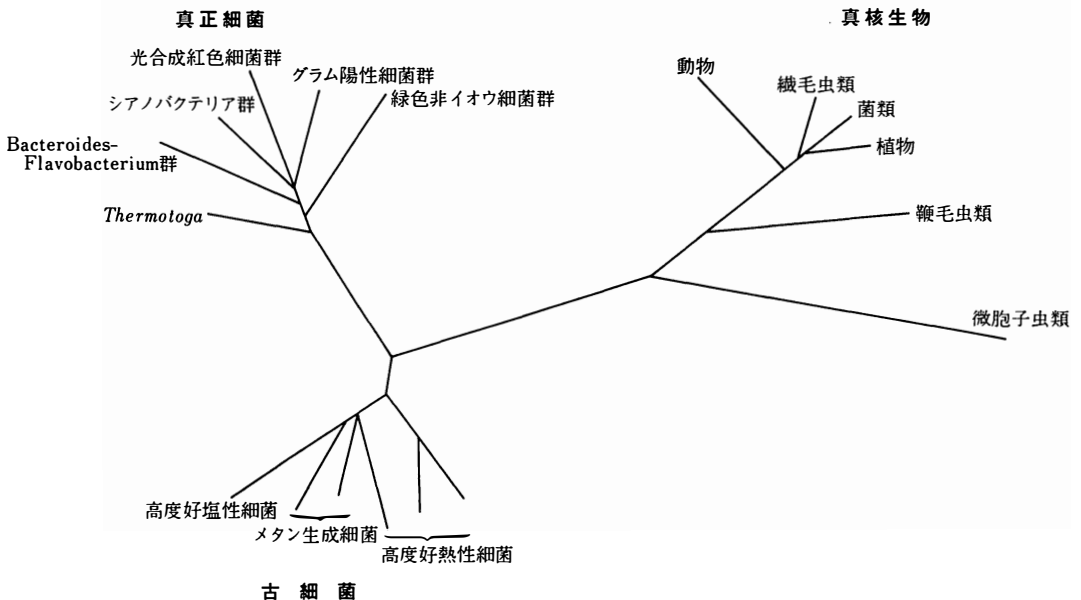


図-2 Woese (1987) による主な生物の系統樹

る (PASTER et al., 1991; BENTLEY et al., 1991)。クローニング法に比べて簡便であるものの、16 S rRNA 中の修飾塩基が反応を強く阻害するために、この方法だけで100%正確に決定することはできないとされている。また、3'末端の配列は他の方法を用いて決定せざるを得ない、RNA は DNA に比べて取り扱いが難しいなどの欠点も指摘されている。

(iii) PCR による方法

16 S rRNA のコード領域を polymerase chain reaction (PCR) で増幅した後に配列を決定する方法である。増幅産物を M 13 などにクローニングしてから配列決定を行うことも可能である。しかし、この場合電気泳動像は直接シーケンス法に比べて鮮明になるが、*Taq* ポリメラーゼの合成の間違いによって誤りが出るとの指摘もある。

一方、PCR の増幅産物を鋳型にして直接シーケンスを行う方法 (SAWADA et al., 1992 b) では、クローニングの手間が省けるだけでなく、*Taq* ポリメラーゼの読み間違いがほとんど無視できるという利点がある。いろいろな直接シーケンス法が考案されており、アイソトープラベルを使う従来からの方法のほかに、シーケンサーも利用できるようになってきた。

2) 塩基置換数とその推定法

配列が決定できたら、次の段階としてサンプル間で配列の比較を行うことになる。あるサイトの塩基が一方のサンプルでのみ欠けている場合は、空白を挿入して類似度の最大化を図る必要がある。この空白をギャップといい、このような配列上の操作をアラインメントという。

アラインメント後の比較において、あるサイトの塩基がサンプル間で異なっていたとしても、そのサイトにおいて過去に実際に起こった塩基置換は1回だけとは限らない。すなわち、進化の過程で何度か繰り返し起こって現在に至っている可能性もある。このような置換は多重置換といわれている。多重置換があると、単純に比較して認められる塩基の相違数は、進化の過程で実際に起きた置換の回数よりも少ないことになる。したがって、多重置換の補正を行って真の塩基置換数を推定し、過小評価を避ける必要がある。そのためにいろいろな推定法が考案されているが、16 S rRNA の解析では KIMURA (1980) の進化距離 (K_{nuc}) がよく使われているようである。

$$K_{nuc} = -(1/2) \log_e \{ (1-2P-Q) (1-2Q)^{1/2} \}$$

P: サンプル間で塩基がトランジション型で異なっている割合

Q: トランスバージョン型で異なっている割合

プリン同士あるいはピリミジン同士の塩基置換をトランジションといい、それ以外の塩基置換をトランスバージョンという。トランジション型の塩基置換はトランスバージョン型に比べて生じやすいことが知られている。進化距離 (K_{nuc}) は、このような傾向を考慮した上で算出される値である (KIMURA, 1980)。

3) 系統樹の作成法

系統樹を作成する方法にもいろいろなものが考案されている (根井, 1990)。1990 年の国際細菌分類命名委員会の特別委員会は、塩基の置換速度がサンプル間で異なっている可能性も考慮に入れて系統樹を作成することを薦めている (MURRAY et al., 1990)。近隣結合法や最尤法などの方法がこれに該当するが、16 S rRNA の解析では近隣結合法 (SAITOU and NEI, 1987) が用いられることが多いようである。

ところで、塩基の置換はランダムな変動に伴って起こるものであるため、そのようなデータから推定した系統樹は、100% 確実なものとはなりえないとの指摘がある。したがって、得られた系統樹の確からしさを確率的に表現することが求められるようになってきた。そのためには、配列データに基づく系統樹推定法一般に適用できるブートストラップ法が便利であるとされている (FELSENSTEIN, 1985)。

以上のように、16 S rRNA をはじめとする rRNA の解析手法にはさまざまなものがあるが、今後もさらに技術改良が進み、これらの持つ情報がより簡便に活用できるようになるであろう。このような状況を考慮して、国際細菌分類命名委員会の特別委員会は、種以上の分類群の系統関係を定めるためには、DNA-rRNA 交雑法と、1,000 塩基以上の 16 S rRNA の配列決定が適した手法であると報告している (MURRAY et al., 1990)。ただし、表現形質の重要性も特に強調されており、16 S rRNA のような遺伝学的なデータのみにも偏ることなく、総合的に判断を下すよう注意を呼びかけている。23 S rRNA については、有効である場面があるものの、現時点では必ずしも必要ではないとの表現をしている。一方、5 S rRNA に関しては、有用ではあるが、サイズが小さいことから情報に限界があることに留意すべきであるとしている。また、その翌年 (1991 年) には、*Agrobacterium* に近縁であると考えられている根粒形成菌の分類においても、16 S rRNA の情報の重要性が指摘され、最小記載性状の一つとすることが提案されている (GRAHAM et al., 1991)。

II 16S rRNA 解析の植物病原細菌への応用

1 研究の現状

植物病原細菌の16S rRNA解析例を表-3に示した。ただし、次に述べる筆者らの解析結果や難波によるMLOの研究例(次号参照)はこの中に入れていない。また、表-3を作成するにあたって参考資料としたDe RIJKら(1992)及びNEEFSら(1991)のリストは、16S rRNAの全塩基配列のうち、70%以上の配列が解読されたもののみ掲載している。したがって、70%未満の部分配列が明らかにされた植物病原細菌は、表-3に示した6菌株以外にも多数存在するものと思われる。しかし、1992年の段階で、70%以上の配列が決定された真正細菌が合計625菌株にも達していることを考えると(De RIJK et al., 1992)、植物病原細菌を対象とした研究が大変遅れていることが明らかである。

ところで、1991年の段階で16S rRNA解析例のリスト(NEEFS et al., 1991)に載っていた真正細菌が276菌株であったのが、翌年(De RIJK et al., 1992)にはその数が倍以上にも膨れ上がっていることから、応用微生物や医学細菌の分野では猛烈な勢いでデータが蓄積されていることがわかる。このことは、16S rRNA解析が分類をはじめとするさまざまな研究面でいかに重要視されているかを物語っている。

表-3 植物病原細菌の16S rRNA解析例^{a)}

植物病原細菌	菌株番号	解読され た塩基数 (bp)	解読され た割合 (%) ^{b)}	accession number	文献
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	DSM 30105	1489		M 11223	50
<i>Clavibacter xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i>	MDE 1	1524	100.0	M 60935	33
<i>Pseudomonas cepacia</i>	ATCC 25416	1449	94.5	M 22518	7
<i>Rhodococcus fascians</i>	DSM 20131	1301	85.0	X 53204	40
<i>Spiroplasma citri</i>	ATCC 27556	1503	98.2	M 23942	43
<i>Xylella fastidiosa</i>	ATCC 35880	1477	95.5	M 26601	44

^{a)} De RIJKら(1992)及びNEEFSら(1991)のリストに基づいて作成した。なお、これらのリストは、16S rRNAの全配列のうち70%以上が解読されたもののみ掲載している。

^{b)} *E. coli*の16S rRNAの全塩基配列に対する割合。

以下に具体例として、筆者らが*Agrobacterium*とその近縁細菌を対象として行っている16S rRNA解析を紹介したい。

2 *Agrobacterium* 属細菌への実施例

(1) *Agrobacterium* 属細菌をめぐる分類学上の問題点
*Agrobacterium tumefaciens*や*A. rhizogenes*は、保持しているプラスミドが遺伝子のベクターとして利用できることからプラスミド関連の研究が注目され、その利用技術の開発が盛んに行われている(松本・町田, 1990)。しかし、その分類に関しては研究が遅れており、分類体系に矛盾や不明瞭な部分が多く残されている。その中でも特に、属や種の定義(KERSTERS and DE LEY, 1984)がプラスミドに関連した性質に基づいていることが問題であるとされている。なお、本属の分類に関する問題については、本誌で既に述べているので(澤田, 1991)、そちらを併せて参照されたい。

(2) 16S rRNAに基づく分子系統樹の作成

属の定義や境界が問題となっている*Agrobacterium*と*Rhizobium*を対象として、16S rRNAに基づいた比較を試みた。そのために、両属の各分類群の基準株を中心とする14菌株について、PCRを利用した直接シーケンス法によって16S rRNAの全塩基配列を決定し、*K_{nuc}*を算出した。また、比較のために、これらと同じく*Rhizobiaceae*(リゾビウム科)に属する*Bradyrhizobium japonicum*と*Azorhizobium caulinodans*の基準株も供試した。系統樹は近隣結合法に基づいて作成した。

16S rRNAの全塩基配列の相同性を表-4に、作成した系統樹を図-3に示した。*Agrobacterium*と*Rhizobium*の各分類群は互いに94%以上の高い相同性を示しているのに対して、*B. japonicum*とは90%前後、*E. coli*とは80%前後と低い値が得られている(表-4)。また、系統樹においても、*Agrobacterium*と*Rhizobium*の各分類群は一つの大きなbranchとしてまとまることが認められた(図-3)。

*B. japonicum*や*Az. caulinodans*は、同じ*Rhizobiaceae*に属する*Agrobacterium*や*Rhizobium*とは、系統樹の上で相当離れた所に位置している。このことは、従来から指摘されているように(JARVIS et al., 1986; DE LEY et al., 1987)、*Rhizobiaceae*に科としてのまとまりが欠けていることを示している。「植物に異常肥大を誘起する」という科の定義が、人為的、恣意的色彩の強いものであることがその原因であると考えられている。

一方、*Agrobacterium*と*Rhizobium*のbranchは、(1) biovar 1, biovar 3, NCPPB 1650, *A. rubi*の4菌株の*Agrobacterium*属細菌と、*R. galegae*とOK-55

表-4 16S rRNA の全塩基配列の相同性(%)

分類群	biovar 1	biovar 2	biovar 3	<i>A. rubi</i>	K-Ag-3	Ch-Ag-4	NCPPB 1650	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>R. loti</i>	<i>R. fredii</i>	OK55	<i>B. japonicum</i>
<i>Agrobacterium</i>													
biovar 1													
biovar 2	96.3												
biovar 3	96.5	95.8											
<i>A. rubi</i>	98.5	95.5	96.8										
K-Ag-3	96.0	99.7	95.7	95.3									
Ch-Ag-4	96.3	100.0	95.8	95.5	99.7								
NCPPB 1650	98.6	95.6	96.6	99.7	95.4	95.6							
<i>Rhizobium</i>													
<i>R. leguminosarum</i>	96.2	98.6	94.8	95.1	98.3	98.6	95.1						
<i>R. meliloti</i>	95.9	97.5	95.4	95.3	97.2	97.5	95.4	97.2					
<i>R. loti</i>	94.3	95.2	94.4	95.0	95.0	95.2	95.2	95.3	96.4				
<i>R. fredii</i>	96.2	97.3	95.9	95.6	97.0	97.3	95.7	97.0	99.0	96.0			
OK 55	96.8	96.2	96.3	96.8	95.9	96.1	96.8	96.8	95.6	95.4	95.5		
<i>Bradyrhizobium</i>													
<i>B. japonicum</i>	89.4	89.8	89.0	89.3	90.0	89.8	89.4	90.6	88.5	88.8	89.0	90.5	
<i>Escherichia</i>													
<i>E. coli</i>	82.0	82.4	81.8	82.0	82.6	82.4	81.7	82.6	77.1	80.1	79.5	82.2	80.3

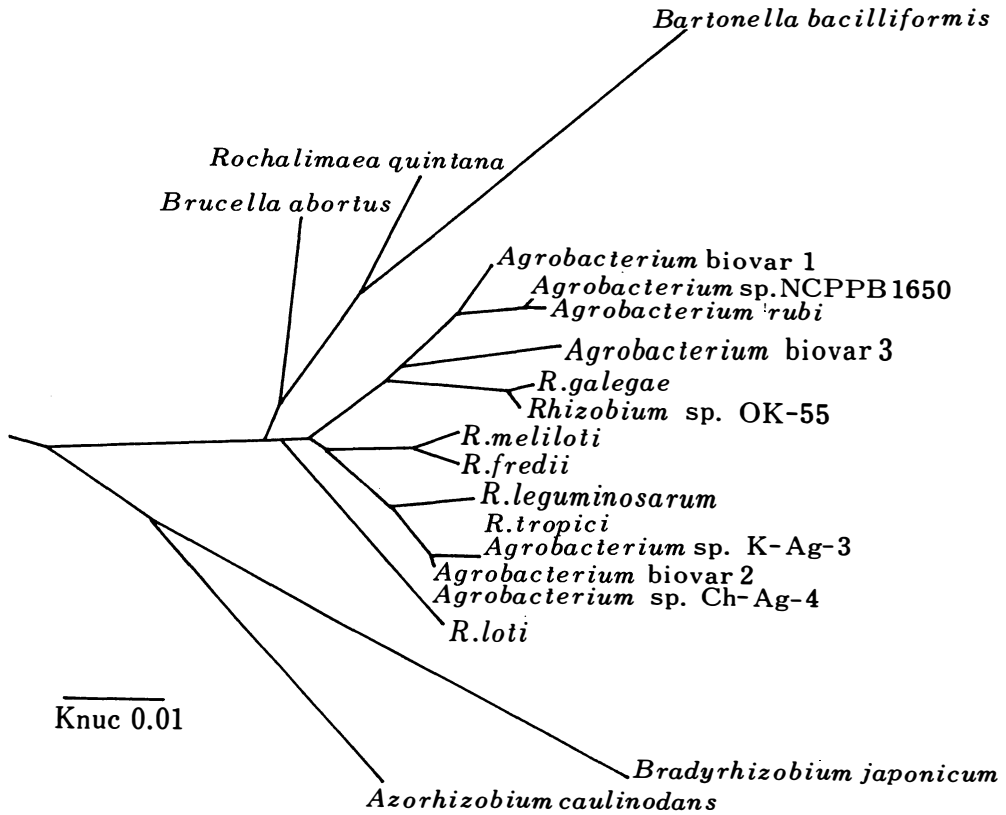


図-3 16S rRNA の全塩基配列に基づく *Agrobacterium* 属及び *Rhizobium* 属細菌の分子系統樹

の2菌株の *Rhizobium* 属細菌とを含むグループ、(2) *R. meliloti*, *R. fredii*, *R. leguminosarum*, *R. tropici* の4菌株の *Rhizobium* 属細菌と、biovar 2, K-Ag-3, Ch-Ag-4の3菌株の *Agrobacterium* 属細菌を含むグループ、(3) *R. loti* を含むグループ、の合計三つの小さなグループに細かく分けられることが認められた (図-3)。しかし、*Agrobacterium* は *Agrobacterium*, *Rhizobium* は *Rhizobium* という具合に、属ごとにまとまるという傾向はまったく認められなかった。この結果は、生理・生化学的性質、血清学的性質や遺伝学的性質に基づいて認められてきた結果 (KERSTERS and DE LEY, 1984; BOUZAR et al., 1986; JARVIS et al., 1986) と一致しており、プラスミドに基づいた属の定義や境界が系統関係を無視したものであることを示唆している。

また、*Agrobacterium* 属内の各 biovar (biovar 1, 2 及び 3) の間には、16 S rRNA の配列に明らかな相違があり、系統樹の上でそれぞれが異なった位置を占めることが認められた (図-3)。生理・生化学的性質、血清学的性質、化学分類学的性質あるいは DNA-DNA 相同性に関しても、biovar 間で相違がはっきりと認められている (KERSTERS and DE LEY, 1984; OPHEL and KERR, 1990; JARVIS et al., 1986; 澤田ら, 1992; SAWADA and IEKI, 1992; SAWADA et al., 1992 a)。以上の結果は、OPHEL ら (1990) が指摘しているように、本属の biovar を変種レベルに位置づけていることに対して、見直しが必要であることを示している。

おわりに

今後、植物病原細菌についても rRNA 解析が進み、系統進化に関する情報が次第に蓄積されてくることが予想される。その結果、主に表現形質によって特徴づけられてきた分類群がより均質なものに整理され、分類群間の系統関係が活発に論じられるようになると思われる。ただし、前述したように、分類について検討するためには、rRNA をはじめとする遺伝学的性質だけでは不十分であることが指摘されている。国際細菌分類命名委員会の特別委員会は、遺伝学的性質と表現形質との対応を明らかにすることが必要であるとしている (MURRAY et al., 1990)。また、根粒形成菌の分類においても、16 S rRNA の塩基配列や DNA-rRNA 相同性などの rRNA 解析だけではなく、各種表現形質や DNA-DNA 相同性、RFLP あるいはアイソザイム分析などについても検討し、できるだけ多くのゲノムの情報を考慮しなければならないとされている (GRAHAM et al., 1991)。植物病原細菌を対象

とする場合は、病原性をはじめとする植物との関係が重要な要因となってくるであろう。rRNA 解析を基盤の一つとしながらも、できるだけ多くの情報を加味した上で、実用性にも十分配慮した分類を行っていくことが望まれている。

ところで、rRNA 解析によって分類群が DNA や RNA のレベルでも均質なものに整理されると、DNA・RNA レベルの新しい同定技術を利用することができるようになるであろう。特に、16 S rRNA の塩基配列に関する情報が急速に蓄積されているので、この情報をデータベース化し、コンピューターを活用して分離菌株の同定を行うことが考えられている (山里, 私信)。さらに、分離菌株の塩基配列をいちいち決定することなく、簡便に同定を行う方法も検討されている。すなわち、rRNA に関連した RFLP を検出したり (RODRIGUES et al., 1991; GOTTLIEB and RUDNER, 1985; 平八重ら, 1992)、16 S rRNA 中に存在する特異性の高い配列をターゲットとしてプローブを作製し、phylogenetic stains (DE LONG et al., 1989) やドットプロットハイブリダイゼーション (WANG et al., 1991) などの手法を利用することが報告されている。また、特異性の高い配列に基づいてプライマーを設計し、PCR で同定を行ったり (保科・町田, 1992)、PCR-RFLP によって近縁な分類群を識別する試みもなされている (GURTNER et al., 1991)。

また、rRNA 解析で得られた成果をもとに検出技術を開発すれば、病気の診断や病原細菌の生態学的研究へと発展させることが可能であろう。具体的な手法については、前段で述べたようにさまざまなものが候補として考えられるが、その中でも PCR を利用することが大いに期待されている。PCR にはさまざまな利点があるが (佐野, 1990)、感度が高いことから被検材料からの直接検出が期待できる点が特に魅力である。このような利点を生かすためにも、植物病原細菌の rRNA 解析をさらに進め、データを蓄積していくことが必要であろう。

引用文献

- 1) BENTLEY, R. W. et al. (1991) : Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 487~494.
- 2) BOUZAR, H. et al. (1986) : Phytopathology 76: 1265~1269.
- 3) DE LEY, J. et al. (1987) : Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 35~42.
- 4) DE LONG, E. F. et al. (1989) : Science 243: 1360~1363.
- 5) DE RIJK, P. et al. (1992) : Nucleic Acids Res. 20: 2075~2089.
- 6) DE VOS, P. et al. (1989) : Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 35~49.
- 7) DEWHIRST, F. E. et al. (1989) : ibid. 39: 258~266.
- 8) FELSENSTEIN, J. (1985) : Evolution 39: 783~791.
- 9) FOX, G. E. et al. (1977) : Int. J. Syst. Bacteriol. 27:

- 44~57.
- 10) GIOVANNONI, S. J. et al. (1990) : Nature 345: 60~63.
 - 11) GOTTLIEB, P. and R. RUDNER (1985) : Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 244~252.
 - 12) GRAHAM, P. H. et al. (1991) : ibid. 41: 582~587.
 - 13) GURTLER, V. et al. (1991) : J. Gen. Microbiol. 137: 2673~2679.
 - 14) 平八重一之ら (1992) : 植物防疫 46 (9) : 320~325.
 - 15) HORI, H. (1975) : J. Mol. Evol. 7: 75~86.
 - 16) ——— and S. OSAWA (1987) : Mol. Biol. Evol. 4: 445~472.
 - 17) 保科定頼・町田勝彦 (1992) : 臨床と微生物 19: 167~170.
 - 18) JARVIS, B. D. W. et al. (1986) : Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 129~138.
 - 19) KERSTERS, K. and J. DE LEY (1984) : In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (ed. KRIEG, N. R. and J. G. HOLT), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 244~254.
 - 20) KIMURA, M. (1980) : J. Mol. Evol. 16: 111~120.
 - 21) 木村資生 (1984) : 分子進化学入門 (木村資生編), 培風館, 東京, pp. 1~38.
 - 22) LANE, D. J. et al. (1985) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6955~6959.
 - 23) 松本省吾・町田泰則 (1990) : 蛋白質・核酸・酵素 35: 190~203.
 - 24) MURRAY, R. G. E. et al. (1990) : Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 213~215.
 - 25) NEEFS, J.-M. et al. (1991) : Nucleic Acids Res. 19: 1987~2015.
 - 26) 根井正利 (1990) : 分子進化遺伝学, 培風館, 東京, pp. 247~287.
 - 27) OPHEL, K. and A. KERR (1990) : Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 236~241.
 - 28) OYAIZU, H. and C. R. WOESE (1985) : System. Appl. Microbiol. 6: 257~263.
 - 29) PASTER, B. J. et al. (1991) : J. Bacteriol. 173: 6101~6109.
 - 30) RODRIGUES, U. M. et al. (1991) : J. Appl. Bacteriol. 71: 509~516.
 - 31) SAITOU, N. and M. NEI (1987) : Mol. Biol. Evol. 4: 406~425.
 - 32) 佐野輝男 (1990) : 植物防疫 44 (12) : 557~561.
 - 33) SATHYAMOORTHY, M. et al. (1991) : Gene 108: 47~53.
 - 34) 澤田宏之 (1991) : 植物防疫 45 (8) : 332~336.
 - 35) SAWADA, H. and H. IEKI (1992) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 37~45.
 - 36) ——— et al. (1992 a) : ibid. 58: 46~51.
 - 37) ——— et al. (1992 b) : Int. J. Syst. Bacteriol. 投稿中
 - 38) 澤田宏之ら (1992) : 日本植物病理学会平成4年度大会講演要旨集, p. 104.
 - 39) STACKELRANDT, E. et al. (1988 a) : Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 321~325.
 - 40) ——— et al. (1988 b) : J. Gen. Appl. Microbiol. 34: 341~348.
 - 41) VAN LANDSCHOOT, A. et al. (1986) : Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 150~160.
 - 42) WANG, R. et al. (1991) : Appl. Environ. Microbiol. 57: 3666~3670.
 - 43) WEISBURG, W. G. et al. (1989) : J. Bacteriol. 171: 6455~6467.
 - 44) WELLS, J. M. et al. (1987) : Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 136~143.
 - 45) WILLEMS, A. et al. (1992) : ibid. 42: 107~119.
 - 46) WOESE, C. R. and G. E. FOX (1977) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5088~5090.
 - 47) ——— et al. (1985) : System. Appl. Microbiol. 6: 143~151.
 - 48) ——— (1987) : Microbiol. Rev. 51: 221~271.
 - 49) YANG, D. et al. (1985 a) : System. Appl. Microbiol. 6: 251~256.
 - 50) ——— et al. (1985 b) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4443~4447.

本 会 発 行 図 書

『応用植物病理学用語集』

濱屋悦次 (前農林水産省農業環境技術研究所微生物管理科長) 編著 B6判 506ページ

定価 4,800円 (本体4,660円) 送料 380円

植物病理学研究に必要な用語について、植物病理学はもちろん、農業、防除、生化学、分子生物学などについても取り上げ(約6,800語)、紛らわしい用語には簡単な説明を付けそれぞれを英和、和英に分けてアルファベット順に掲載し、また、付録には植物のウイルス、細菌、線虫の分類表を付した用語集です。植物病理学の専門家はもちろん広く植物防疫の関係者にとってご活用いただきたい用語集です。

お申し込みは前金(現金書留・郵便振替・小為替など)で直接本会までお申し込み下さい。