

植物防疫基礎講座：植物病原菌の分子系統樹—そのシステムと見方—細菌編（4）

植物病原性 *Ralstonia* 属細菌の分類の現状と課題

北海道農業研究センター 堀 田 光 生

はじめに

Ralstonia 属ではこれまでに2種の植物病原細菌が報告されており、特に青枯病菌 (*R. solanacearum*) はナス科作物ほか数百種の植物を犯す重要病原細菌として広く知られている (HAYWARD, 1991)。青枯病菌には宿主範囲、地理的分布、病原性、疫学的特徴および生理・生化学的性質等の異なる系統の存在が知られている。近年、分子生物学的手法を用いた解析が進み、青枯病菌は複数種の複合体 (species complex) と定義するほうが適切であると考えられてきている。現状では *Xanthomonas* 属細菌や *Pseudomonas syringae* 群細菌のような種の再分類は行われていないが、遺伝子情報に基づく新たな類別方法が提唱される (FEGAN and PRIOR, 2005) など、将来大幅に変更される可能性がある。今回は青枯病菌を中心に、*Ralstonia* 属細菌の分類の現状と課題について述べてみたい。

I 学名の変遷について

青枯病菌は1914年にSMITHが *Pseudomonas* 属に移行し、*P. solanacearum* として広く定着した。1973年、PALLERONI et al. は rRNA-DNA の相同性試験より *Pseudomonas* 属が遺伝的にヘテロな集団であり、五つの相同なグループ (I ~ V) に区分けできることを報告した。青枯病菌は他の植物病原細菌 *P. andropogonis*, *P. caryophylli*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. glumae*, *P. rubrisubalbicans* および動物病原細菌 *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. pickettii* 等の種とともにグループ II に分けられた。1992年、YABUCHI et al. は 16S rRNA の塩基配列に基づき、グループ II に属するいくつかの種とともに青枯病菌を *Burkholderia* 属への変更を提案した。さらに1995年、YABUCHI et al. は他の *Burkholderia* 属細菌との 16S rRNA の塩基配列、細菌学的性質等の違いから *Ralstonia* 属への変更を提案し、現在に至っている。

1996年、TAGHAVI et al. は 16S rRNA の塩基配列の解析結果から、*P. syzygii* (チョウジの Sumatra disease の病

原体) およびバナナの Blood disease の病原体 (通称 BDB) が青枯病菌と同一種レベルの高い相同性を有していることを明らかにした。2004年、VANECHOUTTE et al. は上記の報告および DNA-DNA 相同性試験の結果から *P. syzygii* の *Ralstonia* 属への移行を提案し、同属の植物病原細菌は2種となった。BDB についても *Ralstonia* 属の1種とするのが妥当であるが、いまだ有効な学名が提案されていない。

II 従来の青枯病菌の分類について

青枯病菌の病原学的、細菌学的、遺伝的な不均質性については昔から知られており、これらを区別するために様々な分類方法が検討されてきた (岡部・後藤, 1961; BUDDENHAGEN and KELMAN, 1964; HAYWARD, 1964)。

過去40年間は二つの異なったアプローチ、すなわち宿主との親和性に重点を置いたレースおよび生化学的特徴に重点を置いた biovar (生理型) が世界的に頻用されてきた。レース, biovar は、ともに亜種および病原型 (pathovar) 以下の非公式な分類方法である (HAYWARD, 1991)。

1 レース

本菌は現在、分離宿主および宿主範囲の違いから五つのレースに分けられている (DENNY and HAYWARD, 2001)。レース1 (多犯性) を除く他のレースでは宿主範囲が限られ、自然条件で特定の宿主以外から分離されないが、人工接種するとそれぞれ宿主以外の多くの植物を発病させるため、接種試験ではレースを判別できない場合がある。

2 Biovar

本菌はまた、9種の糖類からの酸の産生能の違いにより六つの biovar に分けられている (HAYWARD, 1994)。biovar とレースに相関性は認められないが、ジャガイモより分離される biovar 2 はレース3に相当すると考えられてきた。しかし、近年、南米アマゾン地域、日本を含むアジア地域および南西アフリカ地域で分離された biovar 2 は、世界各地でジャガイモより分離される biovar 2 と病原性および細菌学的性質 (トレハロース、イノシトール、D-リボースの利用能等) に違いが見られたことから、新しい生理型 biovar N2 (biovar 2T と記載されている) に分けられている (HAYWARD et al., 1990; FRENCH et al., 1993; HORTA et al., 2005)。

なお, biovar を検定するときには AYERS et al. の基本培

地に 0.1%濃度でペプトンを加えた軟寒天培地 (0.3%寒天) を使用し, 3 ~ 4 週間培養して観察することが重要で (HAYWARD, 1964 ; 1994), これ以外の培地では再現性が得られないことを指摘しておく。

3 日本産青枯病菌の類別

日本においては, 岡部・後藤 (1961) が 5 種の作物に対する病原性, バクテリオファージに対する感受性, 3 種の糖類の利用能に基づき, 日本産株を 13 の pathotype に類別した。尾崎・木村 (1992) は, 4 種のナス属植物に対する病原性の違いにより, ナス科野菜から分離された菌株が五つの菌群に類別できることを報告した。これら分類群で示された各系統は, 大半が上記のレース 1 に相当すると考えられ, レース 1 は病原性などの違いによりさらに複数の系統に分かれることを示している。

III 遺伝子情報に基づく青枯病菌の分類

1971 年, PALLERONI and DOUDOROFF は biovar の異なる青枯病菌株間の DNA-DNA 相同性が同一種の基準以下であることを明らかにし, biovar が種に相当する違いである可能性を示唆している。1989 年以降, 従来のレース, biovar 分類に加え, 分子生物学的手法 (RFLP, rRNA 遺伝子等の塩基配列, rep-PCR 等) を用いた解析により青枯病菌を分類・識別する試みが行われてきた。FEGAN and PRIOR (2005) はこれまでの解析結果を基に, 同菌を species complex と定義して phylotype, sequevar など新たな分類方法を提案した。従来の分類方法との関係を表-1 に示す。

1 Phylotype

Phylotype は rRNA 遺伝子 (16S, ITS) のほか, 病原性関連遺伝子 (*hrpB*, endoglucanase) の塩基配列情報 (FEGAN et al., 1998 ; Poussier et al., 2000 a ; 2000 b) を基に青枯病菌および近縁種を系統解析した結果, 明確化された分類群であり, 各 phylotype 間は種または亜種レベルの違いに相当するとされている。これは従来の RFLP 解析 (Cook et al., 1989), 16S rRNA の塩基配列

(TAGHAVI et al., 1996) に基づく division, subdivision の概念を発展させたものである。

Phylotype I にはアジア由来の biovar 3, 4, 5 の株が, phylotype II はアメリカ由来の biovar 1, 2, N2 の株がそれぞれ含まれる。世界に広く分布するレース 3 (ジャガイモを犯す), レース 2 (バナナ, ヘリコニアを犯す) は phylotype II に, レース 4 (ショウガを犯す), レース 5 (クワを犯す) は phylotype I にそれぞれ含まれる。

Phylotype III にはアフリカ由来の biovar 1, N2 が, phylotype IV にはアジア由来の biovar 1, 2, N2 のほか, 近縁種 *R. syzygii* と BDB がそれぞれ含まれる。

FEGAN and PRIOR (2005) は, ITS 領域の塩基配列情報を基にしたマルチプレックス PCR による各 phylotype の簡易識別法についても報告している (表-2, 図-1)。各 phylotype は複数の sequevar から構成される。

2 Sequevar

Sequevar は, endoglucanase 遺伝子の保存領域の塩基配列の違いを基に類別する方法で, 2 株以上の相同な配列を有する菌株がある場合にのみ設定され, これまでに 20 以上の sequevar が設定されている。主な sequevar は複数の糖類, 有機酸の利用能の違いによっても区別できる。各 sequevar はさらに複数の系統に分けられ, これらは PFGE, AFLP, rep-PCR 等の DNA フィンガープリント解析で識別する。詳細は原文を参照いただきたい。

3 日本産菌株の分類学的位置付け

日本産菌株のレース, biovar と phylotype との関係を

表-1 青枯病菌の分類体系

Phylotype	Biovar	レース	分離地域
I	3, 4, 5, (N2)	1, 4, 5	アジア
II	1, 2, N2	1, 2, 3	アメリカ他
III	1, N2	1	アフリカ
IV	1, 2, N2 (<i>R. syzygii</i>) (BDB)	1, 3	アジア (インドネシア)

表-2 Phylotype 識別用 PCR プライマー

プライマー a)	塩基配列 (5'-3')	特異性 (Phylotype)	増幅サイズ
Nmult21 : 1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	I	144 bp
Nmult21 : 2F	AAGTTATGGACGGTGGAAGTC	II	372 bp
Nmult23 : AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	III	91 bp
Nmult22 : InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	IV	213 bp
Nmult22 : RR ^{b)}	TTTCGCTTGACCCTATAACGAGT	すべて	

a) マルチプレックス PCR では各プライマー濃度を 6 ~ 18 pmol, アニールン温度を 59℃に設定。 b) 共通 reverse プライマー。

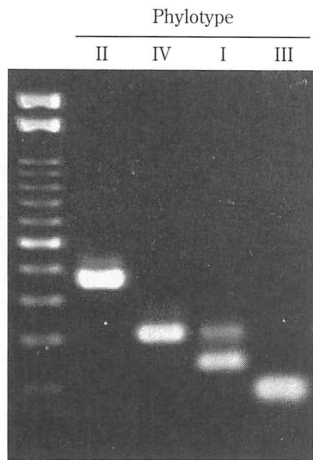


図-1 PCR法による Phylotype の識別

表-3 日本産青枯病菌の分類

Biovar	酸の産生			分離植物	レース	Phylotype
	A	B	C			
3	+	+	V	ナス科ほか	1	I
4	-	+	V	ナス科ほか ショウガ科	1 4	I
N2	+	-	+	ジャガイモ以外 のナス科 ジャガイモ	1 3	I IV

A: マルトース, ラクトース, セロビオース. B: マンニトール, ソルビトール, ダルシトール. C: トレハロース, イノシトール, D-リボース. +: 陽性, -: 陰性, V: 菌株により反応が異なる.

表-3 に示した。表-3 からわかる通り, biovar と分離植物がわかれば塩基配列情報を解読しなくても phylotype が推定可能である。日本では主に biovar 3, 4 が分離されるが, これらはすべて phylotype I に属する。biovar N2 の場合, ジャガイモ分離株のみが phylotype IV となる。表-3 に対応しない菌株が出た場合, 上記のマルチプレックス PCR 法や特定遺伝子の塩基配列について調査する必要がある。

Phylotype, sequevar による分類方法と従来のナス属植物に対する菌群や pathotype との関連は不明な点が多く, 未整備な面もある。今後, 外国産菌株との遺伝的関係や病原性関連遺伝子群の比較調査, 海外から導入された植物体や種苗で新発生した系統の調査などの植物検疫の場面では, 青枯病菌の由来やその発生地域を特定

するための重要な指標になると考えられる。

おわりに

青枯病は世界的に重要な病害であり, 青枯病菌の分類体系の確立は植物病理分野のみならず, 作物育種, 植物検疫関係者にとっても重要である。Phylotype や sequevar は青枯病菌を単一種名のまま保持しながら遺伝情報を取り入れた分類体系の構築を試みたものであり, 従来の分類方法との矛盾点が見られないため既に一部の研究者で利用されてきている (WICKER et al., 2002; VILLA et al., 2004; PRIOR and FEGAN, 2005)。

青枯病菌が種, 亜種レベルで複数の系統に分けられることは明らかであり, 今後, 植物病理分野以外の分類学者による新たな提案が行われる可能性が高い。ただ, その場合も上記の分類体系を把握しておけば, 無用な混乱は避けられるのではないかと考えられる。

引用文献

- 1) BUDDENHAGEN, I. and A. KELMAN (1964): Ann. Rev. Phytopathol. 2: 203 ~ 230.
- 2) COOK, D. et al. (1989): Mol. Plant-Microbe Interact. 2: 113 ~ 121.
- 3) DENNY, T. P. and A. C. HAYWARD (2001): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, APS Press, St. Paul, p. 151 ~ 174.
- 4) FEGAN, M. and P. PRIOR (2005): Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex, APS Press, St. Paul, p. 449 ~ 461.
- 5) ——— et al. (1998): Bacterial Wilt, Disease: Molecular and Ecological Aspects, Springer, Heidelberg, p. 19 ~ 33.
- 6) FRENCH, E. R. et al. (1993): Bacterial Wilt, ACIAR, Canberra, p. 70 ~ 77.
- 7) HAYWARD, A. C. (1964): J. Appl. Bacteriol. 27: 265 ~ 277.
- 8) ——— (1991): Ann. Rev. Phytopathol. 29: 65 ~ 87.
- 9) ——— (1994): Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*, CAB International, Wallingford, p. 123 ~ 135.
- 10) ——— et al. (1990): J. Appl. Bacteriol. 69: 269 ~ 280.
- 11) HORITA, M. et al. (2005): J. Phytopathol. 153: 209 ~ 213.
- 12) 岡部徳夫・後藤正夫 (1961): 静岡大農研報 11: 25 ~ 42.
- 13) 尾崎克己・木村俊彦 (1992): 中国農研報 10: 49 ~ 58.
- 14) PALLERONI, N. and M. DOUDOROFF (1971): J. Bacteriol. 107: 690 ~ 696.
- 15) ——— et al. (1973): Int. J. Syst. Bacteriol. 23: 333 ~ 339.
- 16) POUSSIER, S. et al. (2000 a): Microbiology 146: 1679 ~ 1692.
- 17) ——— et al. (2000 b): System. Appl. Microbiol. 23: 479 ~ 486.
- 18) PRIOR, P. and M. FEGAN (2005): Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex, APS Press, St. Paul, p. 405 ~ 414.
- 19) TAGHAVI, M. et al. (1996): Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 10 ~ 15.
- 20) VANECHOUTTE, M. et al. (2004): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 317 ~ 327.
- 21) VILLA, J. E. et al. (2004): J. Gen. Plant Pathol. 71: 39 ~ 46.
- 22) WICKER, E. et al. (2002): Bacterial Wilt Newsl. 17: 20 ~ 21.
- 23) YABUCHI, E. et al. (1992): Microbiol. Immunol. 36: 1251 ~ 1275.
- 24) ——— et al. (1995): ibid. 39: 897 ~ 904.