



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	植物病原細菌の分類・同定(内容の要旨)
Author(s)	楠元, 智子
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第386号
Issue Date	2005-09-14
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/3083

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本国籍)	楠元智子(愛媛県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第386号
学位授与年月日	平成17年9月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	植物病原細菌の分類・同定
審査委員会	主査 静岡大学 教授 瀧川雄一 副査 静岡大学 教授 露無慎二 副査 岐阜大学 教授 百町満朗 副査 信州大学 助教授 久我ゆかり

論文の内容の要旨

本学位論文は、植物病原細菌の多様性と系統進化について、特に β -Proteobacteriaに属する細菌を中心に、新たな病害発生にともなう3種の病原の同定と4種の植物病原細菌の分類学的位置づけの検討を行い、その結果得られた数多くの新知見をまとめたものである。

1987年頃より福島、栃木、愛媛で発生し問題となっていたイチゴ斑点細菌病では、細菌学的性状、遺伝子解析、病原性の試験などから、その病原が従来考えられていた*Burkholderia*ではなく*Herbaspirillum* sp.であることを明らかとした。*Herbaspirillum*属細菌によるイネ科作物以外の病害は、これが初めての報告であった。さらに、本菌によって生ずる病徴は環境条件に左右されることをつきとめた。また、本病原細菌の簡易同定に*hrpO*相同領域上流に設計されたプライマーHV3F、HV3Rが有効であることを示した。

1996年に同定依頼を受けたスマトラ島におけるパナナの萎凋病害の発生では、その病原がBlood disease bacterium (BDB) *Ralstonia* sp.であることを明らかとした。本菌については、従来報告されていた16S rDNAの特徴を再確認するとともに、詳細な細菌学的性状を明らかとした。さらに、BDBがクロラムフェニコールおよびテトラサイクリン耐性を有し、この性質が選択培地作成に有効であることをつきとめた。

1997年に静岡で発生した新病害、カンパニュラ青枯病の病原の同定を行い、世界で初めて*R. solanacearum*によるキキョウ科(Campanulaceae)の青枯病の発生を確認した。

イネ苗立枯細菌病菌*Burkholderia plantarii*とバンダより分離される*B. vandii*の分類学的位置づけ(異同)について再検討し、両者がほとんどの細菌学的性状が一致し、キノン、脂肪酸組成、病原性についても差は見られず、遺伝的にも非常に類似し、DNA-DNA

相同性では種の境界（70%）以上の相同性を有し、同種と考えられた。しかし、ラムノースおよびグリセロールの利用性が異なり、16S rDNA シークエンス解析においても両種は非常に近縁ながら、別々のクラスターを形成した。さらに 16S rDNA および 16S-23S ITS 領域に、それぞれに特異的な PCR プライマーを設計して両者を識別することに成功した。ERIC および REP PCR、*fliC* の RFLP 解析でも、両種は別の系統であることが示唆された。これらのことから、*B. plantarii* と *B. vandii* は種以下のレベルで区別されることを明らかとし、両種をそれぞれ亜種として *B. p. subsp. plantarii*、*B. p. subsp. vandii* とすべきことを示した。

クロキがん腫細菌病菌およびイリス類葉枯細菌病菌の分類学的位置づけの再検討を行った。‘*Pseudomonas symplaci*’ として報告されていたクロキがん腫細菌病菌は、主なキノンや脂肪酸組成の特徴および細菌学的性状は *Pseudomonas* 属ではなく *Burkholderia* 属に当てはまるものであり、16S rDNA シークエンス解析で *Burkholderia* 属に所属する新種とすべきであると考えられた。イリス類葉枯細菌病菌は、*Xanthomonas campestris* pv. *tardicrescens* として同定されていた。しかし、黄色色素は xanthomonadin ではなく、脂肪酸組成の特徴も *Xanthomonas* 属の特徴と異なっていた。16S rDNA シークエンス解析で *Xylophilus ampelinus* と近縁であることが示され、細菌学的性状も *X. ampelinus* とよく一致していた。イリス類葉枯細菌病菌は、*Xanthomonas* 属ではなく、*Xylophilus* sp. であると同定された。

さらに、 β -Proteobacteria 所属の植物病原細菌について 16S rDNA シークエンスに基づく系統解析、*hrpO* 相同領域の系統解析、*fliC* の系統解析の比較を行ったところ、必ずしも一致しないことを明らかにし、*hrpO* の系統関係は、*Burkholderia* 属を 2 つに分け、*Burkholderia* 属内よりも属を越えて他の β -Proteobacteria の属により近い系統関係を示すグループが存在した。*fliC* の系統解析では、属ごとのまとまりは明瞭であったが、属単位で 16S rDNA による系統関係とは異なっていた。特に、*Acidovorax* の *fliC* が同じ β -Proteobacteria の *Burkholderia* 属よりも γ -Proteobacteria の *Xanthomonas* 属に近いことが示された。以上のことから、 β -Proteobacteria ではゲノム内の多くの遺伝子が、独立の系統進化を遂げていることが明らかとなった。さらに、パルスフィールド（PFGE）を用いて、 β -Proteobacteria 所属細菌のゲノム構造解析を試みたところ、調査した 5 菌株いずれもメガサイズのゲノムを複数有する、複合ゲノムであった。 β -Proteobacteria の多くの種がメガサイズの複合ゲノム構造を有していることが明らかとなり、このことが β -Proteobacteria のゲノム構造の特徴の 1 つであり、このことがゲノム内の多くの遺伝子が多様であることの一因であると推察した。

以上を要するに、本研究ではイチゴ、バナナ、カンパニュラの 3 種類に発生した病害の病原体の同定を行い、*Herbaspirillum* sp. など新たな病原を確認した。また、分類学的に問題のあった *Burkholderia plantarii* と *B. vandii* の関係を明らかにし亜種とすべきこと、ナカハラクロキこぶ病菌、イリス類葉枯細菌病菌をそれぞれ *Burkholderia* および *Xylophilus* の新種であることを明らかにした。また、 β -Proteobacteria の多くの植物病原細菌の遺伝子系統解析をおこない、*fliC* 遺伝子や *hrpO* 遺伝子が 16SrDNA とは異なった系統進化を遂げたことを明らかにし、その原因の一端が複合ゲノム構造にあることを明らかにするなど、植物病原細菌の分類同定に関する数多くの新知見が得られた。

審 査 結 果 の 要 旨

本学位論文は、植物病原細菌の多様性と系統進化について、特に β -Proteobacteria に属する細菌を中心に、新たな病害発生にともなう 3 種の病原の同定と 4 種の植物病原細菌の分類学的位置づけの検討を行い、その結果得られた数多くの新知見をまとめたものである。

1987 年頃より福島、栃木、愛媛で発生し問題となっていたイチゴ斑点細菌病では、細菌学的性状、遺伝子解析、病原性の試験などから、その病原が従来考えられていた *Burkholderia* ではなく *Herbaspirillum* sp.であることを明らかとし、イネ科作物以外で初めて *Herbaspirillum* 属細菌による病害の存在を示した。さらに本菌によって生ずる病害は環境条件に左右されることをつきとめた。また本病原細菌の特異的検出プライマーを作成することに成功した。

1996 年に同定依頼を受けたスマトラ島におけるバナナの萎凋病害の発生では、その病原が Blood disease bacterium (BDB) *Ralstonia* sp.であることを明らかとした。本菌については、従来報告されていた 16S rDNA の特徴を再確認するとともに、詳細な細菌学的性状を明らかとした。さらに、BDB がクロラムフェニコールおよびテトラサイクリン耐性を有し、この性質が選択培地作成に有効であることをつきとめた。

1997 年に静岡で発生した新病害、カンパニュラ青枯病の病原の同定を行い、世界で初めて *R. solanacearum* によるキキョウ科 (Campanulaceae) の青枯病の発生を確認した。

イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* とバンダより分離される *B. vandii* の分類学的位置づけ (異同) について再検討し、両者はほとんどの細菌学的性状が一致し、キノン、脂肪酸組成、病原性についても差は見られず、遺伝的にも非常に類似し、DNA-DNA 相同性では種の境界 (70%) 以上の相同性を有し、同種と考えられたが、ラムノースおよびグリセロールの利用性が異なり、16S rDNA シークエンス解析において独立クラスターを形成した。さらに 16S rDNA および 16S-23S ITS 領域に、それぞれに特異的な PCR プライマーを設計することに成功した。ERIC および REP PCR、*fliC* の RFLP 解析でも、両種は別の系統であることが示唆された。これらのことから、*B. plantarii* と *B. vandii* は種以下のレベルで区別されることを明らかとし、両種をそれぞれ亜種として *B. p. subsp. plantarii*、*B. p. subsp. vandii* とすべきことを明らかとした。

クロキがん腫細菌病菌およびイリス類葉枯細菌病菌の分類学的位置づけの再検討を行った。‘*Pseudomonas symploci*’として報告されていたクロキがん腫細菌病菌は、主なキノンや脂肪酸組成の特徴および細菌学的性状は *Pseudomonas* 属ではなく *Burkholderia* 属に当てはまるものであり、16S rDNA シークエンス解析で *Burkholderia* 属に所属する新種とすべきであると考えられた。イリス類葉枯細菌病菌は、*Xanthomonas campestris* pv. *tardicrescens* として同定されていたが、黄色色素は xanthomonadin ではなく、脂肪酸組成の特徴も *Xanthomonas* 属の特徴と異なっていた。16S rDNA シークエンス解析で *Xylophilus* 属と近縁であることが示され、*Xylophilus* sp. であると同定された。

さらに、 β -Proteobacteria 所属の植物病原細菌について 16S rDNA シークエンスに基づく系統解析、*hrpO* 相同領域の系統解析、*fliC* の系統解析の比較を行ったところ、必ずしも一致しないことを明らかにし、*hrpO* の系統関係は、*Burkholderia* 属を 2 つに分け、*Burkholderia* 属内よりも属を越えて他の β -Proteobacteria の属により近い系統関係を示すグループが存在した。*fliC* の系統解析では、属ごとのまとまりは明瞭であったが、属単位で 16S rDNA による系統関係とは異なっていた。特に、*Acidovorax* の *fliC* が同じ β -Proteobacteria の *Burkholderia* 属よりも γ -Proteobacteria の *Xanthomonas* 属に近いことが示された。以上のことから、 β -Proteobacteria ではゲノム内の多くの遺伝子が、独立の系統進化を遂げていることが明かとなった。さらに、パルスフィールド (PFGE) を用いて、 β -Proteobacteria 所属細菌のゲノム構造解析を試みたところ、調査

した 5 菌株いずれもメガサイズのゲノムを複数有する、複合ゲノムであった。β-Proteoacteria の多くの種がメガサイズの複合ゲノム構造を有していることが明らかとなり、このことがβ-Proteobacteria のゲノム構造の特徴の1つであり、このことがゲノム内の多くの遺伝子が多様であることの一因であると推察した。

以上の内容について審査した結果、学術上も応用上も極めて有意義な成果が得られていると判断され、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

Kusumoto, S., Titik, N. A., Mujim, S., Ginting, C., Tsuge, T., Tsuyumu, S. and Takikawa, Y. (2004). Occurrence of Blood Disease of Banana in Sumatra, Indonesia. J. Gen. Plant Pathol. 70: 45-49.

Kusumoto, S. and Takikawa, Y. (2005). Bacterial wilt of bellflower caused by *Ralstonia solanacearum* in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 71: 158-159.