

## Burkholderia

愛媛県農業試験場生産環境室 楠元 智子

### はじめに

*Burkholderia* 属は *Proteobacteria* 門の *Betaproteobacteria* 綱に所属する属で、40 を超える種が存在し、現在も新種等の発見・提案が相次いでいるグループである。本属は、もともと旧 *Pseudomonas* 属に所属していたグループであったが、分類手法の多様化によってその異質性が顕著になり、1992年に YABUCHI et al. によって *Pseudomonas* 属より分けられ、新しい属として設立されたグループである (YABUCHI et al., 1992)。そのため、旧名に馴染みが深かった方はしばらく違和感を覚えたかもしれないが、新属設立から10年以上経ちようやく改名後の名が定着してきたのではないだろうか。

*Burkholderia* 属は人間を含む動植物の病原細菌として知られる種を含むだけでなく、その分離源は、我々の身近にある土壌・水・植物などの環境分離株、さらに医療サンプル・産業排水など非常に広範囲にわたり、バラエティに富んだ属である。本属には *B. cepacia* や *B. gladioli* のように同一種の中に植物病原細菌と非植物病原細菌が混在する種も存在する。植物病原細菌としては、*B. andropogonis*, *B. caryophylli*, *B. cepacia*, *B. glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii* の6種が知られている。さらに、上記6種に加えバンダ褐色腐敗病菌 *B. vandii* およびクロキがん腫細菌病菌 *Burkholderia* sp. がある。*B. vandii* については、イネ苗立枯細菌病菌 *B. plantarii* と種以下のレベルでの違いであることが言われており、本稿では *B. plantarii* (*B. vandii*) として扱った (COENY et al., 1999; 平川ら, 1999; 楠元・瀧川, 2000)。クロキがん腫細菌病菌は *Burkholderia* 属の新種で、種については未決定の植物病原細菌であり、本稿においては *Burkholderia* sp. とした (楠元・瀧川, 1999)。*B. cepacia* は少なくとも九つのグループに分類され、genomovar I~IX として類別されており *B. cepacia* complex と呼ばれている。近年、genomovar を種として独立させる方向にある。植物病原細菌は、genomovar I と III に属し、

I を *B. cepacia*, III を *B. cenocepacia* とすることが提案されている (SOTOKAWA and TAKIKAWA, 2004; SEO and TSUCHIYA, 2005)。しかし、中間を示す菌株が存在することも確認されているため、本稿では *B. cepacia* とし、genomovar が判明しているものにはそれを明記した。

本稿においては、*Burkholderia* 属の16S rRNAを中心としたハウスキーピング遺伝子を用いた系統解析と *Burkholderia* 属の植物病原細菌の同定について述べた。また、ハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子 *hrpO* および *flhC* の系統解析について紹介する。

### I 16S rRNA 遺伝子に基づく *Burkholderia* 属の分子系統樹

系統分類に用いられる遺伝子には数種のハウスキーピング遺伝子 (ほとんどの細菌に広く存在し生存に不可欠な遺伝子) があるが、*Burkholderia* 属全体についてデータが揃い系統解析に用いることができるのは、現在のところ16S rRNAのみである。系統分類に用いられる指標については、本シリーズの総説において瀧川により解説されているのでそれを参照していただきたい。*Proteobacteria* 門の *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* の各綱は16S rRNAに基づいて分けられている。16S rRNAによって、何%以上の相同性で同属、同種といった基準はないが、*Burkholderia* 属の新種提案では必ず16S rRNAによる系統解析が行われ、それを一つの指標として分類されている。よって、16S rRNA 遺伝子による系統樹では *Burkholderia* 属は一つの大きなクラスターを形成し、属としてのまとまりは明瞭である。*Burkholderia* 属には、40 を超える種が提案されているが、その中で植物病原細菌として知られるのは6種である。これらの植物病原細菌は、*Burkholderia* 属の大きなクラスターの中に散在して存在し、植物病原細菌だけが単一の起源で進化したのではないことがわかる。ここでは属全体の系統樹は割愛し、後述する他の遺伝子の系統解析との比較のため、*Burkholderia* 属の植物病原細菌および他属の植物病原細菌数種を含めた16S rRNA 遺伝子による系統樹を示す (図-1)。属単位では、*Burkholderia* 属は同じく *Betaproteobacteria* 綱である *Ralstonia* 属、*Acidovorax* 属、

Phylogenetic Analysis of Phytopathogenic Genus *Burkholderia* spp. and Related Bacteria. By Satoko KUSUMOTO

(キーワード: *Burkholderia* 属, *Betaproteobacteria*, 系統解析, 16S rRNA, *hrpO* 遺伝子, *flhC* 遺伝子)

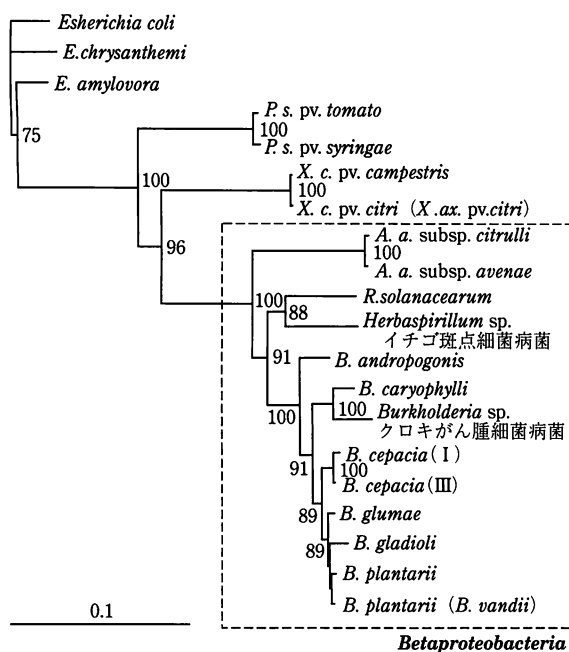


図-1 16S rDNA 遺伝子に基づく分子系統樹

E.: *Erwinia*, P.s.: *Pseudomonas syringae*, X.c.: *Xanthomonas campestris*, ax.: *axonopodis*, A.a.: *Acidovorax avenae*, R.: *Ralstonia*. 系統樹はNJ法により作成。分岐点の数値はブーストラップ確率。

*Herbaspirillum* 属と同じクラスターに属する。また、*Burkholderia* 属内では、*B. plantarii*, *B. gladioli*, *B. glumae* が一つのサブクラスターを形成し、それが *B. cepacia* complex からなるサブクラスター近くに位置する。そして、それらのクラスター、*B. andropogonis*, *B. caryophylli*, クロキがん腫細菌病菌が、非植物病原の *Burkholderia* 属細菌の中に散在するトポロジー (樹形) となる。

16S rDNA 以外の分子指標による *Burkholderia* 属の系統解析では、*recA* 遺伝子に基づく系統樹が報告されている (PAYNE et al., 2005)。*recA* 遺伝子による系統解析においても、*Burkholderia* 属は属としてのまとまりを見せ、16S rDNA 遺伝子の系統解析とほぼ一致している。また、*gyrB*, *rpoD* についてもシーケンス解析が進んでいる。2005年の日本植物病理学会大会において、前田ら (2005) により *gyrB*, *rpoD* 遺伝子による *B. gladioli*, *B. glumae*, *B. plantarii* の系統解析が報告された。*gyrB*, *rpoD* についても16S rDNA や *recA* 遺伝子の系統関係と同様であった。前田らは、この *gyrB* 遺伝子の解析をもとに、これら3種の植物病原細菌の multiplex PCR による同時識別を可能としている。

## II *Burkholderia* 属の既知植物病原細菌の同定について

植物病原細菌であることが明瞭で、*Burkholderia* 属であるところまでわかれば、既報の種ごとの細菌学的性状の違いによって同定することが可能である。しかし、時間的な問題や性状を調べるのが不慣れで遺伝的手法の方が得意であるというような場合は、分子系統解析など分子生物学的手法を行うのが有効と考える。*Burkholderia* 属に所属する既知の植物病原細菌については、16S rDNA による分類と生理的、化学的分類指標による分類とが一致しているからである。16S rDNA 解析によって同定を行うのに混乱はないと思われる。

全く属や種の見当がつかない場合、またはシーケンス解析をとっても簡便に行うことができる環境にある場合には、まず16S rDNA 遺伝子解析を行って、おおよその見当をつけることも有効である。しかし、シーケンス解析をすぐに行えず、かつ既知の植物病原細菌の中である程度種が推測される場合であれば、特異的PCRプライマーを利用することも簡易かつ有効である。分子系統解析がさかんに行われるようになった結果、それらのデータをもとに種や属の特異的プライマーが設計・公表されている。参考に16S rDNA および16S-23S rDNA ITS 領域に設計されているプライマーを表-1に示す。

一方 *B. cepacia* complex の各 genomovar は遺伝的手法を用いなければ同定できない。*B. cepacia* complex では、多数の遺伝子を同時に用いた解析 Multilocus Sequence Typing (MLST) の報告があるが、各遺伝子の解析結果と genomovar が必ずしも一致しなかったり、さらに細分されたりする結果が示されており、各 genomovar を同定するのは注意が必要である (BALDWIN et al., 2005)。

## III *hrpO* および *fliC* 遺伝子の分子系統樹

現在、系統解析に用いられている遺伝子は生存に必須で、急激な変異が起らず保存性が高いことから、系統関係を強く反映しているだろうと考えられている。実際、いくつかのハウスキーピング遺伝子の系統解析の結果は、ほぼ似た系統関係を示すことが報告されており、上述したように、*Burkholderia* 属においても、16S rDNA, *recA*, *gyrB* および *rpoD* による系統解析の結果はおおよそ一致する。

では、他の生存に必要不可欠ではない遺伝子については、どうなのであろうか？ 本シリーズの総説において瀧川は、「それぞれの遺伝子」の系統解析の重要性を車

表-1 *Burkholderia* 属細菌の特異的プライマー

特異性	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)	文献	
<i>B. andropogonis</i>	Pf	AAGTCGAACGGTAACAGGGA	410	BAGSIC, R. D. et al. (1995)	
	Pr	AAAGGATATTAGCCCTCGCC			
<i>B. cepacia</i>	CMG-16-1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	468	BAUERNFEIND, A. et al. (1998)	
	CM-16-2	CCGRCTGTATTAGAGCCA			
	CMG-23-1	ATAGCTGGTTCTCTCCGAA			
<i>B. gladioli</i>	CM-23-2	CTCTCCTACCATGCGYGC	388	BAUERNFEINF, A. et al. (1998)	
	CMG-16-1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG			
	G-16-2	CGAAGGATATTAGCCCTC	468	BAUERNFEINF, A. et al. (1998)	
	CGM23-1	ATAGCTGGTTCTCTCCGAA			
	G-23-2	CCTACCATGCAYATAAAT	388	BAUERNFEINF, A. et al. (1998)	
	LP4 <sup>a)</sup>	AGAAGCTCGCGCCACG			
	LP1 <sup>a)</sup>	GGGGGGTCCATTGCG			
<i>B. glumae</i>	LP2 <sup>a)</sup>	TAGCAAGCTTAACCGA	700	WHITBY, P. W. et al. (2000)	
	GL-13f	ACACGGAACACCTGGGTA	400		TAKEUCHI, T. et al. (1997)
	GL-14r	TCGCTCTCCCGAAGAGAT			
<i>B. plantarii</i>	PL12f	AGCCAGTCAGAGGATAAGTC	180	TAKEUCHI, T. et al. (1997)	
	PL11r	CAATTGAGCCGAACATTTAAG			
<i>Burkholderia</i>	Burk3	CTGCGAAAGCCGGAT	500	SALLES, J. F. et al. (2002)	
	BurkR	TGCCATACTCTAGCYYG			

<sup>a)</sup> LP4-LP1 または LP4-LP2 のプライマーペア。M = A or C, R = A or G, Y = C or T. 注意: 条件などについて原著の文献を参照のこと。

のシャーシとボディーに例え、モデルチェンジ=特殊遺伝子の獲得を見極めることが必要だと述べている。筆者は、いわゆる生存必須のハウスキープング遺伝子ではなく、瀧川の述べる「それぞれの遺伝子」に当たる *hrpO* 遺伝子および *fliC* 遺伝子の系統解析を試み、興味深い結果が得られたので、ここに紹介する。

### 1 *hrpO* 遺伝子の分子系統樹

*hrp* 遺伝子群は、主要なグラム陰性の植物病原細菌に共通して存在することが報告されており、その相同領域は植物だけでなく動物病原細菌にも存在し、水平移動することが報告されている (SAWADA et al., 1999)。*hrpO* 遺伝子は、*hrp* 遺伝子群の中でも保存性が高い領域の一つである。筆者は、*Burkholderia* 属に所属する6種の植物病原細菌も *hrp* 相同領域をもつ菌株が存在することを確認している。解析が可能であった *Burkholderia* 属の植物病原細菌5種7菌株 (*B. plantarii*, *B. glumae*, *B. cepacia*, *B. caryophylli*, クロキがん腫細菌病菌 *Burkholderia* sp.) および他属の植物病原細菌8菌株について *hrpO* 遺伝子の系統解析を行った。なお、*B. cepacia* complex においては、genomovar I (*B. cepacia*) には *hrp* 領域が存在せず、genomovar III (*B. cenocepacia*) には *hrp* 領域が存在する。

解析に用いたのは *hrpO* 相同領域の一部 325 bp であるが、*hrpO* 全領域が明らかとなっている菌株について解

析を行った場合と同様な傾向の系統樹が得られることを確認している。*hrpO* 遺伝子の系統樹を図-2に示す。16S rRNA, *recA* および *gyrB* のいずれ解析においても、*B. glumae*, *B. plantarii*, *B. gladioli* からなるクラスター近くに *B. cepacia* が位置するという系統関係が支持されていた。しかし *hrpO* 遺伝子の系統解析においては、*B. cepacia* は *B. glumae*, *B. plantarii* とは離れ *B. caryophylli* とともに別のクラスターに位置した。

### 2 *fliC* 遺伝子の系統樹

*fliC* は鞭毛遺伝子で、広く細菌の分類学的研究に用いられており、その構造はN末端の約400 bpとC末端の約300 bpが保存性の高い領域で、中央部分は多様性に富むことがわかっている (WINSTANLEY and MORGAN, 1997)。同一種内でも大きさが異なるものが報告されており、*B. cepacia* では種の多様性解析に用いられている (HALES et al., 1998)。*fliC* 遺伝子のN末端約450 bpを用いて系統解析を行った。系統樹を図-3に示す。16S rRNAによる系統樹と、*fliC* の系統樹を比較すると属単位での系統関係が異なっている。16S rRNAでは、*Betaproteobacteria* 綱 (*Burkholderia*, *Acidovorax*, *Ralstonia*) は一つのクラスターを形成するが、*fliC* では *Acidovorax* 属が *Ralstonia* や *Burkholderia* 属と離れ、*Xanthomonas* 属と同じ分枝に位置した。すなわち、*fliC* 遺伝子の系統解析では、属単位の系統関係が16S rRNAによるものと異な

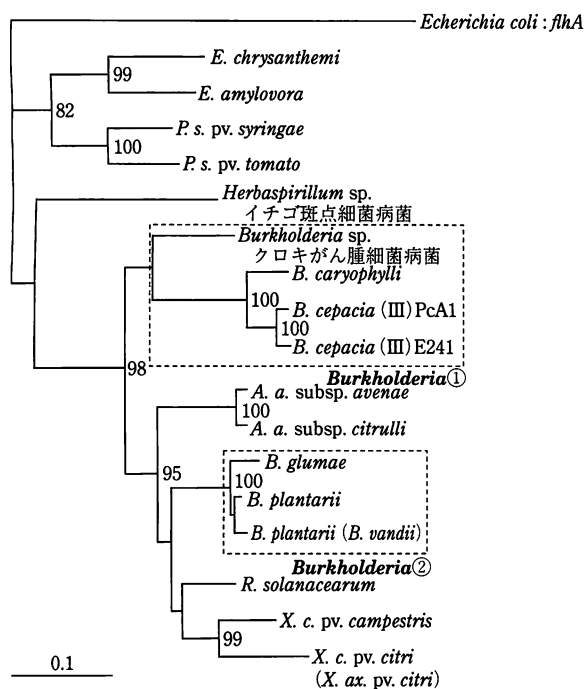


図-2 *hrpO* 遺伝子の分子系統樹

*E.* : *Erwinia*, *P.s.* : *Pseudomonas syringae*, *X.c.* : *Xanthomonas campestris*, *ax.* : *axonopodis*, *A.a.* : *Acidovorax avenae*, *R.* : *Ralstonia*. 系統樹は NJ 法により作成。分岐点の数値はブーツストラップ確率。

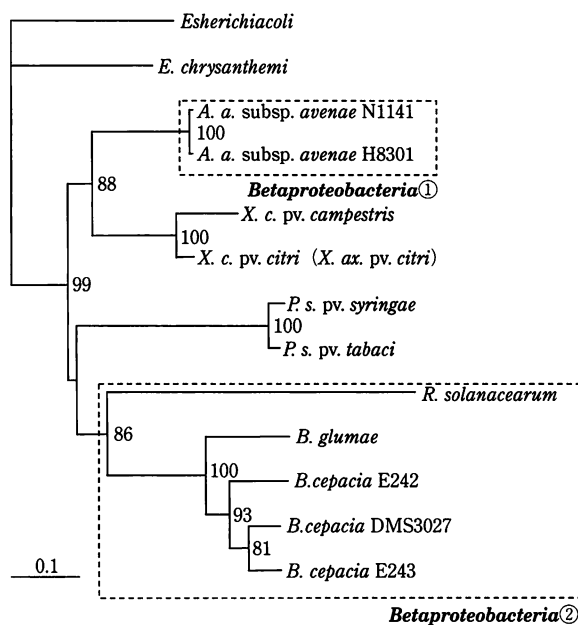


図-3 *fliC* 遺伝子の系統樹

*E.* : *Erwinia*, *P.s.* : *Pseudomonas syringae*, *X.c.* : *Xanthomonas campestris*, *ax.* : *axonopodis*, *A.a.* : *Acidovorax avenae*, *R.* : *Ralstonia*. 系統樹は NJ 法により作成。分岐点の数値はブーツストラップ確率。

## おわりに

既知の病害を診断する場合などには、16S rRNA のシーケンス解析や種特異的な PCR プライマーを利用できる。しかし、新種と推定される場合、種を決定するには 16S rRNA やその他従来法（生化学的・化学的分類手法）に加えて、基準菌株との DNA-DNA 交雑試験を行わなければならない。16S rRNA をはじめ一遺伝子の解析結果は、分類を行う上での一つの指標にすぎないということを忘れていただきたい。そして、*Burkholderia* 属には土壌生息性の腐生菌も多く存在し、同一種の中に植物病原細菌と腐生菌が混在していたりする。すなわち、調査した細菌、もしくは調査しようとしている細菌が本当に病原菌であるかを確認する必要がある。

今後、16S rRNA 以外の系統分類の指標についても、さらにデータが充実し、複数の指標をもとにした系統解析が行われるようになって考えられる。それによって、種の同定方法・定義が変わり、明確になること、細菌性病害の診断（検出・同定手法）が進歩することが期待される。

った。

### 3 16S rRNA による系統関係とそれぞれの遺伝子の系統関係が異なる

*hrpO* 遺伝子および *fliC* 遺伝子の系統関係が、16S rRNA による系統関係と異なることを示した。*B. cepacia* においては、*hrpO* 遺伝子の解析においてその傾向が顕著であった。*B. cepacia* の基準菌株は四つのゲノムからなる複合ゲノムであり、その他数種の *Burkholderia* 属細菌においても複合ゲノムであることが確認され、筆者も *B. cepacia*, *B. plantarii* 等でそのことを確認している (RODLEY et al., 1995)。大部分の遺伝子は全体として進化していく中で、一部の遺伝子については、ゲノム単位での交換や可動遺伝子の水平移動が起こっているのではないだろうか。特に、*B. cepacia* のような土壌生息性の細菌は、寄主が特化した種に比べて多様な環境に遭遇するため、そういったゲノム獲得のチャンスが多いのではないかと推察する。なお、*fliC* 遺伝子については種類の異なる鞭毛を有している場合もあり、複数の鞭毛遺伝子が存在する可能性があるため今後検討が必要である。

## 引用文献

- 1) BAGSIC, R. D. et al. (1995) : Letter in Applied Microbiol. 21 : 87 ~ 92.
- 2) BAUERNFEIND, A. et al. (1998) : J. Clin. Microbiol. 36 : 2748 ~ 2751.
- 3) BALDWIN, A. et al. (2005) : ibid. 43 : 4665 ~ 4673.
- 4) COENYE, T. et al. (1994) : Int. J. Syst. Bacteriol. 49 : 37 ~ 42.
- 5) HALES, B. A. et al. (1998) : J. Bacteriol. 180 : 1110 ~ 1118.
- 6) 平川ゆみら (1999) : 九病虫研会報 45 : 1 ~ 4.
- 7) 楠元智子・瀧川雄一 (1999) : 日植病報 65 : 360 ~ 361 (講要).
- 8) ————— (2000) : 同上 66 : 130 (講要).
- 9) 前田由紀子ら (2005) : 日植病報 71 : 291 ~ 292 (講要).
- 10) PARSONS et al. (2001) : FEMS Microbiol. Lett. 203 : 103 ~ 108.
- 11) PAYNE, G. W. et al. (2005) : Appl. Environ. Microbiol. 71 : 3917 ~ 3927.
- 12) RODLEY, P. D. et al. (1995) : Mol. Microbiol. 17 : 57 ~ 67.
- 13) SALLES, J. F. et al. (2002) : Appl. Environ. Microbiol. 68 : 1595 ~ 1603.
- 14) SAWADA, H. et al. (1999) : J. Mol. Evol. 49 : 627 ~ 644.
- 15) SOTOKAWA, N. and Y. TAKIKAWA (2004) : J. Gen. Plant. Pathol. 70 : 348 ~ 352.
- 16) SEO, S.-T. and K. TSUCHIYA (2005) : FEMS Microbiol. Lett. 251 : 273 ~ 280.
- 17) TAKEUCHI, T. et al. (1997) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63 : 455 ~ 462.
- 18) WINSTANLEY, C. and J. A. W. MORGAN (1997) : Microbiology 143 : 3071 ~ 3084.
- 19) WHITBY, P. W. et al. (2000) : J. Clin. Microbiol. 38 : 282 ~ 285.
- 20) YABUCHI, E. et al. (1992) : Microbiol. Immunol. 36 : 1251 ~ 1275.

## 新しく登録された農薬 (29 ページから続き)

## 「殺菌剤」

- **イプロジオン・テブコナゾール水和剤**  
21641 : ユキスター水和剤 (バイエルクロップサイエンス) 2006/2/22
- 21642 : 三共ユキスター水和剤 (北海三共) 2006/2/22  
イプロジオン : 50.0%, テブコナゾール : 5.0%  
芝 (ベントグラス) : 雪腐小粒菌核病 : 根雪前
- **メトミノストロビン粒剤**  
21643 : オリザトックパック (三共アグロ) 2006/2/22  
メトミノストロビン : 27.0%
- **イミノクタジン酢酸塩液剤**  
21653 : 協友ベフラン液剤 25 (協友アグリ) 2006/2/22  
イミノクタジン酢酸塩 : 25.0%

麦類 (小麦を除く) : 雪腐大粒菌核病, 紅色雪腐病 : 根雪前, 麦類 (小麦を除く) : 紅色雪腐病, 条斑病, 斑葉病, なまぐさ黒穂病 : は種前, 小麦 : 雪腐大粒菌核病, 紅色雪腐病 : 根雪前, 紅色雪腐病, 条斑病, なまぐさ黒穂病 : は種前, 赤かび病 : 収穫 21 日前まで, りんご : 紫紋羽病 : 苗木植付前, モニリア病, 腐らん病 : 展葉期, 腐らん病 : 休眠期, すず点病, すず斑病, 斑点落葉病, 褐斑病, 輪紋病, 黒星病 : 収穫 7 日前まで, おどろ : 晩腐病, 褐斑病, 黒とう病 : 休眠期, 黒とう病, 枝膨病 : 収穫 60 日前まで, 日本なし : 黒斑病 : 休眠期, 西洋なし : 輪紋病 : 収穫 30 日前まで, 黒斑病 : 休眠期, もも : 縮葉病 : 休眠期, みかん : 貯蔵病害 (青かび病), 貯蔵病害 (緑かび病), 貯蔵病害 (黒腐病), 貯蔵病害 (白かび病) : 収穫前日まで, みかん以外のかんぎつ類 : 貯蔵病害 (青かび病), 貯蔵病害 (緑かび病), 貯蔵病害 (黒腐病), 貯蔵病害 (白かび病) : 収穫前日まで, マルメロ : 腐らん病 : 展葉期, かりん : 腐らん病 : 展葉期, アスパラガス : 茎枯病 : 収穫終了後 (冬期まで), 茶 : 灰色かび病 : 摘採 40 日前まで, りんどう : 花腐菌核病, 葉枯病 : —

## 「殺虫殺菌剤」

- **MEP・TPN 粉剤**  
21649 : スミチオンダコニール粉剤 DL (クミアイ化学工業) 2006/2/22
- 21650 : 住友化学スミチオンダコニール粉剤 DL (住友化学) 2006/2/22
- 21651 : SDS スミチオンダコニール粉剤 DL (エス・ディー・エス バイオテック) 2006/2/22  
MEP : 3.0%, TPN : 5.0%  
だいず : カメモシ類, マメシクイガ, 紫斑病 : 収穫 21 日前まで
- **イミダクロプリド・プロベナゾール水和剤**  
21652 : 側条オリゼメートアドマイヤー顆粒水和剤 (バイエルクロップサイエンス) 2006/2/22  
イミダクロプリド : 4.0%, プロベナゾール : 48.0%  
稲 : いもち病, イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ : 移植時

## 「除草剤」

- **カフェンストール・シクロスルフアムロン・ダイムロン・ベンゾビシクロン粒剤**  
21630 : サスケーラジカルジャンボ (BASF アグロ) 2006/2/8  
カフェンストール : 10.5%, シクロスルフアムロン : 2.25%, ダイムロン : 22.5%, ベンゾビシクロン : 10.0%
- 移植水稲 : 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道・東北), ヒルムシロ, セリ (北陸・九州を除く), アオミドロ・藻類による表層はく離 (九州を除く)

(45 ページへ続く)