

植物防疫基礎講座：

## 植物病原細菌の同定・判別手法

農業生物資源研究所ジーンバンク 澤 田 宏 之

## はじめに

罹病サンプルなどから分離された植物病原細菌の分類上の所属を明らかにする（同定）、過去に分離された菌株と比較して菌株レベルで同一性・関連性を評価する（判別・タイピング）といった機会は、病害関係の研究室では多いのではないだろうか。その際に用いられる手法は「表現形質の検査」, 「血清学的試験」, 「菌体成分の分析」, 「遺伝情報の利用」の四つに大きく整理することができる。しかし、そのいずれに関しても、原理、解像度、信頼性、迅速性、難易度、コスト等に関してバリエーションに富んだ多種多様な手法が報告されており、どれを用いればいいのか迷ってしまうほどである。

ここでは、そのうちの植物病理学分野でもよく使われている代表的なものについて、「どのような手法なのか」, 「長所・短所は?」, 「どう評価したらいいのか?」といった視点から簡単に紹介してみたい。ただし、できるだけ一般的な立場から紹介を試みたものではあるが、研究対象や環境・目的が違えば見方も変わり、評価も異なってくるのは避けられない。また、培養を介さないで実施できる「直接的な検出・診断手法」や、新種・新病害を「分類・記載するための研究手法」についてはここでは扱っていない。あくまでも、「罹病サンプルなどから分離した、植物病原細菌と思われる菌株を、できるだけ簡易に同定・判別する」ための手法を対象を絞って紹介したい。

## I 表現形質の検査

## 1 いわゆる“細菌学的性質”の検査（従来法）

細菌の形態、培養性状、生理・生化学的性質などのいわゆる“細菌学的性質”は、「シャーレや試験管」を用いた検査方法（ここでは「従来法」と表記する）によって調べられてきた。このうちの「形態」に関しては、細菌細胞の形、大きさ、鞭毛、莢膜、菌体内顆粒や芽胞の有無などの検査項目があり、顕微鏡観察に基づいて記載されてきた。また、種々の培地上における生育、集落形状

や色素、皮膜形成の有無などは「培養性状」として観察され、記録されてきた。「生理・生化学的性質」の中には、温度や酸素濃度などの環境と生育との関係、各種の酵素活性、炭素化合物・窒素化合物・高分子化合物の分解・利用などをはじめとする多数の検査項目があり、被検菌を検査用培地で培養し、培地に現れる変化を記録する、検査用の試薬を添加して呈色反応を観察するなどの方法によって調べられてきた。

このような従来法による試験は大きかりな器械・設備がいらないことから、かつては植物病理学関係の研究室において広く利用されていた。検査対象の菌種に応じた特別な準備（特異抗体やプライマーなどの作製）が不要であること、多数の検査項目の中から研究目的・環境や対象菌種に応じて適当な項目を取捨選択できること（表-1）などは、本法の有利な点として挙げる事ができ

表-1 従来法による *Agrobacterium* 属細菌の同定

検査項目 <sup>a)</sup>	1 <sup>b)</sup>	2	3	4
3-ケトラクトースの生成	+ <sup>c)</sup>	-	-	-
パーブルミルク培養	K	A	K	K
マロン酸からのアルカリの産生	-	+	+	+
L-酒石酸からのアルカリの産生	d	+	+	-
クエン酸の利用	d	+	+	-
クエン酸鉄アンモニウム培地での薄膜の形成	+	-	-	-
生長素要求性	-	+	+	+
New and Kerr 培地での生育	-	+	-	-
2% NaCl 耐性	+	-	+	d
アルギニン加水分解	+	-	d	-
ズルシットからの酸の産生	+	+	-	-
メレジトースからの酸の産生	+	-	-	W
$\alpha$ -メチル-D-グルコシドからの酸の産生	+	+	-	W
L-チロシンの利用	-	+	-	-

<sup>a)</sup> 上段に示した5項目は、*Agrobacterium* 属の各菌種内での変異が少なく、しかも菌種間の差が明確に判別できることから、効率の良い鑑別性状として特に期待できる。一方、下段は予備的な検査項目であり、必要に応じて検査に追加して補足したり、上段の検査の代替として利用することができる（澤田・土屋, 2003）。

<sup>b)</sup> 1: *A. tumefaciens*, 2: *A. rhizogenes*, 3: *A. vitis*, 4: *A. rubi*. なお、本稿では、*Agrobacterium* 属における三つの分類・命名システム（A～C; 澤田, 2007）のうちの、Bのシステムを用いて学名の表記を行っている。<sup>c)</sup> +: 80%以上が陽性, -: 80%以上が陰性, d: 菌株間で反応が異なる, W: 弱陽性, K: アルカリの産生, A: 酸の産生。

Methods for Identification and Typing of Plant Pathogenic Bacteria. By Hiroyuki SAWADA

(キーワード: 植物病原細菌, 同定, 判別, タイピング, 分類)

きる。一方、結果が得られるまでに時間がかかる(検査によっては数週間もかかるものがある)、手技に対する習熟度や結果の判定基準に関して個人差があり、そのことが同定結果に影響を与える可能性があるなどの点は短所といえるかもしれない。それを解消するような代替法が以下に述べるように続々と開発されつつあることから、本法は分離菌の迅速な同定・判別よりも、記載分類における特徴づけ・類別といった場面で使われていくのかもしれない。

## 2 細菌検査キットの利用

アピ20NEをはじめとする様々な細菌検査キットや自動分析機器が市販されているが、いずれも原理は類似している。すなわち、ウェル内に固相化された基質へ被検菌の菌液を添加して培養し、色や濁度の変化をもとに陽性/陰性の判定を行った後、データベースを用いて菌種同定(確率的同定)を行うことになる。迅速・簡便な手法であることから、前述の従来法に替わって広く使われるようになってきている。

一定の品質の培地を用いて所定の条件下で一律・簡易に検査ができ、手技に対する習熟度に左右されにくいことは本法の大きな利点であろう。また、西山(2007)の「簡易同定96」は、アピ20NEを用いて蓄積されてきた植物病原細菌に関する膨大なデータを収納しており、確率的同定を行ううえで非常に有効であることから、本法の利用価値を大いに高めている。一方、固定された少数の検査項目(アピ20NEの場合は21項目)が必ずしも対象菌種と相性が良いわけではない、陽性/陰性の結果を判定する際に個人差が入り込む余地があり、同定結果に影響を与える可能性がある、従来法とは異なる結果が得られることがある、などの点には注意が必要であろう。本法はDNAを扱う施設がないような条件下で、属～種レベルの所属を推定したいという場面で威力を発揮するのではないだろうか。

## II 血清学的試験

### 1 試験管内凝集反応法

抗血清の希釈列と被検菌の懸濁液とを混合し、凝集を示す最高希釈倍数を求めてその被検菌の凝集価とする。その値によって、菌株間の血清学的な類縁関係を表現することができる。本法は視覚的に判定しやすく、定量的な結果を安定して得ることができる。ただし、多数の小試験管を扱うなど操作が多少煩雑であることから、分離菌の迅速な同定・判別よりは、特徴づけや類別に適した手法なのかもしれない。



図-1 スライド凝集反応による *Agrobacterium vitis* の血清型別  
左：陰性、右：陽性。 *A. vitis* は試験管内凝集反応法と寒天ゲル内二重拡散法によって四つの血清群(A～D)に類別された(澤田, 1994)。スライド凝集反応法を用いることによって、種レベルの同定と血清群の判別とを簡易に行うことができる(澤田, 1994; KAWAGUCHI et al., 2008)。

### 2 寒天ゲル内二重拡散法

寒天ゲルの隣り合ったウェルのそれぞれに、被検菌から調製した可溶性抗原と抗血清とを入れてゲル内を拡散させると、会合した兩者の間で沈降反応が成立した場合にのみ最適比のところに沈降線が形成される。その沈降線のパターンをもとに、菌株間の血清学的な類縁関係を分析することができる。前述の手法と同様に本法の場合も、分離菌の迅速な同定・判別よりは特徴づけ・類別に使われることが多いようである。

### 3 スライド凝集反応法

抗血清と被検菌をスライドガラス上で混合し、ガラスを揺り動かしながら凝集物が形成されるかどうかを観察するという極めて簡便な手法である(図-1)。迅速・安価で多検体処理もこなせる、視覚的にも判定しやすく、手技に対する習熟度にも左右されないなどの長所がある。ただし、信頼できる抗血清が必要であることと、対象分類群に対する血清学的な特徴づけ・類別が完了していることが求められる。この条件さえ満たしていれば、本法は実用的な血清型別法として、コロニースクリーニングや菌株の同定・判別といった場面で利用価値が極めて高いであろう。

## III 菌体成分の分析

### 1 菌体脂肪酸組成

脂肪酸は細胞膜のリン脂質や外膜のリポ多糖の構成成分であり、その組成はガスクロマトグラフィーによって明らかにすることができる。得られたデータは分類群ごとに特徴あるパターンを示すことから(図-2)、属レベルの分類・同定の指標として非常に有効であり、種レベルの同定に利用できる場合もある。また、脂肪酸は分子種が多く、組成比も含めると情報量が極めて豊富である

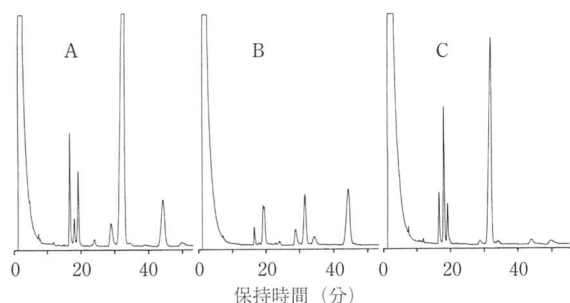


図-2 *Agrobacterium* 属細菌の菌体脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム

A: *A. tumefaciens*, B: *A. rhizogenes*, C: *A. vitis*.  
*Agrobacterium* 属の菌種ごとに特徴あるクロマトグラムが得られた (澤田, 1994).

ことから、その値は数値解析にも利用可能であり、菌種間の類縁関係の推定に使われることもある。

ただし、被検菌の培養条件やサンプルの調製方法によって結果が影響を受けやすいので、それらの条件を一定に保つ必要がある。また、サンプル調製や分析機器の維持・管理が比較的煩雑である点も考慮すると、本法は分離菌の迅速な同定・判別よりは、記載のための特徴づけ・類別の指標として適しているのかもしれない。

## 2 その他の成分の分析

脂肪酸以外にもキノン、ポリアミン、アイソザイム、全菌体タンパク質等をはじめとする様々な菌体成分の組成 (比) が分類学的研究において利用されてきた。高価な分析機器が必要となる場合があり、分析手法も比較的煩雑なものが多いことから、これらは記載分類における特徴づけ・類別に適した指標なのかもしれない。

ただし、「迅速抽出-TLC法」は簡便・迅速・安価であることから、分離菌の実用的な同定手法として期待されている。本法では、菌体から抽出したアミノ脂質を薄層クロマトグラフィーで展開することによって、属・種レベルで特徴のあるクロマトグラムが得られている (松山ら, 2004)。

## IV 遺伝情報の利用

### 1 PCRの利用

#### (1) 特異的プライマーによる PCR

必須遺伝子 (16S rDNA, *gyrB*, *dnaJ* 等) 中の可変領域内に存在する対象菌種に特異的な配列や、対象菌種にのみ特異的に分布する病原性遺伝子などを標的として、「菌種特異的/病原因子特異的プライマー」を設計することができる。このようなプライマーを用いて PCR 反応を行い、目的とする増幅産物が得られれば、対象とす

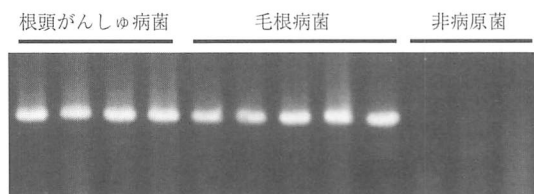


図-3 病原因子特異的プライマーを用いた病原性菌株の判別  
病原性プラスミド上の *virC* オペロンを標的としたプライマーによって、病原性の *Agrobacterium* 属細菌からのみ増幅が認められる (SUZAKI et al., 2004; KAWAGUCHI et al., 2005)。

る菌種 (病原性菌株) であると同定・判別することができる (図-3)。

コロニー PCR, fast PCR, マルチプレックス PCR 等の手法を組み合わせることで、迅速・簡便かつ効率的に結果を得ることができる。また、増幅産物を鋳型としてその配列を決定する、RFLP 解析 (PCR-RFLP) を行うなどの操作によって、より細かい判別や特徴づけを試みることも可能である。さらに、設計した特異的プライマーは、直接的な検出・診断のための技術開発へも応用することができる。DNA を扱う設備があり、対象菌種に対する特異的プライマーの準備さえできていれば、本法は分離菌の迅速な同定・判別法として現時点では「一押し」の手法と言えるのではないだろうか。

#### (2) ユニバーサルプライマーによる PCR

必須遺伝子の配列内の、特に保存性の高い領域を標的として「ユニバーサルプライマー」を設計し、PCR によって得られた産物に対して以下に示すような手法を適用すれば、同定・判別のために必要な情報を引き出すことができる。

##### 1) 相同性検索

増幅産物の配列を決定して相同性検索にかければ、得られた結果をもとに被検菌の分類上の位置づけ (～属・種レベル) を推定することができる。判定の精度は、指標として用いた遺伝子の多型性の程度や、検索に用いたデータベースの質に大きく左右されることになる。特に近年は、誤同定の菌株由来の情報やシーケンスエラーがノイズとしてデータベース中に大量に混入しているようなので注意が必要である。

16S rDNA や *gyrB* などの指標に特化したデータベースが公開・市販されているので、それらも用いることによって複数の検索結果を比較したり、関連する菌種の「基準株」との相同性を個別に確認する、などの措置を行って判定の精度を上げる努力が必要であろう。また、分子系統に基づいて分類体系が構築されていることが本

法を適用する際の必要条件となるが、すべての分類群がそれを満たしているわけではない。対象菌種をめぐる分類体系が現在どのような状況にあるのかを事前に確認しておく必要がある。

## 2) 分子系統解析

前項の相同性検索の結果を参考にしながら被検菌に近縁と考えられる菌種を選択し、分子系統解析を行ってそれらとの系統関係を明らかにすれば、被検菌の分類上の位置づけ・所属を推定することがさらに容易になる(図-4 A)。相同性検索の結果を示す画面からわずか数クリックで系統樹が構築可能であり、質の低いデータの影響がどの程度あるのかもわかりやすい形で視覚化されるので、菌属・菌種の絞り込みや同定がより確実にできるであろう。

## 3) MLSA (multilocus sequence analysis)・MLST (multilocus sequence typing)

複数の多型性の高い必須遺伝子の配列を決定し、その配列を連結したうえで分子系統解析を行うのが MLSA

である。一方、MLSTとは、各必須遺伝子を配列の差異に基づいてグループ (allele) に類別した後、各被検菌ごとにそれらが有する必須遺伝子のグループ番号 (allele 番号) を並べ、その数字の組み合わせを指標としてタイピングを行うという手法である。いずれも手法としては煩雑であるものの、標準化は容易であり、解像度や信頼性は極めて高い(図-4 B)。

## 4) PCR-RFLP

増幅産物を制限酵素処理し、生成する断片のパターンをもとに被検菌のタイピングを行う(図-5)。ただし、手間の割に得られる情報量は少ないので、16S rDNAや *gyrB* を対象とするのであれば、配列を決定して分子系統解析を行ったほうがいいのではないだろうか。

## 5) PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism)

増幅産物を熱変性によって1本鎖にした後、非変性条件下で電気泳動を行うと、配列の相違に応じて異なった高次構造が形成されるために移動度に差が生じる。1塩

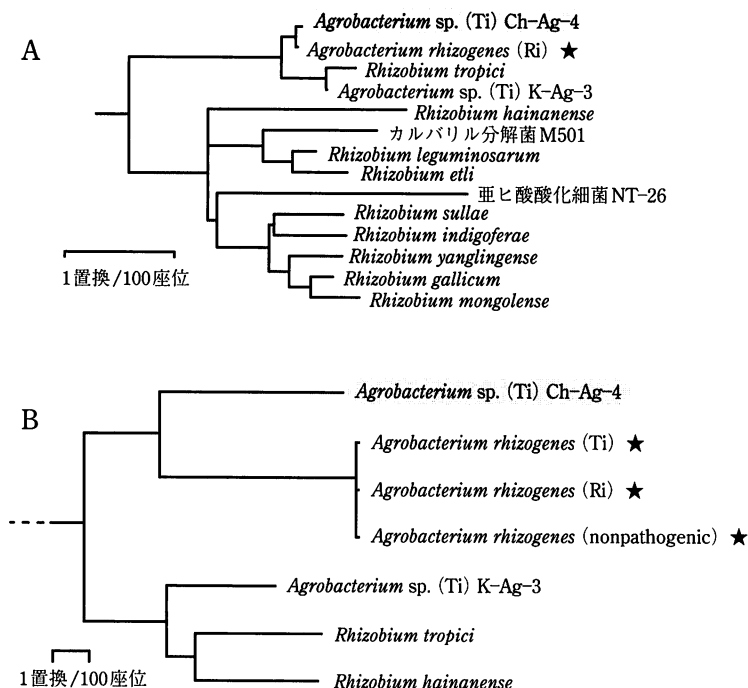


図-4 分子系統解析による分類上の位置づけの確認

A: 16S rDNA を指標とした場合 (澤田, 2007), B: 五つの必須遺伝子を用いた MLSA の場合 (一幡ら, 2006), いずれも系統樹の一部のみ示してある。網掛けをした Ch-Ag-4 は新種である可能性の高い根頭がんしゅ病菌である (澤田, 1994)。しかし、A の 16S rDNA を指標とした系統樹では、*A. rhizogenes* (★で示した) との違いがはっきりとはわからない。一方、B の MLSA を行うことによって、*A. rhizogenes* とは位置づけが大きく異なることが確認できた。

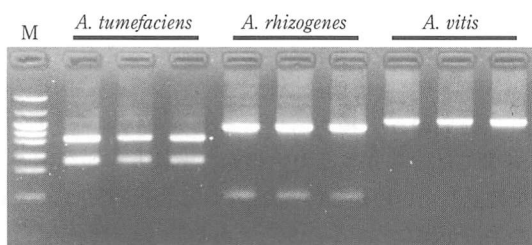


図-5 PCR-RFLPによる *Agrobacterium* 属細菌のタイピング

増幅した 16S rDNA を *BsiHKA I* 処理することによって菌種レベルの同定ができる (澤田ら, 1993). M: マーカー.

基置換が検出できるほどの高い解像度が期待できるとされており、菌株や分類群の類別・判別に使われることがある。

#### 6) アレイ解析

被検菌 (被検サンプル) から得られた増幅産物を、基準株の増幅産物 (あるいは分類群特異的なオリゴヌクレオチド) がスポットされたアレイとハイブリさせることによって、～属・種レベルの所属に関する情報が得られる。分離菌の同定手法としてよりも、群集構造解析を網羅的に行うための手法として大変期待されている。

#### (3) rep-PCR (repetitive sequence-based PCR)

多くの細菌染色体上には保存性の高い反復配列 (REP, ERIC, BOX 等) が散在しているが、これらの染色体上における位置は菌種・菌株によって異なっている。そこで、反復配列から外向きに設定したプライマーを用いて PCR を行い、反復配列に挟まれた領域を増幅させると、菌種・菌株によってパターン異なる断片を多数得ることができる。このパターンを利用して被検菌のタイピングを行うのが rep-PCR である (図-6)。

本法によって種より下位のレベルの細かい類別や判別を行うことが可能である。標的となる反復配列の保存性が高いため、対象菌種のための専用プライマーを新たに設計しなくてもよい場合が多いというは有利な点であろう。ただし、種レベルの所属はあらかじめ別の方法で確認しておく必要がある。それが確認さえできていれば、本法は多数の菌株の類別や判別、多様性の評価をするための手法として極めて有効ではないだろうか。疫学・生態学的研究において利用価値が高いと思われる。

#### (4) RAPD (random amplified polymorphic DNA)

1 種あるいは 2 種の短いランダムプライマーを用いて比較的低いアニーリング温度で PCR を行うと、プライマーは被検菌ゲノム上の部分的に類似した配列にアニー

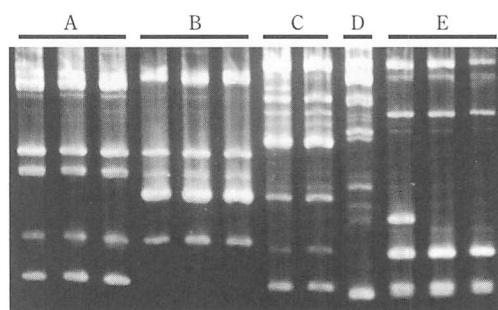


図-6 rep-PCRによる *Agrobacterium vitis* のタイピング  
BOX プライマーを用いた rep-PCR によって、*A. vitis* は A ~ E の五つのグループに類別された (KAWAGUCHI et al., 2008)。

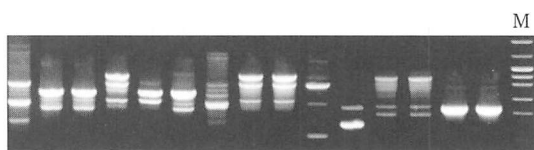


図-7 RAPDによる *Agrobacterium vitis* のタイピング  
RAPD によって *A. vitis* 内に様々な多型が認められた (澤田ら, 1993)。

ルすることができる。その際、プライマー同士が適当な距離を置いて向き合うことがあれば、挟まれた領域が増幅されて様々なサイズの断片が多数生成される。この断片のパターンに基づいて被検菌のタイピングを行うのが RAPD である (図-7)。

本法ではランダムプライマーが用いられるので、プライマー設計のために対象菌種の配列を改めて調べるといった手間はかからない。ただし、目的とする解像度を得るためには、プライマーの選別や反応条件の最適化のための試行錯誤が必要となる。再現性や標準化に関して問題が生じる可能性もありうる。

#### (5) AFLP (amplified fragment length polymorphism)

本法ではまず、被検菌のゲノム DNA を 2 種類の制限酵素で切断した後、アダプターを連結する。その後、アダプターから制限酵素認識部位にかけての配列を利用して設計した選択プライマーを用いて、断片の数を絞り込むための選択的 PCR を行い、シーケンサーによってその多型を解析する。菌株や分類群の類別・判別に使用されることがある。

#### 2 RFLP (restriction fragment length polymorphism)

被検菌のゲノム DNA を制限酵素処理し、泳動によって分離した後、標的として選んだ領域をプローブとして用いてサザン分析を行うと、標的およびその周辺の領域

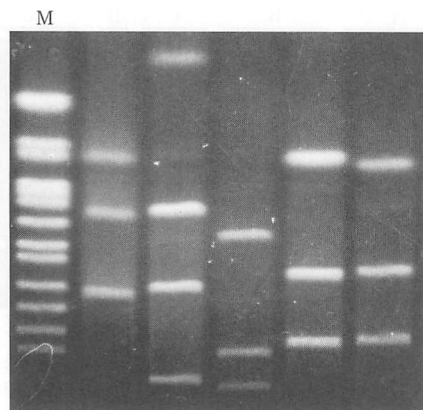


図-8 PFGEによる *Pseudomonas syringae* 群細菌のタイピング

ゲノム DNA を I-Ceu I 処理後、PFGE で分離することによって pathovar 間で多型が観察された (SAWADA et al., 2002)。

における配列の相違が多型として検出できる。菌株や分類群の類別・判別に使用されることがある。PCR-RFLP よりは高い解像度が期待できる。

### 3 PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)

被検菌のゲノム DNA を制限酵素処理し、パルスフィールド電気泳動によって分離して切断パターンの違いを検出する (図-8)。医学細菌の疫学的研究において、菌株タイピング手法の主役として利用されてきた実績がある。解像度や再現性は高いとされている。

### 4 DNA-DNA ハイブリダイゼーション

基準株のゲノム DNA を固定したマイクロプレートやアレイに、標識した被検菌のゲノム DNA を加えてハイブリさせ、洗浄後に雑種 2 本鎖がどの程度残っているのかを定量することによって両者のゲノム DNA の類似度を求める。種レベルの判別に用いられるが、手法としては比較的煩雑である。

## おわりに

### 1 どの手法を用いるべきか?

「何のために同定・判別するのか?」ということは手法を選択するうえでの大事なポイントである。目的によって必要とされる判定精度や、結果を得るまでにかかる時間・予算などが決まってくるのではないだろうか。研究の目的としては、「病気の診断」、「接種用菌株の絞り込み」、「病害発生調査」、「疫学・生態学的研究」、「研究開発のための材料の確保」、「分類・記載のための準備・予備試験」など様々なものが考えられるが、そのいずれに相当するのかということをはっきりさせておく

必要がある。

「どのレベル (分類階級) まで判別する必要があるのか?」ということも明確にしておきたい。属レベルがわかればいいのか、種あるいはそれ以下の亜種、変種、race まではっきりさせたいのか、菌株レベルの同一性まで確認したいのかといったレベルに応じてそれぞれ適した手法が異なってくるからである。

対象菌種をめぐる研究の進み具合によっても事情が異なってくる。すなわち、特異的なプライマー、プローブ、抗体などが開発されているのか、適当なデータベースが整備されているのかなどについて調べておく必要がある。直接的な検出・診断手法は利用できないのかということもチェックしておきたい。また、遺伝情報に基づいた手法を適用したいのであれば、対象菌種をめぐる分類体系が分子系統や遺伝型を反映した形になっているかどうか、遺伝的にきちんと定義された分類群になっているかどうかについて、事前に確認しておかなければならない。

実験を行う環境や担当者の経験・習熟度といったことも、手法を選択する際の重要なポイントである。DNA を扱うための施設・器械が利用できるのか、分析機器やキットの使用経験があるのかなどを考慮しながら方針を決定することになるであろう。

### 2 手法は今後どのように進歩していくのだろうか?

遺伝情報に基づいた手法が広く使われるようになるであろうが、その中でも流れは大きく二極化していくのではないだろうか? 一方の流れは、菌株レベルの判別や同一性の確認をより高い解像度と信頼性のもとで実現していく方向へと進んでいくことであろう。MLSA や MLST といった標準化が容易な配列ベースの解析方法が使われるようになり、フラグメント解析に取って代わる場面が多くなるのかもしれない。もう一方の流れとしては、より簡便・迅速・安価に多検体処理ができる同定・判別手法が求められるのではないだろうか。いずれの流れに関しても、分子生物学的な実験技術の進歩によってそれが実現され、より発展していくことを期待したい。

## 引用文献

- 1) 一幡由香利ら (2006): 日本植物病理学会報 72: 305.
- 2) KAWAGUCHI, A. et al. (2005): J. Gen. Plant Pathol. 71: 54 ~ 59.
- 3) ——— et al. (2008): Plant Pathology 57: (in press).
- 4) 松山宣明ら (2004): 日本植物病理学会報 70: 284.
- 5) 西山幸司 (2007): 簡易同定 96-検索専用 ver.1.3 (MS Access で動くデータベース).
- 6) 澤田宏之 (1994): 果樹試験場報告特別報告, 第 5 号: 1 ~ 110.
- 7) ——— (2007): 日本微生物資源学会誌 23: 29 ~ 34.
- 8) ———・土屋健一 (2003): 日本植物病理学会報 69: 349 ~ 365.
- 9) ———ら (1993): 同上 59: 314.
- 10) SAWADA, H. et al. (2002): J. Mol. Evol. 54: 437 ~ 457.
- 11) SUZAKI, K. et al. (2004): J. Gen. Plant Pathol. 70: 342 ~ 347.