

II. 東南アジアにおけるイネ白葉枯病

2. 病原細菌のRFLP解析

加 来 久 敏

農業生物資源研究所微生物探索評価研究チーム

Bacterial Leaf Blight of Rice in Southeast Asia

2. RFLP analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

Hisatoshi KAKU

National Institute of Agrobiological Resources

Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

RFLP analysis was used for the differentiation of races of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. The strains representative of Japanese, Indonesian and Philippine races of *X. c.* pv. *oryzae* were differentiated by RFLP patterns using the probe pJEL101, a pUC18 plasmid containing a 2.4kb *EcoR1-HindIII* fragment derived from strain PXO86 of *X. c.* pv. *oryzae*. Japanese strains of *X. c.* pv. *oryzae* were grouped into certain categories by RFLP, and most of them coincided with races. Strains of the bacterium from different the geographic areas in South East Asia were also divided into some subgroups corresponding to geographic origin by RFLP patterns. RFLP patterns of chemically-induced mutants of *X. c.* pv. *oryzae* reflected the shift of the races. It is concluded that RFLP is a useful method for the differentiation of races and for genetic diversity analysis.

Key words: race, RFLP analysis, bacterial leaf blight, genetic diversity

キーワード: レース, RFLP 解析, イネ白葉枯病, 遺伝的多様性

はじめに

イネ白葉枯病はイネの最も重要な細菌病であり、アジアの稲作地帯だけでなく、西アフリカ、オーストラリア南部、アメリカ合衆国及び中南米において発生する。しかし、本病による被害が大きいのは依然として東南アジア各国である^{23,25}。

イネ白葉枯病に対しては抵抗性品種の栽培が最も有効な防除手段とされている。したがって、品種抵抗性ととも病原細菌の病原性の分化についても多くの研究がなされてきた。その結果、イネ白葉枯病

菌のレースの分化は東南アジアのみならず、わが国においても、きわめて多様であることが明かとなった。

このレースは判別品種に対する病原性に基いて分類されるが、そのためには判別品種の栽培、接種、発病調査など多くの労力・時間を必要とする。したがって、レースの簡便で迅速な判別法の開発が求められている。そこで、RFLPによるレースの判別を試みるため、イネ白葉枯病菌をモデルとしてRFLP解析を行った。

RFLPとはrestriction fragment length polymorphismの頭文字を取ったもので、制限酵素断片長と訳されている。すなわち、DNAを制限酵素によって切断

した場合、その断片の長さが多型を示すことをいう。近年、分子生物学的手法の急速な発展により、遺伝子レベルで直接解析することが可能となってきたが RFLP 解析もそのような遺伝子解析のひとつであり、新しい遺伝マーカーとして広く利用されている。植物病原細菌学の分野においても、pathovar やレースを分類する方法の一つとして RFLP 法が利用され始めている^{4,5,10,11,12,15,16,17,18,19}。

RFLP 解析は DNA の抽出・精製、制限酵素による消化 (digestion)、アガロース電気泳動、サザンブロッティング、ハイブリダイゼーション、RFLP バンドの検出とデータの解析という手順で行う。

これらのうち、植物病原細菌の RFLP 解析において最も重要なことはどのようなプローブ (検出用 DNA) を用いるかということである。すなわち、細菌 DNA の特定の部位とハイブリダイズし、レースの識別が可能なプローブが必要である。植物病原細菌の RFLP 解析で、これまでに用いられてきたプローブはペクチン分解酵素遺伝子クローンや hrp 遺伝子群など病原性や過敏反応 (HR) 誘導に関連した遺伝子、染色体及びプラスミド DNA 断片、高頻度反復配列クローン、大腸菌 rRNA などである。本研究において用いたプローブは

pJEL101であるが、これはイネ白葉枯病菌の染色体 DNA 中の高頻度反復配列約 2.4kb を pUC18 に組み込んだプローブであり、Leach ら¹⁹)によって開発されたものである。高頻度反復配列は分類学上近縁であっても著しく異なる場合が多く、近年、多くの生物の RFLP による分類に用いられている。なお、これらのプローブは放射性同位³²P や非放射性的のビオチンなどで標識されて用いられる¹⁴)。

なお、本研究は農業生物資源研究所・微生物保存研究チーム、微生物機能利用研究室及び熱帯農業研究センターとの共同研究である。

イネ白葉枯病菌の RFLP 解析法

培養 供試細菌を液体培地 (ペプトン 10g, 蔗糖 5g, グルタミン酸ソーダ 1g, 水 1,000ml) で 28C, 16 時間振とう培養した。

DNA の抽出・精製植物病原細菌からの DNA は大腸菌からの抽出法を若干改変した方法を用いた。DNA 抽出・精製に関して、特に *Xanthomonas* 属細菌は多量の細胞外多糖類 (EPS) を産生するため、DNA の精製がかなり困難である。CTAB 処理によって多糖質を除

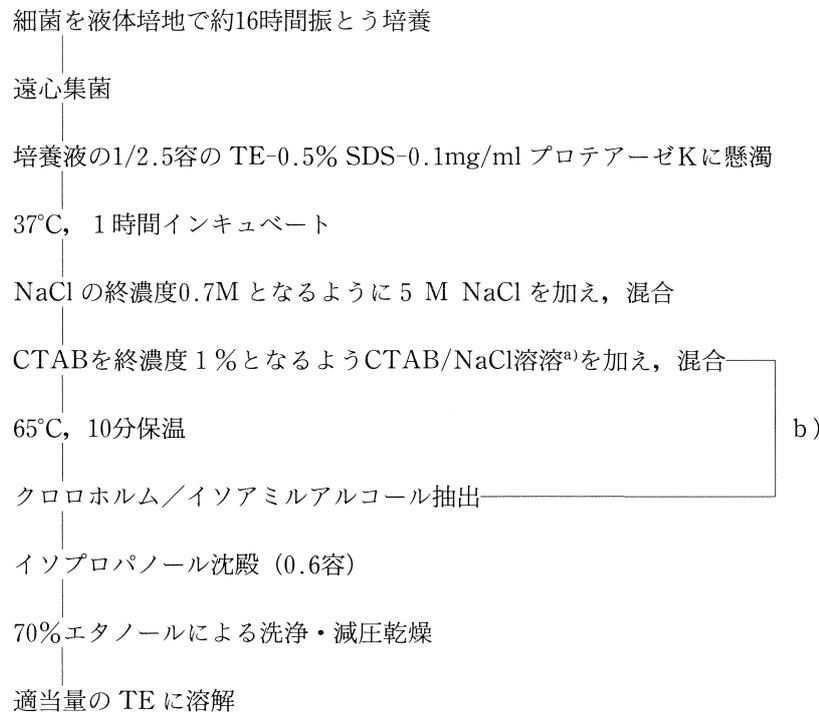


図1 *Xanthomonas* 属細菌からの DNA の抽出法

- a) 10% CTAB-0.7M NaCl.
- b) 必要に応じて数回繰り返す

去しているが、さらに効率的に抽出・精製するための改良が必要である。

サザンブロッティング精製したDNAを制限酵素 *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *ClaI*, *Hind III* で37°C, 2時間消化後、アガロース電気泳動(12V, 16時間)を行った。泳動後、ゲルを酸変性、アルカリ変性した後、各画分をナイロン膜(Hibond-N, Amasham)に転写した。転写膜は2XSSCで洗浄・風乾後、UV照射を行った。ブリハイブリダイゼーション(42°C, 2時間)後、pJEL101をプローブとしてハイブリダイゼーション(42°C, 16時間)を行った。DNA・DNAハイブリッドの検出はBlu-GeneのDNA検出キットを用いて行った。

イネ白葉枯病菌のRFLP解析

1. イネ白葉枯病菌と *Xanthomonas campestris* の各種 pathovar との比較

イネ白葉枯病菌 (*X. c. pv. oryzae*) と他の *Xanthomonas campestris* の11 pathovar とを、pJEL101及び大腸菌のリボゾームRNAプローブとして、制限酵素 *EcoRI* を用いてRFLPパターンの比較を行った。その結果、プローブとしてpJEL101を供試したした場合、

各 pathovar は特有のRFLPパターンを示した。特に、イネの重要な病原細菌であり、病徴も似ているため混同されやすい *X. c. pv. oryzae* はイネ白葉枯病菌とは明らかに異なるRFLPパターンを示した。しかしながら、他の pathovar と比較した場合、イネ白葉枯病菌との相同性は高かった。大腸菌の同制限酵素を用い、リボゾームRNAをプローブとして、*X. c. pv. campestris*, *X. c. pv. citri*, *X. c. pv. oryzae* 及びイネ白葉枯病菌のRFLPパターンの比較を行った結果、それらはたがいに識別可能であった。

堀田ら¹²⁾は *Xanthomonas campestris* に属する19の pathovar について、大腸菌のリボゾームRNAをプローブとして、*EcoRI* 断片のRFLP解析を行った。その結果、検出されるバンドの数は著しく減少したが、各 pathovar はそれぞれに特徴的なRFLPプロフィールを示し、各 pathovar の類別はきわめて容易であった。したがって、属、種、pathovar の分類・同定にはこのようなプローブが適当であると考えられた。

以上の結果から、さらに多数の pathovar, 多数の菌株を用いたデータの蓄積が必要であるが、これら pathovar の識別、分類・同定の一手法としてRFLP法は有望であると考えられた。

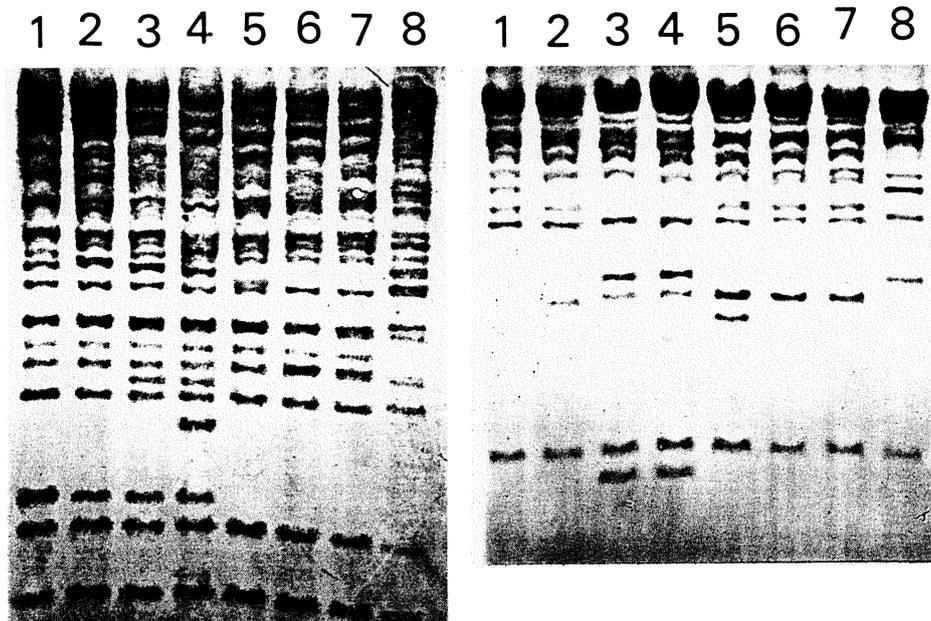


図2 pJEL 101 をプローブとしたイネ白葉枯病菌 (*X. c. pv. oryzae*) 各レースのRFLPプロフィール (制限酵素 左: *EcoRI*, 右: *Hind III*)

- 1 : レース I (T 7174) 2 : レース II (T 7147) 3 : レース III (T 7133)
 4 : レース IV (H 75373) 5 : レース IV (Xo-7435) 6 : レース V (H 75304)
 7 : レース V (Xo-7306) 8 : レース VII (H 85149)

2. イネ白葉枯病菌各種レースのRFLP解析

イネ白葉枯病菌には病原性を異にする多数のレースが存在する。これらレースの判定は判別品種に対する病原性に基いて行われるが、わが国では現在まで判別品種金南風、黄玉、Te-tep、中国45号、ジャワ No.14 に対する病原性から6レースが報告されている。また、フィリピンにおける6レースはじめ、外国ではさらに多数のレースの存在が明らかにされている。これらの判定は実際には判別品種に接種を行い、その発病程度によって判定され、多大な労力を必要とすることから、簡易判別システムの開発にRFLPの応用が期待されていた。

そこで、判別体系が確立している日本及びフィリピンのレースの代表菌株についてRFLP解析を行った。

最初に日本産5レースの代表菌株について、pJEL101をプローブとし、制限酵素 *EcoR*1を用いてRFLPパターンの比較を行った結果、日本産各レースの代表菌株は互いに異なるRFLPパターンを示した(図2)。制限酵素として *EcoR*1を用いた場合、レースIVでは、特有のバンドが検出されたが、他のレースは類別が可能ではあったもののパターンはかなり類似していた。そこで、インドネシア産のレースIV菌株とレースVIIの菌株を加え、制限酵素を *Hind* IIIとしてRFLPパターンを比較した結果、これらの菌株は明らかに異なるRFLPパターンを示し、さらに判別が容易となった(図2)。*EcoR*1では互いによく似たパターンを示すインドネシア産レースIV菌株と、日本産及びインドネシア産レースV菌株も特異的なバンドにより判別が可能であった。しかしながら、日本産レースV菌株とインドネシア産レースV菌株はいずれの制限酵素を用いた場合でも判別は困難であった。

フィリピン産レース現在まで6レースが報告されている。そこで、それらのレースの代表菌株についてRFLPパターンの比較を行った。その結果、レース2とレース3は類似したRFLPパターンを示した。しかしながら、その他のレースは明らかに異なるRFLPパターンを示した。

次に同じプローブを用いて日本産レースの判別の可能性について検討した。レースI, II, III, IV, V及びVIIに属するの27菌株を供試し、制限酵素 *EcoR* I, *Cla* I及び *Hind* IIIとプローブ pJEL101の組合わせでRFLP解析を行った。その結果、レースIV及びVIIの菌株はいずれの制限酵素によってもそれらのレースに特異的なバンドにより判別が可能であった。その他のレ

ースの代表菌株もRFLPパターンにより判別可能であった。また、同じレースに属する菌株もさらにいくつかのグループに分れることが明らかとなった。今後、このようなパターンと病原性の関係についてさらに検討が必要である。

さらに、わが国に保存されているインドネシア産菌株についてRFLP解析を行った。インドネシア産菌株で病原性によりレースとして分類されている菌株はXo-7306を除き、5菌株ともレースIVに属する菌株であった。そこで、日本産レースIVの代表菌株とのRFLPパターンの比較を行った。

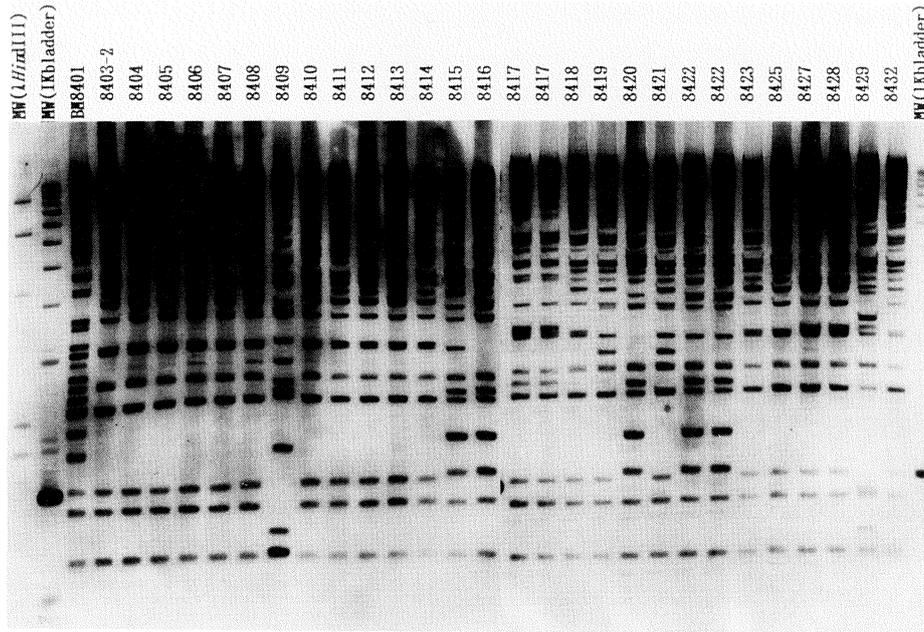
その結果、日本産レースIV菌株 H75373とインドネシア産5菌株 Xo-7435, Xo-7338, Xo-7439, Xo-7330, Xo-7403とは異なるRFLPパターンを示した。また、同じレースIVと判別されたインドネシア産菌株のRFLPパターンも必ずしも一致しなかった。これらは、レースの判別が極めて限られた数の判別品種に対する病原性に基いて行われること、pJEL101が病原性に関連したプローブではないことによると考えられる。一方、日本産レースVとインドネシア産レースVのRFLPパターンは一致した。

本研究においては *EcoR*1を基本的な制限酵素として用いたが、プローブを pJEL101に固定し、制限酵素によるRFLPパターンの比較を行った。その結果、*Pst*Iでは消化できなかったが、*Bam*HI, *EcoR*V, *Cla*I及び *Hind* IIIのいずれの制限酵素によっても消化は可能であった。これらの制限酵素を用いた場合、RFLPパターンは *EcoR*1よりもレース間のRFLPパターンの差がより明瞭に現われた。とくに、*Hind* IIIでは日本産の6レースの判別もきわめて容易であった。制限酵素 *EcoR*1を用いた場合、日本産レースではレースIとレースIIの識別が困難であったが、*Hind* IIIや *Cla*Iでは容易に判別が可能であった。なお、制限酵素として *Cla*Iを用いた場合、検出されるバンドの数は他の制限酵素と比較して著しく増加した。

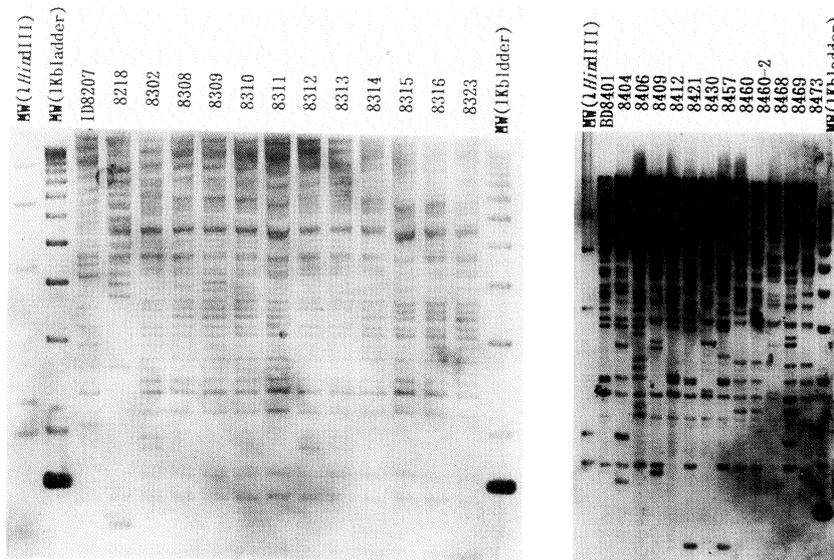
なお、レースの判別にプローブとして大腸菌のリボゾームRNA(16S+23S)を用い、各種制限酵素との組み合わせによってRFLPパターンの比較を行った。その結果、RFLPパターンに違いがみられることが多かったが、そのようなパターンとレースとの関係は明らかではなかった。

3. 各国産イネ白葉枯病菌々株の遺伝的多様性

イネ白葉枯病は温帯から熱帯にかけて世界の稲作地帯に広く分布する病害である。したがって、これまで



(A)



(B)

(C)

図3 各国産イネ白葉枯病菌々株のRFLPパターン

A：ミャンマー産菌株，B：インド産菌株

C：バングラデシュ産菌株

各国から多数のレースが報告されていることが示すように、本病原細菌の遺伝的多様性は非常に大きいことが予想された。そこで、東南アジア各国産の菌株を供

試し、プローブ pJEL101と制限酵素 *EcoRI*, *BamHI* 及び *Hind III* の組み合わせで RFLP 解析を行った。

その結果、同一国産菌株は概ね類似した RFLP パタ

ーンを示した。また、そのパターンは各国ごとに異なっており、産地により遺伝的に多様であることが明らかとなった(図3)。すなわち、各国産菌株は大別してインド・ネパール産菌株グループ、バングラデッシュ産菌株グループ、フィリピン産菌株グループ、インドネシア・ミャンマー・タイ・マレーシア産菌株グループに分かれた²⁴⁾。日本産菌株は最後者のグループと類似していた。また、フィリピン産菌株は先に Leach ら²⁰⁾が発表した結果と一致していた。

以上のように、各国共通と考えられるバンド及び各国に特異的なバンドが存在することから、国、地域及びレースにより本病原細菌の遺伝的多様性がきわめて大きいことが推察された。また、各国産菌株のグルーピング結果は地域別とも概ね一致していた。今後、各国におけるレース分布など、各国産菌株の病原性との関連について検討していく予定である。

4. イネ白葉枯病菌各種変異株のRFLP解析

フィリピン産イネ白葉枯病菌でレース1に属するPXO61及びレース2菌株PXO63-6を供試し、ニトロソグアニジン処理によって誘発されたレース変異株、病原性喪失変異株及び病原性低下変異株についてRFLP解析を行った。なお、プローブとしてはpJEL101を供試し、制限酵素は*EcoRI*、*EcoRV*、*ClaI*及び*Hind III*の4種類を用いた。

その結果、レース変異株(レース1→レース2)は野生株とは明らかに異なり、レース2菌株とほぼ相同なパターンを示した¹³⁾。一方、両野生株由来の病原性変異株、病原性低下変異株及び色素非産生変異株は概ね野生株と同じRFLPパターンを示した。

以上の結果から、フィリピンにおけるレース2に属する菌株の中には、突然変異によりレース1から分化したものが含まれていることが推定され、そのレース分化には点突然変異とともに、pJEL101内のトランスポゾン様反復配列(Leach ら, 1992)の転位が関連していることが示唆された。

おわりに

以上の結果から、RFLPは、さらに有効なプローブの探索など改良の余地はあるが、イネ白葉枯病菌各種レースの判別に適用できる可能性が高いと考えられた。また、本病原細菌の遺伝的多様性及び病原性遺伝子の研究にも非常に有効であることが明らかとなった。

RFLPによるレース判別のための標準システムを確

立するためには、さらに国内外の多数の菌株についてRFLPパターンを調べる必要である。本実験においても、限られた数ではあるが、同一レースに属する菌株においてもRFLPパターンが異なる場合もみられた。これは先に述べたように、レースの判別が極めて限られた数の判別品種に接種して行われ、判別品種の数を増やせば増やすほどレースの数は増える性格のものであることから当然のことと言えよう。

プローブpJEL101によって、ほとんどの場合、レース間のRFLPパターンの差は認められた。レース間の差が出にくい場合でも、さらに複数の制限酵素を組み合わせることで分類される可能性が高い。しかし、判別をより簡便化するためには、さらに有効なプローブを探索する必要がある。また、pJEL101のように、バンドが多数現われるプローブの場合、パターンの識別及びパターンのグルーピングが困難であるため、パソコンによるデータ処理を検討中である。さらに、DNA抽出・精製に関して、細菌、特に*Xanthomonas*属細菌は多量の細胞外多糖類(EPS)を産生するため、DNAの精製がかなり困難であり、本実験の効率化のための問題点である。このDNA精製法の改良も重要な点である。

RFLPは遺伝的多様性(genetic diversity)の解析にも広く用いられており、それらと病原性、宿主範囲、血清型等との関連も種々の微生物で論じられている^{1,3,6,7,8,9,20)}。イネ白葉枯病は世界中の稲作地帯に広く分布する病害であることから、その病原細菌の遺伝的多様性が大きいことが予想された。これまで、国や地域ごとに特異的なRFLPパターンが存在することが明らかとなり、その多様性が証明されたが、今後、さらに本細菌の生態や病原性の変異機構などとの関連を明らかにしていく必要がある。

さらに、RFLPは微生物の属、種、subspecies、pathovarなどの分類・同定への利用が試みられている。また、*Pseudomonas solanacearum*ではbiovarの分類にも適用されている^{2,22)}。各種微生物でそれぞれの目的に適したプローブが得られれば、このような分類・同定への利用は期待されるどころ大である。特に、従来の形態学や生理学的性質によって分類が困難な場合期待できるものと考えられる。

また、RFLPはイネ白葉枯病菌の病原性遺伝子の解析にも適用が可能と考えられる。本病原細菌の病原性遺伝子のクローニングは日本及び米国で試みられているが、これまでのところ成功していない。トランスポ

ゾンの挿入による病原性変異株の作出に関しては報告があるが、ベクター系及び形質転換系が確立していないことが問題と考えられる。さらに、本病原細菌の病原性遺伝子の発現のメカニズムが単純ではないことを示唆している。しかしながら、病原性遺伝子が解明されない限り、本病原細菌のレースなどの本質的な RFLP 解析もありえない。

したがって今後、非病原性変異株の作出とその遺伝子解析、酵素産生遺伝子などイネ白葉枯病菌の機能、病原性に関連した遺伝子の解析を進めてゆきたい。

引用文献

- 1) Boccara, M. et.al. (1991). *Mol. Plant-Microbe Interactions* 4 : 293-299.
- 2) Cook, D. et.al. (1989). *ibid.* 2 : 113-121.
- 3) Denny, T. P. et.al. (1988). *J. Gen. Microbiol.* 134 : 1949-1960.
- 4) — et.al. (1988). *Phytopatology* 78 : 1186-1193.
- 5) Gabriel, D. W. et. al. (1988). *Mol. Plant-Microbe Interactions* 1 : 59-65.
- 6) Gottawald, T. R. et.al. (1991) *Phytopathology* 81 : 749-753.
- 7) Graham, J. H. et.al. (1990). *ibid.* 80 : 829-836.
- 8) Hartung, J. S. and E. L. Civerolo (1987) *ibid.* 77 : 282-285.
- 9) — and — (1989). *ibid.* 79 : 793-799.
- 10) 平八重一之ら (1992). *日植病報*58 : 102.
- 11) —ら (1992). *植物防疫*46 : 320-325.
- 12) 堀田光生ら (1992). *日植病報*58 : 592.
- 13) —ら (1993). *日植病報*59 : 104.
- 14) 兼松誠司ら (1990). *植物防疫*44 : 549-556.
- 15) 加来久敏ら (1992). *日植病報*58 : 103
- 16) —ら (1992). *日植病報*58 : 592
- 17) Lazo, G. R. et.al. (1987). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 : 214-221.
- 18) — and D. W. Gabriel (1987). *Phytopathology* 77 : 448-453.
- 19) Leach, J. E. et. al. (1990). *Mol. Plant-Microbe Interactions* 3 : 238-246.
- 20) — et. al. (1992). *Appl. Environment. Microbiol.* 58 : 2188-2195.
- 21) Mogen, B. D. et. al. (1990). *Phytopathology* 80 : 90-96.
- 22) 中村吉秀ら (1993). 日本植物病理学会平成5年度大会講演要旨集 p. 82.
- 23) 野田孝人 (1989). *植物防疫*43 : 152-156.
- 24) 落合弘和ら (1993). 日本植物病理学会平成5年度大会講演要旨集 p. 82.
- 25) Yamamoto, T. and T. Ogawa (1988). 5th *Int. Cong. Pl. Path. (Abstr.)* : 257.
- 26) 矢野博ら (1991). *日植病報*57 : 445.
- 27) —ら (1991). *日植病報*58 : 593.