

## イネ白葉枯病菌およびイネ褐条病菌のリポ多糖の電気泳動分析

上運天 博・藤田 敏則 (宮崎大学農学部)

**Electrophoretic analysis of the lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and *Pseudomonas avenae*.** Hiroshi KAMIUNTEN and Tosinori FUJITA (Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-21)

グラム陰性菌細胞壁の外膜に局在するリポ多糖 (LPS) は、O特異多糖, コア多糖, リピドAと呼ばれる3つの構成要素から成り、抗原や内毒素としての生物学的活性を有していることが知られている。

近年、SDS-ポリアクリルアミドゲルによるLPSの電気泳動において銀染色法<sup>1)</sup>が導入され、さらに Hitchcockら<sup>2)</sup>はこの方法を発展させ、LPSを純化することなく少量の培養菌体を直接供試することによりLPSの分析が可能な方法をサルモネラを用いて確立した。そこで本実験では Hitchcockら<sup>2)</sup>の方法を用いてイネ白葉枯病菌およびイネ褐条病菌のLPSの電気泳動による分析を試みたので、その概要を報告する。

本実験を行うにあたり、菌株を分譲していただいた九州大学農学部脇本 哲教授ならびに北陸農業試験場門田 有生氏に対し感謝の意を表する。

### 材料および方法

#### 1) LPS試料の調整とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

YPA培地 (酵母エキス5g, ペプトン10g, 塩化ナトリウム5g, 寒天15g, 蒸留水1ℓ, pH7.0) で48時間培養した菌株から約1mgの菌体をかきとり、50 $\mu$ ℓのLPS調整液 (2% SDS, 4% 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 1M トリス-pH 6.8, 0.01% ブロムフェノールブルー) に懸濁したのち、100 $^{\circ}$ C, 5分間の熱処理を行った。その後50 $\mu$ ℓのプロティナーゼK (1mg/ml) を加え60 $^{\circ}$ Cで1時間処理したのち、10~15 $\mu$ ℓの試料を12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。

#### 2) LPSの銀染色

電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルを5%の酢酸を含む40%エタノール液に一晩浸し固定した。固定終了後、過ヨウ素酸液 (0.7% 過ヨウ素酸, 40%エタノール,

5%酢酸) で5分間処理した。次に水洗を30分間、4~5回行い、硝酸銀液 [0.1N水酸化ナトリウム (28ml), 28%アンモニア水 (2ml), 20%硝酸銀 (5ml), 蒸留水 (115ml)] 中で10分間激しく振とうした。再度10分間、3回水洗したのち、現像液 [クエン酸 (50mg), 37%ホルムアルデヒド (0.5ml), 蒸留水 (1ℓ)] に浸し、ゆっくりと振とうした。LPSのバンドが暗褐色に染まったのち、ゲルを0.35%酢酸液に移し、現像を停止させ、写真撮影を行った。

### 結果および考察

イネ白葉枯病菌15菌株のLPSの電気泳動を行った結



第1図 イネ白葉枯病菌LPSの電気泳動像

1: 電気泳動パターンI

2: 電気泳動パターンII

3: 電気泳動パターンIII

第1表 LPSの電気泳動パターンによるイネ白葉枯病菌の分類

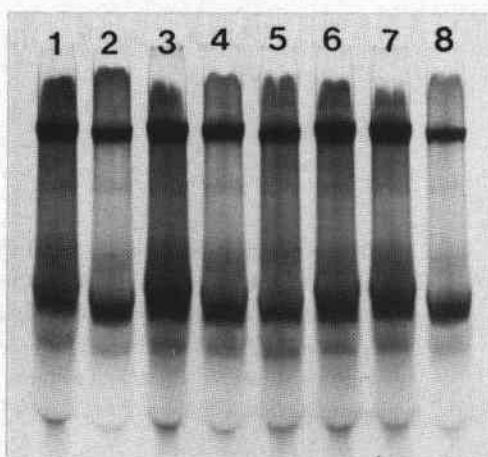
電気泳動パターン	菌 株
I	T7133, N 5854, N 5710, N 5843, N 5342, N 5342, N 5875, H 75304
II	N 5806, N 5859, N 5833, Siga 2
III	N 5847, N 5837, N 5868, N 5843

第2表 イネ白葉枯病菌 LPSの電気泳動パターンと血清型との関連

血清型	泳動パターン	菌 株 数
A	I	5
	II	0
	III	0
B I	I	2
	II	2
	III	1
B II	I	0
	II	2
	III	3

果、3つの電気泳動パターンに分けることができ、それぞれ電気泳動パターンI、II、IIIと命名した(第1図)。電気泳動パターンIに属する菌株は7菌株と最も多く、IIおよびIIIに属する菌株はそれぞれ4菌株であった(第1表)。Hitchcockら<sup>2)</sup>はLPSの化学型の相違が電気泳動パターンの差になって表れることを明らかにしており、イネ白葉枯病菌LPSには少なくとも3つの化学型の存在が示唆された。

LPSの多糖部分はグラム陰性菌のO抗原決定基として免疫学的特異性を有していることが明らかにされており、魚類病原細菌類においてLPSの電気泳動パターンと血清型との間に相関関係が認められる場合もあったという報告<sup>3)</sup>がなされている。そこで、イネ白葉枯病菌のLPS電気泳動パターンと血清型との関連を調べたが、明らかな関連性は認められなかった(第2表)。血清型はChoiら<sup>1)</sup>により分類されたものであるが、血清型



第2図 イネ褐条病菌 LPSの電気泳動像

1 : H8205 (A), 2 : H8328 (A)  
3 : H8302 (B), 4 : H8341 (B)  
5 : H8204 (C), 6 : H8515 (C)  
7 : H8306 (D), 8 : H8516 (D)  
( ) 内は血清型

Aに所属していた5菌株はすべて電気泳動パターンIを示しており、さらに菌株数を増やして血清型と泳動パターンとの関連を検討する必要があると思われた。

イネ褐条病菌8菌株のLPSの電気泳動パターンをイネ白葉枯病菌と同様に調べた結果、菌株又は血清型に関係なくほぼ同一の電気泳動パターンを示した(第2図)。

本実験において示したように、植物病原細菌において Hitchcockら<sup>2)</sup>の方法により極めて容易にLPSの電気泳動分析が可能であり、今後、植物病原細菌類のLPSの研究に十分活用できるものと思われた。

## 引用文献

- 1) Choi, J. E., Matsuyama, N. and Wakimoto, S. (1980). Ann. Phytopath. Soc. Japan 46 : 209-215.
- 2) Hitchcock, P. J. and Brown, T. M. (1983). J. Bacteriol. 154 : 269-277.
- 3) Nomura, J. and Aoki, T. (1985). Fish Pathology 20 : 193-197.
- 4) Tsai, C. M. and Frasch, C. F. (1982). Anal. Biochem. 119 : 115-119.

(1990年5月1日 受領)