

Pseudomonas syringae における全菌体及び菌体膜脂肪酸組成の比較

井上美由紀・松元 賢・古屋 成人・松山 宣明 (九州大学農学部)

Comparative studies on fatty acid composition of the membrane and whole cells of *Pseudomonas syringae*. Miyuki INOUE, Masaru MATSUMOTO, Naruto FURUYA and Nobuaki MATSUYAMA (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812)

近年、菌体の化学組成や遺伝情報等の分析結果に基づく細菌の分類・特定の有用性が認められてきており、また機器分析技術の進歩は化学分類の発展を促した^{1,3,6,7,12,13}。特に生体成分のうち菌体脂肪酸分析は、属・種の鑑別に有用である場合の多いことが認められている^{4,5,8,10,11}。そこで本研究ではガスクロマトグラフィー法 (GLC) を用いて、*P. syringae* の16種類の病原型について全菌体、菌体膜脂肪酸組成に基づく類別を試みた。

材料及び方法

1. 供試菌株

九州大学農学部植物病理学教室保存の菌株と農林水産省農業生物資源研究所より分譲された植物病原性 *P. syringae* の16種類の病原型、合計30菌株を実験に供試した。

2. 菌体試料の調製

供試菌株を YP 平板培地 (酵母エキス 5 g, ペプトン 10 g, 塩化ナトリウム 5 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 l, pH 6.8) で 30°C, 24時間前培養し、523液体培地 (シヨ

糖 10 g, カゼイン加水分解物 8 g, 酵母エキス 4 g, リン酸水素 2 カリウム 2 g, 硫酸マグネシウム 0.3 g, pH 7.0) に移植後、30°C, 24時間振盪培養した。この培養液を遠心分離 (3,600×g, 30分間, 4°C) し、生理食塩水で洗浄後、さらに遠心分離 (3,600×g, 30分間, 4°C) し、その沈澱の一部を凍結乾燥し全菌体試料とした。

3. 菌体膜試料の調製

上記で得られた沈澱から、Frash らの方法²⁾により菌体膜を抽出した。

4. 脂肪酸メチルエステルの調製と抽出方法

定法に従い、脂肪酸メチルエステルの調製及び抽出を行った⁷⁾。

5. ガスクロマトグラフィー (GLC) による脂肪酸の検出

全菌体及び菌体膜からの脂肪酸の検出は GLC (分析器: 島津 GC-17A, 検出器: 島津 C-R7A plus, カラム: HR-SS-10, 0.25mm×50m, カラム温度: 180°C, 注入部温度: 250°C, キャリヤーガス圧力: 95Kpa, キャ

Table 1 Comparison of fatty acid compositions between whole cell and cellular membrane in *Pseudomonas syringae*

Fatty acid ^{b)}	Percentage ^{a)}	
	Whole cell	Cellular membrane
Lauric acid (12:0)	4.75	11.28
3-Hydroxycapric acid (10:0 3-OH)	2.81	5.59
Palmitic acid (16:0)	34.81	28.73
2-Hydroxylauric acid (12:0 2-OH)	2.21	5.15
Palmitoleic acid (16:1 <i>cis</i> 9)	32.91	24.45
3-Hydroxylauric acid (12:0 3-OH)	2.96	5.91
Stearic acid (18:0)	1.67	1.42
Vaccenic acid (18:1 <i>cis</i> 11)	14.93	12.47
Dihydrosterulic acid (19:0 <i>cyclo</i>)	1.42	1.21

a) Percentage of each fatty acid was automatically calculated by an integrator (Shimadzu C-R7 A plus).

b) GLC (Column: HR-SS-10, 0.25mm×50m, Column temp.: 180°C, Inj. temp.: 250°C, N₂ pressure: 95 Kpa).

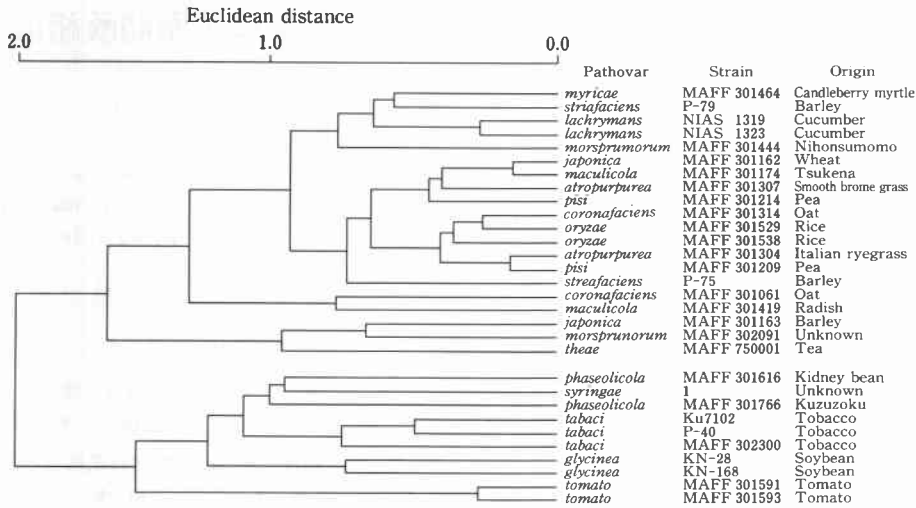


Fig. 1 Dendrogram with cluster analysis on fatty acids of cellular-membrane for *Pseudomonas syringae*

リアーガス流量：60ml/min) を用いて行った。各ピークの脂肪酸は標準脂肪酸との相対的な保持時間との比較、及び以前の報告^{5,9)}を参考にして同定した。また脂肪酸の組成比は、ガスクロマトグラムから得られたピークの

面積比から算出した。

6. データ解析

各菌株間の類縁性を検討するために、11種類の脂肪酸の組成比を変数として、群平均法によりクラスター分析

Table 2 Analysis on fatty acids of cellular membrane for *Pseudomonas syringae*

Pathovar	Percentage of fatty acid ^{a)}			
	12:0 ^{b)}	16:0	16:1 <i>cis</i> 9	18:1 <i>cis</i> 11
<i>atropurpurea</i> MAFF 301314	12.87	35.51	39.05	12.57
MAFF 301307	16.15	36.23	34.67	12.95
<i>coronafaciens</i> MAFF 301061	17.02	31.10	38.06	13.83
MAFF 301314	15.43	33.86	38.68	12.03
<i>japonica</i> MAFF 301162	15.87	35.70	32.93	15.50
MAFF 301163	7.87	31.74	34.95	25.43
<i>oryzae</i> MAFF 301529	15.51	34.70	36.89	12.90
MAFF 301538	14.88	33.32	36.78	15.02
<i>striafaciens</i> P-75	12.66	38.11	35.20	14.02
P-79	14.94	37.88	31.32	15.86
<i>glycinea</i> KN-28	12.37	38.48	27.87	21.27
KN-168	13.28	34.15	30.75	21.82
<i>phaseolicola</i> MAFF 301616	15.36	41.93	22.81	19.91
MAFF 301766	12.20	39.43	26.34	22.03
<i>syringae</i> 1	14.06	42.48	26.50	16.95
<i>tabaci</i> Ku7102	18.01	40.44	26.76	14.79
P-40	15.59	39.18	29.22	16.02
MAFF 302300	19.88	37.76	26.53	15.83
<i>tomato</i> MAFF 301591	15.51	43.80	25.68	15.01
MAFF 301593	17.26	44.20	25.45	13.09

a) The percentage of each fatty acid was automatically calculated by an integrator (Shimadzu C-R7A plus).
 b) GLC (Column: HR-SS-10, 0.25mm×50m, Column temp.: 180°C, Inj. temp.: 250°C, N₂ pressure: 95 Kpa).

を行い、デンドログラムを作成した。

結果及び考察

P. syringae の16種類の病原型について、全菌体と菌体膜脂肪酸組成比を比較検討した。その結果、11種類の脂肪酸が検出され、これらの脂肪酸は全菌体及び菌体膜に共通であり、組成比1%以上の脂肪酸については一方だけに特徴的な脂肪酸は検出されなかった。主要な11種類の脂肪酸のうち、全菌体から検出された9種類の脂肪酸組成比を Table 1 に示した。12:0, 10:0, 3-OH, 12:0 2-OH 及び12:0 3-OH は、全菌体より菌体膜においてその組成比が高く、反対に16:0, 16:1 *cis* 9及び18:1 *cis* 11 は全菌体においてその組成比が高いことが示された。

P. syringae の各病原型の類縁性を検討するために、脂肪酸組成比に基づいたクラスター分析を行った。その結果、主要な11種類の全菌体脂肪酸組成比を基に形成されたデンドログラムは、各病原型の特徴を明確に示さなかった。一方、菌体膜脂肪酸組成比について形成されたデンドログラムは大きく2つのクラスターに分かれ、各病原型の特徴を比較的明確に示した。つまり *pv. atropurpurea*, *pv. coronafaciens*, *pv. japonica*, *pv. oryzae* あるいは *pv. striafaciens* 等イネ科植物を宿主とする菌株群が一つのクラスターを、また *pv. pisi* を除いた、*pv. glycinea*, *pv. phaseolicola* あるいは *pv. syringae* 等、マメ科植物に病原性を示す菌株と、*pv. tomato* あるいは、*pv. tabaci* 等、ナス科植物に病原性を示す菌株群が一つのクラスターを形成した (Fig. 1)。前者のクラスターに属する菌株では、16:0 及び16:1 *cis* 9 の組成比がほぼ同じで後者のクラスターに属する菌株では、16:1 *cis* 9 より16:0 の組成

比が高いことが示された (Table 2)。

以上のように、病原型の様な種レベル以下の近縁の菌株でも菌体膜脂肪酸組成比が異なっており、いくつかのグループに類別される場合のあることが明らかとなった。特に、各グループが宿主植物を異にする場合が観察されたことは、病理学的にも極めて興味ある事実である。また、いくつかの化学的手法を組み合わせることにより、従来よりもより簡単に、正確に及び迅速に同定することが可能かもしれない。

謝 辞

本実験を遂行するにあたり、菌株を供試いただいた農林水産省農業生物資源研究所に厚く御礼申し上げる。

参 考 文 献

- 1) DAVIS, G. H. and BAIRD-PARLER, A. C. (1959) J. Gen. Microbiol. **21** : 612-621.
- 2) FRASH, C. E. and GOTSHLICH, E. C. (1974) J. Exp. Med. **140** : 87-104.
- 3) 藤野安彦 生物化学実験法9 脂質分析法入門 学会出版センター.
- 4) IKEMOTO, S., KATOH, K., KOMAGATA, K. (1978) J. Gen. Microbiol. **24** : 41-49.
- 5) IKEMOTO, S., KURAIISHI, H., KOMAGATA, K., AZUMA, R., SUTO, T. and MUROOKA, H. (1978) J. Gen. Appl. Microbiol. **24** : 199-213.
- 6) 川本 勲 放線菌の同定実験法 (日本放線菌学会編) 日本放線菌研究会.
- 7) 駒形和男 微生物の化学分類実験法 学会出版センター.
- 8) ROY, M. A. (1988) Plant Dis. **72** : 460.
- 9) STEAD, D. E. (1992) Int. J. Syst. Bacteriol. **42** : 281-295.
- 10) SUZUKI, K. and KOMAGATA, K. (1983) Int. J. Syst. Bacteriol. **33** : 188-200.
- 11) TRACEY, R. P. and BRITZ, T. J. (1989) J. Appl. Microbiol. **66** : 445-456.
- 12) 藪内英子 細菌学技術叢書8 新しい分類学に伴走する細菌同定法 (日本細菌学会教育委員会編) 菜根出版.
- 13) 矢野郁也 細菌学技術叢書6 クロマトグラフィによる細菌の迅速同定 (日本細菌学会教育委員会編) 菜根出版.

(1995年4月28日 受領)