

## イネもみ枯細菌病を抑制する拮抗微生物 CAB-02の 16S rRNA の塩基配列の解析

奥田 充<sup>1)</sup>・井上 博喜<sup>2)</sup>・宮川 久義<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>九州農業試験場・<sup>2)</sup>中国農業試験場)

**Analysis of 16S ribosomal RNA sequence of strain CAB-02, an antagonistic bacterium against *Burkholderia glumae*.** Mitsuru Okuda<sup>1)</sup>, Hiroyoshi Inoue<sup>2)</sup> and Hisayoshi Miyagawa<sup>2)</sup> (<sup>1)</sup> Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan. <sup>2)</sup> Chugoku National Agricultural Experiment Station, Fukuyama, Hiroshima 721-8514, Japan)

**Key words :** 16S rRNA, antagonistic bacterium, CAB-02, rice disease

### 緒 言

拮抗細菌 CAB-02 株 (以下, CAB-02 とする) はイネもみ枯細菌病による苗腐敗症を抑制する拮抗微生物として, 角田らにより分離・選抜された。催芽 (浸種) 時に籾を CAB-02 の懸濁液 ( $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml) に浸漬することで, 育苗期におけるイネもみ枯細菌病 (苗腐敗症) および苗立枯細菌病の発症を顕著に抑制するため, 生物防除剤としての実用化が期待されている (奥田ら, 1998)。本菌は形態的観察および炭素源の利用能の分析により, *Pseudomonas* 属細菌と同定されたが, 炭素源利用能において性質の一致する既知の細菌が存在せず, 本菌を利用した病害防除法として実用新案登録した際には種名未同定のまま *Pseudomonas* sp. としている (角田ら, 1999)。近年, Yabuuchi ら (1992) により, *Pseudomonas* 属細菌の RNA group II に属する細菌を *Burkholderia cepacia* を type strain とする *Burkholderia* 属と定義することが提唱され, *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. caryophylli* が *Burkholderia* 属に分類された。また後に, 旧称 *P. plantarii*, *P. glumae*, *P. vandii* も *Burkholderia* 属細菌に移行することになった (Urakami et al., 1994)。さらに, トマト青枯病の病原菌である *R. solanacearum* に関しては, 一時 *Burkholderia* 属に分類されたものの, 新たに *Ralstonia* 属として分類することが提唱された (Yabuuchi et al., 1995)。このように旧来一元的に *Pseudomonas* 属にまとめられていた細菌が, 遺伝的類縁性に基づき再分類され, その結果, 細菌学的性質においても性格が明瞭になりつつある。本研究では CAB-02

の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し, 分類学的位置を明らかにすることを試みた。

### 材料および方法

#### 1. 染色体 DNA の抽出

染色体 DNA の抽出には CTAB 法 (太田 編, 1996) の変法を用いた。液体培地で振とう培養した菌体を遠心分離により回収し, 0.5% SDS, 1 mg/ml proteinase K 含有 TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA] 600  $\mu$ l 中で 37°C - 1 時間処理した。これに 100  $\mu$ l の 5M NaCl を添加した後, 80  $\mu$ l の 10% CTAB-0.7 M NaCl を加え, 65°C 下 10 分間処理した。これをクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1, v/v), フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) で順次抽出した。水層に 0.6 倍量のイソプロパノールを添加し, 糸状に析出した染色体 DNA を得た。

#### 2. 16S rRNA 遺伝子領域の PCR による増幅

16S rRNA 遺伝子の検出には PCR 法を用いた。抽出した CAB-02 の染色体 DNA を鋳型として, 既に報告されている *Pseudomonas* 属, *Burkholderia* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較的保存されている領域を参考に合成したプライマー F4 と R1504 (第 1 表) を用いて PCR 反応を行った。50  $\mu$ l の反応液 [0.2 mM dATP, 0.2 mM dTTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq polymerase] にプライマー対をそれぞれ終濃度 0.2  $\mu$ M (終濃度) と染色体 DNA を 100 ng 添加し, サーマルサイクラー (TECHNE) を用いて 95°C 2 分間の熱変性後, 95°C 30 秒 - 55°C 30 秒 - 72°C 1 分を 1 サイ

クルとする反応を30回行った。反応液の一部を電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射下で増幅産物の確認を行った。

3. 16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列の決定

増幅産物をスピнкаラム (Suprec-02, 宝酒造) で精製し、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE ABI) と 373 DNA Sequencing system (PE ABI) を用いて、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。Cycle sequencing 反応には既に報告されている *Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属細菌の16S rRNA 遺伝子において比較的保存されている領域を参考に合成したプライマーを使用した (第1表)。

第1表 CAB-02株の rRNA 遺伝子の塩基配列の同定に用いたプライマー配列

Primer	Sequences (5' - 3')
F4	CTGAAGAGTTTGATCCTGGC
F238	GATTAGCTAGTTGGTGGGGT
F513	GCCAGCAGCCGCGTAATAC
F787	GATACCTGGTAGTCCACGC
F1067	TCGTGTCGTGAGATGTTGGG
F1237	CGCTAGTAATCGCGGATCAG
R257	ACCCACCAACTAGCTAATC
R412	CTTCTTACACACGCGGCAT
R690	TACGCATTTCACTGCTACAC
R950	TCCACATCATCCACCGCTG
R1237	CCGACCATTGTATGACGTGT
R1504	TACGGCTACCTGTTCACGAC

第2表 相同性解析に使用した 16S rRNA 遺伝子

Source	Accession No. <sup>1)</sup>
<i>Burkholderia caryophylli</i>	AB021423
<i>Burkholderia cepacia</i>	M22518
<i>Burkholderia gladioli</i>	AB024491
<i>Burkholderia glumae</i>	U96931
<i>Burkholderia graminis</i>	U96941
<i>Burkholderia mallei</i>	AF110188
<i>Burkholderia multivorans</i>	Y18703
<i>Burkholderia plantarii</i>	U96933
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	U91839
<i>Burkholderia thailandensis</i>	U91838
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	AF097534
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X06684
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	D84006
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	D84009
<i>Pseudomonas mandelii</i>	AF064457
<i>Pseudomonas mendocina</i>	D84016
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	D84022
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	D84017
<i>Pseudomonas putida</i>	D84020
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	D84018
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF143245
<i>Pseudomonas synxantha</i>	D84025
<i>Pseudomonas syringae</i>	D84026
<i>Pseudomonas syzygii</i>	AB021403
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	D84027
<i>Ralstonia eutropha</i>	Y10824
<i>Ralstonia pauca</i>	AF085226
<i>Ralstonia solanacearum</i>	X67036

<sup>1)</sup> GenBank 登録番号

1	TCAGATTGAA	CGCTGGCGGC	ATGCCTTACA	CATGCAAGTC	GAACGGCAGC	ACGGGTGCTT	GCACCTGGTG	GCGAGTGGCG	80
81	AACGGGTGAG	TAATACATCG	GAACATGTCC	TGTAGTGGGG	GATAGCCCGG	CGAAAGCCGG	ATTAATACCG	CATACGATCT	160
161	ACGGATGAAA	GCGGGGGACC	TTCGGGCCCTC	GCGCTATAGG	GTTGGCCGAT	GGCTGATTAG	CTAGTTGGTG	GGGTAAAGGC	240
241	CTACCAAGGC	GACGATCAGT	AGCTGGTCTG	AGAGGACGAC	CAGCCCACT	GGGACTGAGA	CACGGCCCGG	ACTCCTACGG	320
321	GAGGCAGCAG	TGGGGAATTT	TGGACAATGG	GCGAAAGCCT	GATCCAGCAA	TGCCGCGTGT	GTGAAGAAGG	CCTTCGGGTT	400
401	GTAAGCACT	TTTGTCGGGA	AAGAAATCCT	TGGCTCTAAT	ACAGCCGGGG	GATGACGGTA	CCGGAAGAA	AAGCACCGCG	480
481	TAACACTCGT	CCAGCAGCCG	CGGTAAATACG	TAGGGTGCAA	GCGTTAATCG	GAATTACTGG	GCCTAAAGCG	TGCGCAGCGG	560
561	GTTTGCTAAG	ACCGATGTGA	AATCCCCGGG	CTCAACCTGG	GAACTGCATT	GGTGACTGGC	AGGCTAGAGT	ATGGCAGAGG	640
641	GGGTAGAAAT	TCCACGTGTA	GCAGTGAAAT	GCGTAGAGAT	GTGGAGGAAT	ACCGATGGCG	AAGGCAGCCC	CCTGGGCCAA	720
721	TACTGACGCT	CATGCACGAA	AGCGTGGGGA	GCAAACAGGA	TTAGATAACC	TGGTAGTCCA	CGCCCTAAAC	GATGTCAACT	800
801	AGTTGTTGGG	GATTCATTTT	CTTAGTAACG	TAGCTAACGC	GTGAAGTTGA	CCGCTGGGG	AGTACGGTCG	CAAGATCTAA	880
881	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	ACCCGCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTTCGATGA	ACCAGAAAAA	CCTTACTTAC	960
961	CCTTGACATG	GTCGGGAATCC	TGCTGAGAGG	CGGGAGTGCT	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCTGC	1040
1041	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCCTT	GTCCTTAGTT	GCTACGCAAG	AGCACCTCTAA	1120
1121	GGAGACTGCC	GGTGACAAAC	CGGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAGTCCCT	CATGGCCCTT	ATGGGTAGGG	CTTCACACGT	1200
1201	CATACAATGG	TCGGAACAGA	GGGTTGCCAA	CCCAGCAGGG	GGAGCTAATC	CCAGAAAACC	GATCGTAGTC	CGGATTCGAC	1280
1281	TCTGCAACTC	GAGTGCATGA	AGCTGGAATC	GCTAGTAATC	GCGGATCAGC	ATGCCCGCGT	GAATACGTTC	CCGGGCTTTG	1360
1361	TACACACCGC	CCGTACACCC	ATGGGAGTGG	GTTTTACCAG	AAGTGGCTAG	TCTAACCACA	AGGAGGACGG	TCACCACGGT	1440
1441	AGGATTCATG	ACTGGGGTGA	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	1461

第1図 CAB-02株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (DDBJ 登録番号 AB041730)

## 4. 塩基配列の相同性の解析

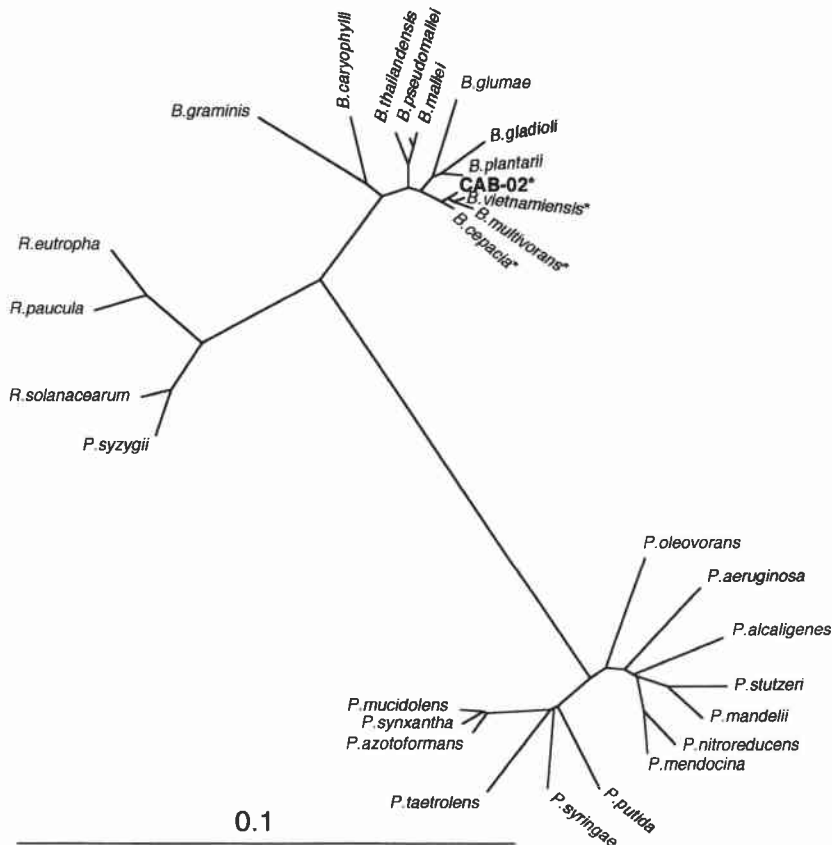
GenBankに登録されている3属29種の16S rRNA 遺伝子 (第2表) のうち、共通して配列が判明している領域1400 bpを相同性解析に用いた。マルチプルアライメントと塩基置換度の推定にはClustal Xプログラム (Thompson et al., 1997) を用いた。各配列間の塩基置換度から近隣接合法 (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。

## 結果および考察

CAB-02の培養菌体より抽出した染色体DNAを鋳型としたPCRにより約1.5 kbの単一DNAフラグメントの増幅産物が得られた。増幅産物の一次構造をダイレクトシーケンスにより解析した結果、増幅DNAは1461bpよりなることが明らかとなった。PCR産物の全塩基配列を第1図に示す。Blastプログラムにより相同性検索を行った結果、いくつかの*Burkholderia*属細菌の16S rRNA 遺伝子と最も高い相同性を示した。この結果より、

CAB-02は*Burkholderia*属に属することが示唆された。

GenBankに登録されている*Pseudomonas*属11種、*Burkholderia*属15種、*Ralstonia*属3種 (第2表) の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いてマルチプルアライメントを行った結果においてもCAB-02の16S rRNA 遺伝子は*Burkholderia*属細菌のものと高い相同性を示した (第2図)。塩基置換度の推定値から近隣接合法による系統樹を作成したところ、各属が明瞭に分離した3つのクラスターが形成され、CAB-02はその中の*Burkholderia*属からなるクラスターに分類された。その中でも*B. vietnamiensis*、*B. multivorans*、*B. cepacia*に比較的近縁であることが示唆された。CAB-02は炭素源利用能 (角田ら, 1999) において*B. vietnamiensis*に比較的類似している。*B. vietnamiensis*は1994年にベトナムのイネの根圏より分離された窒素固定能を持つ*Burkholderia*属細菌である (Gills et al., 1995)。CAB-02もイネから分離されており、粉の発芽時に対数増殖することが明らかになっているなど (奥田ら, 1998)、イネに対する定



第2図 16S rRNA 遺伝子の相同性に基づき作成した系統樹枝長は一塩基当たりの塩基置換率を示す。アスタリスク (\*) は CAB-02 と同一クラスターのものを示す。

着性において両者は類似していると思われる。しかし、CAB-02は窒素固定を行わないことが明らかになっており（データ未発表）、近縁であるものの *B. vietnamiensis* とは異なると考えられた。一方、イネもみ枯細菌病 (*B. glumae*) やイネ苗立枯細菌 (*B. plantarii*) も同じ *Burkholderia* 属であることから、CAB-02とこれら病原菌の生理学的性質は比較的類似していると推察される。実際、イネもみ枯細菌病菌やイネ苗立枯細菌病菌を保菌したイネもみに対し、CAB-02を催芽時処理した場合、CAB-02が優位に増殖し、病原菌の増殖を抑制することが示されている（奥田ら，1998）。具体的な機作は未解明だが、近縁種どうしの栄養源あるいは増殖場所の競合や細菌間の相互作用が関与しているものと思われる。

以上のことから、CAB-02は角田らにより新規 *Pseudomonas* sp. と報告されたが、今後は *Burkholderia* sp. としたい。病原菌の発病抑制に関する特性の解明やDNAフィンガープリント分析等のゲノム全体を対象とした解析を行うことで、本菌のさらに詳細な分類学的位置が明らかになるとと思われる。

#### 引用文献

- Gillis, M., Van V. T., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T. and Fernandez, M.P. (1995) Polymorphic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 : 279-289.
- 伊藤秀郎 (1996) DNAの抽出精製。遺伝子操作の基礎技術 (大田美智男 編) 菜根出版 (東京) pp. 62-75.
- 奥田 充・宮川久義 (1998) 拮抗細菌 CAB-02の産生する抗菌性物質。日植病報 64 : 384-385 (講要)。
- 奥田 充・角田佳則・宮川久義 (1998) 育苗期水稻に発生する細菌病を抑制する *Pseudomonas* 属細菌の発見。ブレインテクノニュース 67 : 5-7.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 : 406-425.
- 角田佳則・高屋茂雄・石井清子 (1999) 新規拮抗微生物を用いたイネ苗の立枯性病害防除剤および防除方法。日本国特許第2884487号。
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24 : 4876-4882.
- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kitajima, T., Suzuki, K.-I. and Komagata, K. (1994) Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 : 235-245.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, 36 : 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y. (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiol. Immunol.* 39 : 897-904

(2000年4月30日 受領)