

連載「農業関連微生物」



第1回 いわゆる「アグロバクテリウム」について — (1) プロフィールの紹介 —

澤田宏之

独立行政法人農業生物資源研究所 基盤研究領域 ジーンバンク 〒305-8602 つくば市観音台 2-1-2

Agrobacteria — (1) Introduction of their profiles —

Hiroyuki Sawada

National Institute of Agrobiological Sciences
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

1. はじめに

Agrobacterium 属細菌は *Alphaproteobacteria* 綱 *Rhizobiales* 目 *Rhizobiaceae* 科に属するグラム陰性、好気性の周毛桿菌であり (Young *et al.*, 2005), 属内には根頭がんしゅ病菌や毛根病菌といった重要な植物病原菌が含まれている。そのため、本属菌に関する研究は、植物病理学分野において病気の診断・防除を目的として始められた。また、その研究の過程で本属菌が植物に病気を起こすメカニズムが解明されると、その仕組みを利用して植物に有用形質を導入するための遺伝子組換え技術が開発された。それ以来、本属菌は遺伝子導入ベクターを供給する有用菌としても注目されてきた。さらに、臨床材料や水圏、土壌などのさまざまな環境から本属菌が分離される事例が相次いで報告されるようになり、いわゆる環境微生物としての生態や、環境汚染物質分解菌としての機能にも大きな関心が寄せられつつある。本号では、さまざまな形で人間生活と関わりを持ち、「アグロバクテリウム」と呼称されてきた本属菌の横顔について簡単に紹介したい。

2. 病原菌としての横顔

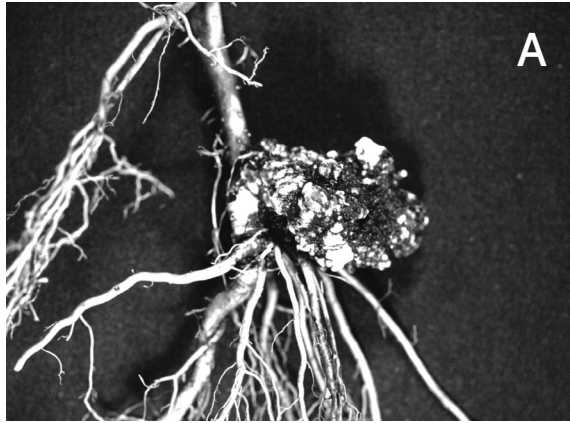
本属菌が引き起こす植物の病害としては、根頭がんしゅ病と毛根病の2つが知られている (図1)。根頭がんしゅ病に関しては、1890年に和歌山県において

南米からの輸入オウトウ苗で発生が認められたのが、わが国における初記載であると考えられている。その後、各地で果樹、花卉をはじめとするさまざまな作物において発生が確認されてきた。人為的な接種試験によって確認された根頭がんしゅ病菌の宿主範囲は非常に広く、双子葉植物だけでなく、一部の単子葉植物や裸子植物にも及ぶとされている。138科588属1193種の植物に接種を行った結果、93科331属643種に病原性が認められたとの報告もある (De Cleene & De Ley, 1976)。

一方、人為的な接種ではなく、自然条件下で実際に発病が確認された植物はこれよりも少ない。わが国で自然発病が報告されている有用植物は今のところ50種類とされている (日本植物病理学会, 2000, 2006)。また、根頭がんしゅ病菌は病原性に関して著しく分化が進んでおり、多犯性のものからごく限られた宿主にしか病気を起こせないものまでさまざまな系統が存在していることにも注意すべきである。たとえ人為的な接種試験においても、すべての菌株が上記のような広い宿主範囲を示すわけではない (澤田, 1994)。

根頭がんしゅ病に侵された植物では、地下部の根や地上部の幹や枝のさまざまな部位にがんしゅと呼ばれるこぶが形成されるが、地際部付近に認められることが比較的多い。がんしゅは発病初期には乳白色の小さな球形の隆起として認められるが、時間の経過とともに肥大し、互いに融合して直径5 cm以上に達することもある (図1A)。がんしゅ表面は硬化した組織

E-mail: sawada@affrc.go.jp



根頭がんしゅ病—リンゴの根に形成されたこぶ



毛根病（塩見原図）—メロンの株元から地上部に現れた不定根

図1 アグロバクテリウムが引き起こす植物の病気

で覆われて灰褐色～黒褐色となり、亀裂が多数入って粗造になるが、がんしゅ内部の組織は乳白色で柔らかい状態を保っていることも多く、そのような状態の組織からは病原菌を分離することも可能である（澤田, 1994）。

根頭がんしゅ病菌のゲノムは、2本の染色体と複数のプラスミドから構成されている場合が多い。病原性関連遺伝子の多くは約150～250 kbのTi (tumor-inducing) プラスミド上に存在しているが、一部は染色体上にもコードされている。Ti プラスミドには *vir* (virulence) 領域と T-DNA (transferred DNA) 領域という病原性関連遺伝子が集中して存在している領域が2つあり（図2）、前者の働きによって後者が宿主植物の染色体へと転移して病気が引き起こされる。T-DNAはRB (right border) とLB (left border) という2つの境界配列に挟まれており、これらの境界配列がT-DNAの転移において重要な役割を果たしている。この発病に至るまでのメカニズムについては、分子生物学の進歩とともに遺伝子・分子レベ

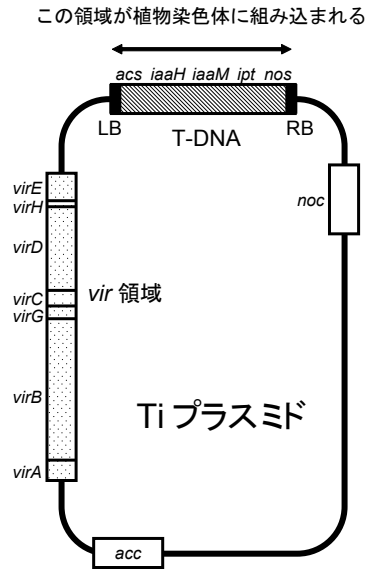


図2 Ti プラスミドの構造

日本に多く分布しているノバリン型のTiプラスミドの模式図を示した。LBとRBに挟まれたT-DNA領域には、オーキシンとサイトカイニンの合成酵素遺伝子 (*iaaM*, *iaaH*と*ipt*) やオパイン合成酵素遺伝子 (*nos*と*acs*) がある。*vir* 領域にはT-DNAの転移に働く遺伝子群 (*virA*～*virH*など) が含まれている。*noc* 領域と*acc* オペロンにはオパインの代謝に関わる遺伝子群が存在している。

ルで詳しく解析が行われてきた (Zhu *et al.*, 2000; 我彦, 2004)。その概要は以下の通りである。土壌中に生息する本菌は、宿主植物の傷口から分泌されるアセトシリゴンなどの植物因子に誘引されて傷口に到達した後、植物細胞の細胞壁に付着する。菌側の2成分制御系によってこれらの植物因子が感知されると、そのシグナルが伝達されることによって *vir* 領域内の各遺伝子群 (*virD*, *virE*, *virB*など) の発現が誘導される。その結果として、まずVirD1/D2タンパク質の働きによってT-DNA領域の両端のRBとLBに切れ目が入られ、T-DNAがプラスミドから1本鎖のDNA断片として引き剥がされる。切り出されたT-DNAはVirD2やVirE2タンパク質とともに、タイプIV分泌系によって宿主植物の細胞内へと送り込まれる。VirD2やVirE2タンパク質は核移行シグナルを有しており、これらの先導によってT-DNAは植物細胞の核内へと輸送され、染色体へと挿入されて転移が完了する。T-DNA上には植物ホルモン（オーキシン

とサイトカイニン)の合成酵素遺伝子 (*iaaM*, *iaaH* と *ipt*) が存在しており, T-DNA の染色体への挿入後, これらは植物細胞からの制御を受けずに構成的に発現するようになる. その結果, 植物ホルモンが過剰生産されてバランスが崩れ, 感染部位が異常増殖し, こぶとして肉眼的に認められるまでに肥大していく.

また, T-DNA 上には「オパイン」と総称される特殊なアミノ酸誘導体の合成酵素遺伝子 (*nos*, *acs* など)があるので, がんしゅ組織では植物ホルモンとともにオパイン類も盛んに生産されるようになる. 一方, Ti プラスミド上にはオパイン代謝に関わる遺伝子群 (*noc*, *acc* など)があるため, がんしゅ組織が生産したオパインを根頭がんしゅ細菌は炭素源として独占的に利用することができる. すなわち, 本菌は植物細胞をがんしゅ化することによって自分専用の食料生産工場に作りかえてしまうことから, 本病は「遺伝的植民地化」とも呼ばれている. なお, Ti プラスミドは多様化が進んでいてさまざまな系統があり, それぞれ誘導するオパインが異なることから, オパインの種類によってオクトピン型, ノパリン型, アグロピン型などと大別されている. 日本にはノパリン型 (図2) の分布が多いようであるが, それらは病原性などに関してさらに複雑に分化している (澤田, 1994).

本属菌が引き起こすもう一つの病害である毛根病については, 1939年に福岡県下のリングで初記載された後, バラやメロンにおいても発生が確認されている (日本植物病理学会, 2000). 本病に侵されると地際部の茎にこぶが形成され, そこから白色の不定根が発生するとともに, 周辺の土壌からも多数の不定根が現れて地表を覆うまでになる (図1B). このような不定根は根毛を持たないものが多い (塩見, 1987). 毛根病菌が有している病原性プラスミドはRi (root-inducing) プラスミドと呼ばれており, その基本的な構造や病気を引き起こすメカニズムはTi プラスミドと類似している. ただし, Ri プラスミドのT-DNA上には*rol* (root loci) 遺伝子群という特異的な領域があり, その働きによって植物細胞のオーキシンに対する感受性が高まるために, 不定根の形成が著しく促進されると考えられている (我彦, 2004).

根頭がんしゅ病と毛根病のいずれに関しても, 保菌した母樹や親株から生産される汚染苗によって大規模な集団発生が起こりうること, 土壌中の病原菌が長期間生存する能力を有しているために土壌伝染が起こりうること, 卓効のある治療薬がないことなどにより, 難防除の重要病害として問題とされてきた (澤田,

1994; 塩見, 1987). 特に若木や弱い品種で集団的に発生した場合は大きな被害が出ることから, 有効な診断・防除技術の確立が望まれているところである.

3. 有用菌としての横顔

本属菌には有用菌としての側面もある. その中でも最もよく知られているのは, 本属菌が病気を起こすメカニズムを利用して遺伝子組換え技術 (いわゆるアグロバクテリウム法) が開発されたことであろう. ここでは, その際に広く用いられているバイナリーベクター系について紹介したい. 前述したような根頭がんしゅ病の発病に至るまでの過程では, 植物の染色体に転移する「T-DNA」と, T-DNAを植物細胞へと送り届ける役割を果たす「*vir*領域」の2つが必要不可欠の要素となっている (図2). このうちのT-DNAに関しては, その両端に存在するRBとLBが重要であり, それさえ揃っていればその間にどのような配列が挟まれていようとも植物の染色体に転移することができる. また, *vir*領域とT-DNAは同じプラスミド上にある必要はなく, 別々のレプリコン上にあってもそれぞれの機能を果たすことができる. 以上のような性質をうまく利用することによって, 図3に示すような2つのプラスミドからなるバイナリーベクター系が構築された (Gelvin, 2003; 我彦, 2004). 一方のバイナリーベクターには, 本属菌と大腸菌のいずれでも増殖できるような複製開始領域が組み込まれており, シャトルベクターとして扱うことができる. したがって, RBとLBに挟まれた領域内へ有用遺伝子や薬剤耐性遺伝子をクローニングするという操作を, 大腸菌の系を用いて容易に行うことが可能である. もう一方の改変Tiプラスミドは, 野生型のTiプラスミドからT-DNA領域を欠失させ, *vir*領域を残すようにして作られている. これら2つのプラスミドを本属菌の菌体内に共存させた上で, その菌を目的の植物に感染させると, *vir*領域内の各遺伝子群の働きによってRBとLBに挟まれた領域が切り出され, 植物細胞内へと送り込まれて染色体に挿入される. その後, 薬剤耐性マーカーを利用することによってT-DNAの挿入を受けた形質転換細胞を選抜し, それを植物体へと再分化させれば, 有用遺伝子が導入された組換え植物を得ることができる.

以上のような遺伝子導入ベクターの改良は今も続けられており, 適用範囲の拡大や遺伝子導入効率の向上を目指してさまざまな工夫が試みられてきた. また, シグナル分子であるアセトシリンゴンで処理して

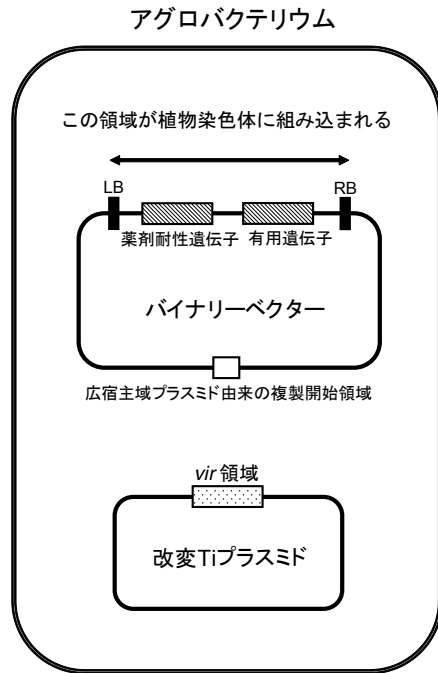


図3 バイナリーベクター系
改変 Ti プラスミド上の *vir* 領域の働きによって、バイナリーベクター上の LB と RB で挟まれた領域が植物の染色体へと転移する。

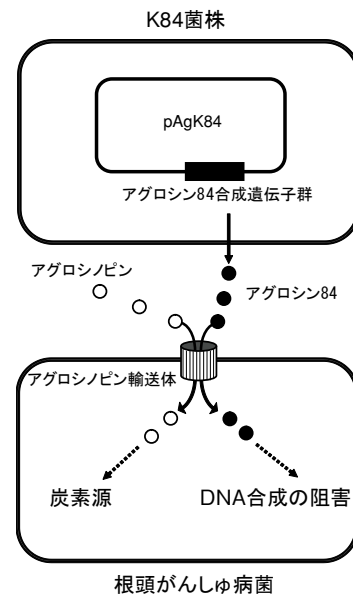


図4 K84 菌株が根頭がんしゅ病を予防するメカニズム

K84 が分泌するアグロシン 84 は、アグロシノピン輸送体によって病原菌の菌体内に取り込まれ、病原菌の DNA 合成を阻害する。

やれば、植物以外の糸状菌、酵母、キノコ、ヒト培養細胞などでも本属菌の系を用いた形質転換が可能であり、目的とする遺伝子をこれらの染色体へと挿入できることが明らかとなってきた (Kunik *et al.*, 2001)。さらに、T-DNA の染色体への挿入はほぼランダムに起こることから、本属菌の系は植物をはじめとするさまざまな真核生物において、挿入変異体を取得する方法としても利用されるようになっており、遺伝学的研究におけるツール (T-DNA タギング法) として広い分野で定着しつつある。

本属菌の中には根頭がんしゅ病を予防するための生物農薬として活躍しているものもある。オーストラリアでモモの根圏から分離された非病原性の「K84 菌株」がそれであり、根頭がんしゅ病に対して予防効果を示すことから世界中で生物農薬として利用され、成果を上げてきている (牧野, 1986)。日本でも果樹類、バラおよびキクで本病に対する予防剤として用いられている。K84 が本病を予防するメカニズムについても詳しく調べられているので (Kim & Farrand, 1997)、その概要を以下に紹介したい (図 4)。K84 の有している pAgK84 というプラスミドには、アグロシン 84

という抗菌性物質の生合成遺伝子群が存在しており、K84 はアグロシン 84 を盛んに生産して菌体外に分泌している。一方、病原菌の中にはアグロシノピンというオパインを資化できる系統が存在している。この系統はアグロシノピンを菌体内へ取り込むためのトランスポーター (輸送体) を有しているが、その輸送体はアグロシノピンだけでなくアグロシン 84 も菌体内へと取り込んでしまう。その結果、アグロシン 84 の作用によって病原菌の DNA 合成が阻害されてしまうことになる。したがって、苗木の根を K84 の菌液に浸し、K84 を根に十分に定着させてからほ場に植え付ければ、病原菌が根に近づくのを防ぐことができるわけである。ただし、以上のような仕組みのため、K84 はアグロシノピンの輸送体を持っていない病原菌に対しては効果がないことに注意する必要がある。K84 が効かないタイプの病原菌に対しても有効な生物農薬を求めて、現在も各国で熱心に探索が続けられており、やはり本属に属する非病原性菌株の中から有望な系統が見つかりつつある (Kawaguchi *et al.*, 2005)。

有用菌の最後に、環境汚染物質分解菌としての横顔を取り上げてみたい。さまざまな有害化学物質で汚染された土壌や地下水などを浄化するために、汚染物質

の分解能を有する微生物が世界中で精力的に探索されている。その結果としてさまざまな分解菌が報告されるようになってきたが、その中には本属菌やその近縁菌が少なからず含まれていることが明らかになってきた (Struthers *et al.*, (1998) をはじめとして多数の報告がある)。対象となる汚染物質は多岐にわたっていることから、土壤中でさまざまな物質に囲まれながら暮らしてきた本属菌は大きな可能性を秘めているのかもしれない。これらの分解菌が有する分解遺伝子群の中には、トランスポゾンやプラスミドなどの可動性因子上に存在しているものがあることから、ゲノムの再編成や水平移動を通じて機能の多様化や分布の拡大が行われてきた可能性がある。

4. おわりに

本属菌の持つさまざまな横顔を紹介してきたが、実はここに挙げた例は本属菌の実体のほんの一部分に過ぎないと考えられるべきなのかもしれない。臨床材料や水圏、土壌などのさまざまなサンプルから本属菌と考えられる菌株が分離されてくることから、環境微生物の一員として本属菌がきわめて広範な環境に分布していることは間違いないであろう。いわゆる VBNC (viable-but-nonculturable) の状態でプラスミドを保持しながら (Alexander *et al.*, 1999), 大多数の本属菌はどこで何をしているのだろうか。分子生態学の進歩とともにその大きな謎が解き明かされることを期待したい。

ところで、本属菌は植物病原菌という形で早い時期から研究対象になってきたため、分類体系の枠組みが非常に人為的な形で構築されてきたという問題を抱えている (Young *et al.*, 2005)。しかも、その弊害を解消するために、最近になって分類の変更が相次いで提案されたものの、それが逆に分類のユーザーの混乱を招いているような状況にある。本属菌を巡るきわめて重要な問題ではあるが、紙面の関係で本号では触れることができないので、次号でその概略について紹介したい。

文献

Alexander, E., Pham, D. & Steck, T.R. (1999). The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3754-3756.

De Cleene, M. & De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *Bot. Rev.* **42**: 389-466.

Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 16-37.

Kawaguchi, A., Inoue, K. & Nasu, H. (2005). Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *J. Gen. Plant Pathol.* **71**: 422-430.

Kim, H. & Farrand, S.K. (1997). Characterization of the *acc* operon from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58, which encodes utilization of agrocinopines A and B and susceptibility to agrocin 84. *J. Bacteriol.* **179**: 7559-7572.

Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. & Citovsky, V. (2001). Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 1871-1876.

牧野孝宏 (1986). *Agrobacterium radiobacter* 利用による根頭がんしゅ病の防除. *植物防疫* **40**: 540-546.

日本植物病理学会編 (2000). 日本植物病名目録. 日本植物防疫協会, 東京.

日本植物病理学会編 (2006). 日本植物病名目録追録. 日本植物病理学会, 東京.

澤田宏之 (1994). *Agrobacterium* 属細菌の系統および分類に関する研究. *果樹試験場報告 特別報告* **5**: 1-110.

塩見敏樹 (1987). メロン毛根病の発生とその病原細菌. *植物防疫* **41**: 4-7.

Struthers, J.K., Jayachandran, K. & Moorman, T.B. (1998). Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3368-3375.

我彦広悦 (2004). アグロバクテリウムハンター. *化学と生物* **42**: 29-34.

Young, J.M., Kerr, A. & Sawada, H. (2005). Genus *Agrobacterium*. In Garrity, G.M. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition. vol. 2 Part C, p. 340-345, Springer, New York.

Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J. J., Farrand, S.K. & Winans, S.C. (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 3885-3895.