



第3回 いわゆる「アグロバクテリウム」について — (3) 今後の分類を考えるための視点 —

澤田宏之, 富岡啓介, 永井利郎, 青木孝之,
遠藤眞智子, 廣岡裕吏, 佐藤豊三

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 — (3) Viewpoints for considering their systematics —

Hiroyuki Sawada, Keisuke Tomioka, Toshirou Nagai, Takayuki Aoki,
Machiko Endo, Yuuri Hirooka and Toyozo Sato
National Institute of Agrobiological Sciences
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

1. はじめに

Agrobacterium 属細菌の分類体系に関しては, A) 病原性に基づいた人為分類, B) 種レベルへの自然分類の導入, C) 属レベルへの自然分類の導入, という3つの異なる考え方(システム)が鼎立しており, その混乱が収束するまでにはまだ長い時間がかかりそうである, という状況については前号で紹介した(澤田, 2007). この混乱を收拾するために, 「学問的な厳密さ」と「実用上の利便性」という2つの観点からさまざまな検証がなされるであろうことと, その過程でどのような問題が俎上に載せられる可能性があるのかについても簡単に述べたところである. ここでは, その問題点のうち特に重要と思われるものについて, 具体的な事例を挙げながらさらに詳しく紹介してみたい. なお, *Agrobacterium* 属の学名についてはBのシステムにしたがって表記を行った.

2. 学問的な厳密さからの視点

1) 分子生態学から見てきたプラスミドの動態

Agrobacterium 属と *Rhizobium* 属(近縁の *Sinorhizobium* (*Ensifer*) 属を含む)のメンバー間でプラスミド(前者のTiまたはRiプラスミドと後者のSymプラスミド)が交換可能であり, しかも伝達

されたプラスミド上の遺伝子群が属の異なる受容菌においても正常に機能することが, 実験室レベルの接合伝達試験によって繰り返し確認されてきている(Martinez *et al.*, 1987 以来多数の報告がある). しかも, 分子生態学が進むにしたがって, このようなプラスミドの交換は自然環境中においても実際に行われていることを示すデータが, 以下のように次々と提示されるようになってきた. すなわち, 毛根病に罹病した植物からRiプラスミドを有する *Rhizobium* 属細菌が分離され, しかもこの「根粒菌の属のメンバー」が実際に病原性を有しており, 接種すると毛根病を誘導することが確認されている(Weller *et al.*, 2004, 2005). Tiプラスミドが土壤中で *Agrobacterium* 属細菌から *Sinorhizobium* 属細菌へと伝達されることも認められている(Teyssier-Cuvelles *et al.*, 1999). 逆に, マメ科植物の根粒から *Agrobacterium* 属細菌が分離される事例も報告されている(de Lajudie *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2005). また, SymプラスミドとTi/Riプラスミドをともに有する菌株が発見されており, しかもそれらの菌株が共生窒素固定能と病原性の両方を兼ね備えていることも確認されている(Velazquez *et al.*, 2005). その中でも特に, *A. rhizogenes* (=biovar 2)の基準株(ATCC 11325)として扱われてきた菌株が, 実はSymプラスミドも有しており, マメ科植物に接種すると根粒を形成する, という事実は大変重いと言

えるのではないだろうか。以上のような数々の知見によって、両属のメンバーの遺伝的背景はきわめて類似しており、それぞれの属の「共有派生形質」と考えられてきた「病原性」と「共生窒素固定能」そのものが、属間で交換可能であることが明らかになってきたわけである。両属の間に設けられた属レベルの「境界」にどのような意味があるのかについて、改めて考え直す必要があるのかもしれない。

2) ゲノム情報から何が見えてくるのか

急速に進展しているゲノムプロジェクトからも、*Agrobacterium* 属と *Rhizobium* 属の分類に影響を与えるような成果が得られつつある。現時点で既に *Agrobacterium* 属に関しては1菌株、*Rhizobium* 属に関しては2菌株の全ゲノム情報が公開されているが、両属はいずれも人間生活にとって重要な細菌であることから、今後も情報がより一層蓄積されていくのは間違いないであろう。また、multilocus sequence analysis (いわゆる MLSA) が広く使われるようになり、さらに多くの情報が蓄積され、利用できるようになるであろう。これらの膨大なデータと新しい解析手法が組み合わされることによって、両属のメンバーに関する「系統進化の道筋」や「環境中での生き様」がよりはっきりと描き出され、それが分類にさまざまな影響を与えることになると思われる。実際に、*Agrobacterium* 属の分類・命名システムを考えるためには、*Rhizobium* 属だけでなく *Sinorhizobium* (*Ensifer*) 属も含めて比較検討する必要があるということ、MLSAに基づいて既に指摘したところである(一幡ら, 2006)。また、これら3つの属がきわめて近縁であることはゲノム情報に基づいた解析でも同様に示されていることから(Young *et al.*, 2006)、*Sinorhizobium* 属も含めた新たな分類上の提案が第4のシステムとして登場する可能性も考えられるのではないだろうか。

3. 道具としての利便性に基づく視点

1) 学名の独り立ちが望まれる

3つの分類・命名システム(A~C)のいずれもが並行して使われているという混乱した状況下では、どのシステムにしたがって学名を表記するつもりなのかをあらかじめ明示しておくことが大変重要となる。特に、「*A. tumefaciens*」と「*A. rhizogenes*」に関しては2つのシステム(AとB)で用いられているが、システムによって同じ学名が全く異なる実体を指し示すこ

とになっている。そのため、どちらのシステムに基づいているのかを最初にはっきりと宣言した上でこれらの学名を使用することが是非とも必要である。具体的には、Aのシステムに基づいている場合は、「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第1版(Kerstens & De Ley, 1984)で用いられた分類・命名システムに従う」ということを明記した上で、学名に「biovarの情報」も必ず付記するべきであろう。Bに従う場合は、「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第2版(Young *et al.*, 2005)で用いられた分類・命名システムに従う」と記した上で、「tumorigenicや(Ri)などの病原性に関する情報」も学名に付ける、という措置をとるべきであろう。

しかし、論文の冒頭でいくらそのような注釈を付けたとしても、その論文の情報が別の場面で引用される際に、注釈も学名とともに伝えてもらえるであろうか。また、その論文にかかわる菌株が人の手を渡っていく際も、注釈付きの学名とともに伝わってくれるであろうか。さらに、菌株の情報や配列情報がネット上のさまざまなデータベースに蓄積されることが多くなってきたが、その際も注釈付きの学名として扱ってもらえるであろうか。学名を扱うあらゆる場面で注釈の介添えが必要であるにもかかわらず、いつの間にか注釈が脱落し、学名が正体不明のあやふやなラベルと化してしまう危険性が捨てきれないであろう。

一方、Cのシステムの場合は、どのシステムを拠り所としているかが属名によって明示されており、学名の指し示す内容について誤解を与えることがない、という利点がある。上記のような注釈を学名に付けておく必要がなく、注釈が途中で脱落するのを心配することからも解放されるのである。今後ネット上にますます情報が蓄積され、さらには発信者のコントロールを離れて情報が自己増殖していくような時代には、このような「独り立ちしたシステム」が望ましいと考えられるようになるのかもしれない。

2) 環境細菌をいかに記載するのか

1970年代まではすべての根粒菌が *Rhizobium* 属細菌として整理されていた。その後、*Rhizobium* 属が遺伝的にヘテロな分類群であることが明らかになると、その知見を基に複数の属に分割されていった(澤田, 2003; Sawada *et al.*, 2003; Kuykendall *et al.*, 2005)。現在では、「根粒菌を含む種」は12属に分布しており、それらは *Alphaproteobacteria* 綱のみならず *Betaproteobacteria* 綱にまで広がっている。

これら12属はその成り立ちと定義に基づいて大きく2つに分けることができる。1つは比較的早い時期に成立した「*~rhizobium*」という学名が冠された属である。これらは、『「根粒菌を含む種」で構成された属』という形で定義された人為的な分類群である。そのため、「根粒菌を含まない種」は属内にはまったく存在していない。もう1つのグループは、比較的最近になってから根粒菌が属の新たなメンバーとして発見され、その属の新種として記載されたものである。このグループの属は、いずれも系統樹上でそれぞれが単系統群としてよくまとまっているのが特徴である。ただし、属（単系統群）内には根粒菌だけでなく、さまざまな表現形質を示す多種多様な環境細菌が含まれており、それらが1つの属としてまとめられている。前者のグループ（根粒菌のみの純血主義の属＝表現形質ベースの属）の例としては、*Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* 属がある。後者（単系統群としてよくまとまっている属＝分子系統ベースの属）には *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum* 属が挙げられる（澤田, 2003; Sawada *et al.*, 2003; Kuykendall *et al.*, 2005）。

問題となるのは前者における属の定義である。「根粒菌を含まない種」は、たとえ系統樹上で「*~rhizobium* 属」と同じ単系統群に入っていようと、分類上は決してその属の正式メンバーとして認められないのである。そのために、「*~rhizobium* 属」の単系統群内には、共生窒素固定能の認められていないいわゆる「環境細菌」が、学名も付けられないまま「所属不明菌」として多数放置されてきた（澤田, 2003）。

ところが、このような混乱した状況に最近になって変化の兆しが見えてきたのである。その口火を切ったのが *Bradyrhizobium betae* として正式記載された非根粒菌である（Rivas *et al.*, 2004）。*B. betae* はサトウダイコンのこぶから分離された菌であるが、サトウダイコンにこぶを形成せず、しかもマメ科植物に根粒を形成する能力も確認されていないにもかかわらず、*Bradyrhizobium* 属のメンバーとして記載されたのである。その後も、共生窒素固定能の確認されていない菌株が *Mesorhizobium thioanganeticum* や "*Bradyrhizobium iriomotensis*" として報告されている（Ghosh & Roy, 2006; Islam *et al.*, 2007）。今まで頑なに「根粒菌を含まない種」を拒み続けてきた「*~rhizobium*」グループが、門戸を広げ始めたと言える

のかもしれない。

一方、グループの総本家とも言える *Rhizobium* 属の周辺では、依然として根粒菌を含む種は *Rhizobium* 属、病原菌を含む種は *Agrobacterium* 属とする考え方（AあるいはBのシステム）が主流である。しかし、いつまでもその頑なな純血思想のままでは、増え続ける「所属不明菌」のために混乱が激しくなるばかりであることから、混乱を軽減するための新たな「テクニック」が使われるようになってきた。すなわち、マメ科植物の根粒以外の分離源から得られた環境細菌であっても、接種試験によっていずれかのマメ科植物に対して少なくとも「無効根粒」さえ形成できれば、*Rhizobium* 属の正式メンバーとして認める、というものである。この「テクニック」によって、バイオリクターから分離されたシアン化物分解菌やおが屑から分離されたセルロース加水分解細菌が *Rhizobium* 属細菌として正式に記載された（Quan *et al.*, 2005; Garcia-Fraile *et al.*, 2007）。

しかし、いかにもその場しのぎのこの「テクニック」によって、増え続けるばかりの環境細菌をどこまで *Rhizobium* 属細菌として整理することができるのであろうか。また、前述したように *A. rhizogenes* の基準株は共生窒素固定能も併せ持っていることから（Velazquez *et al.*, 2005）、この手法に従うのであれば *A. rhizogenes* は *Rhizobium* 属の正式メンバーとして扱われるべきではないだろうか。自然環境においても病原性/共生プラスミドの交換が実際に行われており、環境中でも系統樹上でも病原菌/根粒菌と環境細菌とが入り乱れて共存しているのであるならば、分類体系もその現状を受け入れるのが自然ではないだろうか。

3) 16S rDNA では属レベルの同定ができないのか

「16S rDNA の相同性検索によって分離菌や環境配列の分類学的な所属を推定する」という手法が、分子生態学分野を中心として広く利用されるようになってきている。しかし、この手法を *Agrobacterium/Rhizobium* 関連細菌に使う場合には注意が必要である。すなわち、この手法を適用するためには「分類体系が分子系統に基づいて構築されている」ことが必要条件となるが、AやBのシステムはいずれもその条件を満たしているとは言えない。したがって、AやBのシステムが主流派となっている現段階で安易にこの手法を用いると、正しい判定ができないばかりでなく、その不適切な判定結果が配列データベースに登録され

るとそれがノイズとなってしまう。さらに、そのノイズが別の検索においてヒットすることによって新たなノイズが生み出され、ノイズの拡大再生産が際限なく進んでしまう恐れがある。データベースがノイズや正体不明のラベルで一杯にならないうちに対策を考えなければならない問題ではないだろうか。

4. おわりに

Agrobacterium/Rhizobium 関連細菌の分類について考えていく上で、特に重要と思われる問題・視点のうちのいくつかを取り上げて紹介したわけであるが、これ以外にもまだまださまざまな問題が残されているであろう。また、データが蓄積されていくにしたがって、あるいは、分類を使うユーザーの構成が変化していくのにもよって、予期しない新たな問題が生じたり、問題に対する見方が変化していくことも考えられる。人間生活に深くかかわる菌種が多数含まれているような両属の分類に関しては、今後もさまざまな視点のバランスを保ちながら慎重に考えていくことが必要であろう。

文 献

- Garcia-Fraile, P., Rivas, R., Willems, A., Peix, A., Martens, M., Martinez-Molina, E., Mateos, P.F. & Velazquez, E. (2007). *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 844-848.
- Ghosh, W. & Roy, P. (2006). *Mesorhizobium thio-gangeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 91-97.
- Han, S.Z., Wang, E.T. & Chen, W.X. (2005). Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 265-276.
- 一幡由香利, 吉田隆延, 野口雅子, 染谷信孝, 土屋健一, 中島雅巳, 阿久津克己, 澤田宏之 (2006). *Agrobacterium* および *Rhizobium* 属細菌の多様性に関する分子進化学的研究. *日本植物病理学会報* **72**: 305.
- Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Seki, T. (2007). *Bradyrhizobium iriomotensis* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote island in Japan. *Microbiol. Cult. Coll.* **23**: 59.
- Kersters, K. & De Ley, J. (1984). Genus *Agrobacterium*, In Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 1, p. 244-254, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kuykendall, L.D., Young, J.M., Martinez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2005). Genus *Rhizobium*, In Garrity, G.M. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition. vol. 2 part C, p. 325-340, Springer, New York.
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Mohammed, S.H., Torck, U., Coopman, R., Filali-Maltouf, A., Kersters, K., Dreyfus, B., Lindström, K. & Gillis, M. (1999). *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 119-132.
- Martinez, E., Palacios, R. & Sánchez, F. (1987). Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**: 2828-2834.
- Quan, Z., Bae, H.-S., Baek, J.-H., Chen, W.-F., Im, W.-T. & Lee, S.-T. (2005). *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2543-2549.
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L., García-Benavides, P., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Gillis, M. & Velázquez, E. (2004). *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1271-1275.
- 澤田宏之 (2003). 根粒菌の系統分類—過去・現在・将来—。土と微生物 **57**: 39-64.
- 澤田宏之 (2007). いわゆる「アグロバクテリウム」について—(2) 分類の現状—。日本微生物資源学会誌 **23**: 29-34.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D. & Young, J.M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**: 155-179.
- Teyssier-Cuvette, S., Mougél, C. & Nesme, X. (1999). Direct conjugal transfers of Ti plasmid to soil microflora. *Mol. Ecol.* **8**: 1273-1284.
- Velazquez, E., Peix, A., Zurdo-Pinero, J.L., Palomo, J.L., Mateos, P.F., Rivas, R., Munoz-Adelantado,

- E., Toro, N., Garcia-Benavides, P. & Martinez-Molina, E. (2005). The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 1325-1332.
- Weller, S.A., Stead, D.E. & Young, J.P.W. (2004). Acquisition of an *Agrobacterium* Ri plasmid and pathogenicity by other α -*Proteobacteria* in cucumber and tomato crops affected by root mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2779-2785.
- Weller, S.A., Stead, D.E. & Young, J.P.W. (2005). Induction of root-mat symptoms on cucumber plants by *Rhizobium*, but not by *Ochrobactrum* or *Sinorhizobium*, harbouring a cucumopine Ri plasmid. *Plant Pathol.* **54**: 799-805.
- 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.
- Young, J.P.W., Crossman, L.C., Johnston, A.W.B., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., Wexler, M., Curson, A.R.J., Todd, J.D., Poole, P.S., Mauchline, T.H., East, A.K., Quail, M.A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S. & Parkhill, J. (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* **7**: R34.

(担当編集委員：青木孝之)