



第2回 いわゆる「アグロバクテリウム」について —(2) 分類の現状—

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 — (2) Present status of their systematics —

Hiroyuki Sawada

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

1. はじめに

人為分類色の強い *Agrobacterium* 属の分類体系には、属・種および変種レベルにまたがって複数の問題が複雑に絡み合っており存在していることから（澤田，土屋，2003；Young *et al.*, 2005），それらを解消することを目指してさまざまな提案がなされてきた。その結果として、分類・命名に関する3つの異なる考え方（以下，それぞれを「システム」と表記する）が鼎立するという混乱した状況となっている（表1）。

この3つのシステムは、「どれを使っても間違いではない」という意味では条件のまったく同じ選択肢であり、分類のユーザーの自由な選択に委ねられている状態である。しかし、どれを使うべきかの判断に困る、システムによって同じ学名が違う意味で用いられているなど、ユーザーにとって分かりにくい点が多い。ここでは、本属の分類における変遷の歴史を簡単に振り返りながら、それぞれのシステムの特徴と今後の展望について考えてみたい。

2. 病原性に基づいた人為分類（表1A）

根頭がんしゅ病に関する病原学的研究は19世紀末には既に始められており、20世紀に入ると根頭がんしゅ病菌や毛根病菌が分類群として記載されるようになった。当時は「植物に対する病原性」が属や種レベルの分類基準として重視されていたため、これ

らの病原菌も病原性に基づいて整理が進められ、それぞれが種として記載されていった。1940年代に入るとこれらの病原菌が1つにまとめられて新属「*Agrobacterium*」が設けられ、根頭がんしゅ病菌は「*A. tumefaciens*」、毛根病菌は「*A. rhizogenes*」、*Rubus* 属植物から分離された根頭がんしゅ病菌は「*A. rubi*」とされた。また、病原性は認められないものの、これらの病原菌と生理・生化学的検査では区別できないような細菌が土壌から分離されることから、これを「*A. radiobacter*」として種のレベルで病原菌とは区別する、という措置がとられた。1943年にこれら4種が *Agrobacterium* 属を構成するメンバーとして出揃うと、この人為的な分類・命名システム（表1A）は多くのユーザーに広く用いられるようになっていった（Allen & Holding, 1974）。

一方、病原性に大きく依存しながら属や種が記載されるのと並行して、さまざまな生理・生化学的性質も本属を対象とした分類学的研究に導入されていった。その結果、*A. rubi* 以外の3種の内部には、生理・生化学的性質の異なる複数の系統が存在していることが明らかになってきた（Holmes & Roberts, 1981）。そして、それらの系統を整理して記載するために、それぞれの種内に変種レベルの分類階級である「生理型 (biovar)」が設けられた（表1A）。本属におけるこの biovar を用いた分類・命名システムでは、「同じ biovar の番号を持つ菌株は、たとえ所属する種が異なっても（つまり、病原性が違って

表1 *Agrobacterium* 属内における3つの分類・命名システム間の対応関係^a

分類・命名システム 特徴 ^b 文献 ^c	A	B	C
	病原性に基づいた人為分類 Kerstens & De Ley (1984)	種レベルへの自然分類の導入 Young <i>et al.</i> (2005)	属レベルへの自然分類の導入 Young <i>et al.</i> (2001)
1 ^d	<i>A. tumefaciens</i> biovar 1	<i>A. tumefaciens</i> ^e (Ti)	<i>Rhizobium radiobacter</i> (Ti)
	<i>A. rhizogenes</i> biovar 1	<i>A. tumefaciens</i> ^e (Ri)	<i>Rhizobium radiobacter</i> (Ri)
	<i>A. radiobacter</i> biovar 1	<i>A. tumefaciens</i> ^e (nonpathogenic)	<i>Rhizobium radiobacter</i> (nonpathogenic)
2 ^d	<i>A. tumefaciens</i> biovar 2	<i>A. rhizogenes</i> (Ti)	<i>Rhizobium rhizogenes</i> (Ti)
	<i>A. rhizogenes</i> biovar 2	<i>A. rhizogenes</i> (Ri)	<i>Rhizobium rhizogenes</i> (Ri)
	<i>A. radiobacter</i> biovar 2	<i>A. rhizogenes</i> (nonpathogenic)	<i>Rhizobium rhizogenes</i> (nonpathogenic)
3 ^d	<i>A. tumefaciens</i> biovar 3	<i>A. vitis</i> (Ti)	<i>Rhizobium vitis</i> (Ti)
	<i>A. radiobacter</i> biovar 3	<i>A. vitis</i> (nonpathogenic)	<i>Rhizobium vitis</i> (nonpathogenic)
4 ^d	<i>A. rubi</i>	<i>A. rubi</i> (Ti) ^f	<i>Rhizobium rubi</i> (Ti) ^f
5 ^d	未記載	<i>A. larrymoorei</i> (Ti) ^f	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (Ti) ^f

^a 同じ行にある学名同士は、まったく同じ実体を指し示している。したがって、ある菌株に付けられた学名は、同一行上の他の学名にそのまま読み替えることができる。

^b 各分類・命名システムの特徴を示した。詳細については本文の各項目を参照。

^c 各分類・命名システムについて説明している最も代表的な文献を挙げた。

^d これら5つの自然分類群はそれぞれ種に相当する。

^e 最近になって Young *et al.* (2006) は、B-1 の分類群に対して「*A. tumefaciens*」ではなく「*A. radiobacter*」を適用することを新たに提案している。

^f 種内には今のところ根頭がんしゅ病菌 (Ti) のみが報告されているが、非病原菌 (nonpathogenic) の存在も予想される。

も)、同じ生理・生化学的性質を示す」ということを表している。すなわち、根頭がんしゅ病菌である *A. tumefaciens* biovar 1、毛根病菌である *A. rhizogenes* biovar 1、および非病原菌である *A. radiobacter* biovar 1 は、生理・生化学的性質に関してはまったく同じであり、いわゆる細菌学的検査によってこれら3つの菌を区別することはできない。

3. 種レベルへの自然分類の導入 (表1B)

病原性に関する分子生物学的な研究が進むにつれ、本属菌では病原性関連遺伝子が染色体だけではなくプラスミド (Ti あるいは Ri プラスミド) 上にも多数分布していることが明らかとなってきた (澤田, 2006)。しかも、これらのプラスミドの多くは自己伝達性である上、菌体内から脱落することもある。したがって、プラスミドの有無に左右される「病原性」を種レベルの分類基準として用いている限り、プラスミドの獲得や脱落が起こる度に分類上の所属 (種) が変わってしまうという問題が、1980年代に入ってから徐々に指摘されるようになった (Kerstens & De Ley, 1984)。

一方、種内変異を記載するために設けられた変種レベルの biovar は、近年の自然分類・系統分類の基準に照らし合わせると、種のレベルで扱うべき自然分類群であることが分かってきた。すなわち、染色体にコードされたさまざまな分類指標に基づいて解析が進むにたがって、biovar 1, 2, 3 および *A. rubi* は、それぞれが独立した分類群としてよくまとまっていることが明らかとなってきた (Holmes & Roberts, 1981; Kerstens & De Ley, 1984)。

以上の2点を主な根拠として、人為的に定義されてきた本属の種レベルの分類を、自然分類・系統分類に沿った形へと修正すべきであるとの意見が出てきた。すなわち、変種レベルの分類群とされてきた biovar 1, 2 および 3 を、それぞれ種レベルの分類群へと格上げすることが検討されるようになった。そして、1990年代に入ると筆者らを含めた複数のグループによってそれが正式に提案され、選択肢の一つとしてユーザーに提示されていった (表1B) (Ophel & Kerr, 1990; Sawada *et al.*, 1993)。

なお、種が自然分類群として整理されるのに伴い、

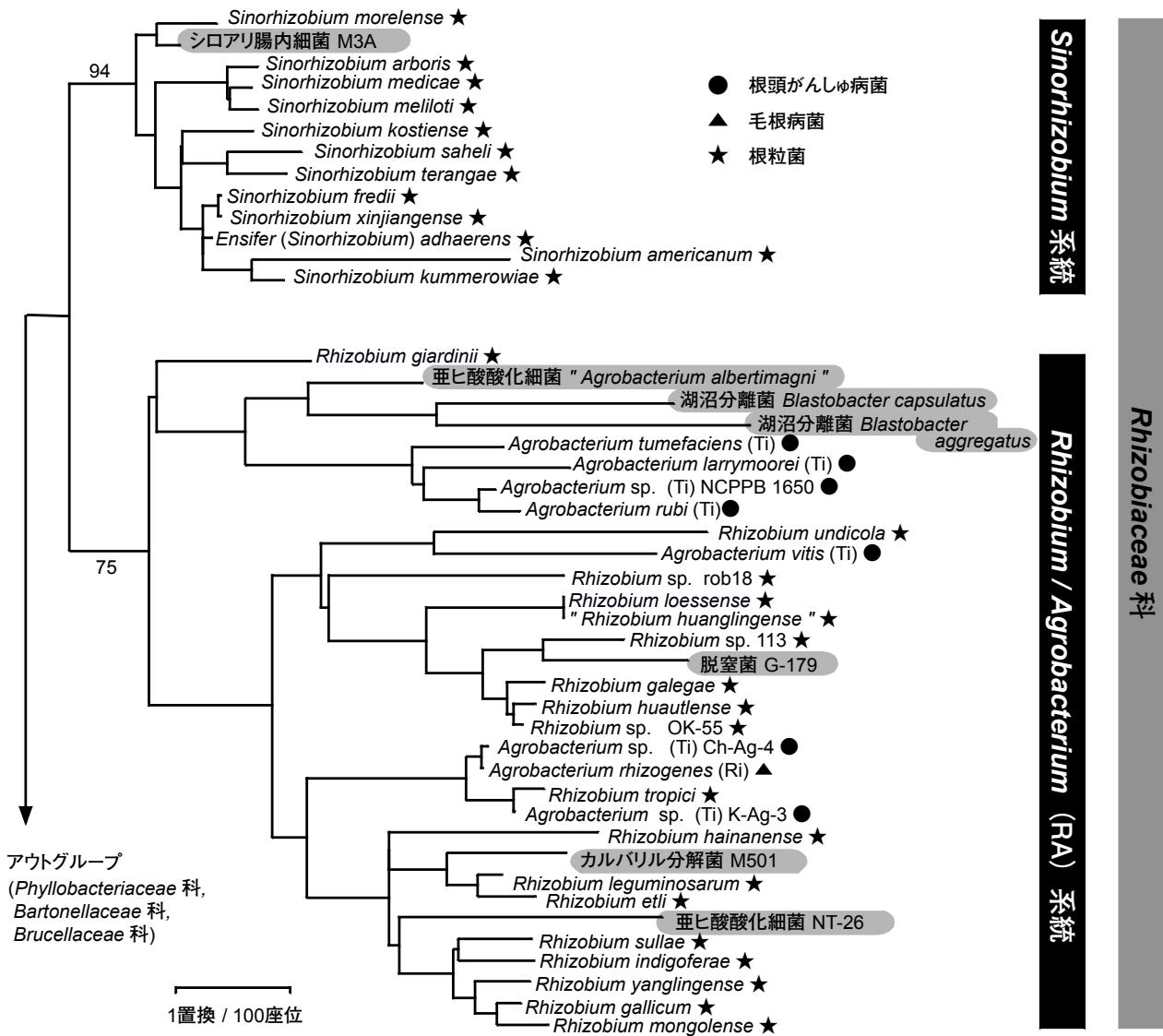


図1 16S rDNA 配列に基づいた *Rhizobium/Agrobacterium* およびその近縁細菌の系統関係
 Bergey's Manual 第2版 (Young *et al.*, 2005) において採用された学名を用いて菌株の表記を行った. すなわち, *Agrobacterium* 属細菌については表1Bのシステムを用いている. 根頭がんしゅ病菌は●, 毛根病菌は▲, 根粒菌は★, いわゆる「環境微生物」は網掛けで示した.

各菌株の病原性に関する情報を以下のようにして表示することが考えられている. すなわち, 根頭がんしゅ病菌には tumorigenic という形容詞を学名の前に付けるか,あるいは,学名の後に (Ti strain) あるいは (Ti) を付記する. 毛根病菌では学名の前に rhizogenic, あるいは後に (Ri strain) や (Ri) を付ける. 非病原菌の場合には nonpathogenic を学名に付記する, という表記方法が提唱された (Young *et al.*, 2005) (表1B).

4. 属レベルへの自然分類の導入 (表1C)
Agrobacterium 属は前述のように病原菌がまとめられて設けられた属である. また, 近縁の *Rhizobium* 属は, 「根粒菌をメンバーとして含む種」がまとめられた属であり, その共生窒素固定に関与する多くの遺伝子は伝達性の共生 (Sym) プラスミド上に存在している (澤田, 2003; Kuykendall *et al.*, 2005). 近年になり, これら両属における「属の定義」に対して以下のような疑問が投げかけられるようになってきた.

さまざまな指標を用いた分子系統学的解析にお

いて、*Rhizobium* 属細菌は *Agrobacterium* 属細菌と同じ系統に含まれることが示されている (図 1 に *Rhizobium/Agrobacterium* 系統として示した。以下、RA 系統と略す)。ただし、いずれの解析例においても、RA 系統内でこれら 2 つの属のメンバーは無秩序に混在してしまい、それぞれの属ごとにまとまるというような傾向はまったく観察されていない (図 1) (Sawada *et al.*, 2003; 一幡ら, 2006; Young *et al.*, 2001)。

また、Sym プラスミドが導入された *Agrobacterium* 属細菌が共生窒素固定能を獲得することや、逆に Ti プラスミドが導入された *Rhizobium* 属細菌ががんしゅを誘導することが「実験的に」確認されている (Kuykendall *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2005)。さらに、このようなプラスミドの交換がこれら 2 属の間で「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、分子生態学の進歩とともに続々と報告されるようになってきた (Weller *et al.*, 2004 など多数あり)。

以上のことから、病原性・共生プラスミドの獲得や脱落が、RA 系統のメンバーによって進化の過程で繰り返されてきたために、各プラスミドを有する菌種が系統内で混在するような状況 (図 1) がもたらされたと考えられるようになってきた (Kuykendall *et al.*, 2005)。多様な菌がモザイク状に分布している RA 系統の中から、特定のプラスミドを有している菌が人為的に拾い上げられ、属としてまとめられたのがこれまでの分類体系 (表 1A, B) であるといえる。

プラスミドの種類に依拠した人為分類が不安定なものであることは、前項の種レベルの問題において述べた通りである。しかも、この属レベルの人為分類はこれ以外にも以下に示すようなさまざまな問題を抱えている。1) 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ことが生態学分野を中心として広く行われているが、この手法は「分子系統に基づいて分類体系が構築されている」ことを前提としている。しかし、RA 系統に関してはその条件が全く満たされていないため、この手法が安易に使われると配列データベース中にノイズが拡大再生産されてしまう。2) RA 系統の中には、「病原性や共生窒素固定能の認められない環境微生物」も多数含まれている (図 1 にもその一部を網掛けで示した)。しかし、今の人為分類 (表 1A, B) のもとでは、このような菌はどちらの属にも正式メンバー (新種) として受け入れられてもらえない状況にある。そのため、数多くの環境微生物が、学名が付けられないまま「所属不明菌」と

して放置されている。

このような問題を解消するために、「さまざまな性質に関して共通点の多い RA 系統を 1 つの属としてまとめる」という選択肢が考えられた。系統全体を 1 つの属としてまとめた上で、属の定義から病原性や共生窒素固定能をはずしておけば、この系統に入るどのような環境微生物も、この属の「新種」として正式に記載することが可能となる。この選択肢は、自然分類の観点からも、実用上の利便性の観点からも優れているように考えられることから、その実現のための第一歩として「*Agrobacterium* 属と *Rhizobium* 属を 1 つの属としてまとめる」ことが筆者らによって提案され (Young *et al.*, 2001)、選択肢の 1 つとしてユーザーに提示された (表 1C)。

5. どの分類・命名システムを用いればいいのか?

以上のようにして成立した 3 つの選択肢はいずれも命名規約上は有効であり、どれを用いても間違いにはならないという扱いになっている (Lindstrom, 2002)。とはいうものの、分類のユーザーである我々としては、とりあえずどの選択肢をどのように用いればいいのかであろうか?

表 1A の「人為分類システム」は、1984 年の Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第 1 版 (Kerstens & De Ley, 1984) で採用されていたものであり、現在でもきわめて多くのユーザーが実際に使っている。しかも、既知の分類群に属する典型的な病原菌のみを扱っている限りは不都合な場面に出会うことも少ないと思われることから、これからも多くのユーザーがこの人為分類を使い続けるであろう (Broughton, 2003; Farrand *et al.*, 2003)。

表 1B の「種レベルに自然分類を導入したシステム」については、Bergey's Manual 第 2 版 (Young *et al.*, 2005) や Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 第 3 版 (Moore *et al.*, 2001) で採用されたことから、今後このシステムを用いるユーザーが徐々に増えてくとも考えられる。

表 1C の「属レベルへも自然分類を導入したシステム」に関しては、ATCC をはじめとする菌株保存機関などのデータベースで採用されつつあるので、徐々に認知されていく可能性もある。*Bradyrhizobium* 属や *Mesorhizobium* 属において、「根粒菌をまったく含まない種」が正式メンバー (新種) として記載され始めたことは (Rivas *et al.*, 2004; Ghosh & Roy, 2006)、このシステムにとって追い風となるのかもしれない。

また, biovar 1 はきわめて変異に富んだ複合群であり, 種のレベルに相当するような系統が複数存在しているとの指摘もなされているが (Portier *et al.*, 2006), このような系統が今後種として独立する方向に進むようなことがあると, そういった措置を受け入れやすい B や C のシステムが望ましいと考えられるようになるかもしれない。

いずれにせよ, 今後しばらくの間は, 3つのシステムのいずれもが並行して用いられるという混沌とした状態が続くものと思われる。このような時に重要なことは, どのシステムの学名を用いているのかを明確に示すことであろう。このうち, C のシステムを用いる場合は, 属名によってそれが明示されているので他のシステムと混同される心配はない。一方, A や B のシステムを用いる場合は注意が必要である。特に, 「*A. tumefaciens*」と「*A. rhizogenes*」に関しては, まったく同じ学名が A と B で用いられているが, その指し示す中身が異なっているので, どちらのシステムに依るものなのかをはっきりと示した上で用いることが是非とも必要となる。

6. おわりに

3つの有効なシステムが並立するという混沌とした時代の中で, 混乱が一定の方向に収束し始めるまでにはまだ長い時間がかかりそうである。その間に新たな選択肢がさらに提出される可能性もある。今後はそれらをたたき台としながら, ゲノムデータも取り込みつつ多角的な検証が徹底的に行われていくであろう。また, ユーザーにとってどのシステムが一番便利で使い勝手が良いか, という点も重要なポイントとして考慮されることであろう。

ただし, この利便性に関しては, 立場が異なると考え方も違って来るようである。植物病理学分野のユーザーにとって, 表 1C の「属レベルへも自然分類を導入したシステム」は利点を感じられにくいかもしれない。典型的な病原菌のみを扱っている限りは, 表 1A の「人為分類システム」で間に合う場面が多いと思われるので (Farrand *et al.*, 2003), 分類・命名システムを変更することに伴う混乱を考えると割が合わない, という判断がなされるかもしれない。また, 根粒菌を扱う研究分野 (Broughton, 2003) でも同様にとらえ方をされる可能性がある。

一方, 環境修復を目的として汚染物質分解菌をスクリーニングしたり, 土壌微生物の生態を基礎的な観点から調べたりするような, 未記載の環境微生物を多数

扱わざるを得ない立場からすると, 表 1A や B のシステムはきわめて不便であるといえる。特に, 「病原性や共生窒素固定能が認められない環境微生物」は, 今のままでは新種として記載することさえままならない, という問題はきわめて深刻である。

したがって, RA 系統を研究対象とする研究者の構成が今後どのように変化していくかが, 分類・命名システムの方向性に大きな影響を与える可能性がある。今までは植物病理と共生窒素固定に関係する研究者が中心となって研究が行われてきたが, より広い分野へと研究の裾野が広がって行くようなことがあると (澤田, 2006), 分類に対して求められるものが変わっていくことも考えられる。いずれにしても, 分類のユーザーとなるさまざまな分野の研究者にとって利便性が高く, しかも学問的な厳密さともバランスのとれた形へと, 時間をかけて収束していくことであろう。

文 献

- Allen, O.N. & Holding, A.J. (1974). Genus *Agrobacterium* Conn, In Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eighth edition. p. 264-267, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Broughton, W.J. (2003). Roses by other names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **185**: 2975-2979.
- Farrand, S.K., van Berkum, P.B. & Oger, P. (2003). *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1681-1687.
- Ghosh, W. & Roy, P. (2006). *Mesorhizobium thiogangeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 91-97.
- Holmes, B. & Roberts, P. (1981). The classification, identification and nomenclature of agrobacteria. Incorporating revised descriptions for each of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn 1942, *Agrobacterium rhizogenes* (Riker *et al.*) Conn 1942, and *Agrobacterium rubi* (Hildebrand) Starr and Weiss 1943. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 443-467.
- 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.
- Kerstens, 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* vol. 2 part C, second edition. p. 325-340, Springer, New York.
- Lindstrom, K. (2002). Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 2337.
- Moore, L.W., Bouzar, H. & Burr, T. (2001). *Agrobacterium*, In Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. (eds.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, third edition. p. 17-35, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Ophel, K. & Kerr, A. (1990). *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 236-241.
- Portier, P., Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J. & Nesme, X. (2006). Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7123-7131.
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L., Garcia-Benavides, P., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Gillis, M. & Velazquez, 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 (2006). 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—. *日本微生物資源学会誌* **22**: 117-121.
- 澤田宏之, 土屋健一 (2003). *Agrobacterium* 属細菌の分類. *日本植物病理学会報* **69**: 349-365.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H. & Matsumoto, S. (1993). Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 694-702.
- 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.
- 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.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 89-103.
- Young, J.M., Kerr, A. & Sawada, H. (2005). Genus *Agrobacterium*, In Garrity, G.M. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 2 part C, second edition. p. 340-345, Springer, New York.
- Young, J.M., Pennycook, S.R. & Watson, D.R.W. (2006). Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 491-493.

(担当編集委員：青木孝之)