

畑地土壌から分離した *Agrobacterium* (*Rhizobium*) 属細菌の特性

大脇 良成^{a)}

農研機構 中央農業総合研究センター

[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1]

Isolation of *Agrobacterium* (*Rhizobium*) strains from soil using selective medium

Yoshinari OHWAKI^{a)}

NARO Agricultural Research Center

1. 目的

Agrobacterium 属細菌は、根頭がんしゅ病や毛根病の原因菌として植物病理学分野で古くから研究が進められてきた (澤田, 2006)。また、近年では植物に外来遺伝子を導入するための有用菌としても広く利用されている。一方、土壌や水圏などの環境中からも、*Agrobacterium* 属細菌が広く分離されているが、これらの環境中における生態や農業生産との関連は不明な点が多い。本研究では、土壌から選択培地を用いて分離した *Agrobacterium* 属細菌の特性について報告する。なお、*Agrobacterium* 属細菌の分類体系は統一されておらず、複数の分類・命名システムが混在している状況にある (澤田・土屋, 2003)。*Agrobacterium* 属と *Rhizobium* 属を統合する提案 (C システム; 澤田・土屋, 2003) もあるが、本報告では基本的に、「病原性に基づいた人為分類システム (A システム)」、あるいは「種レベルに自然分類を導入したシステム (B システム)」(澤田・土屋, 2003) に基づいて記載した。なお、引用文献、基準株、あるいは DNA データベースの登録データ (図 1, 2) の学名はそれぞれの原報に従ったので、A, B, C の 3 つのシステムの学名が混在していることに留意頂きたい。農業生物資源ジーンバンクにおける *Agrobacterium* 属細菌の学名の整理については、澤田ら (2014) により紹介されているので参照いただきたい。

2. 材料および方法

1) 細菌の分離

中央農業研究センター内のダイズ栽培跡地および小麦栽培跡地の作土層より、土壌を採取した。

a) (現所属) 農研機構 中央農業研究センター Central Region Agricultural Research Center, NARO
[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 2-1-18]

土壌は、2地点ともに淡色クロボク土であった。採取した土壌は、2mm のふるいを通した後、直ちに10倍量の滅菌蒸留水に懸濁し、室温で10分間振とうした。土壌抽出液は、滅菌蒸留水で希釈した後、*Agrobacterium* biovar 1 の選択培地である1A培地 (K_2TeO_3 を80ppm添加)に塗布し、28°Cで培養した (Mougel *et al.*, 2001)。プレートに出現したコロニーのうち、Mougel *et al.* (2001)により報告された *Agrobacterium* biovar 1 のコロニー形態 (黒色、円形、半レンズ状、全縁) と類似のものを釣菌し数回純化した。

2) 分子系統解析

分子系統解析には、分離した菌株のうち MAFF 107659 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107660 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107661 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107662 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107671 (小麦跡地土壌)、MAFF 107672 (小麦跡地土壌)、MAFF 107673 (小麦跡地土壌) および MAFF 107675 (小麦跡地土壌) を供試した。菌体から DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出し、プライマー 20F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCA-3') と 1540R (5'-AAGGAGGTGATCCAGC-3') を用いて PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅し (Ishikawa *et al.*, 2003)、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に近隣結合法により系統樹を作成した。また、MAFF 107659、MAFF 107660、MAFF 107661、MAFF 107672、MAFF 107673 については、プライマー SM (5'-AAGTCGTAACAAGGTAGCC-3') と BR3 (5'-GCTTTTCACCTTCCCTCAC-3') を用いて ITS 領域を増幅し (Willems *et al.*, 2001)、同様に塩基配列を決定し系統樹を作成した。

3. 結果

16S rRNA 遺伝子の塩基配列を基にした分子系統解析の結果、土壌から K_2TeO_3 を80ppm添加した1A培地を用いて分離した菌株は、 α -プロテオバクテリアのうち、*Rhizobium/Agrobacterium* 属細菌とクラスターを形成した。特に *Agrobacterium radiobacter* ATCC 19358 や *Agrobacterium tumefaciens* NCPPB 2437 と近縁関係にあった (図1)。供試した菌株のうち、MAFF 107659、MAFF 107661、MAFF 107671、MAFF 107672、MAFF 107673 および MAFF 107675 株は高いブートストラップ値で支持される同一のクラスターを形成したが、MAFF 107660 と MAFF 107662 株はこれらの菌株とは異なる系統関係にあった。ITS 領域の塩基配列による系統解析結果も、これらの分離菌株が *Rhizobium/Agrobacterium* 属細菌と近縁であることを示した (図2)。16S rRNA 遺伝子の塩基配列による分子系統解析で同一のクラスターを形成した菌株は、ITS 領域の塩基配列による系統樹においても近縁関係を示した。一方、MAFF 107660 株は、ITS 領域の塩基配列を基にした系統樹においても、他の分離菌株とは異なる系統関係を示した。

これらの菌株について、*Agrobacterium* 属の病原性プラスミド (Ti および Ri プラスミド) 保有の有無を、プライマー VCF3 と VCR3 を用いた PCR 法により検討した (澤田・土屋, 2003)。その結果、供試したどの菌株からも、病原性遺伝子に相当する DNA 断片は増幅されなかった (データ省略)。

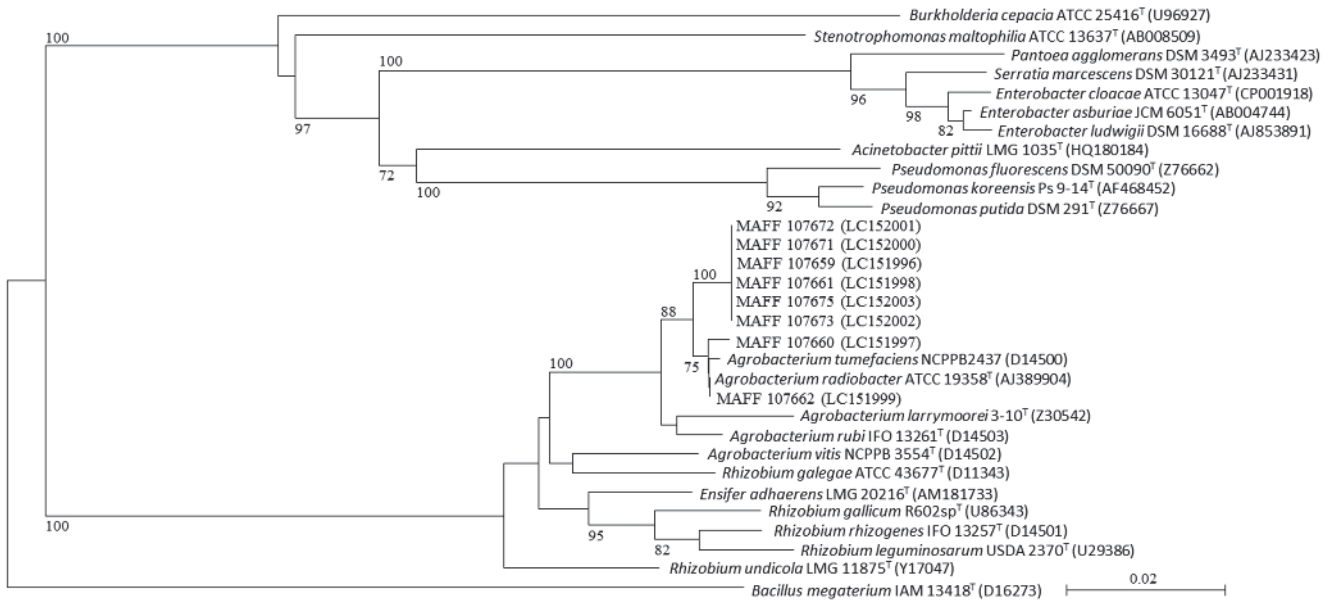


図 1. 16S rDNA 遺伝子の塩基配列を基にした分離菌株の系統樹

系統解析に供試した菌株は、プロテオバクテリアより選定し、アウトグループは *Bacillus megaterium* IAM 13418^Tとした。ブートストラップ値は70%以上を表示した。括弧内に DNA データベースの登録番号を示した。

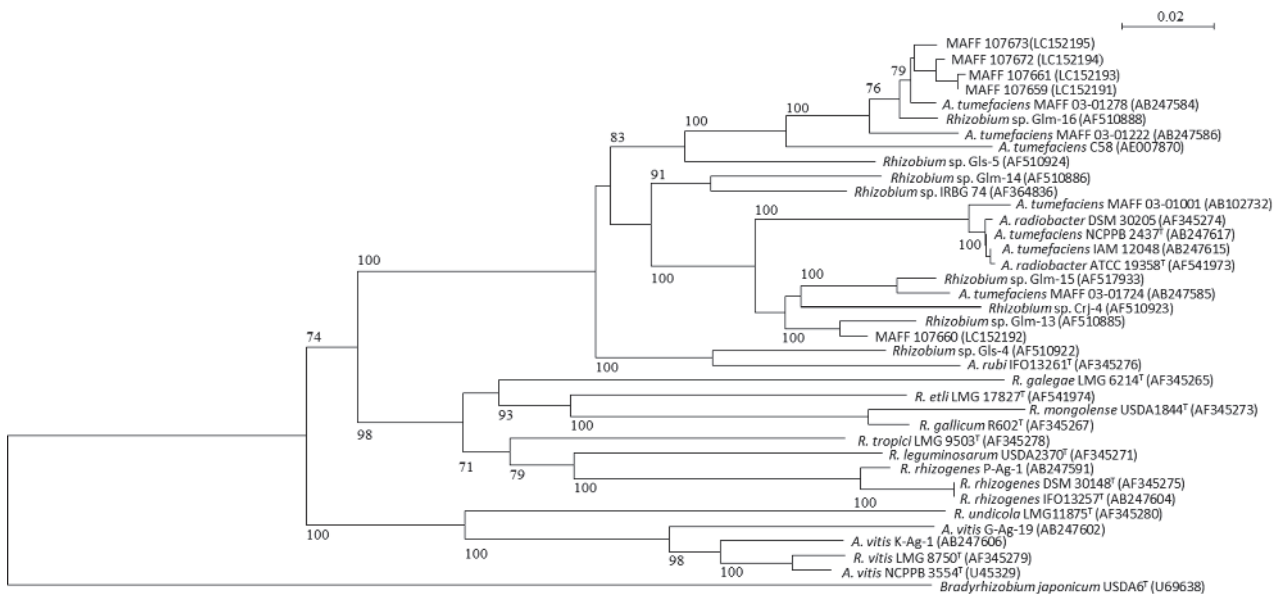


図 2. ITS 領域の塩基配列を基にした分離菌株の系統樹

系統解析に供試した菌株は、*Rhizobium/Agrobacterium* 属細菌より選定し、アウトグループは *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^Tとした。ブートストラップ値は70%以上を表示した。カッコ内に DNA データベースの登録番号を示した。

4. 考察

Agrobacterium biovar 1 の選択培地である 1A に K_2TeO_3 を 80ppm 添加した平板培地を用いて、土壌から *Agrobacterium* を分離することが可能であった。土壌抽出液を接種した平板培地上には、数種類の異なる形態のコロニーが出現したが、Mougel *et al.* (2001) により記載された *Agrobacterium* biovar 1 のコロニー形態 (黒色, 円形, 半レンズ状, 全縁) により分離した菌株は、16S rRNA の塩基配列の相同性より *Agrobacterium* 属であると判断された (図 1)。また、*Agrobacterium* の近縁関係を推定するのに有効であると報告されている ITS 領域の塩基配列 (Bautista-Zapanta *et al.*, 2009) からも、これらの菌株は、*Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium radiobacter*) と近縁であると考えられた (図 2)。これらのことから、本培地が低密度で存在する環境サンプル中からの *Agrobacterium* の分離に有効であることが確認された。

今回分離された *Agrobacterium* からは、PCR 法により病原性プラスミドが検出されなかったことから、非病原性の株と推定された。小麦栽培跡地とダイズ栽培跡地のいずれからも非病原性 *Agrobacterium* が分離されたことから、これらの菌は栽培土壌中に広く分布する可能性が示唆された。これまで、*Agrobacterium* の研究は主に植物病原性の面から行われてきたが、土壌中の *Agrobacterium* の多くは非病原性の株であると報告されている (Mougel *et al.*, 2001)。今後、植物病原性の研究に加えて、環境中での *Agrobacterium* の生態や有用機能の開発に関する研究が進展することが期待される。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、中央農業研究センターの佐々木由美子さんにご協力いただいた。ここに記して感謝の意を表す。

6. 参考文献

- Bautista-Zapanta, J., Arafat, H. H., Tanaka, K., Sawada, H. and Suzuki, K. (2009). Variation of 16S-23S internally transcribed spacer sequence and intervening sequence in rDNA among the three major *Agrobacterium* species. *Microbiol. Res.* 164: 604–612.
- Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y. and Yamasato, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 711-720.
- Mougel, C., Cournoyer, B. and Nesme, X. (2001). Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 65–74.
- 澤田宏之・土屋健一 (2003). *Agrobacterium* 属の分類. 日本植物病理学会報 69: 349–365.
- 澤田宏之 (2006). いわゆる「アグロバクテリウム」について— (1) プロフィール紹介—. 日本微生物資源学会誌 22: 117–121.

澤田宏之・山崎福容・竹谷 勝・青木孝之 (2014). 植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の分類の変遷とジーンバンクにおける対応. 日本微生物資源学会誌 30: 13–27.

Willems, A., Coopman, R. and Gillis, M. (2001). Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 623–632.