植物の根頭がん腫病菌 *Agrobacterium tumefaciens* Conn の研究

第1報 電子顕微鏡による形態的観察

西 沢 良 一*

Ryoichi NISHIZAWA: Studies on Crown Gall Bacteria, *Agrobacterium tumefaciens* Conn.
I. Morphological Observation with Electron-microscope.

Received August 2, 1967

Abstract

In three strains of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn, a bacterium inducing crown gall, electron-microscopic observations were made on the morphological structures, e. g., shape and arrangement of cells, the characteristics of cytoplasm, slime layer, cell wall and flagellum. The bacteria are rods in shape, varying within the range of about $0.9-2.5\mu$ in the long axis. The cells show a network arrangement when a thick suspension is smeared on a slide glass, whereas a staphylotype arrangement may be observed in case of a thin bacterial suspension. As a rule, the arrangement is conformed to be directional rather than random. The cytoplasm of younger cells is dense and homogeneous. With advancing age, it gradually loses its homogeneity to form mass of granules of higher electron density. Afterwards, the cells become electron translucent, and granules disappear to form a clear area. The cells turn into ghost cells. Slime layer is seen as a halo around the cells and consists of fine granules of about $40\text{ m}\mu$ in diameter. As a rule, bacterial cells, single or agglomerated, are surrounded by the slime layer.

The basic structure of the cell wall appears to be a network or a frame of cross strings. Such a structure can be seen in ghost cells. A single bacterial cell bears 1-6 peritrichous flagella (2-3 in most cases), whose length is 3.8μ on an average, corresponding to about 3 times the average length of the long axis of the cell. Primary flagellum is a single fiber, some of which are put together to form flat ribbon or twig-like structure.

根頭がん腫病 (crown gall) は *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn によって発生する (Smith and Townsend, 1907)¹⁾。罹病植物の細胞組織的観察や転移現象等が動物がんの場合と高い類似性を示すことから, Smith らはこれが一種の植物がんであることを指摘した。しかし, 当時は植物瘤は, すべて肉芽腫 (granuloma) の類とみなされていたため, 彼らの主張は一般には認めら

れなかった。その後, Braun (1943, 1947)^{2,3)} は, 本菌がひとたび寄主に gall を発生させると, 以後は菌の存否に拘らず細胞は自発的かつ無制限に増殖することを確認した。また Braun and White (1943)⁴⁾ は転移して生じた第二次の crown gall 内には菌が存在しない事実を実証し, 植物がんであることを確認している。

従来の研究の主眼は, crown gall の発がん因子の究明^{5,6,7,8,9)} とその発生機構^{10,11)} にあった。一方 Levine (1931)¹²⁾, Morre (1931)¹³⁾ および de Ropp (1947)¹⁴⁾ らによって, crown gall とがんとの異同性

* 大阪府立生野高等学校 Osaka Ikuno High School 5-152, Minami-Ikuno, Ikuno-ku, Osaka, Japan.

も追求された。最近木場 (1966)¹⁵⁾ は、細胞学的見地から、本菌による gall が動物がんの判定基準に合致することを報告した。本菌は細菌学者や植物病理学者によって、近來とみに注目されるようになってきた。

しかし、*Agrobacterium tumefaciens* の形態に関する顕微鏡的研究は少なく、Gainor and Price (1953)¹⁶⁾ および Levine (1936)¹⁷⁾ らの研究がその主なるものである。Gainor らは毒性の強い系統を用い三種の変異菌集落を観察したが毒性にvarietyないことをみ、Levine は培養中の菌の形態的变化を日を追って追跡し、菌形の変異は培養成分の減少に伴う一時的のもので、桿形が種本来の形態であると報告している。何れにしても菌の個々の形態については詳細に触れていない。

著者はまず、*Agrobacterium tumefaciens* の形態的特徴を明らかにするために、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて観察を行なった。

材料および方法

供試菌として下記の3菌株を用いた。

(1) *Agrobacterium tumefaciens*, S₁-strain; 静岡大学の岡部徳夫教授によりバラの crown gall より分離された (1962). 菌株記号 S₁ (Shizuoka) strain 1.

(2) *Agrobacterium tumefaciens*, A. t₂-strain; 農林省農業技術研究所の富永時任博士により、サクラの crown gall より分離された (1956). 農林省系統番号 A. t₂ 号.

(3) *Agrobacterium tumefaciens*, I-strain; 著者が大阪府立生野高等学校で *Sedum alboroseum* の crown gall より分離した (1958). 菌株記号 I (Ikuno)-strain.

以上3菌株のうち、べん毛ならびに粘液層の観察には主として I-strain を用い、他の2株は時にのみ併用した。なお、この3株は著者の考案した下記培地で継代保存している。

培地の組成および菌の培養条件。

普通寒天培地にトリプトファンとピオチンを微量加え、30° で、48時間培養した。培地の組成を下に示す。

肉エキス 10 g

ペプトン	10 g
食塩	5 g
トリプトファン	0.1 g
ピオチン	0.05 mg
寒天	20 g
蒸留水	1000 ml

注 (i) トリプトファンの添加はヘテロオーキシンの生成を促すため。

(ii) S₁-strain には普通のパレイシヨ培地が適当。

鏡検試料の調整。

Agrobacterium tumefaciens (I-strain) を上記の培養条件で培養し、生じた菌集落を蒸留水に懸濁して原液とした。原液を支持膜上にのせる方法は吉井¹⁸⁾らの方法と著者考案の方法とによった。著者の方法は菌を培養した寒天斜面の底部凝結水や夾雑物を除去するために試験管の管壁に沿って蒸留水を静かに注入し、斜面底部に溜った液を毛細管ピペットで除く。このようにして数回洗滌したのち、改めて少量の蒸留水を同様の方法で注入し、試験管を傾けて蒸留水を静かに菌集落に接触させて、やや濃い懸濁液を作る。一方あらかじめ小さな管瓶に少量の蒸留水を入れておき、この液中に毛細管ピペットを用いて懸濁液を静かに移注して、適当に希薄な濃度にする。支持膜上にのせるには、小管瓶を傾けピンセットで挟んだメッシュを液面に接触させたのち、静かに引上げて離すか、あるいは毛細管ピペットを用いて支持膜上に静かに滴下する。

シャドウ法には、クロミウムと白金とを併用した。電子顕微鏡は、JEM-4型(加速電圧50 kv)とJEM-7型(加速電圧80 kv)とを用いた。

べん毛の数および長さの測定。

菌体の長径および太さの計測は最終的引伸し写真について行った。べん毛数の算定は、起始部が明瞭でなくとも、細胞質から発生していることが確認されたもののみにについて行った。測定は細胞壁のすぐ外側部位においてそれぞれ明らかに独立しているもののみにについて行い、切断遊離したもの、絡みあっているものはすべて除外した。

べん毛は直線状、波状などいろいろの状態を示しているが、長さの測定には細い銅線をべん毛写真像上にかさね、その長さを拡大率に対比して算出した。

太さの測定はシャドウの方向と平行の部分のみについて行なった。

菌体の長径は菌体の両端に認められる細胞壁の縁から縦断径を測定し、短径はほぼ菌体中央で最も広い部位における横断径を測定した。

結果と考察

種々な細胞概観像

本菌のスライドガラス上の配列は網状で (Fig. 1) 個々の細胞は相互に密着し、ある程度一定の方向性をもって整然とならんでいる (Fig. 2)。懸濁液が希薄な場合は網が切れて、いわゆるブドウ状の配列を示す (Fig. 3, 4)。スライドガラス上の網状配列は乾燥時の人工像とも考えられ易いが、次の諸点から菌本来の性質と思われる。すなわち、

(1) Van Tieghem's cell を用いて、懸滴培養法で観察すれば培養液中でも立体的な網目状を形成している。たゞしこの場合は試料をチールの石炭酸フクシンで染色する。

(2) 普通の細菌、*Rhizobium radicola*, *Xanthomonas oryzae* 等では、同じ方法を用いても網目状の配列は観察されない。

(3) 細菌集団のスライドガラス上の形態は、スライドガラスの清浄度と塗抹方法とによって種々影響されるが、*Agrobacterium tumefaciens* の場合は、例えばクローム硫酸で処理した清浄なスライドガラス上への塗抹、滴下または噴霧その他懸濁液ヘコルネットピンセットで挟んだカバーガラスを平面的に接触後、離して表面張力を利用してのせる方法等いろいろ行なったが何れも結果は同じであった。

(4) *Escherichia coli* も濃い懸濁液では網状となり易いが、濃度が希薄になるに従い散在する。たゞし、*Escherichia coli* は菌株の系統によって多少の差異が認められた。*(E. coli* p-ox strain は網状を作り易く、*E. coli* 099 H 504 C strain はやゝ作り *E. coli* 0113 6182-50 strain は散在しがちである。)

(5) *Staphylococcus* は濃い懸濁液の場合は、網状を呈し、希薄な場合はブドウ状 (staphylo type) となる。*Agrobacterium tumefaciens* も同様である。したがって、*Agrobacterium tumefaciens* は *Staphylococcus* と相通ずる点がある。普通の桿菌では、*Streptobacterium* のように連鎖状の配列は

認められているが、ブドウ状の集団はほとんどみられない。そのために *Staphylobacterium* のような名称は用いられていない。しかし本菌にはこの種の性質がある。

桿菌で、濃い懸濁液の場合、網状配列を示しやすいものとしては、*Bacillus mycoides*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* などが知られているが、その種類は多くない。なお本菌が網状配列を呈するとき、各細胞はほぼ一定の方向性を示し、ある程度整然とした配列を示しているが、これがどのような要因によるか興味ある問題である。

個々の菌体についてみると、本菌は本来桿菌とされているが常に長短著しい変異があり、中には極めて大きな長桿形からほぼ球形に近いものまでみられ、かなりの変異性が認められ、多形性を示している。変異の範囲は菌体長径は約 $0.9-2.5\mu$ 、短径は $0.4-1.0\mu$ であった。

細胞は両端鈍円状のものが多く、若い細胞は細胞質の密度が高く、外観膨らんで弾力感があるようにみえる (Figs. 5, 6)。古い細胞では細胞質内に塊りを生じ果粒状かつ不均質となって、しわの認められるもの (Fig. 7)、全く ghost 化して、細胞壁のみをとどめるもの、既に自己崩壊をおこしているもの (Fig. 8)、なども観察されるが、それぞれ像の十分な解釈はまだできない。

粘液層

粘液層は菌体の周辺に暈像として観察されるが、要約すると下記の通りである。

(1) 菌体周辺には極めて小さな粒子よりなる暈像が認められる (Fig. 9, 10)。

(2) 暈像の部分には粒子がほぼ均一に分布するが、時には粒子が連ったり、離れたりして不均一となり、空白間隙が認められるものもある。

(3) 粒子の大きさは電顕像から測定して約 $40\text{ m}\mu$ 程度である。

(4) これらの粒子は菌体外のべん毛あるいは支持膜上にはみられない。

(5) 個体によっては、暈像が認められないで菌体周辺からゲル状の樹枝状物が放射状にでていることもある (Fig. 11)。

(6) 暈像も樹枝状物も認められない個体もあるが、詳細に観察すると、このような菌体の周壁には微細

な糸状物ないし鋸歯状物がみられる (Fig. 12).

(7) 多数集った菌体の周辺では、暈像の密度も大きくなり全体が重なり集ると繊維状物が絡みあった状態となって、こまかな網状構造を示すこともある (Fig. 13).

Tomcsik¹⁹⁾ は *Bacillus megatherium* について、その周縁部に微細な線状構造を認め、各菌体ごとに棒状に区切られていることを報告しているが、Glauert²⁰⁾ は *Corynebacterium faciens* について、菌体周縁部に網状構造を認めている。 *Agrobacterium tumefaciens* では、菌の集合体の周囲に繊維状物質が絡みあった網状構造が観察されるが、個々の菌体では Tomcsik のような構造は認められなかった。

鈴木²¹⁾ は *Clostridium thiaminolyticum* の、また下井²²⁾ は水生 *Spirillum* の粘液層について、菌体の暈像は直径 5-40 μ m の微粒子からなり、時には巾 5 μ m 内外の糸状物をも含むと報告している。 *Agrobacterium tumefaciens* の周縁部にも糸状物を含む暈像が認められるが、これがみられない菌体では、その周辺にいずれもゲル状の樹枝状物や糸状または鋸歯状その他いろいろな像がみられた。

要するに、種々の像が観察されるが、これは粘液層自体が多く構成要素を含んでおり、その上人為的産物も加わった結果と思われる。

粘液層と暈像とについての多数の報告から判断すると、 *Agrobacterium tumefaciens* で観察された暈像は粘液層に相当するものと思われる。

本菌が 2 個以上集合した場合には、その周辺に粘液層が配置され、また時には粘液層が樹枝状に伸びている現象などは、Tomcsik が *Bacillus megatherium* の莢膜について観察した結果と著しく異っている。これらの差異が莢膜と粘液層との相違であるかも知れない。

細胞壁.

若い細胞の細胞壁は概して平滑である。生長期を過ぎ粘液層も細胞質も完全に消失した ghost 細胞の外表面は、斜線状の細繊維状物が随所に区切られて、網状あるいは格子縞のような構造にみえる (Fig. 14). 細胞壁にみられるこのような繊維状構造は、 *Spirillum* (Pease²³⁾), *Bacillus aneurinolyticus* (渡辺²⁴⁾) *Clostridium thiaminolyticus* (鈴木²⁵⁾)

などにおいても報告されている。鈴木はこの繊維状物は高分子の micellar strings で細胞壁の強さを増すのに役立つものと推定した。なお、その出現が不定であることは、細胞壁の構造が単一ではなく、さらに繊維状物を覆う粘液層があるためとみている。このような繊維構造のうち特に格子縞構造を呈するのは、グラム陰性の Pseudomonadales に属する桿菌と *Bacillus* に属するグラム陽性桿菌に限られていることを武谷²⁶⁾らが報告している。

べん毛

べん毛は細胞壁からではなく、細胞質からでている (Fig. 15). そして細胞質からの発生部において、細繊維が 1 本のもの (Figs. 16, 17), 数本のもの (Fig. 18), あるいは数本が接着してリボン状のもの (Fig. 19), または何本かが束状に含着して根幹状を呈するもの (Fig. 20) 等が観察される。

リボン状のものなどは光学顕微鏡では 1 本とみられたものである。なおこのリボン状或は根幹状のものなどでは、その末端がいくつかに分かれて、全体としては扇状を呈している場合も認められる (Fig. 19).

リボン状を構成している細繊維の数は多いものでは 11 本、各細繊維の巾は約 20 μ m, リボンの巾は約 230 μ m である。リボン状或は根幹状を呈しているべん毛は粘潤な物質によって互に密着しているようにみえるが、このような状態のべん毛が正常な状態であるのか、人工産物であるのかは、この観察結果からだけでは明かでない。べん毛の発生状態をみると、1 本だけが極からでている極毛性 (Fig. 16), 数本が周辺からでている周毛性 (Fig. 18) が多いが、その他に菌体側面から発生しているいわゆる側毛性のものもかなり認められる (Fig. 17). 側毛性は Bergey²⁷⁾ も記載している。べん毛の数、長さ (最長), 太さ, 発生状態, 菌体長径とべん毛の長さとの比などの所見を総括的にまとめると次表のようになる。

本菌のべん毛数、長さについては、個体によってかなりの変異が認められた。べん毛の発生状態は上述のように Bergey の記載の周毛性が普通であるが、1 本の極毛や側毛、多数の周毛まで種々観察された。しかし周毛性のべん毛は、標本作製の途中で脱落しやすいので正確なべん毛数を把握することは

Measurement of Flagella

Findings Photo No.	Number of flagella	Maximum length of flagellum μ	Mean length μ	Thickness of flagella $\text{\AA}$	Behavior of flagellation	Long axis of Bacterial cell μ	Maximum length of flagellum/long axis of bacterial cells
1	1	2.80	2.80	130	lateral	1.27	2.20
2	1	5.00	5.00	220	polar	1.47	3.50
3	6	4.44	3.03	140	peritrichous	1.67	2.66
4	3	4.47	2.59	150	"	1.19	3.76
5	5	4.00	3.32	180	"	1.00	4.00
6	2	3.63	3.20	120	lateral	0.93	3.90
7	2	1.44	1.06	160	"	1.44	1.00
8	2	5.00	3.67	160	"	1.27	3.94
9	2	1.73	1.32	150	"	1.39	1.24
10	1	5.11	5.11	160	"	1.67	3.06
11	3	6.33	5.43	150	peritrichous	1.70	3.72
12	1	5.19	5.19	190	lateral	2.47	2.10
13	1	2.66	2.66	120	polar	1.50	1.77
14	2	4.33	4.11	140	lateral	1.33	3.26
15	2	3.98	3.80	160	"	1.30	3.06
16	1	5.67	5.67	160	polar	1.44	3.94
17	2	5.44	4.76	140	lateral	1.60	3.40
18	2	6.87	6.16	200	"	2.04	3.37
19	1	4.05	4.05	190	polar	1.56	2.60
20	1	2.66	2.66	170	lateral	1.50	1.77
Mean	2	—	3.78	159		1.48	2.92

Notice

1 Culture medium: An ordinary broth added with a small amount of biotin and tryptophane.
2 Time of culture: 48hr.
3 Optimal growth: Logarithmic phase.
4 In a few cases, number of flagella were counted as many as 10.

容易でない。なお、本数については、リボン状、束状などの場合にそれを構成する各組織維をそれぞれ1本のべん毛とみなせば、本菌のべん毛数は、Bergey の記載よりもかなり多いことになる。

一般に細菌のべん毛の太さは、種類によってかなりの差異が認められるが、本菌では、120-220 Å で平均約 160 Å である。この測定値は Labaw and Moseley によって報告された *Bacterium* の場合とほぼ一致する。べん毛の太さの厳密な測定は、その断面像から直径を測定するのが理想的であるが、本観察ではシャドウ法によって行なった。したがってこの場合特に支持膜上のべん毛の位置と蒸着方向との関係を充分考慮の上測定した。

摘 要

(1) *Agrobacterium tumefaciens* の形態は桿状で大きさ平均 1.5 μ 内外である。菌自体は多形性であり変異の範囲は菌体長径については約 0.9-2.5 μ である。

(2) 菌の配列は網状を呈している。濃度が希薄な場合は網が切れてブドウ状となる。網状配列の個々の菌体は一定の方向性をもってならんでいる。

(3) 若い細胞の原形質は均質、かつ高密度で電子線が透過しがたい。生長期をすぎると不均質となり透過性もましてくる。ghost 細胞では細胞質は半透明となり、細胞壁のみをとどめているにすぎない。

(4) 粘液層は 40 $m\mu$ 内外の微粒子からなり、菌体の周辺に暈状に存在している。2 個体以上が集ると、菌体を中心に、その周辺に粘液層が配置される。

(5) 細胞壁は格子縞構造を示している。極度の ghost 細胞でなければ、明らかなこのような構造は観察しがたい。

(6) べん毛は周毛性、平均 2-3 本で、その長さは菌体長径の約 3 倍である。発生状態は、極毛性、側毛性および周毛性等である。

(7) べん毛がリボン状または根幹状を呈しているものは、その末端が分れて扇状をしている。

本研究に関しては、東京教育大学の林孝三教授および遠山益博士、山口大学の吉井善作助教授、京都大学の浜田稔助教授、大阪歯科大学の梅本芳夫教授および山岡昭助教授の懇篤な御教示を仰いだ。

菌株を分譲された静岡大学の岡部徳夫教授、農林

省農業技術研究所の富永時任博士、電顕撮影に御協力頂いた山高里盛氏、佐川寛典氏、福富雅夫氏、徂徠昭子氏、そのほか同僚関栄義氏、吉田恭子氏の方々に深く感謝の意を表する。なお大阪府教育委員会(昭和 37 年度)ならびに文部省(昭和 39 年度)より科学研究奨励金の交付を受けた。ここに記して謝意を表す。

文 献

- 1) Smith, E. F., and Townsend, C. O., Science 25: 671 (1907).
- 2) Braun, A. C., Amer. J. Bot. 30: 674 (1943).
- 3) ———, ibid. 34: 234 (1947).
- 4) ———, and White, P. R., Phytopathol. 33: 85 (1943).
- 5) Klein, R. M., Amer. J. Bot. 40: 597 (1953).
- 6) Brown, N. A., and Gardner, F. E., Phytopathol. 26: 708 (1936).
- 7) ———, and ———, ibid. 27: 1110 (1937).
- 8) Lipitz, J., Science 149: 865 (1965).
- 9) Lippincott, J. A., and Lippincott, B. B., ibid. 147: 1578 (1965).
- 10) Riker, A. J., J. Agr. Res. 25: 119 (1923).
- 11) Patty, F. A., Phytopathol. 20: 85 (1930).
- 12) Levine, M., Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 21: 506 (1924).
- 13) Morre, J., Bull. Inst. Pasteur 29: 726 (1931).
- 14) de Ropp, R. S., Nature 160: 780 (1947).
- 15) 木場三郎, 日本植物病理学会報 32: 302 (1966).
- 16) Gainor, C., and Price, W. C., Phytopathol. 43: 509 (1953).
- 17) Levine, M., Amer. J. Bot. 23: 191 (1936).
- 18) 吉井善作他, 山口医学 8: 557 (1956).
- 19) Tomcsik, J., Experimentia 7: 459 (1951).
- 20) Glauert, A. M., Brit. Med. Bull. 18: 245 (1962).
- 21) 鈴木照男, 山口医学 8: 1173 (1959).
- 22) 下井一之, 山口医学 8: 1165 (1959).
- 23) Pease, P., Experiment. Cell Res. 10: 234 (1956).
- 24) 渡辺毅敏, 日本細菌学雑誌 13: 983 (1958).
- 25) 鈴木照男, 日本細菌学雑誌 14: 957 (1959).
- 26) 武谷健二, 久恒和仁, 蛋白質核酸酵素 11: 863 (1966).
- 27) Robert, S. B., et al., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 288 (The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1957).

Explanation of figures

- Fig. 1. Light-micrograph showing a network arrangement of cells of *Agrobacterium tumefaciens* in a concentrated suspension. ($\times 1500$)
- Fig. 2. Electron-micrograph showing a network arrangement of *Agrobacterium* cells. The arrangement seems to be directional rather than random.
- Fig. 3. Light-micrograph showing a staphylo-like arrangement in a dilute cell suspension. ($\times 400$)
- Fig. 4. Electron-micrograph showing a staphylo-like arrangement of *Agrobacterium* cell.
- Figs. 5 & 6. Electron-micrograph showing polymorphism in the size of cells and homogeneous cytoplasm of higher density in younger cells.
- Fig. 7. Electron-microscopic view showing an agglomeration of granular bodies in both polar regions.
- Fig. 8. Electron-micrograph of a bacterial cell beginning autolysis.
- Fig. 9. Electron-micrograph of slime layer surrounding a bacterial cell.
- Fig. 10. Electron-micrograph showing the slime layer surrounding the twinned bacterial cells.
- Fig. 11. Electron-microscopic view showing the component part of the slime layer protruding from the bacterial body.
- Fig. 12. Electron-micrograph showing the component part of the slime layer in filamentous or serrated structure.
- Fig. 13. Electron-micrograph showing the flagella and slime layer in agglomerated cells.
a. . . . flagella
b. . . . slime layer
c. . . . agglomerated cells
- Fig. 14. Electron-micrograph of the cell wall showing the network or cross-stripe structure.
- Fig. 15. Electron-micrograph showing the development of twig-like flagella from inner cytoplasmic body.
- Figs. 16, 17 & 18. Electron-microscopic views on flagellation: monotrichous type (16), lateral type (17) and peritrichous type (18).
- Figs. 19 & 20. Variety of morphological features of flagella revealed by electron microscope: Root or twig-like, ribbon-shaped, and fanned out at an end.