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

根頭がん腫から分離した数種の 病原性菌株の比較

西 沢 良 一**

Ryoichi NISHIZAWA: Studies on Crown Gall Bacteria,
Agrobacterium tumefaciens Conn III.
Comparative Studies on Several Strains of Causative
Bacteria Isolated from the Crown Galls.

Received February 1, 1969

Abstract

This paper deals with six strains of *Agrobacterium tumefaciens*, viz., two laboratory stock strains (S_1 , At_2) and four strains (I, M, S_2 and S_3) which were isolated recently by the present author from crown galls on *Sedum* and *Rosa*. On these six strains, studies were made on their biochemical, tumor inducing and serological characteristics. Four strains (S_1 , At_2 , I and M) were not fermentative on simple sugars, while the remaining two (S_2 , S_3) were markedly fermentative. When inoculated on *Sedum alboroseum*, three (S_1 , At_2 , I) of the non-fermentative strains showed an excellent ability of gall formation. These three strains were found to share most of their antigens in immune diffusion agar, so that they were considered to be antigenically homogeneous. The fermentative strains (S_2 , S_3) and one (M) of the non-fermentative ones showed only a limited degree of gall formation and serological behaviors distinguishable from the former, tumor-inducing group. According to Bergey, the key to the classification of plant pathogens belonging to the genus *Agrobacterium* lies in nitrate reduction and indole reaction. In all of the six strains, the reaction for nitrate reduction was positive, but the indole reaction was shown to be negative altogether. In this respect, all the strains isolated must be assigned, according to Bergey, to the species *gypsophilae* rather than *tumefaciens* in the genus *Agrobacterium*. However, some contradiction has been encountered between the Bergey's criterion of *gypsophilae* and the observation of the present pathogens in question. For the present, it seems that there is much to be improved in the classification of individual species in *Agrobacterium*. As one of the reliable characteristics, the immunochemical properties may be supplemented for this purpose because of a closer connection with the infectivity of these pathogenic microbes. The experiments were made with caution along this line, and the availability of the results was discussed.

* 本研究の経費の一部は文部省科学研究費によった。

** 大阪府立生野高等学校 Osaka Ikuno High School, 552 Shindo, Matsubara, Osaka, Japan.

植物の根頭がん腫は気候風土の異なる各国に広く発生する多犯性病害である。この病害を誘発する *Agrobacterium tumefaciens* に関する研究は、近來特にヒトの“がん”との関連において、学界に関心がたかまってきた。本菌には、いくつかの生態種（生理学的品種）があることは、すでに Wormald¹⁾ の報告や Bergey²⁾ の成書にもみられる。根頭がん腫は、このような生態種の識別には、各菌株の形態学的かつ生化学的特性のほか、発がん性 (tumorigenesis), 血清学的特性 (Serotype) 等も重要視される。発がん性についての血清学的方法による研究は、僅かに Szabadi³⁾ の報告がみられるにすぎないが、血清学的特性については、まだ報告がない。

著者は、最近分離した4株と、研究室に保存の2株とについて、それぞれの発がん能力、生化学的ならびに血清学的特性を比較研究するとともに、さらに抗原分析法による生態種の判別の可能性についても検討した。

実験材料 および 方法

供試菌株は、下記6株である。

- (1) *Agrobacterium tumefaciens*, S₁ strain
- (2) „ „ At₂ strain
- (3) „ „ I strain

以上3株の由来は、第1報⁴⁾に記載した通りである。

(4) *Agrobacterium tumefaciens*, M strain

本菌株は、滋賀県立農業試験場日岡登治氏が採集されたバラの根頭がん腫から著者が1964年に分離したものである。

(5) *Agrobacterium tumefaciens*, S₂ strain

(6) „ „ S₃ strain

これら両株は、静岡県立農業試験場森田儔氏採集のバラの根頭がん腫から著者が1966年に分離したものである。なお、以上の6株は著者により継代保存されている。

菌の分離：新鮮な第1次発生の gall (Fig. 1) と第2次発生の gall (Fig. 2) の2つを選び、滝本⁵⁾、明日山⁶⁾ および Wormald⁷⁾ らの方法に準じて菌を分離した。その際、とくに材料の滅菌と洗滌に注意し、分離用組織切片は、gall の中心から上皮層にかけて矩形型に採取した。

発がん試験：分離菌が gall を形成するか否かを確かめるために、次の方法で *Sedum alboroseum* (ベンケイソウ) に対する発がん試験を試みた。すなわち、培地上の菌集落を滅菌した柄付針の先端にやゝ多量付着させて、供試植物の茎葉に突き刺すいわゆる needle prick (針刺) 法を用いた。なお、対照は滅菌針で刺すだけとした。

Fig. 1. Primary crown gall.
Host plant: *Rosa hybrida* Hort.
(Cultivar: Christian Dior)
Collected by H. Morita at Osuga
(Ogasa-gun, Shizuoka Pref.) on
June 12, 1966.

Fig. 2. Secondary crown gall.
Host plant *Prunus salicina* Lindl.
(Cultivar: Santa Rosa)
Collected by the author at Sugi (Hirakata,
Osaka) on April 5, 1964.

分離菌の培養：生物学的性状を検討するため、まず、分離菌を下記の各培地で培養した。試験方法〔下記①～⑩〕は、常松⁹⁾、戸田⁹⁾および青山¹⁰⁾らの記載によった。すなわち、① Barsiekow's medium ② lysine decarboxylation medium ③ phenylalanine-malonate medium ④ Simmons, citrate medium ⑤ gelatin-agar medium ⑥ nitrate medium ⑦ litmus-milk medium ⑧ SIM medium (hydrogen sulfid indole motility) ⑨ Hesse's medium ⑩ indole test.

Bergey は、インドール反応を種の決定の重要な指標としているので、著者は、特にこの点に注意して、液体培地 および固形培地でこの反応を調べ、Kovac の方法でその成績を判定した。

液体培地の組成：バクトペプトン 20 g, 塩化ナトリウム 5 g, トリプトファン* 1 g, 蒸留水 1000 ml, 比色法 NaHCO_3 で pH 7 に調整。

固形培地：Braun and Silberstein¹¹⁾のインドール確認法を適用するために、SIM培地を用いた。この場合、クロロホルム約 1 ml を培地に重層し、Kovac 試薬 1 ml を滴下してインドールの生成を判定した。対照には、インドール生産菌として、*Escherichia coli* を、非生産菌として、*Shigella sonnei* を用いて反応の正確を期した。

血清学的方法：上記 6 株を前述の液体培地で培養し、遠沈法で集菌し、生理食塩水で 3 回遠心洗滌後、菌を 0.5% ホルマリン生理食塩水に再浮遊したものを抗原として使用し、抗原の注射は 3～4 日の間隔で 7 回、すなわち初回 0.5 ml 2 回 1 ml 3 回 2 ml 4 回 4 ml 5～7 回 6 ml を家兎の耳静脈内に注射して免疫血清を作った。

試血後抗体価の高いものは、最終注射後 10 日めに全採血した。

凝集素吸収試験は、Castellani¹²⁾の方法に準じた。寒天ゲル内沈降反応は、Ouchterlony¹⁴⁾の方法によった。抗原は、上記の凝集反応に用いた 6 株の菌体懸濁液と、60 分間超音波 20 KC で処理したもの、さらに、Westphal のフェノール法で抽出したものを用いた。抗血清には、上記 6 株のホルマリン菌免疫血清を用いた。

実験結果

菌の分離実験の結果：第 1 次発生の gall 内からは菌が分離できたが、第 2 次発生の gall からは菌は発生せず、従って無菌と判定された。

発がん試験の結果：*Sedum alboroseum* の茎における gall 発生状態は、Fig. 3～9 に示すように対照には反応なく、M, S₂, S₃ の 3 株は、いずれも僅かに隆起を示したに過ぎなかった。しかし、S₁, At₂, I の 3 株は顕著な発がん性を示した。

生物学的性状：供試 6 株は、いずれもグラム陰性の桿菌で運動性がある。培地上での発育にも差異が認められる。フィヨン寒天培地で 30°, pH 7, 24 時間培養の場合、最も発育のよいのは、S₂ と S₃ の両株で、円形、湿潤、半透明、直径約 1 mm の菌集落を作るが、I, At₂, M はこれにつぎ、S₁ は著るしく劣る。同じく液体培地の場合は、混濁を示したが、48 時間後には S₂ と S₃ とは菌膜を作るが、S₁ 株は最も劣り混濁も認め難かった。Barsiekow's medium における糖分解能は、第 1 表に示した通りである。すなわち、S₁, At₂, I および M の 4 株は、使用した糖をほとんど分解しない点で共通性があり、S₂ と S₃ の両株は、ほとんどすべての糖を分解する点で一致している。

lysine decarboxylation については、S₁ 株は微反応にとどまるが、他はいずれも陽性である。phenylalanine malonate では、S₂ と S₃ 両株は発育良く陽性、M 株は微陽性他の株はいずれも陰性。

Simmons' citrate medium では、菌株によって差はあるが、すべて発育する。6 菌株のうち最も発育の悪いのは S₁ 株である。gelatin agar は、いずれも溶解せず、硝酸塩還元試験は、S₁, At₂, I, M の 4 株は微陽性、S₂ と S₃ 両株は顕著な陽性反応を示した。litmus-milk medium では、いずれも色素を還元し、凝固性については、S₁, At₂, I, M の 4 株は微陽性、S₂ と S₃ 両株は強い陽性反応を示した。SIM medium による結果では、いずれも硫化水素やインドールを生産しないが、運動性は 6 株とも認められた。特にインドール反応は、液体培地、固形培地での 14 日間の観察においてすべて陰性であった。

血清学的性状：供試 6 菌株の生菌と煮沸抗原による各菌株間の凝集反応成績は、第 2 表と第 3 表の通

* トリプトファンを加えたのは、インドール生産を促し、安定した成績を得るためである (Ljutov)¹³⁾。

Fig. 3. Control.
No reaction occurs on
needle pricking only.

Fig. 4. M-strain.
Pricking with bacterial
cells cause only a slight
bulge.

Fig. 5. S₂-strain.
Slight bulge caused by S₂
strain.

Fig. 6. S₃-strain.
Similar treatment with S₂
strain.

Fig. 7. I-strain.
Well developed tumor
induced by pricking with
bacterial agglomerate.

Fig. 8. At₂-strain.
Tumor caused by At₂
strain.

Fig. 9. S₁-strain
Similar treatment the I and At₂ strains.

Note; host plant: *Sedum alboroseum*, date of inoculation: June 24, 1966, photographed November 11, 1966.

Table 1. Fermentation reactions of 6 strains on Barsiekow's media.

Sugars \ Strains	S ₁	At ₂	I	M	S ₂	S ₃
lactose	—	—	—	—	+	+
sucrose	—	—	—	—	+	+
glucose	—	—	—	—	+	+
mannitol	—	—	—	—	+	+
maltose	—	—	—	—	+	+
arabinose	—	—	—	—	+	+
xylose	+	—	—	—	+	+
sorbitol	—	—	—	—	+	+
galactose	—	—	—	—	+	+
rhamnose	—	—	—	—	+	+
treharose	—	—	—	—	+	+
adonitol	—	—	—	—	+	—
dulcitol	—	—	—	—	—	+
salicin	—	—	—	—	+	+
inositol	—	—	—	—	+	+
raffinose	—	—	—	—	+	+

Key: (i) Observed within 14-day period.
(ii) S₂ and S₃ being positive after one day.

りである。

At₂とI両株間では、互にそれぞれの抗血清に対して、最終凝集価までの凝集を示した。S₁, M, S₂, S₃の4株は、上記2株とは全く趣を異にし、ホモ菌血清に対してのみ凝集反応を示し、ヘテロ菌血清に対しての凝集は全く認められなかった。

次に、At₂とI両株の生菌抗原を用いて凝集素の交叉吸収試験を行なったところ、両抗原は互に抗At₂血清と抗I血清の凝集素を吸収しつくし、凝集抗原の一致が確認された。

次に、供試菌の菌体から抽出された可溶性抗原について、沈降反応による抗原分析を試みた。その方法は、Ouchterlony¹⁴⁾のゲル内沈降反応によった。供試菌のホルマリン菌食塩水浮遊液ならびにその100°, 2時間煮沸菌液をwellに入れ、それぞれの抗血清に対応させたが、どの場合にも沈降線は、2週間以内には生じなかった。しかし、超音波20 KC, 60分で破壊した菌体を抗原とした場合は、供試菌抗原は、それぞれの自己菌血清に対しては、数条の沈降線を生じた。この沈降反応は、Fig. 10~15に示した。

Westphal¹⁵⁾法によるフェノール抽出抗原を用いたOuchterlonyゲル内沈降反応により、S₁, At₂, Iの3株間にはフェノール抽出可能な共通抗原が実証された。しかし、S₁, At₂とI血清に対して、M, S₂, S₃の3抗原は沈降線を形成しなかった。

生化学的性状に共通性を示したS₂とS₃の両株間においては、S₂血清に対しては、両抗原とも陽性反

Table 2. Result of tube agglutination of living cells with anti-bacterial immune sera.

Antibodies \ Antigen	S ₁	At ₂	I	M	S ₂	S ₃
S ₁	× 6,400	—	—	—	—	—
At ₂	—	× 12,800	× 12,800	—	—	—
I	—	× 12,800	× 12,800	—	—	—
M	—	—	—	× 3,200	—	—
S ₂	—	—	—	—	× 1,600	—
S ₃	—	—	—	—	—	× 6,400

Note. The minus (—) denotes a negative reaction at $\frac{1}{50}$ dilution.

Table 3. Result of tube agglutination of boiled bacterial cells.

Antibodies Antigen						
	S ₁	At ₂	I	M	S ₂	S ₃
S ₁	× 3, 200	—	—	—	—	—
At ₂	—	× 1, 600	× 1, 600	—	—	—
I	—	× 1, 600	× 1, 600	—	—	—
M	—	—	—	× 400	—	—
S ₂	—	—	—	—	× 400	—
S ₃	—	—	—	—	—	× 1, 600

Note. The minus (—) shows a negative reaction at $\frac{1}{50}$ dilution.

応を示し共通抗原の存在が実証された。

以上の試験結果は次のように要約される。(1) 分類学上の Key point と生化学的性状により、菌株 I, M, S₂, S₃ は、インドール反応陰性であるが、*Agrobacterium tumefaciens* と同定される。(2) 菌種 *tumefaciens* 内の biotype を調べると、(i) I, M の両株は、S₁, At₂ 両株と同じく使用した糖を利用しない。(ii) S₂, S₃ の両株は、利用する。(3) 発がん性については、S₁ 株は At₂, I 両株と同程度に強く、M, S₂, S₃ の3株は弱い。(4) Serotype は、凝集反応において I 株と At₂ 株は同一のタイプ：S₁ 株と M, S₂, S₃ の3株とはそれぞれ独立のタイプに属する。フェノール抽出抗原による沈降反応では、I 株は At₂, S₁ の両株と共通抗原が証明される。これらの3株は、いずれも発がん性が強い。S₁, At₂, I 群と M, S₂, S₃ 群との間には共通抗原が証明されないが、S₂ と S₃ 両株間には共通抗原が証明される。

以上をまとめると第4,5表のようになる。

Table 4. Tentative typing of 6 strains of *Agrobacterium tumefaciens* by their biochemical, tumor-inducing and serological properties.

Strains tested	Sugar fermentation	Tumor-inducing ability	Serotype
S ₁	—	marked	A
At ₂	—	marked	A
I	—	marked	A
M	—	slight	B
S ₂	+	slight	C
S ₃	+	slight	C

Sugar fermentation :

- +, positive reaction on usual sugars.
- , no reaction on usual sugars.

Serotype : A, B, C serotypes provisionally defined by the author.

Table 5. Antigenic interrelation between the 6 strains of *Agrobacterium tumefaciens* revealed by the precipitation with phenol-extractable antigens.

Sera	Precipitation with the antigens derived from						References
	S ₁	At ₂	I	M	S ₂	S ₃	
anti-S ₁ serum	+	+	+	—	—	—	Fig. 16
anti-At ₂ serum	+	+	+	—	—	—	Fig. 17
anti-I serum	+	+	+	—	—	—	Fig. 18
anti-S ₂ serum	—	—	—	—	+	+	Fig. 19

Fig. 10.

Fig. 11.

Fig. 12.

Fig. 13.

Fig. 14.

Fig. 15.

Fig. 10-15. Patterns of precipitin bands of the sonicated antigens of 6 strains of *Agrobacterium tumefaciens* against their homologous and heterologous antisera. Central well contains antiserum:

anti-S₁ serum in Fig. 10,

anti-At₂ serum in Fig. 11,

anti-I serum in Fig. 12,

anti-M serum in Fig. 13,

anti-S₂ serum in Fig. 14,

anti-S₃ serum in Fig. 15.

Surrounding wells in Fig. 10, 11, 12, 13, 14 and 15 contain antigen I, At₂, M, S₁, S₂ and S₃, respectively.

Fig. 16.

Fig. 17.

Fig. 18.

Fig. 19.

Fig. 16-19. Agar diffusion precipitin patterns of the phenol-extracted antigens of 6 strains of *Agrobacterium tumefaciens* against their homologous and heterologous antisera.

Central well contains antiserum:

anti-S₁ serum in Fig. 16,

anti-I serum in Fig. 18,

anti-At₂ serum in Fig. 17,

anti-S₂ serum in Fig. 19.

Surrounding wells in Fig. 16, 17, 18 and 19 contain antigen I, At₂, M, S₁, S₂ and S₃ respectively.

考 察

既に Braun and White¹⁶⁾ が報告しているように、植物のがん腫から菌の分離が難しいとされているのは、含菌量が少く第1次発生の根頭がん腫 (Fig. 1) にのみ菌が生存し、転移して生じた第2次 gall (Fig. 2) 内には菌が見出されないからである。本実験においてもこのことが確かめられた。

菌接種後の gall 発生状態は、寄主植物の種類によっても左右される。本菌の寄主植物は極めて多く、Elliott¹⁷⁾ は 203 属の双子葉植物を記載している。一般に、*Rosa*, *Prunus* 属は感受性が大きく、発生し

やすいことが知られている。

gall の形成能は、菌株の系統によっても異なるようである。本実験では、寄主として *Sedum* を用いたが、この植物では、S₁, At₂, I の3株は M, S₂, S₃ の3株よりも顕著な発がん性を示した。

生化学試験に関しては、糖分解能は S₁, At₂, I, M の4株はいずれも陰性であった。S₁ は lysin decarboxylation medium, phenylalanine-malonate medium, Simmons' citrate medium においても発育が悪く微陽性反応を示すにとどまった。菌の生化学反応の調査中に気づいたことは、S₁ 株が他の株に比して、Barsiekow's medium 中のいずれの糖

でも発育不良のこと、また、最適な培地が本菌と他の5菌株とで異なることなどである⁴⁾。従って、S₁株は栄養要求その他でかなり特異な性質をもつものようである。なお、S₂、S₃の両株は、糖の資化および硝酸塩の還元作用が顕著で他の4株とは、著しく異っている。

今回の実験で特に注意すべき点は、供試6菌株は、いずれもインドール反応が陰性なことである。従って、Bergeyの分類法によれば、本実験に供した6菌株は *Agrobacterium gypsophylae* に近似である。しかし、硫化水素の反応や、gall形成の寄主植物の類縁関係などからみれば、*A. gypsophylae* とも一概には断定しがたい。*Agrobacterium tumefaciens* のインドール反応陰性の事実は、既に、Caninor and Price¹⁸⁾ も報告している。また、岡部は、Bergeyの成書に基準菌株の性質や系統の記載を欠く不備を指摘し、インドール反応の有無は、*Agrobacterium tumefaciens* と *A. gypsophylae* との区別の基準にはならない、おそらく両種は同一種とみるべきものと推定している。

以上の理由から、供試菌株はすべてインドール反応が陰性ではあるが、根頭が腫から分離されたことと、gall形成能をもつ事実とを重視して、著者はこれらを *Agrobacterium tumefaciens* に編入した。ただし、S₂とS₃の両株は、他の株とは生化学的にも異っているので、将来は *Agrobacterium* 属以外の菌に分類される可能性もある。*Agrobacterium* 属の種の決定には、なお、再検討の余地があると思われる。

血清学的には、供試菌は凝集反応によって2群に分けられる。第1群のAt₂、Iの両株は、相互に強い類属凝集を示し、凝集素吸収試験により両者の凝集抗原の一致が証明され、同一のSerotypeと考えられる。この両株は、gall形成能や糖の資化においても同一性を示した。

第2群は、自己菌血清に対してのみ凝集するもので、これには、S₁、M、S₂、S₃の4株が属している。凝集反応で抗原の共通性がみられなかった第2群菌のうちでも、生化学的性状の特異なS₂とS₃の両株間では、フェノール抽出抗原を用いてのOuchterlonyのゲル内沈降反応では、抗原の共通性がみられ、独立のserotypeと考えられる。At₂、I株と同じく糖非分解群に属するS₁、Mの両株のうち

gall形成能の強いS₁は、フェノール抽出抗原を用いての沈降反応によっては、抗原的には第I群に属することが証明された。M株は抗原的には異なるタイプと判断された。

本研究には、大阪市立衛生研究所微生物課長大森玄洞博士、岩尾守義博士、来住輝彦博士および山口大学助教授吉井善作博士の方々に血清学的な面で懇篤なご指導を仰ぎ、またご校閲を賜わった。なお、静岡大学教授岡部徳夫博士、栃木県立佐野保健所青山巖博士には、有益なるご助言を頂いた。実験材料については、滋賀県立農業試験場日岡登治氏、静岡県立農業試験場森田篤氏のご協力を得た。武田薬品工業株式会社研究開発本部宮田孝一氏、同僚関栄義氏、浜本恭子氏にも何にかとご援助いただいた。これらの諸氏に厚く謝意を表する。

文 献

- 1) Wormald, H., Trans. Brit. Mycol. Soc. 28: 134(1945).
- 2) Robert, S.B., et al., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, p. 288. (The William and Wilkins Co. Baltimore, 1957).
- 3) Szabadi, L., Naturwis 45: 169 (1958).
- 4) Nishizawa, R. Bot. Mag. Tokyo 81: 90 (1968).
- 5) 滝本清透, 微生物及び植物病理学実験法 p. 299. (養賢堂 東京 1942).
- 6) 明日山秀文, 他 植物病理学実験法 P. 219. (日本植物防疫協会 東京 1963).
- 7) Wormald, H., Trans. Brit. Mycol. Soc. 28: 136 (1945).
- 8) 常松之典, 他 細菌学実習提要 P. 139 (丸善 東京 1958).
- 9) 戸田忠雄, 他 戸田新細菌学 P. 707 (南山堂 東京 1967).
- 10) 青山 巖, 腸内細菌の簡単な検査法 P. 14 (日水製薬株式会社 東京 1964).
- 11) Braun, H. and Silberstein, W., Tib. Facultesi Meemuasi, 3: 1596 (1940).
- 12) Ljutov, v., Acta pathol. et Microbiol. Scand 46: 349 (1959).
- 13) Castellani, A., Zeitscher. f. Hyg. U. Infektions-krankh. 40: 1 (1902).
- 14) Ouchterlony, O., Acta pathol. et Microbiol. Scand. 25: 186 (1948).
- 15) Westphal, O., et al. Z. Naturforsch 7b: 148 (1952).

- 16) Braun, A. C., and White, P. R., Phytopathol. **33**: 85 (1943).
Mass., U. S. A. 1951).
- 17) Elliott, C., Manual. Bact. Plant pathogen. P. 6 (Chronica Botanica Co., Waltham,
- 18) Caninor, C., and Price, W. C., Phytopathol. **43**: 509 (1953).