

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 森 友花
Name

学位論文題目： 宿主植物内における青枯病菌によるバイオフィーム形成の発見とその機構の解明
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

土壌生息細菌である青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、熱帯・亜熱帯地帯から温帯にかけて、トマト、ナスおよびジャガイモなどナス科植物のみならず、バナナ、ショウガおよびミョウガをはじめとした200種類以上の経済上重要な作物に萎凋症状である青枯病を引き起こし、甚大な被害を生じさせている。そのため、世界の農業生産に多大な損失を負わせており、青枯病に対する早急な防除対策の確立が、長年、望まれている。

我国の青枯病研究は「現場」における活用技術の開発を中心に行われてきた。その結果、独立行政法人野菜茶業研究所(旧農林水産省野菜茶業試験場)と、多くの県研究機関を中心に青枯病抵抗性品種の選抜と育成が多年にわたり行われ、LS-89、台太郎、カレヘンおよびトレロなどの抵抗性台木がトマト栽培やナス栽培に普及されている。また、各種ナス科植物に対する病原性を基に、青枯病菌菌株は菌群別に類別されている。この類別法の利用により、圃場に生息する青枯病菌の宿主の推定が可能になり、抵抗性台木の選択が容易となった。さらに、クロロピクリンや臭化メチル等の化合物利用および太陽熱や温水利用による土壌消毒は、全国各地のナス科作物栽培圃場とくに施設園芸地帯に普及している。臭化メチルの撤廃に伴う代替技術の開発を主要研究課題として取り組んでいる県研究機関が多いことから、その普及程度がうかがえる。

一方、現実には、青枯病菌の土壌生態学的な知見不足により、これら土壌消毒の効果が安定して認められない。青枯病に対する抵抗性品種の多くは果実品質が劣るため生食用には不適であり、台木品種として接木栽培において利用されている。しかし、多年にわたる連作や施設園芸による周年栽培を行っている圃場では、接木栽培を行っても青枯病の発生を回避することができなくなっている。青枯病菌の土壌や植物における挙動、青枯病菌の病原性機構および植物の青枯病感受性機構、さらには、抵抗性台木の青枯病抵抗性機構が未解明であるために、恒久的な防除方法の開発にいたっていない。

土壌に生息する青枯病菌は、自らの走化性を起動させ、鞭毛運動により植物の根の表面にたどりつき、根の表面に付着する。そして、根の傷口から細胞間隙に侵入し、そこで、まず、コロニー化する。細胞間隙でコロニー化した青枯病菌は、II型分泌系を介して、植物細胞壁分解酵素を分泌し、導管壁を分解して、導管へ侵入する。導管において、青枯病菌は激しく増殖を行い、導管を通じて全身に移行する。そして、 10^7 colony forming unit (CFU)/ml以上の細菌密度に増殖した青枯病菌は、クオラムセンシング (QS) を起動させて、菌体外多糖を生産する。その結果、導管の通水能を弱め、感染植物に萎凋症状を引き起こすと考えられている。

植物は、鞭毛の構成タンパク質であるフラジェリンや外膜にあるリポポリサッカライドなどの Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を、細胞膜貫通型受容体 (pattern recognition receptors; PRR) にて認識し、PAMPs 誘導自然免疫 (PTI) を誘導して、微生物の感染を阻害する。ある特定の植物に病原性を有する細菌は、*hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) レギュロンを発現し、

ニードル状の構造物である III 型分泌系を構築する。この III 型分泌系を介して、タイプ III エフェクターを植物細胞内に分泌し、タイプ III エフェクターの働きにより、その植物における PTI の誘導を抑制する。これにより、細菌は、特定の植物種に感受性を誘導することが可能となる。しかし、導管病として扱われてきた青枯病について、これまで、いかにして、青枯病菌が PTI などの植物免疫を回避するのかについては明らかとなっていなかった。

曳地と木場らは、細胞間隙侵入直後の青枯病菌と宿主植物との相互作用が、青枯病菌による PTI 回避、すなわち、感受性誘導に関わると想定した。そこで、青枯病菌が感染した *Nicotiana benthamiana* のトランスクリプトーム解析を行い、青枯病菌感染特異的に発現が変動する *N. benthamiana* 遺伝子ライブラリーを構築した。このライブラリーに含まれるそれぞれの遺伝子のサイレンス植物を用いて、感受性誘導機構について解析を行った。その結果、青枯病菌が細胞間隙に侵入した *N. benthamiana* では、葉緑体膜においてリン脂質代謝が活性化し、その産物であるフォスファチジン酸 (PA) を基質として、ジャスモン酸と活性酸素種それぞれを介したシグナル伝達系が活性化し、自然免疫を誘導することを明らかにした。細胞間隙に侵入した青枯病菌により III 型分泌系を介して *N. benthamiana* 細胞内に分泌されたタイプ III エフェクターの働きにより、PA 脱リン酸化酵素 (PAP) 遺伝子の発現が誘導される。そして、PAP の働きにより、葉緑体膜に局在する PA がディアシルグリセロールに脱リン酸化され、葉緑体膜での PA 含量が低下することにより、*N. benthamiana* による自然免疫の誘導が阻害される。その結果、青枯病菌は細胞間隙で増殖を行うことができ、細胞間隙におけるコロニー化を成立する。興味深いことに、この細胞間隙でのコロニー化は、青枯病菌の導管への侵入と全身移行に必要であるとともに、青枯病菌の病原性にとって不可欠な感染過程であった。

このように、導管病と考えられてきた青枯病の発病には、根の細胞間隙に侵入直後の青枯病菌と宿主植物との相互作用と、その結果、もたらされる細胞間隙での青枯病菌のコロニー化が必要である。細胞間隙に侵入した青枯病菌に対する宿主応答と感受性誘導機構については、解明の礎を確立することができている。しかし、青枯病菌の病原性機構を解明するためには、細胞間隙での青枯病菌のコロニー化の解明は必須であるにもかかわらず、その解明は、手つかずの状態である。そこで、本研究は、OE1-1 株の細胞間隙でのコロニー化機構の解明を目的とした。

トマト植物の細胞間隙での OE1-1 株の挙動解析を行った。位相差蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いて観察を行い、トマト植物の細胞間隙に侵入した OE1-1 株は、トマト細胞表面上に固着し、細菌細胞凝集体であるバイオフィームを形成することを明らかとした (Fig. 1)。植物の細胞間隙に侵入した植物細菌によるバイオフィームの形成は、世界で初めての発見である。さらに、トマト植物から分取したアポプラスト液と導管液を用いて、OE1-1 株を培養したところ、マッシュルーム型バイオフィームが、アポプラスト液での培養では観察されたが、導管液での培養では観察されなかった。また、バイオフィーム形成の指標である OE1-1 株の細胞凝集が、アポプラスト液での培養に比べ、導管液での培養で著しく低下した。すなわち、細胞間隙は、OE1-1 株によるバイオフィーム形成にとって好適な条件であると判断された。これらの結果を基に、OE1-1 株によるバイオフィーム形成モデル実験系を確立した。

グラム陰性細菌では、QS が起働し、バイオフィームを形成する。そのため、OE1-1 株によるバイオフィーム形成に関わる遺伝子の発現は、QS に支配されていると想定された。バイオフィーム形成関連遺伝子を探索するために、QS により機能化する病原力関連遺伝子の転写制御タンパク質 PhcA をコードする *phcA* 遺伝子欠損株を用いて、RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を行った。PhcA タンパク質によって発現が正に制御される遺伝子の中から、マンノースとフルクトースに高い結合能を有するレクチン RS-III タンパク質をコードする *lecM* 遺伝子を見出した。*lecM* 遺伝子は、HrpG タンパク質によっても発現が制御されていた。また、緑膿菌が有する PA-III タンパク質が、バイオフィーム形成に関与し、PA-III タンパク質と RS-III タンパク質は立体構造的に相同性が高いことが明らかとなっている。興味深いことに、OE1-1 株をアラビノース、マンノースおよびフルクトースそれぞれを含む最少培地で培養すると、細胞凝集能の増強が認められた。すなわち、OE1-1 株のバイオフ

ィルム形成に RS-III タンパク質が関与すると想定された。

バイオフィーム形成モデル実験系を用いて、*lecM* 変異株と *lecM* 遺伝子によるその相補株のバイオフィーム形成に関連する表現型解析を行ったところ、RS-III タンパク質が、固相面への固着、アポプラスト液におけるマッシュルーム型バイオフィーム形成、青枯病菌の主要な菌体外多糖である EPS I の産生および病原性に関与することを明らかとした。さらに、*lecM* 遺伝子は、バイオフィーム形成いずれの段階でも発現していた。すなわち、RS-III タンパク質は、細胞間隙侵入後の、OE1-1 株の植物細胞表面上への固着に関与するとともに、OE1-1 株のバイオフィーム形成に関わる多糖マトリクスネットワークの形成と安定化および細菌細胞表面と菌体外多糖間の接合にも関与すると考えられた。

青枯病菌は、QS に依存して、ラルフラノン類化合物であるラルフラノン A, B, I, J, K および L を産生し、菌体外に分泌する。フラノン合成酵素 RalA タンパク質をコードする *ralA* 遺伝子の発現は機能化 PhcA タンパク質によって誘導される。RalA タンパク質により、フェニールピルビン酸を基質として、ラルフラノン I が合成される。ラルフラノン I は他のラルフラノン類化合物の生合成前駆体である。ラルフラノン類化合物の OE1-1 株によるバイオフィーム形成への関与について解析を行った。RalA タンパク質は、アポプラスト液における OE1-1 株細胞の凝集とバイオフィーム形成、EPS I 産生、鞭毛を用いた運動能および病原性に関与することを明らかとした。さらに、ラルフラノン類化合物は、バイオフィーム形成に関連する二成分制御系と遺伝子の転写に関わるシグマ因子をコードする遺伝子の発現を制御していた。すなわち、菌体外に分泌したラルフラノン類化合物を介して、OE1-1 株は細胞間情報伝達を行い、秩序性を整えてバイオフィームを形成すると考えられた。

導管病である青枯病を引き起こす青枯病菌の病原性にとって、宿主植物の根の細胞間隙に侵入直後のコロニー化が必須である。このコロニー化とは、(1) 宿主細胞表面への固着、(2) III 型分泌装置の構築とエフェクターの宿主細胞内への分泌およびそれらによる植物免疫の阻害による感受性誘導、(3) 宿主細胞表面における青枯病菌の増殖とそれに依存したクオラムセンシング (QS)、そして QS に依存した青枯病菌細胞の凝集とマイクロコロニーの形成、および (4) 成熟したバイオフィームの形成から構成され (Fig. 2)、成熟したバイオフィームから遊離された浮遊細胞が導管へ侵入することを明らかにした。細胞間隙液に多量に含まれる糖類と結合能を有するレクチン RS-III タンパク質は、青枯病菌の植物細胞表面への固着とともに、青枯病菌の凝集に関わり、バイオフィーム形成に関与すると考えられた。さらに、バイオフィーム形成時の青枯病菌細胞内の情報伝達あるいは青枯病菌細胞間コミュニケーションには、ラルフラノン類化合物がメッセンジャーとして機能すると考えられた。

導管液と比べ、アポプラスト液が OE1-1 株のバイオフィーム形成にとって好適であることが明らかとなり、根への侵入後、細胞間隙に侵入した OE1-1 株細胞は、細胞間隙に面した宿主細胞表面上に固着すると考えられた。さらに、RS-III タンパク質は、OE1-1 株細胞の固着に関与することが明らかとなった。バイオフィーム形成の初期段階は、細菌細胞が可逆的に固相面に固着し、最終的に不可逆的に固着する固着期である。可逆的から不可逆的な固着への転換は、バイオフィーム形成にとって重要である。植物細胞へ固着した OE1-1 株細胞は、III 型分泌系を構築する *hrp* レギュロンを発現し、タイプ III エフェクターを分泌する。その結果、青枯病菌は、宿主植物の自然免疫の抑制を導き、著しく増殖し、QS を起動させ、バイオフィームを形成する。このように、細胞間隙へ感染後のトマト細胞表面上での OE1-1 株細胞によるバイオフィーム形成は、病原性にとって必要であり、RS-III タンパク質は、OE1-1 株における植物細胞表面上への固着だけでなく、バイオフィーム形成に関わる多糖マトリクスネットワークの形成と安定化および細菌細胞表面と菌体外多糖間の接合にも関与すると考えられた。

ラルフラノン I は、ラルフラノン類化合物の前駆体であり、非酵素的反応によりラルフラノン B に転換される。ラルフラノン B から非酵素的反応によるベンズアルデヒドの脱離により、ラルフラノン A が生合成される。一方、ラルフラノン B の酵素反応による酸化により、ラルフラノン J と K は生合成される。ラルフラノン L はラルフラノン I から酵素反応により生合成される (Fig. 3)。なぜ、青

枯病菌は、さまざまな種類のラルフラノン類化合物を細胞外に産出するのだろうか? OE1-1 株における QS 依存のいずれのラルフラノン類化合物の細胞外への産出は、バイオフィルムの形成過程の間、継時的に変化し、細菌細胞凝集、EPS I 産生および鞭毛による運動能の調節を行っていると考えられた (Fig. 3)。それゆえ、バイオフィルム形成の初期段階において、3-OH MAME に介在された細胞間シグナル伝達系が QS を活性化し、ラルフラノン類化合物の産生を導く。いずれのラルフラノン類化合物も、OE1-1 株細胞間の細胞間シグナル伝達系に介在し、その結果、バイオフィルム形成関連遺伝子の発現を制御する (Fig. 4)。さらに、ラルフラノン A、B および J は、それぞれ、二成分制御系である VsrAD タンパク質と VsrBC タンパク質をコードする遺伝子および *rpoN2* 遺伝子の発現制御を介したシグナル伝達に関与する (Fig. 4)。ラルフラノン類化合物による *rpoS* 遺伝子の負の発現制御もまたバイオフィルム形成に関与するかもしれない。すなわち、QS と連働して、それぞれのラルフラノン類化合物を介した OE1-1 株細胞間の細胞間シグナル伝達系の総和が、バイオフィルム形成に寄与し、その結果、病原性に影響を及ぼすと考えられた (Fig. 5)。ラルフラノン化合物を介した細胞間シグナル伝達系は、バイオフィルム形成過程における QS と連働した植物病原細菌細胞間の細胞間シグナル伝達系として初めての報告である。これらの結果から、細胞外に産出された多様なラルフラノン類化合物によるバイオフィルム形成関連遺伝子の発現の精巧で複雑な制御システムは、青枯病菌が多くの植物種に感染し、それらに病原性を示すことを可能にすると考えられた。

青枯病菌は多犯性であり、200 以上の植物種の根から感染し、萎凋症状をもたらす。それぞれの菌株の宿主範囲が多様であり、分子診断によりその宿主範囲を特定することは難しい。さらに、青枯病に対する真正抵抗性遺伝子は未だ同定されておらず、青枯病防除は、土壌消毒や抵抗性台木を用いた接木栽培に依存している。しかし、多年にわたる連作や施設園芸による周年栽培を行っている圃場では、接木栽培を行っても青枯病の発生を回避することができなくなっている。根の細胞間隙は、薬剤が浸透しやすく、バイオフィルム形成能欠損により、細胞間隙以外での青枯病菌の増殖には影響が認められなかったことから、細胞間隙への侵入後の植物細胞表面でのバイオフィルム形成は、耐性菌株が蔓延しにくい静菌作用に基づいた青枯病菌防除薬剤の開発にとっての恰好な作用部位であると期待される。

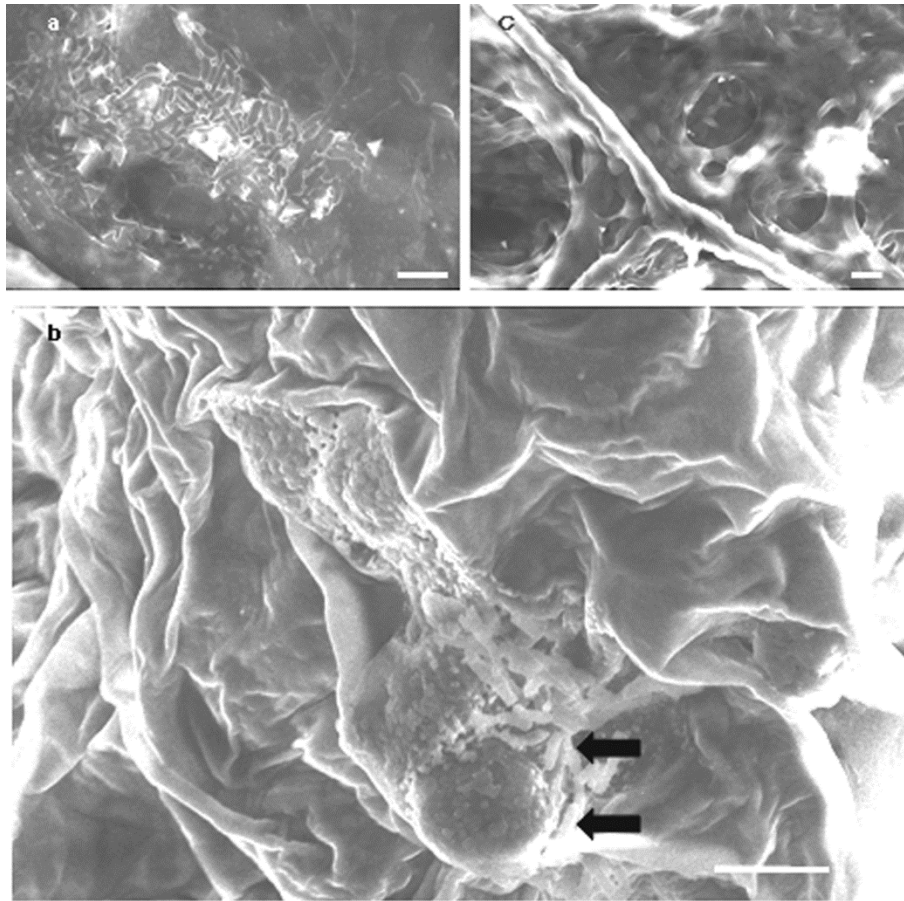


Fig. 1. Formation of a microcolony (a) and a biofilm (b) produced by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1 on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. Tomato leaves with the lower epidermis layers excised at 18 h (a) and 24 h (b) post-infiltration with OE1-1, and non-inoculated leaf with the lower epidermis layers excised at 24 h (c), were observed under a scanning electron microscope. Arrows show planktonic OE1-1 cells released from the biofilm structure. Scale bar, 5 μ m.

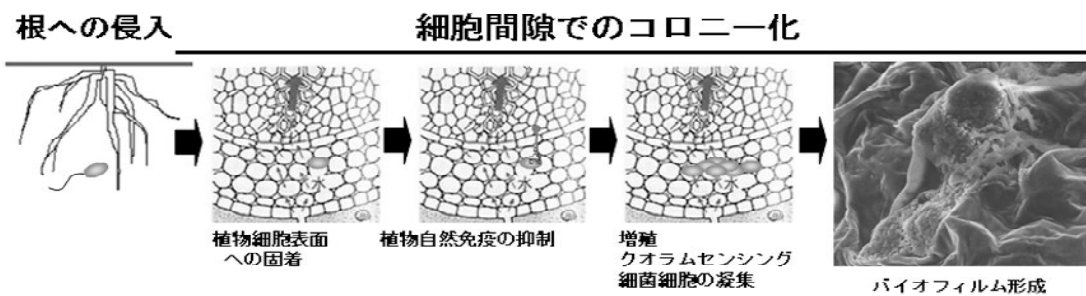


Fig. 2. The scheme of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1 colonization in intercellular spaces of host plant roots.

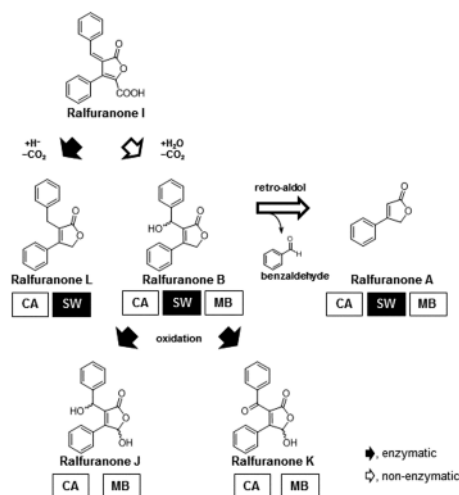


Fig. 3. Scheme of the conversion pathway of ralfuranones from ralfuranone I and positive (blacked) and negative (whited) regulation of ralfuranones on cell aggregation (CA), swimming motility (SW) and mushroom-type biofilm formation (MB) by *Ralstonia solanacearum* strains and expression of biofilm formation-related genes in the strains.

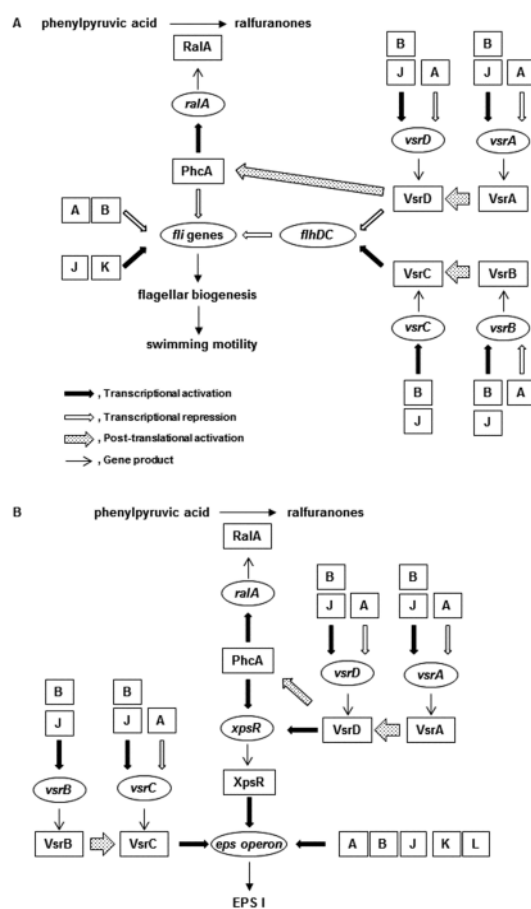


Fig. 4. Scheme of regulation of genes expression involved in swimming motility (A) and EPS I production (B) with ralfuranones of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. A, B, J, K and L show ralfuranones A, B, J, K and L, respectively.

(様式 5) (Style5)

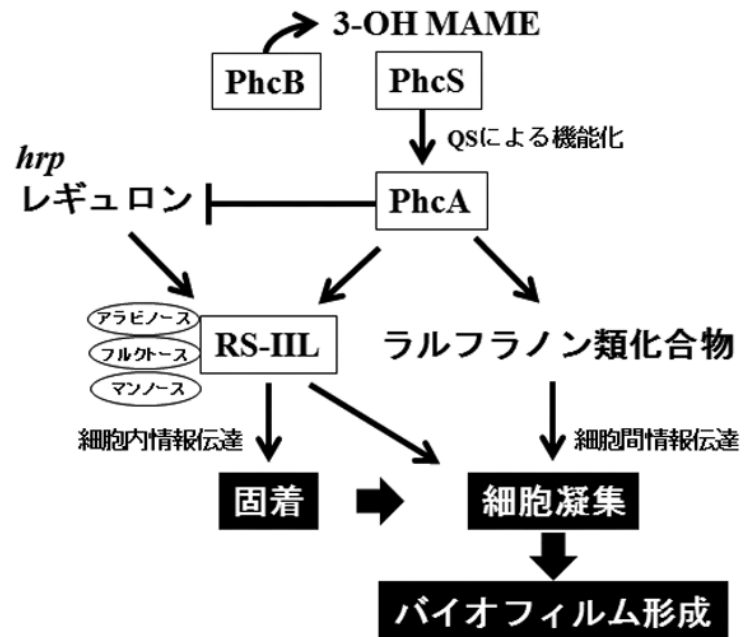


Fig. 5. Scheme of signal transduction involved in biofilm formation by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1 through RS-III protein and ralfuranones coupled with its quorum sensing (QS).