

学位論文審査の結果の要旨

氏名	森 友花
審査委員	主査 曳地 康史 副査 木場 章範 副査 秋光 和也 副査 山岡 直人 副査 大西 浩平

論文名

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

審査結果の要旨

土壤中に生息する青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、傷口などの開口部から、宿主植物の根に侵入し、まず、細胞間隙でコロニー化する。そして、導管へ侵入した青枯病菌は、導管で増殖して、菌体外多糖を産生することで、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きた。しかし、菌体外多糖産生能欠損株が病原性を保持しており、青枯病菌の病原性は未解明のままである。一方、曳地・木場らは、根の傷口から侵入した細胞間隙にて、青枯病菌 OE1-1 株は宿主植物の自然免疫の誘導を回避し、OE1-1 株の病原性にとって不可欠な、細胞間隙でのコロニー化を行うことを明らかにした。しかし、細胞間隙での OE1-1 株のコロニー化の詳細については明らかとなっていない。そこで、本研究は、OE1-1 株の細胞間隙でのコロニー化機構を解明した。

1. 位相差蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いて、トマト植物の細胞間隙での OE1-1 株の挙動解析を行った。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にした。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。

2. 多くのグラム陰性細菌によるバイオフィーム形成は、クオラムセンシング (QS) に依存している。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** 株によるバイオフィーム形成に **RS-III** タンパク質が関与すると想定された。

3. 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ッ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。

4. 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。

5. 本研究の結果から、宿主植物の根の細胞間隙に侵入直後のコロニー化とは、(1) 宿主細胞表面上への固着、(2) **III** 型分泌装置の構築とエフェクターの宿主植物細胞内への分泌およびそれらによる植物免疫の回避による感受性誘導、(3) 宿主細胞表面における青枯病菌の増殖とそれに伴う **QS** の起動、そして (4) **QS** に依存したバイオフィームの形成から構成され、バイオフィームから遊離した浮遊細胞が導管へ侵入すると考えられた。根の細胞間隙へ侵入後の植物細胞表面でのバイオフィーム形成は、耐性菌株が蔓延しにくい静菌作用に基づいた青枯病防除薬剤の開発にとって恰好な作用部位であると期待される。

学位論文の公開審査会は平成28年2月6日に愛媛大学農学部で開催され、論文発表と質疑応答が行われた。続いて開催された学位論文審査会において慎重に審査を行った結果、審査委員が全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値すると判定した。