

学位論文要旨 Dissertation Abstract

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
Title of Dissertation 構の解明

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

宿主植物の導管へ侵入し、増殖した青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、菌体外多糖を産生し、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。一方、曳地・木場らは、根の細胞間隙にて、青枯病菌OE1-1株が宿主植物の自然免疫の誘導を回避し、細胞間隙でコロニー化を行うことを明らかにしている。さらに、細胞間隙での、このコロニー化は、OE1-1株の病原性に不可欠である。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。

本研究では、細胞間隙でのOE1-1株のコロニー化機構の解明を目的に、まず、位相差蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いて、OE1-1株の細胞間隙での挙動を解析した。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、バイオフィームを形成することを明らかとした。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。さらに、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て、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のモデル実験系を確立した。

バイオフィーム形成のために、OE1-1株は著しく増殖する。著しく増殖を行ったOE1-1株では、クオラムセンシング (QS) が起動する。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により機能化する転写制御タンパク質PhcAタンパク質をコードする*phcA*欠損株を用いた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。興味深いことに、OE1-1株をマンノースとフルクトースそれぞれを含む最少培地で培養すると、そのバイオフィーム形成能の増強が認められた。すなわち、青枯病菌の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。

モデル実験系を用いた解析から、RS-IIIタンパク質は、OE1-1株の固相面への固着、アポプラスト液におけるバイオフィーム形成、主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の多糖マトリックスネットワークの安定化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。そこで、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、秩序性を整えバイオフィームを形成すると考えられた。

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) 宿主細胞表面への固着、(2) 植物免疫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QS、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。バイオフィーム形成能欠損により、細胞間隙以外でのOE1-1株の増殖には影響が認められなかった。根の細胞間隙は、薬剤が浸透しやすいことから、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菌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。