

論文の要旨

氏名 緋田 安希子

論文題目 Studies on chemotaxis mechanism involved in the early stage of plant infection by bacterial wilt pathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*
(青枯病菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* の植物感染初期段階に関与する走化性機構の解明)

第一章 緒言

青枯病菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* は土壌伝染性の植物病原菌であり、多くの農作物に深刻な被害を引き起こす。近年、本細菌の植物感染に走化性が関与すると報告された。走化性とは、運動性細菌が化学物質の濃度勾配を感知して自身の好ましい環境へと移動する行動である。走化性は細胞膜上に存在する走化性センサータンパク質 (Methyl-accepting chemotaxis protein, MCP) に化合物が結合することによって生じる。*R. pseudosolanacearum* は 22 種類の MCP を有すると予想されるが、2つの走気性センサー以外の 20 MCP についてはリガンド化合物は不明である。このことがこれまで青枯病菌の感染に関与する具体的な走化性物質の特定を困難にしていた。そこで本研究では、未知の MCP 機能を特定し当該 MCP 破壊株を用いることで、青枯病菌の植物感染に関与する走化性機構の解明を試みた。

第二章 アミノ酸および L-リンゴ酸走化性センサーの特定と植物感染との関連

青枯病菌は植物の根から分泌される物質を目印にして植物根に接近し感染すると考えられている。植物根滲出液主要成分であるアミノ酸、糖、有機酸に対する走化性を測定したところ、*R. pseudosolanacearum* はアミノ酸と有機酸に対して強い走化性を示すことが明らかとなった。各走化性誘引物質に対する MCP を特定するため、*R. pseudosolanacearum* Ps29 株の 22 *mcp* 単独破壊株ライブラリを構築した。当該ライブラリを用いた解析により、アミノ酸センサー McpA および L-リンゴ酸センサー McpM の特定に成功した。一方、その他の有機酸 (クエン酸等) に対する MCP は特定できなかった。本章では、MCP の特定に成功したアミノ酸と L-リンゴ酸走化性に焦点をあて解析を行った。

アミノ酸および L-リンゴ酸走化性の植物感染への関連を解明するために、各センサー破壊株 ($\Delta mcpA$, $\Delta mcpM$) を用いて植物感染実験を行った。トマト苗から離れた位置に各菌体を植菌し、トマト苗の病徴を指標にして評価した。その結果、 $\Delta mcpA$ は野生株と同等の感染能を示したが、 $\Delta mcpM$ では野生株よりも有意に低い感染能が確認された。このような差は根を菌懸濁液に浸漬し直接植菌した場合には見られなかった。これにより、McpM による L-リンゴ酸走化性が *R. pseudosolanacearum* の植物感染初期段階である根への移動に重要であることが明らかとなった。しかし、走化性完全欠損株と比較すると $\Delta mcpM$ の感染能はまだ高いことから、その他の走化性も感染に関与することが示唆された。

第三章 クエン酸走化性センサーの特定と植物感染との関連

本章では、植物感染に関与するその他の走化性として、L-リンゴ酸と同様に根滲出液の主要成分かつ強い走化性誘引物質であるクエン酸に着目した。*mcp* 単独破壊株ライブラリではクエン酸走化性に関与する MCP の特定ができなかったことから、新たな解析ツールとして *mcp* 多重破壊株ライブラリを構築した。本ライブラリを用いた解析により、クエン酸センサー McpC および McpP の特定に成功した。当該 MCP の二重破壊によりクエン酸走化性は大きく低下することから、McpC, McpP が主要なクエン酸センサーであることが明らかとなった。

二章と同様にしてクエン酸走化性の植物感染への関与を評価した。その結果、特定したク

エン酸センサーの単独破壊株および二重破壊株は野生株と同等の植物感染能を示した。これにより、*R. pseudosolanacearum* の植物感染においてクエン酸走化性は重要でないことが示唆された。

第四章 新規走化性物質ホウ酸の発見と当該センサータンパク質の特性化

R. pseudosolanacearum がネガティブコントロールに対して走化性を示すという興味深い現象から、新規走化性物質であるホウ酸を発見した。二章で構築した *mcp* 単独破壊株ライブラリを用いた解析により、ホウ酸センサー *McpB* の特定に成功した。当該 *MCP* とホウ酸の結合について詳細に解析するために、等温滴定熱量測定を行った。精製した *McpB* のリガンド結合ドメイン (LBD) タンパク質溶液に対してホウ酸溶液を滴定したところ、発熱反応が確認された。これにより、ホウ酸が *McpB* LBD に直接結合することが明らかとなった。また、超遠心分析での結果と合わせると、*McpB* LBD は二量体でホウ酸 1 分子を認識することが強く示唆された。

Protein BLAST による解析の結果、当該ホウ酸センサーは植物病原菌に特徴的なタンパク質であることが明らかとなった。そして、ホウ酸は植物の生育必須栄養素のひとつであり、植物体内に存在する化合物である。これらの事実により、ホウ酸走化性が植物感染へ寄与する可能性が示唆された。

第五章 総括

本研究では、青枯病菌 *R. pseudosolanacearum* においてアミノ酸、L-リンゴ酸、クエン酸、ホウ酸に対する走化性について、関与するセンサータンパク質の特定に成功した。そして、各センサー破壊株を用いることで、青枯病菌の植物感染初期段階に L-リンゴ酸走化性が重要であることを見出した。また、植物感染に関与する可能性が高いと予想されるホウ酸走化性の存在も明らかにした。

以上のように、これまで不明であった青枯病菌の植物感染に関与する走化性機構についてその一部を明らかにすることができた。全貌の解明にはさらなる研究が必要となるが、本研究で得られた知見および構築した破壊株は今後の研究の基盤として重要な役割を果たすであろう。そして、植物感染に関与する走化性の知見は、青枯病菌の生物学的防除法の開発に役立つことが期待される。