

ISSN 1346-5767

一般社団法人 日本植物病理学会

植物細菌病談話会論文集 (第29号)

Proceeding of the 29th Plant Bacterial Disease Workshop
December 3, 2022

supported by
The Phytopathological Society of Japan

2022年12月3日
於 法政大学

目次

<i>Pseudomonas</i> 属細菌の感染機構から見えてきた新たな防除法	2
石賀 康博 (筑波大学 生命環境系)	
ファイトプラズマによる葉化病の普遍的分子機構	13
前島 健作 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)	
特別講演	
思いがけない「気づき」と展開・・・未完の研究の話	23
瀧川 雄一 (静岡大学 農学部)	
ナス病原性の青枯病菌を生み出したエフェクター遺伝子変異	27
向原 隆文 (岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所)	
遺伝子発現動態から迫る青枯病菌の感染機構	36
都筑 正行 (高知大学 農林海洋科学部)	

Pseudomonas 属細菌の感染機構から見えてきた新たな防除法

坂田七海・石賀貴子・Nguyen Viet Tru*・臼杵義侑*・石賀康博

Sakata, N., Ishiga, T., Nguyen V. T., Usuki, G. and Ishiga, Y.

New control methods based on *Pseudomonas* spp. infection mechanisms

Abstract

Plant pathogenic *Pseudomonas* spp. induce a variety of symptoms such as leaf spots, cankers, galls, wilt, and blights on different plants, and impact crop productions worldwide. To investigate *Pseudomonas* spp. infection mechanisms, we developed high-throughput Tn5 transposon mutagenesis and comprehensively identified virulence-related genes from *P. cannabina* pv. *alisalensis*, *P. syringae* pv. *actinidiae*, and *P. savastanoi* pv. *glycinea*, causal agents of bacterial blight of crucifer, bacterial canker of kiwifruit, and bacterial blight of soybean, respectively. Screening revealed not only specific virulence factors, such as type III secretion system and effectors, but also basic virulence factors, which are essential for bacterial survival and growth, related to amino acid metabolism, motility, multidrug efflux pumps, and stress tolerance. Furthermore, we found that multiple virulence factors have important roles in the process from plant surface to stomatal invasion (epiphytic phase). We demonstrated that plant defense activators and some amino acids suppress bacterial invasion into plants by activating stomatal-based defense. In addition, we found a positive correlation between stomatal aperture width and the number of bacterial initial entries. Our studies suggest the importance of controlling *Pseudomonas* spp. stomatal invasion. In this paper, we would like to introduce new control methods based on our comprehensive virulence factors identification and infection mechanisms analyses.

Key words: Amino acids, coronatine, plant defense activator, *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*, stomata-based defense, virulence factors

筑波大学生命環境系 Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, 305-8572, Japan.

*筑波大学理工情報生命学術院生命地球科学研究群農学学位プログラム Doctoral Program in Agricultural Sciences, Degree Programs in Life and Earth Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8572, Japan.

はじめに

Pseudomonas 属細菌の感染による植物病害が世界中で問題となっている。その中でも、世界中のキウイフルーツ産地において *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*)によるキウイフルーツかいよう病の大発生が問題になっている。キウイフルーツかいよう病菌の biovar3 (*Psa3*)は、病原力が特に強く、世界中の広範囲に流行し、キウイフルーツ生産に著しい被害を与えている。一方で、日本国内では、*P. cannabina* pv. *alisalensis* (*Pcal*)によるアブラナ科植物黒斑細菌病が大きな問題となっている。

これまでの植物-*Pseudomonas* 属細菌の相互作用に関する研究の多くは、シロイヌナズナと *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) の相互作用系をモデルとして解析が行われてきた (Xin and He, 2013)。分子遺伝学の発展に伴い、このモデル相互作用系の解析から植物免疫システムの全貌が明らかにされてきた。さらに、*Pst* DC3000 の病原性を構築する個々の病原力に必要な遺伝子が明らかになり、その遺伝子欠損変異株は総じて発病能が低下することが明らかとなっている (Ishiga and Ichinose, 2016; Ishiga et al., 2018)。しかし、実際の農業現場で問題となっている植物病原細菌の病原性機構は全く未知である。そこで、私たちは、現場での持続可能な病害防除を将来的な目標として、「モデル系」ではなく実際の病害を引き起こしている植物病原細菌の病原性を構築する未知の病原力に必要な遺伝子を網羅的に単離し、機能を明らかにすることを目指して研究を進めてきた。本稿では、私たちが実施した病原力因子の網羅的同定、感染機構の解析から見えてきた新たな防除法について紹介したい。

1. トランスポゾン挿入変異株を利用した *Pseudomonas* 属細菌の病原力因子の探索

これまでに、*Pseudomonas* 属細菌の病原力に関わる遺伝子を同定するために、さまざまなスクリーニングが行われてきた。トランスポゾン挿入による変異株をライブラリーとしたスクリーニングもその一つである。例えば、*Pst* DC3000 Tn5 変異株 947 株をシロイヌナズナに浸漬接種したスクリーニングでは、37 株が病原力低下を示した (Brooks et al., 2004)。このスクリーニングで用いた浸漬接種法は自然感染の条件に比較的近く、葉の表面での増殖、侵入、アポプラスト内での増殖の全感染サイクルに関わる病原力因子の同定に適した手法である (Brooks et al., 2004)。また、ハイスループットなスクリーニングが *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 (現 *P. cannabina* pv. *alisalensis* ES4326) とシロイヌナズナで行われた (Schreiber et al., 2012)。このスクリーニングでは、約 12,600 の Tn5 変異株を液体培地で生育させたシロイヌナズナに接種し、40 株の病原力低下株を選抜した。このようなフォワードスクリーニングは細菌の感染に必要な病原力因子の探索に新たな知見を与えうる有効な手段であるといえる。ここでは、私たちが実施したトランスポゾン挿入変異株を利用した *Pseudomonas* 属細菌の病原力因子の網羅的な探索について紹介したい。

1-1. *P. cannabina* pv. *alisalensis* の病原力因子の同定

現在、日本では、*Pcal* によるアブラナ科植物黒斑細菌病が大きな問題となっている。古くから *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) が黒斑細菌病の病原体として単離されている。*Pcal*、*Psm* とともにアブラナ科植物に広く感染するが、*Pcal* はエンバクやチモシーなどイ

ネ科植物へも病原性を有する点や細菌学的性状において *Psm* とは異なったグループであることが示されている (Cintas et al., 2002; Bull et al., 2010)。双子葉類と単子葉類を共に宿主にする *Pcal* の病原性メカニズムを理解することは、宿主範囲決定の理解に役立つと考えられる (Sarris et al., 2013)。私たちは、*Pcal* の病原性において重要な役割を担っている病原力因子を網羅的に把握することを目的とし、*Pcal* のトランスポゾン挿入ライブラリーを用いた変異株スクリーニング系を確立し、病原力低下変異株をフォワードスクリーニングにより選抜することで、*Pcal* の病原力因子を網羅的に同定することを目指した。トランスポゾン挿入変異株変異株 1,040 株の浸漬接種によるスクリーニングの結果、53 株が病原力低下を示した。変異遺伝子を同定した結果、発病に特異的な病原力因子であるⅢ型分泌装置をコードする遺伝子だけでなく、細菌の生存生育に必須と考えられる基礎的な病原力因子であるアミノ酸代謝、運動能力関連因子、多剤排出ポンプ、ストレス耐性などに関わる因子をコードする遺伝子も含まれていた。これらの結果は、基礎的な病原力因子が、*Pcal* の病原力に大きく寄与していることを示唆している (Sakata et al., 2019)。

1-2. *P. syringae* pv. *actinidiae* および *P. savastanoi* pv. *glycinea* の病原力因子の同定

これまでの研究から、キウイフルーツの Flood 接種法 (Ishiga et al., 2020a) を利用して、*Psa3* のトランスポゾン挿入変異株 3,000 株のスクリーニングを行い、91 株の病原力低下株を同定した。変異遺伝子を網羅的に明らかにした結果、それらの病原力遺伝子の中には、主要な病原力因子として知られているⅢ型分泌装置、エフェクターだけでなく、アミノ酸代謝、運動能力関連因子、転写調節因子などをコードする遺伝子が含まれていた (未発表; 石賀ら, 2021)。エフェクターの中には、HopR1 や AvrE1 などの *Psa3* の病原力において重要な役割を担うことが知られているものも含まれていた (Jayaraman et al., 2020)。同様に、*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) においてもスクリーニングを実施した。*Psg* によるダイズ斑点細菌病は、世界のダイズ生産地で発生し、最大で 40% の減収を引き起こすことが知られている (Prom and Venette, 1997)。*Psg* の病原力因子を同定するために、シリンジ接種により *Psg* のトランスポゾン挿入変異株 1,000 株のスクリーニングを行い、病原力低下株における変異遺伝子を網羅的に同定した。シリンジ接種によりスクリーニングした *Psg* の変異株の多くは、植物毒素コロナチン生合成関連遺伝子にトランスポゾンの挿入が認められた (Nguyen, et al., 2021)。

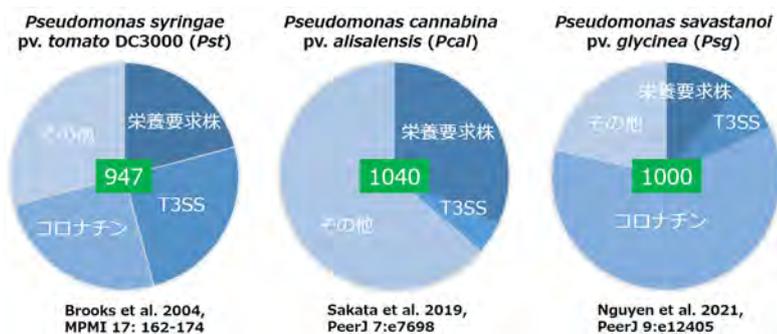


図 1. *Pseudomonas* 属細菌の病原力因子の比較

1-3. スクリーニングから得られた *Pseudomonas* 属細菌の病原力因子の比較

Brooks ら (2004) によるシロイヌナズナでの 947 変異株を浸漬接種したスクリーニングの結果では、Ⅲ型分泌装置と植物毒素コロナチンに関連する変異株が大多数を占

めていた (図 1)。それに対して、私たちの *Pcal* による浸漬接種の結果では、そのような傾向は認められなかった (Sakata et al., 2019)。加えて、シリンジ接種を行った *Psg* の結果では、大多数の変異株がコロナチン生合成に関係していた (Nguyen et al., 2021)。これらを比較してみると、*Pst* と *Pcal* および *Psg* での変異株スクリーニングの結果に類似性は全くなく、それぞれの病原細菌が独自の病原性機構を保持していることを示唆している。

1-4. *Pcal* の病原力因子の感染における機能

葉に対して病徴を引き起こす *Pseudomonas* 属細菌の感染は、①植物への付着、②気孔からの侵入、③細胞間隙での増殖、④病徴の進展という流れで進行する (図 2)。気孔侵入までの①と②の過程 (Epiphytic phase, 植物表生環境) と、植物細胞間隙での③と④の過程 (Endophytic phase, 植物内生環境) では、必要な病原力因子が異なることが予想される。そこで、病原力因子が機能する場所を解明するために、*Pcal* 変異株のシリンジ接種を行った。①と②の過程 (植物表生環境) をスキップし、細胞間隙への注入を行うシリンジ接種を行った場合、病原力が低下しない変異株の原因遺伝子は、侵入までの①と②の過程において機能することが予想される。それに対して、シリンジ接種においても病原力が低下する変異株の原因遺伝子は、③と④の過程においても重要であるということが言える。実際に、*Pcal* をシリンジ接種することにより病原力が低下した変異株は 53 株中 9 株だった (図 3) ことから、*Pcal* の病原力因子の多くが、植物体への侵入までの①と②の過程に必要であることが明らかとなった (Sakata et al., 2020a)。

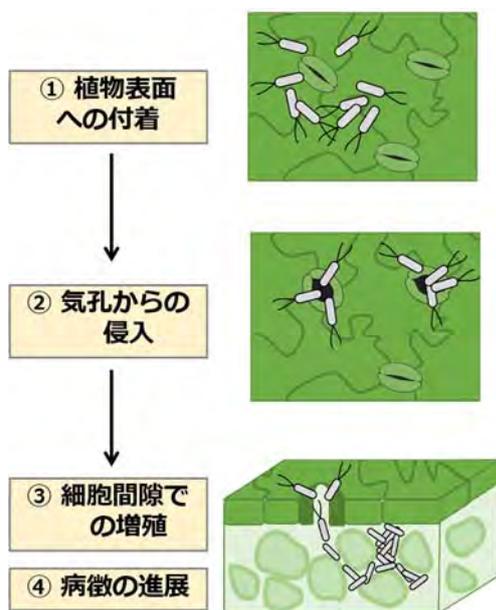


図 2. *Pseudomonas* 属細菌の感染過程

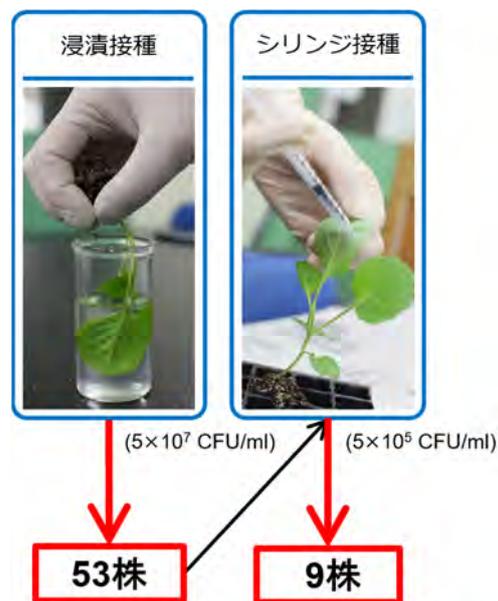


図 3. *Pcal* 変異株スクリーニングの概要

2. *Pcal* の感染に必要な病原力因子の解析

これまでの研究から、III 型分泌装置およびエフェクターは、*Pseudomonas* 属細菌の病

原性において必須な因子であることが明らかになっている。私たちが進めているトランスポゾン挿入変異株を利用した *Pseudomonas* 属細菌の変異株のスクリーニングにおいても、III 型分泌装置およびエフェクターをコードする遺伝子が同定されている。そして、いずれの変異株においても病原力の顕著な低下が認められた。さらに、私たちの研究から、III 型分泌装置だけでなく、様々な病原因子が感染時に重要な役割を担っていることが明らかになった。ここでは、それらの機能解析を実施した例について紹介したい。

2-1. 植物毒素コロナチン

Pcal の感染時の細菌の局在を蛍光ラベルにより可視化したところ、キャベツおよびエンバクにおいて *Pcal* が気孔腔 (Stomatal chamber) で増殖していることを確認した。これらの結果から、*Pcal* は主に気孔から侵入していると考えられた。そこで、気孔の再開口に寄与することが知られているコロナチンの *Pcal* の病原力における役割の解明を目的としてコロナチン生産変異株の解析を行った。コロナチン生産変異株は、浸漬接種およびシリンジ接種の両接種法において野生株と比較して顕著な病原力低下が認められた。さらに、キャベツとエンバクの両宿主に対して、コロナチンは気孔の再開口を誘導するとともに、植物内でのサリチル酸の蓄積の抑制に寄与することが明らかになった (Sakata et al., 2021a)。これらの結果から、*Pcal* の病原力において、コロナチンは侵入前抵抗性および侵入後抵抗性の抑制に寄与していることが示唆された。

2-2. アミノ酸代謝

Pcal のトランスポゾン挿入変異株を用いたスクリーニングにより同定されたトリプトファン生産変異株 (*trpA* 変異株) は、浸漬接種およびシリンジ接種の両接種法において、キャベツおよびエンバクに対して顕著な病原力低下を示した。また、遺伝子発現解析により、*Pcal* 感染時に、*trpA* 変異株では、タイプIIIエフェクターやコロナチン生合成などの病原力に関連した遺伝子の発現が低下し、トリプトファン合成関連遺伝子の発現が上昇することが明らかになった (Sakata et al., 2021b)。これらの結果から、*Pcal* の感染において、病原因子の生産と増殖に不可欠なトリプトファンの生産との間にトレードオフが存在することが明らかになった。

2-3. トランスポーター

Pcal のトランスポゾン挿入変異株を用いたスクリーニングにより同定された RND 型トランスポーターの解析を行った。RND 型トランスポーター変異株をキャベツに対して浸漬接種を行い、植物内細菌数の有意な低下および病徴の減少を確認した。さらに、アブラナ科植物の抗菌性二次代謝産物に対して、変異株の感受性が高くなっていることが明らかになった (Sakata et al., 2022a)。以上の結果から、RND トランスポーターはキャベツの抗菌性二次代謝産物の排出を介して *Pcal* の病原力に寄与することが示唆された。

3. 植物抵抗性誘導剤の作用機構の解明

植物の病害発生には、病気の三角形 (Disease triangle) を構成する宿主植物、病原体、助長する環境が全て揃うことが条件である。この関係は天秤の釣り合いで考えることが

できる (図 4)。植物は、病原体が植物体内へ侵入し、栄養授受の関係が成立するまでの感染初期に発揮される侵入抵抗性と、侵入後に組織内に増殖および蔓延し、発病までに発揮される侵入後抵抗性を有している。これらの抵抗性が病原力を上回った場合、植物体は病原体の感染を許すことなく、健全である。それに対し、病原体は様々な病原力因子を駆使して、植物の抵抗性を抑え、感染を成立させ発病させる。さらに、環境条件が病原体に有利な条件であれば、発病が起こる。裏を返せば、これらの要素が1つでも欠ければ発病を防ぐことが可能である。そこで、病原細菌による発病を防ぐ方法として、次の3つの方法が考えられる：①病原細菌の病原力を抑制する、②植物の抵抗性を促進する、③植物側に有利な環境条件にする。私たちは特に、②植物の抵抗性を促進する、に着目して研究を進めてきた。植物の抵抗性を活性化する薬剤として、既にいくつかの植物抵抗性誘導剤が日本でも使用されている。その中でも、*Pcal* による黒斑細菌病の防除法として現在は実用化されており (2020年2月10日より長野県・群馬県において、はくさい・キャベツに対して販売開始)、その細菌病における薬剤作用機構の詳細な分子機構が未解明であったアシベンゾラル S-メチル (ASM) の作用機構の解明に取り組んできた。ここでは、私たちが明らかにした植物抵抗性誘導剤の作用機構について紹介したい。

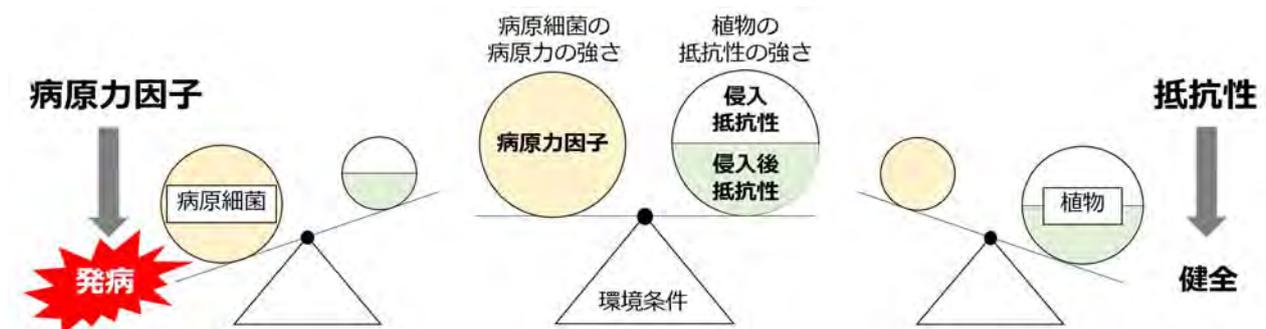


図 4. 病原細菌と植物との攻防を示した相互作用天秤

3-1. アシベンゾラル S-メチル (ASM) は植物の気孔防御を活性化する

ASM の土壌灌注処理によりキャベツにおいて黒斑細菌病の病徴の進展および植物内細菌数の抑制が見られた。また、ASM が処理 2 時間後という非常に早い段階で防除効果を示したことから、*Pcal* の感染過程の初期段階である侵入の過程に作用しているのではないかと考え、気孔の観察を行った。その結果、ASM 処理により気孔防御が活性化されていることが明らかになった。さらに、ASM 土壌灌注処理により細菌の植物内への侵入細菌数が約 100 倍抑制されていた。この結果は、気孔の閉鎖が気孔侵入の細菌にとって有効な防御応答であることを示唆している。これらの結果から、ASM は気孔の閉鎖を誘導することで *Pcal* の植物内への侵入を阻害し、*Pcal* による病害防除に寄与していることが示唆された。これらの結果から、ASM の細菌病防除における新規な作用機構が解明された (Ishiga et al., 2020b)。

次に、*Pcal* による黒斑細菌病細菌病に対して、ASM だけでなくプロベナゾール (PBZ) を用いて防除効果を検証したところ、ASM および PBZ の土壌灌注処理により

黒斑細菌病の病徴の進展が抑制され、植物内細菌数の抑制が見られた。ASM および PBZ は、*Pcal* に対する気孔防御を活性化したが、ASM のみが土壌灌注処理 4 時間以内に気孔防御を誘導した。このように、ASM と PBZ はキャベツの *Pcal* に対する気孔防御を活性化するが、その誘導速度が異なることが解明された (Ishiga et al., 2021)。

Pcal はキャベツだけでなく広くアブラナ科植物に感染し、黒斑細菌病を引き起こすことから、次に、ダイコンに対する ASM の防除効果を検証した。ダイコンでは、第 4 葉に対して ASM を葉面浸漬処理し、処理葉と未処理の第 3 葉と第 5 葉での効果を検証した。その結果、ASM の葉面浸漬処理により、ASM 処理葉および未処理葉において病害抑制がみられた。さらに、ASM 処理葉だけでなく、未処理葉においても *Pcal* に対する気孔防御が活性化されていた (Sakata et al., 2020b)。

3-2. ASM による侵入後抵抗性活性化の検討

ASM 処理による気孔防御の活性化が *Pcal* の感染抑制に非常に有効であることが示された。そこで次に、ASM が侵入後抵抗性の活性化にも寄与しているのかを検証するため、植物内に直接 *Pcal* を打ち込むシリンジ接種を行なった。その結果、ASM 処理 4 時間後には、病徴抑制および細菌数の低下は見られなかった。一方、ASM 処理 1 週間後には、病徴の抑制および植物内細菌数の有意な低下が見られた。これらの結果から、ASM は侵入後抵抗性の活性化にも寄与しているが、その抵抗性活性化は気孔防御の活性化よりも遅れて誘導されることが明らかとなった。同様に、私たちはイネ科のベントグラスにおいても、ASM は気孔防御だけではなく、侵入後抵抗性の活性化に寄与していることを明らかにしている (Sakata et al., 2021c)。

3-3. アシベンゾラル酸による全身抵抗性の誘導

ASM は *Pcal* によるアブラナ科植物黒斑細菌病に防除効果を示し、さらにキャベツでの土壌灌注処理においても、ダイコンでの葉面浸漬処理においても、全身抵抗性を誘導することが明らかになった。そこで、次に、ASM による全身抵抗性を誘導する代謝物質の定量解析を実施した。ここでは、ASM 処理後の ASM とその誘導体であるアシベンゾラル酸を時空間的に定量した。その結果、キャベツの ASM 土壌灌注処理後、アシベンゾラル酸は根、茎、葉で検出されたが、ASM はキャベツの葉では検出されなかった。さらに、ダイコンに ASM を葉面浸漬処理後、アシベンゾラル酸が未処理葉で検出された。これらの結果は、アシベンゾラル酸が処理部位から移動し、キャベツとダイコンで ASM による全身抵抗性を誘発する代謝物質であることを示唆している (Sakata et al., 2022b)。

4. 気孔開口幅、細菌の初期侵入数および病徴発現の相関解析

これまでの研究から、*Pcal* を含めた *Pseudomonas* 属細菌の多くの病原力因子が侵入前に重要であることが明らかになった。さらに、ASM 土壌灌注処理により、気孔防御が活性化され、細菌の植物内への侵入数が抑制された結果、病徴発現が抑制されていた。ここでは、気孔開口幅、細菌の初期侵入数および病徴発現の相関関係の解析について紹介したい。

4-1. 気孔開口幅と細菌の初期侵入数は相関する

キャベツとキャベツ黒斑細菌病菌 (*Pcal*)、トマトとトマト斑葉細菌病菌 (*Pst*) およびタバコとタバコ野火病菌 (*P. amygdali* pv. *tabaci*) の相互作用を利用して、気孔開口幅と細菌の初期侵入の相関関係を解析した。相対湿度を変化させることにより植物の気孔開口幅を制御した状態において、その植物に細菌をスプレー接種し、接種4時間後における植物内細菌数を測定した。その結果、全ての相互作用において、気孔開口幅と細菌の初期侵入数について正の相関が認められた (Sakata et al., 2022c; Sakata et al., 2022d)。

4-2. 細菌の初期侵入数と病徴発現は相関する

気孔開口幅と細菌の初期侵入数について正の相関が認められたことから、次に、初期侵入数と病徴発現の相関を解析した。 5×10^3 、 5×10^4 、 5×10^5 、 5×10^6 CFU/mL に調整した細菌懸濁液をシリンジ接種し、その後の植物内細菌増殖数の測定と病徴を観察した。その結果、細菌接種濃度と細菌増殖最高値について正の相関が認められた。さらに、細菌接種濃度が高いほどより激しい病徴発現を誘導した (Sakata et al., 2022c; Sakata et al., 2022d)。これらの結果は、細菌の初期侵入と病徴発現が相関することを示唆している。

5. 細菌侵入前に効果を発揮する植物保護資材の探索

Pcal に対する防除には、抗生物質や銅剤が使用されているが、既に *Pcal* 耐性菌が報告されており (Takahashi et al., 2013)、有効で持続可能な防除法の開発が喫緊の課題である。ここでは、私たちが実施しているキャベツ黒斑細菌病の防除に資する植物保護資材の探索について紹介したい。

5-1. アミノ酸による植物抵抗性誘導機構の解析

Pcal を浸漬接種した際には、複数のアミノ酸の葉面処理により、病徴形成および植物内細菌数の低下が認められた。しかし、シリンジ接種では、いずれのアミノ酸においても防除効果は認められなかった。さらに、気孔防御の解析を行った結果、多くのアミノ酸が気孔開口幅の減少に寄与することが明らかになった。加えて、*Pcal* に対する防除効果を示したシステイン、グルタミン酸、リシンによる気孔開口幅の減少は、植物内への細菌侵入数の有意な低下をもたらした (Sakata et al., 2022c)。以上の結果から、気孔の開口幅を調節することは細菌病防除のターゲットとなりうることを示唆された。

5-2. セルロースナノファイバーによるキャベツ黒斑細菌病の防除

これまでの研究から、セルロースナノファイバー (CNF) がダイズさび病の抑制に寄与することが明らかになっている (Saito et al., 2021)。そこで、*Pcal* による黒斑細菌病における CNF 処理の防除効果の検討を行った。その結果、スプレー接種した際に、CNF 処理による病徴および植物内細菌数の低下が認められた。一方で、シリンジ接種した際には、CNF 処理による発病抑制は認められなかった。これらの結果から、CNF 処理は *Pcal* の植物侵入前の感染過程で防除効果を発揮することが示唆された。さらに、CNF 処理に

よりキャベツ葉面の疎水度が低下することが明らかになった。加えて、CNF 処理による葉面性質の変化は、*Pcal* の病原力関連遺伝子の発現低下をもたらすことが明らかになった。特に、べん毛タンパク質遺伝子 *fliC* の発現低下により、細菌の運動能が低下し、植物内への細菌侵入数が有意に減少することを明らかにした (Sakata et al., 2022e)。以上の結果から、葉面性質の改変は細菌病防除のターゲットとなりうることが示唆された。

おわりに

Pseudomonas 属細菌の感染過程では、これまで研究が進められてきた III 型分泌装置やエフェクターだけでなく、多様な病原力因子が関与していることを明らかにした。さらに、多くの病原力因子が植物表面から気孔侵入までの過程において重要な役割を持つことが見えてきた。そして、植物抵抗性誘導剤が気孔防御を活性化することにより、細菌の植物内侵入を抑制していることを明らかにした。加えて、気孔開口幅と細菌初期侵入数について正の相関を見出し、アミノ酸による気孔閉鎖による細菌病防除の可能性について提示することができた。これら一連の研究から、*Pseudomonas* 属を含めた葉面感染する細菌に対して、気孔侵入までの段階での防除の重要性が考えられる。現在行われている殺菌剤や抗生物質を使用した防除では、植物と細菌が共生することは難しい。そこで、今後は植物抵抗性誘導剤による積極的な気孔防御の活性化だけでなく、アミノ酸などの天然物による気孔防御の活性化やセルロースナノファイバーなどによる葉面性質の改変を含めた、細菌と植物が共生できる環境作りを目指した総合的防除法の開発が望まれる。私たちが目指している植物と細菌との共生関係における「ナッシュ均衡」を深く理解することが可能になれば、新たな微生物制御技術の開発、さらには植物保護技術の開発に貢献できると信じている。

謝辞

細菌菌株を分譲いただきました長野県蔬菜花卉試験場および農業生物資源ジーンバンクに御礼申し上げます。本研究は、科学研究費補助金、JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト、Syngenta Japan 株式会社、丸紅株式会社および中越パルプ株式会社からの支援を受けて実施した。

引用文献

- Brooks, D.M., Hernández-Guzmán, G., Kloek, A.P., Alarcón-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Peñaloza-Vázquez, A., Bender, C.L. and Kunkel, B.N. (2004) Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 162-174.
- Ishiga, T., Ishiga, Y., Betsuyaku, S. and Nomura, N. (2018) AlgU contributes to the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by regulating phytotoxin coronatine production. *J. Gen. Plant Pathol.* 81:189–201.
- Ishiga, T., Sakata, N., Nguyen, V. T. and Ishiga, Y. (2020a) Flood-inoculation of seedlings on culture medium to study interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and kiwifruit. *J. Gen. Plant Pathol.* 86: 257–265.
- Ishiga, T., Iida, Y., Sakata, N., Ugajin, T., Hirata, T., Taniguchi, S., Hayashi, K. and Ishiga, Y. (2020b) Acibenzolar-

- S-methyl activates stomatal-based defense against *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* in cabbage. *J. Gen. Plant Pathol.* 86: 48–54.
- Ishiga, T., Sakata, N., Ugajin, T. and Ishiga, Y. (2021) Acibenzolar-S-methyl and probenazole control bacterial blight disease of cabbage by activating stomatal-based defense in different timing manners. *J. Gen. Plant Pathol.* 87: 30–34.
- Ishiga, Y. and Ichinose, Y. (2016) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* OxyR is required for virulence in tomato and *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29: 119–131.
- Jayaraman, J., Yoon, M., Applegate, E.R., Stroud, E. A. and Templeton, M. D. (2020) AvrE1 and HopR1 from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* are additively required for full virulence on kiwifruit. *Mol. Plant Pathol.* 21: 1467–1480.
- Nguyen, V. T., Sakata, N., Usuki, G., Ishiga, T., Hashimoto, Y. and Ishiga, Y. (2021) Multiple virulence factors regulated by AlgU contribute to the pathogenicity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean. *PeerJ.* 9:e12405.
- Prom, L. K. and Venette, J. R. (1997) Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on commercial soybean in Eastern North Dakota. *Plant Dis.* 81: 541–544.
- Saito, H., Yamashita, Y., Sakata, N., Ishiga, T., Shiraishi, N., Usuki, G., Nguyen, V. T., Yamamura E. and Ishiga, Y. (2021) Covering soybean leaves with cellulose nanofiber changes leaf surface hydrophobicity and confers resistance against *Phakopsora pachyrhizi*. *Front. in Plant Sci.* 12: 726565.
- Sakata, N., Ishiga, T., Saito, H., Nguyen, V. T. and Ishiga, Y. (2019) Transposon mutagenesis reveals *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* optimizes its virulence factors for pathogenicity on different hosts. *PeerJ.* 20;7: e7698.
- Sakata, N., Ishiga, T. and Ishiga, Y. (2020a) Transposon and deletion mutagenesis of *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* identifies genetic forces driving pathogenicity. *Plant Health 2020 abstract.*
- Sakata, N., Ishiga, T., Taniguchi, S. and Ishiga, Y. (2020b) Acibenzolar-S-methyl activates stomatal-based defense systemically in Japanese radish. *Front. in Plant Sci.* 11: 565745.
- Sakata, N., Ishiga, T., Masuo, S., Hashimoto, Y. and Ishiga, Y. (2021a) Coronatine contributes to *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* virulence by overcoming both stomatal and apoplastic defenses in dicot and monocot plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 34: 746–757.
- Sakata, N., Ishiga, T., and Ishiga, Y. (2021b) *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* TrpA is required for virulence in multiple host plants. *Front. in Microbiol.* 12: 659734.
- Sakata, N., Ishiga, T., Aoyagi, T. and Ishiga, Y. (2021c) Acibenzolar-S-methyl efficacy against bacterial brown stripe caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in creeping bentgrass. *J. Gen. Plant Pathol.* 87: 387–393.
- Sakata, N., Haraguchi, T., Masuo, S., Ishiga, T. and Ishiga, Y. (2022a) *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* virulence factors are involved in resistance to plant-derived antimicrobials during infection. *Plants.* 11: 1742.
- Sakata, N., Masuo, S., Nagayoshi, R., Ishiga, T., and Ishiga, Y. (2022b) Translocation of acibenzolar, an active metabolic substance of acibenzolar-S-methyl, to distal leaves in cabbage and Japanese radish. *J. Gen. Plant Pathol.* 88: 392–398.
- Sakata, N., Ino, T., Hayashi, C., Ishiga, T. and Ishiga, Y. (2022c) Controlling stomatal aperture, a potential strategy for managing plant bacterial disease. *Plant Science.* In press. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111534>
- Sakata, N., Saito, D. and Ishiga, Y. (2022d) Correlations among stomatal aperture width, bacterial entry, and disease

symptoms. JSOL2022 abstract.

- Sakata, N., Shiraishi, N., Saito, H., Komoto, H., Ishiga, T., Usuki, G., Yamashita, Y. and Ishiga, Y. (2022e) Covering cabbage leaves with cellulose nanofiber confers resistance against *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*. J. Gen. Plant Pathol. In press. <https://doi.org/10.1007/s10327-022-01105-1>
- Sarris, P. F., Trantas, E. A., Baltrus, D. A., Bull, C. T., Wechter, W. P., Yan, S., Ververidis, F., Almeida, N. F., Jones, C. D., Dangl, J. L., Panopoulos, N. J., Vinatzer, B. A. and Goumas, D. E. (2013) Comparative genomics of multiple strains of *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*, a potential model pathogen of both monocots and dicots. PLoS One 8: e59366.
- Schreiber, K. J., Ye, D., Fich, E., Jian, A., Lo, T. and Desveaux, D. (2012) A high-throughput forward genetic screen identifies genes required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 on Arabidopsis. PLoS ONE 7(8): e41461.
- Takahashi, F., Ochiai, M., Ikeda, K. and Takikawa, Y. (2013) Streptomycin and copper resistance in *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* (abstract in Japanese). Jpn J Phytopathol 79:35.
- Xin, X.F. and He, S.Y. (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. Annu. Rev. Phytopathol. 51: 473-98.
- 石賀貴子, 坂田七海, 臼杵義侑, 石賀康博 (2021) キウイフルーツかいよう病菌 biovar3 の病原力因子の探索(5). 令和3年度日本植物病理学会大会要旨

ファイトプラズマによる葉化病の普遍的分子機構

前島健作・北沢優悟・岩渕 望・大島研郎*・難波成任・山次康幸

Maejima, K., Kitazawa, Y., Iwabuchi, N., Oshima, K. *, Namba, S. and Yamaji, Y.

The universal molecular mechanism of phyllody diseases caused by phytoplasmas

Abstract

Phytoplasmas ('*Candidatus Phytoplasma*' spp.) are a group of nonculturable pathogenic bacteria that parasitize plant phloem through insect vectors. Phyllody diseases, in which flowers turn into leaves, are common in phytoplasma infections and have been of much interest for at least a thousand years. However, the mechanism of phyllody diseases has been unknown. Through a series of studies, we have found the following: (1) Phyllogen, a family of phytoplasma secreted proteins, binds to and degrades MADS-box transcription factors (MTF) conserved in plants *via* the proteasome, leading to phyllody. (2) Phyllogen can be found in a wide range of phytoplasmas. (3) Phyllogen can bind to and degrade MTF from a wide variety of plants. (4) Phyllogen targets a highly conserved tetramerization region in plant MTF. (5) Phyllogen-mediated MTF degradation involves a previously unknown molecular mechanism of proteasomal degradation of proteins without the need for ubiquitin. The above findings have revealed a universal molecular mechanism of phytoplasma-induced phyllody diseases.

Key words: Phytoplasma, Phyllody, Phyllogen, MADS-box transcription factor, RAD23, Ubiquitin-proteasome system, Effector

はじめに

ファイトプラズマ ('*Candidatus Phytoplasma*' spp.) は昆虫の媒介により植物の篩部に寄生する難培養性の病原細菌の一群で、これまでに約 50 種が報告されている。ファイトプラズマに感染した植物では、いくつかの特徴的な形態異常 (葉化、てんぐ巣、黄化、萎縮など) が観察される (Namba, 2019)。中でも花が葉に変化する葉化病には、病害のみならず鑑賞の対象としても多くの関心が持たれてきた。葉化病の最古の記録 (ファイトプラズマ病の最古の記録でもある) は約一千年前の中国にさかのぼり、ファイトプラズマ

東京大学大学院農学生命科学研究科 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

*法政大学生命科学部応用植物科学科 Department of Clinical Plant Science, Faculty of Bioscience and Applied Chemistry, Hosei University, 3-7-2, Kajino-cho, Koganei, Tokyo 184-8584, Japan

に感染し緑色の花を咲かせる牡丹は、最も貴重で美しい品種とされ毎年の朝貢品だった (Wang and Maramorosch, 1988)。また、ファイトプラズマの感染により葉化した紫陽花は、緑花品種として珍重され国内で近年まで流通していた。これらの事実は、時代や地域を超えて葉化病が人々を魅了してきたことを端的に示している。

一見、花と葉はまったく異なる組織だが、実際には葉が各花器官 (がく片、花弁、雄ずい、雌ずい) に変化することで花が形成される。そのメカニズムは植物に広く保存され、A・B・C・Eクラスに分類される4種類のMADSボックス転写因子 (MTF) の組合せからなる「カルテットモデル」の働きによりそれぞれの花器官への分化が誘導される。

当研究室では以前から葉化病に関心を持ち、葉化病により花が葉に転換した組織において、葉と同様の篩部が新たに形成されファイトプラズマの寄生を受けることや (Arashida *et al.*, 2008)、ABCEクラスのMTFを含む複数の植物因子のmRNA発現が異常になることを明らかにしていた (Himeno *et al.*, 2011)。当時、葉化病には花器官の分化メカニズムが関わると推測されたものの、実際の分子機構は不明だった。

当研究室では世界に先駆けて解読したファイトプラズマ OY 系統の全ゲノム情報 (Oshima *et al.*, 2004) に基づいて、てんぐ巢症状を誘導する病原性因子「tengu」を見出していた。葉化症状

(phyllody) の誘導にも仮定の病原性因子「phyllogen」(phyllody-inducing gene。以下、ファイロジェン) が関わると想定し探索を進めていたところ、近縁のファイトプラズマ系統の分泌タンパク質SAP54が花の形態異常を引き起こすとの報告がなされた (MacLean *et al.*, 2011)。そこで筆者らは、この研究を手がかりとして、ファイトプラズマによる葉化病の分子機構解明に向けて一連の研究をおこなってきた。まだ道半ばではあるものの、この機会をひとつのマイルストーンとして、これまでに得られた知見を解説したい。

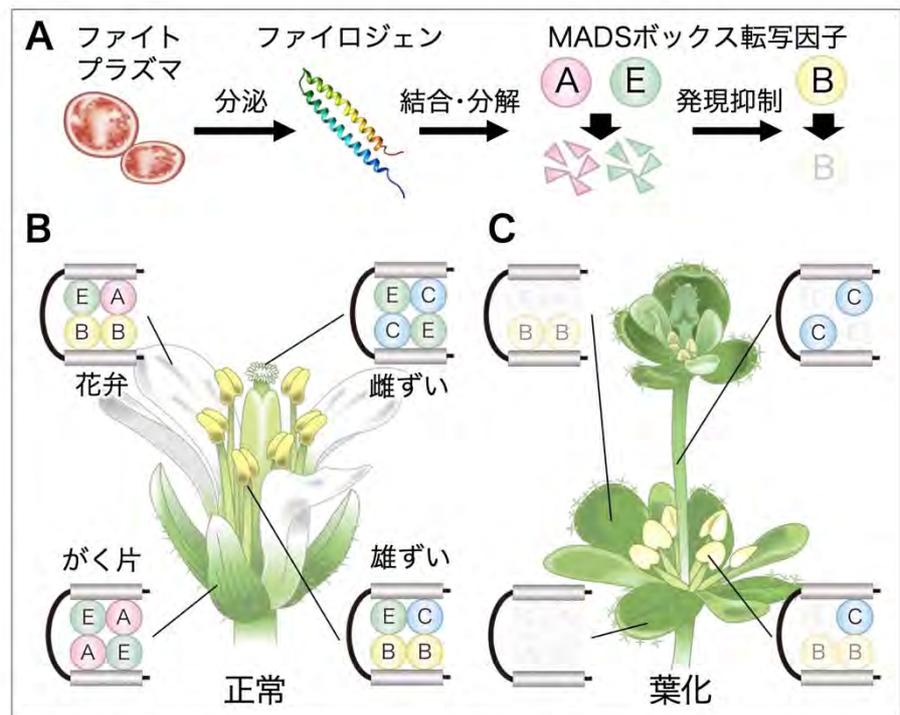


図1. ファイロジェンによる葉化誘導の分子機構

A. ファイトプラズマが分泌するファイロジェンタンパク質は、AクラスおよびEクラスのMADSボックス転写因子 (MADS-box transcription factor, MTF) に結合してプロテアソーム経路を介して分解を誘導する。AおよびEクラスのMTFの分解に伴い、下流のBクラスのMTFの遺伝子発現が抑制される。B. カルテットモデル。MTFが形成する四量体の組合せで、それぞれの花器官への分化が誘導される。C. ファイロジェンによる葉化誘導のモデル。各花器官の葉化の程度は、ファイロジェンがカルテットモデルを構成する各MTFに与える影響の程度で決まると考えられる。

1. 葉化の標的となる普遍的宿主因子 MTF

最初に葉化病の標的となる宿主因子の解明を試みた。まず、OY 系統のゲノム情報より SAP54 と相同な分泌タンパク質 PHYLoY を見出した。N 末端のシグナル配列を除く 91 アミノ酸をシロイヌナズナに発現させたところ花の葉化が引き起こされ、ファイロジェンとして働くことが示された。その表現型は、A・E クラスの MTF 変異体に類似しており、下流遺伝子の発現パターンからも A・E クラスの MTF の働きが失われていることが示唆されたが、興味深いことに、A・E クラスの MTF の mRNA 発現量は PHYLoY による影響を受けていなかった。そこで、タンパク質レベルでの相互作用を調べたところ、PHYLoY が A・E クラスの MTF に対して結合し、さらには分解する働きを持つことが明らかになった (Maejima *et al.*, 2014; 2015)。また、阻害剤を用いて分解機構を調べた結果、宿主が持つプロテアソームの関与が明らかになった。図 1 はこれらの結果をもとに当時予想した葉化のメカニズムで、現在もこのモデルは支持されている。

2. 葉化のファイトプラズマにおける普遍性

葉化はファイトプラズマ病に共通する病徴だが、ファイロジェン遺伝子のごく一部のファイトプラズマで見出されておらず、ファイトプラズマ属全体における葉化病の病原性因子と呼べるのかは不明だった。そこで、幅広いファイトプラズマからファイロジェン遺伝子の探索を試み、配列および機能の保存性について解析した。まず、ファイロジェン遺伝子の探索のため、ゲノム情報から既報のファイロジェン遺伝子と相同性の高い配列を検索する手法に加えて、以下の 2 つを開発した。①ファイロジェン遺伝子周辺に存在する転移性遺伝子クラスター (Potential Mobile Unit, PMU) を標的とする PCR-サザンハイブリダイゼーション法 (Maejima *et al.*, 2014)。②ファイロジェンに保存された 2 つの α ヘリックス (4 章で解説) を標的とする PCR-ゲノムウォーキング法 (Iwabuchi *et al.*, 2020)。これらの手法により、これまでに 11 種 59 系統の幅広いファイトプラズマからファイロジェンが見いだされた。ファイロジェンの全長配列を用いて配列同一性を算出したところ、塩基では 66.7-100%、アミノ酸では 44.1-100%で、ファイロジェン遺伝子は配列多様性に富むことが明らかとなった (Iwabuchi *et al.*, 2020)。そこで、ファイロジェン遺伝子の塩基配列に基づいて系統樹を作製したところ、その系統関係は 16S rRNA 遺伝子の系統関係と一致せず、4 グループ (phyl-A, -B, -C, -D と命名) に分かれた。興味深いことに、同種に属するファイトプラズマ系統間でも、異なるグループのファイロジェンを持つ場合があった。以上の結果は、ファイロジェン遺伝子がファイトプラズマ属のゲノムに広く分布しているものの、ゲノムの進化とは独立に進化を遂げていることを示唆している (図 2)。

次に、各グループのファイロジェンを用いて、機能の保存性を検証した (Iwabuchi *et al.*, 2020)。葉化誘導能の検証にはシロイヌナズナで任意の外来遺伝子を発現できるよう改変したタバコ茎えそウイルス (TRV) ベクターを用いた。その結果、phyl-A、-C、-D グループのファイロジェンは、いずれも葉化誘導能が認められた一方で、phyl-B グループに属するファイロジェンはいずれも葉化誘導能を失っていた (図 2)。また、葉化誘導能をもつファイロジェンはいずれもシロイヌナズナの A・E クラス MTF の分解を誘導したが、phyl-B グループに属する PHYLSY はほとんど分解を誘導しなかった。MTF との結合

能を比較したところ、葉化誘導能をもつファイロジェンはいずれも MTF との結合能を維持していた。一方で、**phyl-B** グループのファイロジェンはいくつかの MTF との結合能が低下していた。以上より、葉化誘導能はファイロジェンファミリーに基本的に保存されているものの、**phyl-B** グループは MTF と結合し分解を誘導する活性が低下したために、葉化誘導能を喪失したことが示された。

3. 葉化の植物における普遍性

前章までで、ファイロジェンがファイトプラズマに幅広く保存されていることが明らかになった。しかし、ファイトプラズマは双子葉植物・単子葉植物を問わず被子植物全般に感染し葉化病を引き起こすため (Chaturvedi *et al.*, 2010)、モデル植物のシロイヌナズナを用いた研究だけでは、多様な植物における葉化病の原因を明らかにしたことはならない。そこで、リンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) ベクター (Li *et al.*, 2004) を用いて、ファイロジェンをナス科 (ペチュニア、*Nicotiana benthamiana*)、キク科 (ヒマワリ、アスター)、ゴマ科 (ゴマ) などの双子葉植物に発現させたところ、いずれの植物にも花器官の葉化が誘導された (図 3) (Kitazawa *et al.*, 2017)。

さらに、ファイロジェンが複数の双子葉植物 (ペチュニア、キク)、単子葉植物 (イネ、ユリ) の A・E クラス MTF に結合し、その分解を誘導することも示された。従って、ファイロジェンは被子植物の A・E クラス MTF を遍く標的としており、その分解を介して

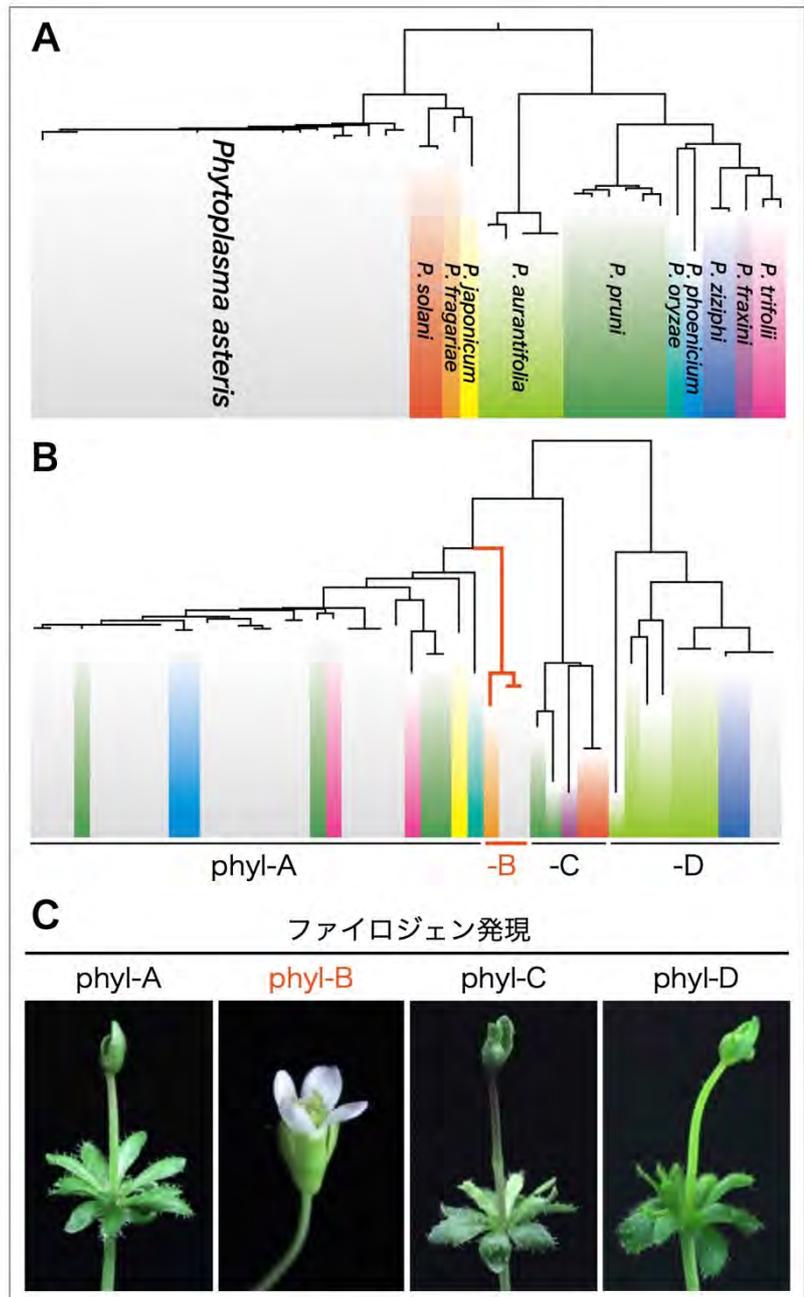


図2. 葉化のファイトプラズマにおける普遍性と多様化
A. ファイトプラズマと **B.** ファイロジェンの分子系統樹。背景の色はそれぞれのファイトプラズマの種を表す。ファイトプラズマの進化に対してファイロジェンの進化は独立に起きている。これはファイロジェンがファイトプラズマ間を水平移動したためと考えられる。ファイロジェンは4グループに分かれていた。 **C.** TRVベクターを用いて各グループのファイロジェンを発現させたシロイヌナズナの花。 **phyl-B**グループ (橙色) は葉化を誘導しない。

植物普遍的に葉化病を誘導すると考えられた。ファイトプラズマ属におけるファイロジェンの高い保存性と併せると、様々なファイトプラズマが様々な植物に引き起こす葉化病は、ファイロジェンという一つの病原性因子ファミリーに起因していることが強く示唆される。

ファイロジェンはどのようにして、幅広い植物の MTF を認識するのだろうか？興味深いことに、花を持たない裸子植物やシダ植物がもつ A・E クラスに近縁な MTF に対しても、ファイロジェンは結合し分解を誘導する (Kitazawa *et al.*, 2017)。従って、ファイロジェンはこれら MTF に進化的に保存された (おそらくは機能上重要な) 領域を標的としており、それが幅広い植物で機能を発揮できる理由だと考えられた。

4. 構造から迫る標的認識の普遍性

続いてファイロジェンと MTF の結合様式解明に取り組んだ。まず、ファイロジェンの立体構造を明らかにするため、PHYLoY の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した (Iwabuchi *et al.*, 2019)。その結果、PHYLoY は 2 つの α ヘリックス (ヘリックス 1、2) がループで繋がれた coiled-coil 構造を形成し、MTF のもつ 4 つのドメインのうちファイロジェンとの結合に重要な K ドメインの構造と類似していた (図 4)。PHYLoY の以外のファイロジェンについても、ホモロジーモデリング (Iwabuchi *et al.*, 2019) や立体構造解析がおこなわれ (Liao *et al.*, 2020; Aurin *et al.*, 2020)、本構造がファイロジェンファミリーに共通することが支持された。ファイロジェンの 2 つの α ヘリックス構造と機能の関係を明らかにするため、それぞれに 2 アミノ酸を挿入し α ヘリックス構造を維持したまま表面電荷の位置関係を変化させた。その結果、

いずれの α ヘリックスでも 2 アミノ酸挿入により葉化誘導能を含む各機能が失われたため (図 4)、ファイロジェンの機能に 2 つの α ヘリックスが深く関わることを示唆された。



図3. 葉化の植物における普遍性
ALSVベクターによりファイロジェンをさまざまな植物種で発現させた (右側)。いずれも花の葉化が誘導されている。

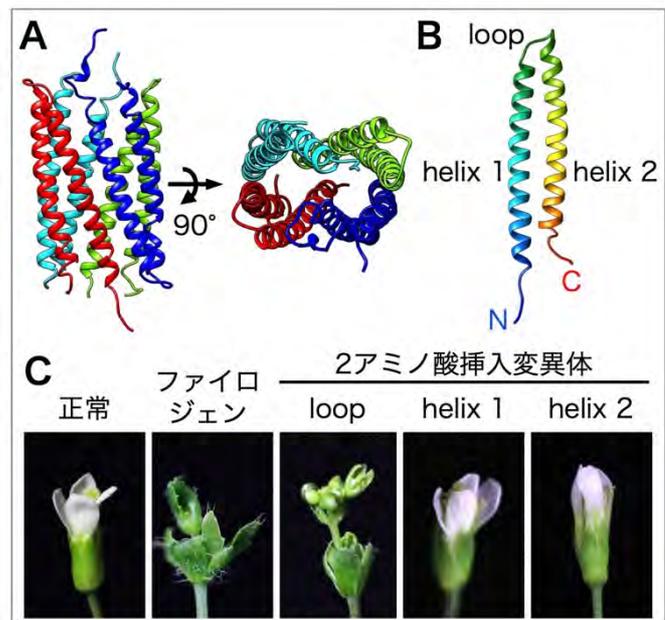


図4. ファイロジェンの立体構造の決定

A. X線結晶構造解析により決定されたファイロジェン4分子からなる立体構造。B. ファイロジェン単量体の構造。2つのヘリックスが短いループで繋がれた構造をとる。C. ファイロジェンの機能における両ヘリックスの重要性。ループへの変異は葉化能に影響しないが、各ヘリックスに変異を入れると葉化能が失われる。

次に、ファイロジェンの機能に重要なアミノ酸を特定するため、ファイロジェンのグループ間で配列を比較した (Iwabuchi *et al.*, 2020)。その結果、各 α ヘリックス表面に露出している 2 つの親水性アミノ酸残基 [30 番目のリジン (K30) と 64 番目のアスパラギン (N64)] が、*phyl-B* グループではそれぞれグルタミン (Q30) およびアルギニン (R64) に置き換わっていた。そこで、*phyl-B* グループのファイロジェンの Q30 および R64 を K30 および N64 に置換したところ、K30 に置換した変異体は花の形態に影響を及ぼさなかったが、N64 に置換した変異体では葉化誘導能を発揮し、両残基を同時に置換した変異体ではより激しい葉化を引き起こした。MTF との結合能を検証したところ、N64 に置換した変異体は A・E クラス MTF との結合・分解能が強まり、K30・N64 に置換した変異体ではより顕著になった。また、*phyl-A*、*-C*、*-D* グループのファイロジェンの K30 および N64 を Q30 および R64 に置換すると逆に葉化誘導能が失われた。以上より、N64 がファイロジェンの葉化誘導能を決定し、K30 はその補助的な役割を担うことが示された。*phyl-B* グループをもつファイトプラズマの感染植物では葉化症状が報告されていないことから、ファイロジェンのわずかなアミノ酸の違いがファイトプラズマ病の病徴を決定している可能性が示唆された (図 5)。

続いてファイロジェンに認識される MTF 上の領域を絞り込んだ。先に述べた通り、ファイロジェンは MTF の K ドメインに結合する。K ドメインは本来、MTF 同士の二量体化、四量体化に関わる。近年、シロイヌナズナの E クラス MTF (SEPALLATA3, SEP3) の K ドメインの立体構造が決定され (Puranik *et al.*, 2014)、二量体化、四量体化に関わる領域がそれぞれ判明していた。そこで各領域に対するファイロジェンの結合活性を解析したところ、四量体化関連領域への結合が明らかとなり、四量体形成に重要な 5 アミノ酸を変異させた SEP3 には結合せず分解の標的とならなかった。このことから、ファイロジェンは、MTF 同士が四量体化する際の結合面を特異的に認識し結合しているのではないかと予想される。近年開発された高精度の立体構造予測プログラム ColabFold (Mirdita *et al.*, 2022) を用いて、ファイロジェンと SEP3 の K ドメインからなる複合体の構造を予測すると、K ドメイン側では四量体形成に関わるアミノ酸を含む領域が、ファイロジェン側では上述した MTF 結合に重要なアミノ酸を含む領域が、相互作用面を形成し、予想と一致した。ファイロジェンの標的となる A・E クラスの MTF において、四量体形成に関わる 5 アミノ酸の保存性は高く、ファイロジェンと標的 MTF との結合様式は構造の観点からも普遍性があると考えられる。



図5. 1アミノ酸多型による病徴決定

ファイロジェングループ間の配列比較により、*phyl-B*グループに特有の 1 アミノ酸変異 (64番目のアミノ酸がアスパラギン [N64: 緑色] からアルギニン [R64: 橙色] に変異) が葉化能を決定していることが示された (N64の場合は葉化誘導能やMTFへの結合・分解活性があるが、R64の場合はそれらの活性を失う)。ファイトプラズマ感染による葉化症状の有無とも相関しているため、ファイロジェンの 1 アミノ酸の違いがファイトプラズマ病の病徴を決定していることが示唆される。

5. プロテアソーム依存的分解の分子機構

プロテアソームによるタンパク質分解は、一般にユビキチン-プロテアソーム系 (Ubiquitin-proteasome system, UPS) と呼ばれる (図 6)。UPS ではまず、複数の酵素の働きで、標的にユビキチンタンパク質が結合する (ユビキチン化)。その後、ユビキチン化タンパク質はプロテアソームと直接結合し分解されるか、ユビキチン化を認識するシャトル分子との結合を介してプロテアソームへと運ばれ分解される (Yu and Matouschek, 2017)。すなわち UPS では、標的タンパク質とプロテアソームとの相互作用をユビキチンが仲介する。宿主のプロテアソームを利用して標的を分解する細菌エフェクターはこれまでに複数知られており、いずれも UPS に準じて標的のユビキチン化を引き起こすことでプロテアソームへ誘導することが報告されている (Kim *et al.*, 2014; Banfield, 2015)。

我々は、ファイロジェン存在下で MTF を免疫沈降させると、沈降物内のユビキチンシグナルが増強されることを見出していた (Maejima *et al.*, 2014)。一方で、ファイロジェンがシャトル分子の一種 RADIATION SENSITIVE23 (RAD23) とも相互作用し、RAD23 が葉化誘導に必要とされることが報告された (MacLean *et al.*, 2014)。そこで、ファイロジェンによる MTF のプロテアソーム依存的分解における、ユビキチンや RAD23 の関わりを明らかにすることとした。

まず、細胞内局在と共免疫沈降により、植物細胞内でファイロジェンが MTF と RAD23 を仲介する形 (MTF/ファイロジェン/RAD23) で三者複合体を形成すること、そして本複合体がプロテアソームと相互作用することが示された (Kitazawa *et al.*, 2022)。この際、MTF ではなくファイロジェンのユビキチン化が認められたが、ユビキチン化されないファイロジェン変異体も MTF 分解活性や葉化誘導能を示したため、ユビキチン化の葉化誘導における役割は限定的と考えられた。三者複合体の形成は、大腸菌でそれぞれのタンパク質を発現・精製して混合した際にも確認されたため、三者はユビキチン非依存的に相互作用することが証明された。また、RAD23 が持つユビキチン結合ドメインの 1 つ (UBA2 ドメイン) が、ファイロジェンの結合領域だった。以上より、ファイロジェンは、ユビキチンに類似した働きにより MTF と RAD23 の結合を仲介し、ユビキチン非依存的にプロテアソームを利用するという新規な標的分解機構を持つことが明らかになった (図 6)。RAD23 は真核生物に幅広く保存されており、ファイロジェンは RAD23 との相互作用を介して、植物普遍的なメカニズムで MTF を分解している可能性が高い。

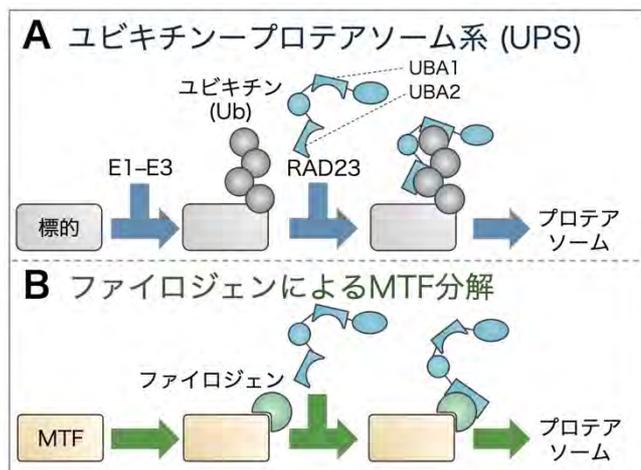


図6. ファイロジェンによるMTFのユビキチン非依存的なプロテアソーム分解の仕組み

A. ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS)。UPS では、標的タンパク質にユビキチンが結合、これを目印としてシャトル分子RAD23のユビキチン結合ドメイン (UBA1, UBA2) がさらに結合することで、標的がプロテアソームへと輸送され、分解される。B. ファイロジェンによるMTF分解の仕組み。ファイロジェンは MTFとRAD23に同時に結合し、ユビキチンの代わりに両者の相互作用を仲介する。これにより、MTFはユビキチン非依存的にプロテアソームへと輸送され、分解される。

最後にファイロジェンが形成する複合体の解析から得られた興味深い結果を紹介したい。ファイロジェンと RAD23 の相互作用は、MTF が存在しない場合では極めて弱い一方、MTF 存在下では著しく強まることを見いだされた。一方で、MTF とファイロジェンの相互作用に RAD23 の存在は影響しなかった。従って、MTF/ファイロジェン/RAD23 の三者複合体は、まずファイロジェンと MTF が相互作用し、次に RAD23 と相互作用することで形成されると考えられる。これは、MTF が存在しない条件においてファイロジェンと RAD23 の相互作用が抑制されることを意味する。ファイロジェンは篩部細胞でファイトプラズマから分泌されたのち植物体内を移行し、標的 MTF が存在する細胞に到達して機能する必要があるため、標的が存在しない細胞で RAD23 との余計な相互作用が起きないように、このような結合様式を有しているのかもしれない。

おわりに

一連の研究を通じて、ファイトプラズマによる葉化病の普遍的な仕組みが少しずつ浮かび上がってきた。A・Eクラスの MTF は被子植物の花器官形成のためにアミノ酸配列と機能が高度に保存されている。また、RAD23 を含むプロテアソーム関連因子も真核生物に普遍的なタンパク質分解機構として知られる。以上より、ファイロジェンはこれら植物に保存される宿主因子を標的とした普遍的な仕組みで葉化を引き起こしていると考えられる。

一方で、MTF/ファイロジェン/RAD23 の三者複合体の立体構造の解明や、葉化誘導能を喪失したファイロジェングループがもつ未知の機能の特定、ファイロジェンがファイトプラズマ間を渡り歩く仕組みの解明など、新たに生じた課題や依然として解明が待たれる課題も多く残されている。特に植物病理学上の興味をもたれる課題は、伝染環における葉化病の意義だろう。現象面では、葉化病により新たな茎葉とともに篩部が増生しファイトプラズマのニッチが拡張されることに加えて (Arashida *et al.*, 2008)、植物組織の寿命の延長効果が観察されている (兼平ら, 1996)。また、ファイロジェンを発現する植物は媒介昆虫を誘引しやすくなる現象も報告されている (Orlovskis and Hogenhout, 2016)。いずれも分子機構の解明が待たれるが、共通点は昆虫による媒介を受けやすくなることにあると考えられる。ファイトプラズマは絶対寄生性のため、伝染環の維持が生存に必要不可欠となる。ファイロジェンによる葉化病は、ファイトプラズマの伝染環を強化する重要な意義をもつのではないだろうか。今後の研究により、その答え合わせができることを期待している。

謝辞

本稿で紹介した研究は、東京大学 植物病理学研究室・植物医科学研究所の在学生および卒業生の皆様、吉川信幸 博士 (岩手大学)、宮武秀行 博士 (理化学研究所)、Assunta Bertaccini 博士 (ボローニャ大学)、Savithamma Dinesh-Kumar 博士 (カリフォルニア大学) のご協力のもと、日本学術振興会 科学研究費補助金などの支援を受けて実施されました。ここに篤く御礼申し上げます。

引用文献

- Arashida, R., Kakizawa, S., Ishii, Y., Hoshi, A., Jung, H.Y., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima, K. and Namba, S. (2008) Cloning and characterization of the antigenic membrane protein (AMP) gene and in situ detection of AMP from malformed flowers infected with Japanese Hydrangea phyllody phytoplasma. *Phytopathology* 98: 769–775.
- Aurin, M.B., Haupt, M., Görlach, M., Rümpler, F., and Theißen, G. (2020) Structural requirements of the phytoplasma effector protein SAP54 for causing homeotic transformation of floral organs. *Mol. Plant Microbe Interact.* 33: 1129–1141.
- Banfield, M. J. (2015) Perturbation of host ubiquitin systems by plant pathogen/pest effector proteins. *Cell Microbiol.* 17: 18–25.
- Chaturvedi, Y., Rao, G. P., Tiwari, A. K., Duduk, B. and Bertaccini, A. (2010) Phytoplasma on ornamentals: detection, diversity and management. *Acta. Phytopathol. Hun.* 45: 31–69.
- Himeno, M., Neriya, Y., Minato, N., Miura, C., Sugawara, K., Ishii, Y., Yamaji, Y., Kakizawa, S., Oshima, K. and Namba, S. (2011) Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner. *Plant J.* 67: 971–979.
- Iwabuchi, N., Kitazawa, Y., Maejima, K., Koinuma, H., Miyazaki, A., Matsumoto, O., Suzuki, T., Nijo, T., Oshima, K., Namba, S. and Yamaji, Y. (2020) Functional variation in phyllogen, a phyllody-inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism. *Mol. Plant Pathol.* 21: 1322–1336.
- Iwabuchi, N., Maejima, K., Kitazawa, Y., Miyatake, H., Nishikawa, M., Tokuda, R., Koinuma, H., Miyazaki, A., Nijo, T., Oshima, K., Yamaji, Y. and Namba, S. (2019) Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513: 952–957.
- 兼平 勉・堀越紀夫・北山裕子・篠原正行 (1996) アジサイ葉化病 (新称) の発生と phytoplasma の検出. *日植病報* 62: 537–540.
- Kim, M., Otsubo, R., Morikawa, H., Nishide, A., Takagi, K., Sasakawa, C. and Mizushima, T. (2014) Bacterial effectors and their functions in the ubiquitin-proteasome system: insight from the modes of substrate recognition. *Cells* 3: 848–864.
- Kitazawa, Y., Iwabuchi, N., Himeno, M., Sasano, M., Koinuma, H., Nijo, T., Tomomitsu, T., Yoshida, T., Okano, Y., Yoshikawa, N., Maejima, K., Oshima, K. and Namba, S. (2017) Phytoplasma-conserved phyllogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins. *J. Exp. Bot.* 68: 2799–2811.
- Kitazawa, Y., Iwabuchi, N., Maejima, K., Sasano, M., Matsumoto, O., Koinuma, H., Tokuda, R., Suzuki, M., Oshima, K., Namba, S. and Yamaji, Y. (2022) A phytoplasma effector acts as a ubiquitin-like mediator between floral MADS-box proteins and proteasome shuttle proteins. *Plant Cell* 34: 1709–1723.
- Li, C., Sasaki, N., Isogai, M. and Yoshikawa, N. (2004) Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Arch. Virol.* 149: 1541–1558.
- Liao, Y.T., Lin, S.S., Lin, S.J., Sun, W.T., Shen, B.N., Cheng, H.P., Lin, C.P., Ko, T.P., Chen, Y.F., and Wang, H.C. (2019) Structural insights into the interaction between phytoplasmal effector causing phyllody 1 and MADS transcription factors. *Plant J.* 100:706–719.
- MacLean, A. M., Orlovskis, Z., Kowitzanich, K., Zdziarska, A. M., Angenent, G. C., Immink, R. G. H. and Hogenhout, S. A. (2014) Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biol.* 12: e1001835.

- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., Nicolaisen, M. and Hogenhout, S. A. (2011) Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 157: 831–841.
- Maejima, K., Iwai, R., Himeno, M., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Fujita, N., Ishikawa, K., Fukuoka, M., Minato, N., Yamaji, Y., Oshima, K. and Namba, S. (2014) Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody. *Plant J.* 78: 541–554.
- Maejima, K., Kitazawa, Y., Tomomitsu, T., Yusa, A., Neriya, Y., Himeno, M., Yamaji, Y., Oshima, K. and Namba, S. (2015) Degradation of class E MADS-domain transcription factors in *Arabidopsis* by a phytoplasmal effector, phyllogen. *Plant Signal. Behav.* 10: e1042635.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S. and Steinegger, M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* 19: 679–682.
- Namba, S. (2019) Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proc. Jpn. Acad. B.* 95: 401–418.
- Orlovskis, Z. and Hogenhout, S.A. (2016) A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes. *Front. Plant Sci.* 7: 885.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genet.* 36: 27–29.
- Puranik, S., Acajjaoui, S., Conn, S., Costa, L., Conn, V., Vial, A., Marcellin, R., Melzer, R., Brown, E., Hart, D., Theißen, G., Silva, C. S., Parcy, F., Dumas, R., Nanao, M. and Zubieta, C. (2014) Structural basis for the oligomerization of the MADS domain transcription factor SEPALLATA3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 3603–3615.
- Wang, M. and Maramorosch, K. (1988) Earliest historical record of a tree mycoplasma disease: Beneficial effect of mycoplasma-like organisms on peonies. *In Mycoplasma Diseases of Crops: Basic and Applied aspects* (eds. Maramorosch, K. and Raychaudhuri, S.P.). Springer-Verlag, New York, pp. 349–356.
- Yu, H. and Matouschek, A. (2017) Recognition of client proteins by the proteasome. *Ann. Rev. Biophys.* 46: 149–173.

特別講演

思いがけない「気付き」と展開・・・未完の研究の話

瀧川雄一

Takikawa, Y.

Unexpected encounters and development of research

Abstract

In my research history, encounters and recognition of unexpected facts greatly promoted developments of the research. Here, some examples of such encounters are presented with *Pantoea*, *Pseudomonas* and other plant pathogenic bacteria.

Key words: *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*

はじめに

今年（令和4年）3月に定年退職した私は、植物病原細菌の同定と分類について研究を行って来た。やり残した研究は多々あり、まとめ上げる能力のなさに忸怩たる思いがある。今回講演の機会をいただいたが、本来の研究の中心的な課題については各個の論文や学会発表、学会賞受賞講演などで公表して来たので、ここでは発表には至らなかったり研究の途中で挫折してしまっただけでも自分としてはとても面白く予想外の成果であったりした話題について紹介して向後の参考にしていただければ幸いである。

分類・同定の研究をしていると、顕微鏡観察だけではわからなかった細菌が分離培養を通じて最初にコロニーを作った時、だいたいどういう種類の細菌でどのような性質を持っているのかというのは想像がついてしまう。とんでもない性質を有して事前の予想が全く外れてしまうというようなことは少ない。これも長年の経験というもので、新病害の診断や病原体の同定においてはかなり強力な武器となる。ただ、経験を重視しすぎるとどうしても見る目にバイアスがかかってきて目の前の現象を予断を持って見るようになってしまう。このことを痛感させられた事例を示す。

1. *Pantoea* での事例

Pantoea 属細菌は植物の表面や内部、土壌中、昆虫の対内外など環境中に広く分布し、

静岡大学 名誉教授

Prof. emerit. Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422-8529, Japan

血液などの人体由来臨床サンプルから分離されることもある。*P. agglomerans* および *P. ananatis* は昔 *Erwinia herbicola* あるいは *E. ananas* と呼ばれており、ほとんどが植物体内外で腐生的に生存しているが、場合によっては病気を起こすことがあるとされてきた。例外として *P. agglomerans* の病原型である *pv. gypsophilae*, *pv. milletiae* と *pv. "betae"* があり、いずれも III 型分泌機構を有しエフェクターを注入することによって「こぶ病」を引き起こす。これはトウモロコシの萎凋細菌病菌である *P. stewartii* とも類似しており典型的な植物病原細菌と言ってよい。ところが大部分の *P. agglomerans* および *P. ananatis* は III 型分泌機構を持っておらず、腐生的生存を主として時に日和見感染（条件的寄生）をすると考えられてきた。それでも *P. agglomerans* によるシクラメン葉腐細菌病、*P. ananatis* によるパイナップル花樟病、イネ内穎褐変病、メロン果実内腐敗病、タマネギ鱗茎腐敗症などこれらの細菌によるとされる植物の病気はいくつか報告されている。このような病気が特定の菌株によるものなのか、腐生的な菌株が時には病原体として振る舞うのか、病原力がスペクトラムのように連続したものなのかなどがわかっていなかった。病原になりうるものと非病原のものが区別できるとすれば、それは伝染環の追求と防除法の確立において重要である。植物周辺のあらゆるところから分離される *Pantoea* 属細菌が病原体となりうるのであれば、特定の伝染環を遮断することはあまり意味がなくなるし、一方で特定の系統のみが病原となるのであれば、その系統の居場所を突き止める必要が出てくる。それまでのサーベイで *P. agglomerans* の先に述べた病原型の株を除く腐生性の株のうち、少数の菌株は III 型分泌機構を有しタバコに過敏感反応（HR）を引き起こすことがあることはわかっていた。しかし、*P. ananatis* の中ではそのような菌株は無かった。メロンの果実内腐敗病を研究していた時に、社会人院生であった K さんがイネやタマネギ由来の *P. ananatis* のうちタバコに過敏感反応を示すものがあると主張した。私はそれまでの経験で *P. ananatis* では HR を起こす菌株は無いと固く信じていたし、実際に自分でタバコに菌の水懸濁液を注入すると反応が出ないことから「そんなはずは無い」と否定した。ところが K さんは絶対に出ると強く言う。ならば私の目の前でやってみろと言うと、彼は前夜から培養していた濃厚培養液を直接タバコに注入した。すると接種後 2 日目になって確かに HR 様の反応が出るではないか。それでも頭の硬い私は「HR の試験というものは培養菌体を水に 10 の 6 乗程度の濃度に懸濁し直して行うべきものであり、今出ている反応は培養による代謝産物か何かによって起こるもので病原性に関係するものではないはずだ」と強く否定した。では、というので液体培養の上清や滅菌したものを注入しても HR 様の反応は出ない。しかも菌株によって反応が出るものと出ないものが決まっている。ようやくここに至ってはたと気が付いた。「この反応は従来の HR とは異なる、しかし確かに生きた *P. ananatis* 菌株によって起きる植物の反応である」ということなのだ。このことを認めざるを得なくなった。この現象は *Pseudomonas syringae* 群細菌などでの常識とは異なっており、自分の頭の中での常識を覆すのに時間がかかった。しかし、この気付きにより *P. ananatis* の病原性決定機構の解明に道が開けることにもなった。すなわち、クラシックな手法ではあるが、トランスポゾンタギングによってタバコ HR 様反応を指標として病原性が変化した株をスクリーニングし、それから病原性決定に関与する遺伝子を洗い

出す手法が可能となった。なお、同時に進めた研究からタバコ HR 様反応の誘導能とネギ・タマネギへの病原性は完全に一致していること (Kido et al. 2010)、培養液を直接使わなくても 3%NaCl 溶液などの高張液に 10 の 8 乗程度の濃度に懸濁すると HR 様反応は出ること、タバコ植物体を高温条件に晒したり、根元に NaCl 溶液を灌注するなどのストレス条件を与えたりすると菌の水懸濁液でも HR 様反応が出ることなどが明らかとなった。一方、遺伝子探索の研究については既に一部を感染生理談話会にて発表したように (瀧川 2015)、病原性 *P. ananas* に特異的に存在する約 19kb に及ぶ遺伝子領域 PASVIL(*Pantoea ananas*- specific virulence locus)を特定し、そのほぼ全長を含むクローン pL422 と pL65 を他の非病原性 *P. ananatis* および *P. agglomerans* に導入すると病原性を獲得することを示すことができた。さらに PASVIL には 16 個の遺伝子が存在しそのうちの 10 個が重要なこと、3 つかそれ以上の転写単位に分かれていること、何らかの代謝産物生成に関与しているらしいことがわかった。また、イネもみを吸汁するミナミアオカメムシが高頻度で PASVIL を有する *P. ananatis* を保有していることが明らかにすることができた (瀧川 令和元~3 年度科研費報告書)。研究自体は完遂することはできず、*P. ananatis* が III 型分泌機構を持たないのにどのようにして植物体からの防御応答を回避しているのかなど残された課題は多いが、このような常識を外した事実への気づきが研究の大きな発展につながった事例として私の中では強く記憶されている。

2. エンドウ先端黄白化症での事例

エンドウ先端黄白化症は 1996 年に静岡県伊豆地方で発生した病害であり、その病原体 *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* WT (white top) strain は pv. *pisii* の一系統でありながら先端黄白化症状を特異的に引き起こす。この先端黄白化症は病徴の発現部位と病原体の存在部位が離れており、細菌病であること自体がなかなか信じられなかった。また、分離された病原体は通常をつる枯細菌病菌と区別がつかなかった。しかし、共同研究者 O 氏の直感と大胆な接種試験で納得せざるを得なかった。さらにこの菌の同定研究を実施した院生の S さんの势力的な実験の中で偶然にも得られたクローンが病原性決定に関与していたことがわかるなど自分の想定外の発展があった (Suzuki et al. 2003, Suzuki and Takikawa 2004)。この特異的領域は NRPS-PKS をコードしており、ノックアウトすると先端の黄白化を引き起こさなくなることから病徴発現に関与しており何らかの毒素様の物質を合成していることが考えられた。また、毒素のスクリーニング法を開発するために他の病原細菌との混合摂取によってトマトで先端黄白化症を起こさせることも確認できた。しかし、最後の詰めが甘くて未完に終わっている。

3. マオラン条斑細菌病菌の事例

マオラン条斑細菌病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *phormiicoa* は観葉植物あるいは繊維作物であるマオラン(ニューサイラン)に条斑症状を起こす極めて稀な病原細菌である。この菌は *Xanthomonas* 属としては例外的に毒素コロナチンを生産している (Tamura et al. 1992)。当時 *Pseudomonas syringae* 群細菌以外ではコロナチン生産は全く知られていなかった。コロナチンの発見が西山幸司氏によるジャガイモ塊茎肥大の偶然の発見によることはよく知られた事であるが、本菌における生産の発見も偶然指摘されて気が

付いた事である。現在ではゲノム解析で *Pectobacterium* 属や *Streptomyces* 属の中にもコロナチン生産遺伝子を有するものがあることが知られているが、当時としては画期的であった。

4. その他

P. syringae pv. *maculicola* と *P. cannabina* pv. *alisalensis* のキュウリへの明確な病原性およびダイコンの根への感染の有無の話 (Takikawa and Takahashi 2014)、*P. syringae* hrp group IA と IB (どちらも genomospecies 2) (Inoue and Takikawa 1999) の区別の話、など細菌学的な性質などからは思いもつかない結果が得られた時、最初はそれを受け入れることがかなり難しかった。逆にそれだからこそどうしてそうなるかを突き詰めればより興味深い話になるに違いないと思うのだがすでに時間切れとなってしまった。

おわりに

近年ではゲノム解析の進展に伴ってゲノム情報からそれまで思いもよらなかった菌種間の系統分類関係が明らかになったり新たな病原性決定領域が見つかったりするなど予想もできなかった発見と気づきが数多くなされている。しかし、眼前の未知の現象に出くわし、それに基づく新たな気づき起きた時のワクワク感はやはり何にも変えられないものがあると思うのである。

謝辞

研究を共に実行していただいた静岡大学農学部植物病理学研究室の全ての卒業・修了生に心からの感謝の意を表します。また、諸先生、諸先輩、協力研究者の皆様にも感謝いたします。

引用文献

- Inoue, Y. and Takikawa, Y. (1999) Grouping of *Pseudomonas syringae* strains by comparing DNA homology at the *hrp* gene cluster and its neighboring regions. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn* 65: 32-41.
- Kido, K., Hasegawa, M., Matsumoto, H., Kobayashi, M. and Takikawa, Y. (2010). *Pantoea ananatis* strains are differentiated into three groups based on reactions of tobacco and welsh onion and on genetic characteristics. *J. Gen. Plant Pathol.* 76: 208-218.
- Suzuki, A., Togawa, M. Ohta, K. and Takikawa, Y. (2003) Occurrence of white top of pea caused by a new strain of *Pseudomonas syringae* pv. *psi*. *Plant Dis.* 87: 1404-1410.
- Suzuki, A. and Takikawa, Y. (2004) Cloning of a specific DNA region of white top pathogen of pea and its detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 174-180.
- 瀧川雄一 (2015) 植物病原細菌 *Pantoea ananatis* の病原性決定因子について. 植物感染生理談話会論文集 50: 1-10.
- Takikawa, Y. and Takahashi, F. (2014) Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis*. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 466-474.
- Tamura, K., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., Goto, M. and Watanabe, M. (1992) Coronatine production by *Xanthomonas campestris* pv. *phormiicola*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn* 58: 276-281.

遺伝子発現動態から迫る青枯病菌の感染機構

都筑正行・竹村知夏・瀬沼和香奈・寺澤夕貴・舘田宇宙・阿部悠里

・木場章範・大西浩平・甲斐建次*・曳地康史

Tsuzuki, M., Takemura, C., Senuma, W., Terazawa, Y., Tateda, S., Abe, Y.,
Kiba, A., Ohnishi, K., Kai, K. and Hikichi, Y.

Understanding the infection mechanism of *Ralstonia pseudosolanacearum* through
its gene expression dynamics

Abstract

Ralstonia solanacearum species complex (RSSC) are a family of soil-borne Gram-negative bacteria causing a wilt disease in a wide-range of host plants. In a phylotype I strain of RSSC, *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1, a gene regulatory mechanism by sensing a cellular density, quorum sensing (QS), is essential for its virulence. It has been reported that QS mutants exhibit pleiotropic phenotypes including reduced biofilm formation, decreased extracellular polysaccharide I (EPS I) production and an enhanced motility, which suggests that QS controls expression of a number of genes related to the traits yet its regulatory mechanism is unclear. For understanding the functional machinery of QS, data of gene expression profiles by RNA sequencing (RNA-seq) provided us with the characteristics of transcriptomic changes caused by QS. Deletion of QS-related genes results in the expression changes of the genes with specific Gene Ontology terms related to the mutant phenotypes. Also, the different mutants showed the different patterns in the gene expression changes. These data suggest that QS controls the gene expression in a different manner dependently on regulatory modules.

Key words: *Ralstonia pseudosolanacearum*, RSSC, Quorum sensing, Transcriptome

はじめに

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* species complex: RSSC) は土壌生息性のグラム陰性細菌であり、幅広い宿主植物に対して萎凋症状を引き起こす「青枯病」の原因となる。青枯病の被害は世界的に問題となっており、日本においても、効果的な防除法がない「難

高知大学農林海洋科学部 Faculty of Agriculture and Marine Science, Nankoku 783-8502, Japan

* 大阪公立大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University, Sakai 599-8531, Japan

防除病害」として指定されている。その原因としては、土壌殺菌剤の臭化メチルが環境破壊を引き起こすなど有効な防除手段が存在しないことが挙げられる。そこで持続的な防除法の開発が求められており、そのためには青枯病菌の感染過程を詳細に理解することが非常に重要である。

青枯病菌の感染過程についてわかっていることとして、青枯病症状を示した植物では維管束から多量の青枯病菌が検出されることが挙げられる。一方で、非感染状態の青枯病菌は土壌に生息している。これらの事実を合わせると、青枯病菌は植物の根部から植物体に侵入し、何らかの過程を経て最終的に維管束へと到達し、激しく増殖することが推測される。しかしながらこれまで植物体において詳細に感染過程を観察した事例は少なく、感染過程については不明な点が多い。では青枯病菌が病原力を発揮するためには、どのようなことが重要なのだろうか。青枯病菌の病原力に関しては、以前から **Phenotype Conversion (PC)** と呼ばれる現象が観察されていた。PC を生じた菌株では、病原力の低下に加えて、菌体外多糖 (EPS I) 産生量の低下、細胞壁分解酵素活性の低下、といった複数の形質の変化が同時に起きることが報告されている (Brumbley and Denny 1990)。そして、遺伝学的な解析から、PC を引き起こす主要な原因遺伝子として *phcA* が同定された (Brumbley and Denny 1990 ; Brumbley et al. 1993)。*phcA* は配列の相同性から LysR 型の転写制御因子 PhcA をコードする遺伝子であると推定されており、複数の形質の変化は PhcA を中心とした遺伝子発現パターンの変化によってもたらされることが予想された。

後の研究によって、PhcA は、自身の周囲の菌密度を感知して遺伝子発現パターンを変化させるクオラムセンシング (QS) 機構の主要な因子であることが明らかになってきた (Hikichi et al. 2017)。ファイロタイプ I に属する OE1-1 株の QS 機構では、メチルトランスフェラーゼ PhcB 依存的に合成される methyl-3-hydroxymyristate (3OH-MAME) がシグナル分子としてはたらくことが明らかになっており、細胞外に分泌したシグナル分子をお互いが受容することにより周囲の菌密度を感知していると考えられる

(図 1: Kai et al. 2015; Ujita et al. 2019)。菌密度を感知した OE1-1 株は、マッシュルーム型バイオフィーム (mBF) と呼ばれる集団構造体を形成することが *in vitro* 実験により観察されている (Mori et al. 2016)。mBF 形成ができなくなるレクチン変異体およびラフラノン合成酵素変異体ではトマト根部からの感染が成立しないことから、mBF 形成は青枯病菌の病原力に必須であることが示唆される (Mori et al. 2016, 2018)。

では PhcA を中心とした QS における遺伝子発現制御はどのような仕組みで行われているのだろうか。QS に関わる因子のはたらきについて、センサーヒスチジンカイネースとレスポンスレギュレーターからなる二成分制御系を中心として、多くの因子の QS への関与が分子遺伝学的な解析によって明らかになってきた (Senuma et al. 2020; Takemura

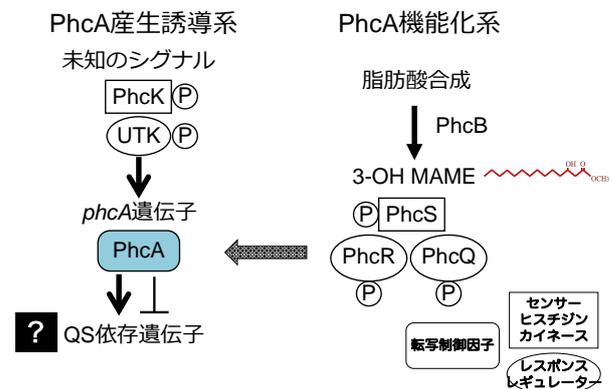


図1 OE1-1株におけるQSを制御する二成分制御系によるシグナル伝達機構の推定図

et al. 2021)。これら二成分制御系を中心とした QS の制御機構は、QS 依存的な遺伝子発現制御において中心的な役割を果たす PhcA をコードする *phcA* 遺伝子の発現誘導系と、遺伝子発現ではなく PhcA の機能に重要な機能化制御系に大別されている (図 1)。機能化制御系の上流には、PhcB 依存的な 3OH-MAME 合成系が位置しており、菌体外の密度を感知した後、リン酸化シグナル伝達によって PhcA の機能が制御されていることを示唆している。

QS に伴って複数の形質が変化することは大規模な遺伝子発現の変化によってもたらされることが予想されるが、どのような遺伝子発現の変化が起きているかに関しては不明な点が多い。また、その変化がどのような仕組みで起きているかについても、不明である。そこで、我々は OE1-1 株の QS に関してトランスクリプトーム解析を行い、QS における遺伝子動態について迫った。また QS における遺伝子動態から見えてきた、感染過程全体における QS の役割について議論する。

1. クオラムセンシングにおける主要な遺伝子発現変化と正のフィードバック機構

OE1-1 株を野生型として、主要な転写制御因子である PhcA の変異体 ($\Delta phcA$) と、QS シグナル分子合成に必要な PhcB の変異体 ($\Delta phcB$) それぞれからトータル RNA を抽出し、RNA シーケンシング (RNA-seq) を行うことでトランスクリプトームデータを得た。カウントデータから発現量比 $|\log_2FC| > 2$ および $q < 0.05$ を満たす遺伝子群を発現変動遺伝子 (DEG) として比較したところ、 $\Delta phcA$ と $\Delta phcB$ では大部分の DEG が共通しており、個々の遺伝子の発現量は強い正の相関を示した (図 2AB; Hayashi et al. 2019)。以上のことから、PhcA と PhcB のはたらきの大部分は共通した経路に存在し、共通して制御を受けていた遺伝子群は QS における主要な変動遺伝子群であると言える。

QS が起きていることを示す主要な形質に EPS I の産生がある。我々は EPS I の合成に必要な *EpsB* の変異体 $\Delta epsB$ を作出し、EPS I 産生の役割を調べた。すると、驚いたことに $\Delta epsB$ における変動遺伝子群は $\Delta phcA$ や $\Delta phcB$ における変動遺伝子と大部分で共通していた。このことから、EPS I 産生は QS において正のフィードバック作用を持つことが示唆された (図 2AB; Hayashi et al. 2019)。

PhcA のはたらきによって産生される二次代謝物質としては、ラルフラノンが挙げられる。ラルフラノンの合成に必要な *ralA* 遺伝子は PhcA 依存的に発現が誘導され、 $\Delta ralA$ 変異体はトマト感染における病原力の低下を示す (Kai et al. 2014)。すなわちラルフラノン合成は OE1-1 株の病原力に重要であることを示している。ではラルフラノンは菌体にどのような影響を与えるのだろうか。上記変異体と同様に $\Delta ralA$ 変異体におけるトランスクリプトーム解析を行ったところ、 $\Delta ralA$ 変異体においてもまた、 $\Delta phcA$ や $\Delta phcB$ との

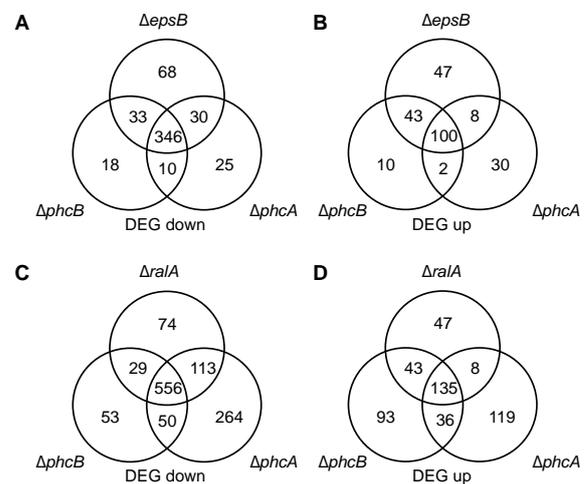


図2 変異体における発現変動遺伝子の共通部分 (A-D) トランスクリプトーム解析より得た発現変動遺伝子の変異体間での共通個数を表したベン図。(A) $\Delta epsB$ と $\Delta phcA$ 、 $\Delta phcB$ において減少したDEGの比較。(B) $\Delta epsB$ と $\Delta phcA$ 、 $\Delta phcB$ において増加したDEGの比較。(C) $\Delta ralA$ と $\Delta phcA$ 、 $\Delta phcB$ において減少したDEGの比較。(D) $\Delta ralA$ と $\Delta phcA$ 、 $\Delta phcB$ において増加したDEGの比較。

間で多くの DEG を共有していた (図 2CD; Mori et al. 2018)。すなわち、QS 機構は *ralA* の発現とラルフラノン合成を介して、正のフィードバックの仕組みを持っているか、または *ralA* 依存的に遺伝子発現を行っていることが示唆される。

以上のように、QS において遺伝子発現制御の中心的役割を果たすであろう PhcA と、菌体間でのシグナル分子のやり取りに必要な PhcB を中心として、多くの遺伝子の発現が制御されており、さらに EPS I やラルフラノンといった二次代謝物質の産生もまた、QS による遺伝子発現制御を遂行する上では欠かせない存在であることがわかった。1 つ興味深い点として、QS の主要な DEG には変異体において発現が上昇したものと減少したものの両方が含まれており、QS による遺伝子発現制御は正負の両方の面で起きている点が挙げられる。すなわち PhcA は、転写活性化と転写抑制の両者を同時に行っている可能性が高いということである。

2. クオラムセンシングによって発現制御を受ける遺伝子群の機能的特徴

では QS によって制御を受ける遺伝子群は、どのような機能を持っているのだろうか。PC において観察されていたように、QS に関わる遺伝子の欠損変異体は、複数の表現型を示すことが知られている。これまでに報告がある表現型には、ラルフラノン合成能の低下、バイオフィーム形成能の低下、EPS I 産生能の低下、植物体根部から感染時の病原力低下、運動能の上昇、シデロフォア活性の上昇などがある (Kai et al. 2014, Senuma et al. 2020, Takemura et al. 2021)。ではこれらの表現型は変動遺伝子の機能から推定できるものなのだろうか。我々は、QS に関係する遺伝子の変異体株を用いて、RNA-seq 法によるトランス

クリプトーム解析を行った。まず遺伝子発現制御の中心的な因子と考えられた PhcA の変異体 $\Delta phcA$ における変動遺伝子 DEG に着目した。 $\Delta phcA$ で発現が減少・増加していた DEG はそれぞれ 315 個、181 個同定された。続いてこれらの遺伝子群に特徴的な機能を推定するために、Gene Ontology enrichment 解析を行った。まず変異体において発現が減少していた遺伝子群では "lipopolysaccharide biosynthetic process" 多糖類合成や、"secondary metabolite biosynthetic process" のような二次代謝系のターム、あるいは "integral component of membrane"、"cellular biosynthetic process" といった細胞構成成分に関するタームが多く見られた。QS に特徴的な EPS I 産生と多糖類合成は直接的に関連が見られる一方で、細胞構成成分に関する遺伝子群の機能と QS の形質との関係は明確ではない (図 3A)。発現が上昇した遺伝子群には、いくつか特徴的なタームが見られた。"bacterial-type flagellum basal body" は鞭毛形成に関与するタームであり、同様に走化性を表す "chemotaxis" など、変異体が持つ運動能の上昇と関連するタームが見られた。やケモタキシスに関わるタームや、Type III 分泌系やエフェクターに関連したターム、そして鉄獲

A $\Delta phcA$ DEG down

Term	P value	Fold enrichment
integral component of membrane	6.19×10^{-05}	1.6
phosphopantetheine binding	9.71×10^{-05}	9.8
organonitrogen compound biosynthetic process	6.90×10^{-04}	9.1
quorum sensing	7.76×10^{-04}	13.7
lipopolysaccharide biosynthetic process	7.81×10^{-04}	9.1
secondary metabolite biosynthetic process	2.34×10^{-03}	10.3
calcium ion binding	4.88×10^{-03}	6.1
cellular biosynthetic process	5.47×10^{-03}	8.2

B $\Delta phcA$ DEG up

Term	P value	Fold enrichment
bacterial-type flagellum basal body	$<10^{-41}$	23.8
bacterial-type flagellum-dependent cell motility	$<10^{-41}$	23.8
structural constituent of ribosome	1.04×10^{-40}	17.2
translation	1.57×10^{-36}	15.0
ribosome	1.79×10^{-26}	15.7
rRNA binding	5.64×10^{-22}	14.7
chemotaxis	5.32×10^{-21}	17.3
signal transduction	8.18×10^{-12}	14.7

図3 QSで変動する主要なGOターム
(A) $\Delta phcA$ にて減少していたDEG中のGOターム、および(B)増加していたDEG中のGOターム。

得機構に関係したタームが多く見られた (図 3B)。これらの遺伝子機能は、これまでに報告があった QS 時の形質の変化、たとえば EPS I 産生の低下や、運動能の上昇などといった変異体の表現型と共通するものであった。すなわち青枯病菌の形質レベルでの振る舞いの変化は、遺伝子発現変動の定量結果と、ある程度の関連性が見られた。

3. 二成分制御系による PhcA を介した遺伝子発現制御の挙動

これまでの分子遺伝学的な解析により、QS には二成分制御系によるシグナル伝達経路が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そこでこれらの因子がトランスクリプトームに与える影響について解析を行うことにした。QS における制御系のうち、シグナル分子の合成に必要な PhcB、遺伝子発現制御に関与すると考えられるレスポンスレギュレーターについて、*phcA* 遺伝子発現制御系に関与する PhcK、PhcA 機能化系における PhcQ、PhcR の 3 つについて、それぞれの欠損変異体から RNA-seq 法によりトランスクリプトームを取得した。変異体における形質の変化から、機能化系の PhcQ は QS シグナル分子を合成する PhcB と同様に QS の形質に大きく影響を持つ一方で、同じくレスポンスレギュレーターの PhcR が与える影響は部分的であることが報告されていた (Takemura et al. 2021)。実際トランスクリプトームデータから GO 解析を行ってみると、 $\Delta phcQ$ では減少していた多糖類合成系の遺伝子群は $\Delta phcR$ では変動があまり見られず、並行して運動能の上昇に関連すると見られるフラジェリン合成系の遺伝子群の発現上昇は $\Delta phcQ$ では大きい一方 $\Delta phcR$ では小さかった。興味深いことに、*phcA* の発現に関わる $\Delta phcK$ で見られた鉄獲得機構遺伝子群の上昇が、 $\Delta phcB$ および機能化系変異体である $\Delta phcQ$ 、においては顕著ではないという傾向が見られた。すなわち、PhcB および下流の PhcA 機能化系は PhcA のはたらきに対して一律に影響を与えているのではなく、制御する遺伝子群=制御モジュールの違いによって影響の強さが異なる可能性がある。

おわりに

今回の解析によって、青枯病菌における QS による遺伝子発現制御が大まかにどのような制御パターンを持った現象なのか、次にどのような機能を持った遺伝子群の制御であるのか、そしてどのような因子がどのような制御を行っているのかについて、仕組みの一端についての知見を得ることができた。はじめに言及したように、これらの遺伝子発現制御の仕組みは青枯病菌の感染過程に当てはめて解釈をされる必要があり、その上で初めて青枯病の防除につながる発見をもたらす。本研究にて明らかにした QS 依存的に起きる遺伝子発現の動態は、感染過程において QS がどのような段階に起きて、どのような役割を持っているのか、という観点から議論される必要がある。特に、QS がどのような環境要因によって誘導されるのか、そして QS が行われた後、解消される仕組み、そして解消されて病原力を発揮するために、またどのような遺伝子発現制御が行われるのかについて明らかにする必要がある。そのためには、植物感染時の青枯病菌における遺伝子発現の変動を捉える解析等が、新たな知見をもたらすはずである。

引用文献

Brumbley, S. M. and Denny, T. P. (1990) Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum phcA*, a gene that when

- mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *J. Bacteriol.* 172: 5677–5685.
- Hayashi, K., Senuma, W., Kai, K., Kiba, A., Ohnishi, K. and Hikichi, Y. (2019) Major exopolysaccharide, EPS I, is associated with the feedback loop in the quorum sensing of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 20: 1740–1747.
- Kai, K., Ohnishi, H., Mori, Y., Kiba, A., Ohnishi, K. and Hikichi, Y. (2014) Involvement of ralfuranone production in the virulence of *Ralstonia solanacearum* OE1-1. *ChemBioChem* 15: 2590–2597.
- Kai, K., Ohnishi, H., Shimatani, M., Ishikawa, S., Mori, Y., Kiba, A., Ohnishi, K., Tabuchi, M. and Hikichi, Y. (2015) Methyl 3-Hydroxymyristate, a diffusible signal mediating *phc* quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*. *ChemBioChem* 16: 2309–2318.
- Mori, Y., Inoue, K., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Higashimoto, C., Ohnishi, K., Kiba, A. and Hikichi, Y. (2016) The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Mol. Plant Pathol.* 17: 890–902.
- Mori, Y., Ishikawa, S., Ohnishi, H., Shimatani, M., Morikawa, Y., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A., Kai, K. and Hikichi, Y. (2018) Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signalling pathway and virulence of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 19: 454–463.
- Senuma, W., Takemura, C., Hayashi, K., Ishikawa, S., Kiba, A., Ohnishi, K., Kai, K. and Hikichi, Y. (2020) The putative sensor histidine kinase PhcK is required for the full expression of *phcA* encoding the global transcriptional regulator to drive the quorum-sensing circuit of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 21: 1591–1605.
- Takemura, C., Senuma, W., Hayashi, K., Minami, A., Terazawa, Y., Kaneoka, C., Sakata, M., Chen, M., Zhang, Y., Nobori, T., Sato, M., Kiba, A., Ohnishi, K., Tsuda, K., Kai, K. and Hikichi, Y. (2021) PhcQ mainly contributes to the regulation of quorum sensing-dependent genes, in which PhcR is partially involved, in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* 22: 1538–1552.
- Ujita, Y., Sakata, M., Yoshihara, A., Hikichi, Y. and Kai, K. (2019) Signal production and response specificity in the *phc* quorum sensing systems of *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem. Biol.* 14: 2243–2251.

一般社団法人 日本植物病理学会
第 29 回 植物細菌病談話会論文集

印刷 2022 年 11 月 23 日

発行 2022 年 12 月 3 日

発行所 一般社団法人 日本植物病理学会
東京都北区中里 2 丁目 28-10

日本植物防疫協会内 電話 03 (5980) 0281

発行者 日本植物病理学会会長（代表理事） 増田 税

談話会運営委員長 大島研郎

編集者 第 29 回 植物細菌病談話会事務代表 大島研郎

印刷所 有限会社ヤマダスピード製版

〒815-0031 福岡県福岡市南区清水 2 丁目 15-30
