

# バイオコントロール細菌 *Pseudomonas protegens* の根圏における生存戦略

国立研究開発法人 農業生物資源研究所 <sup>たけ</sup>竹 <sup>うち</sup>内 <sup>か</sup>香 <sup>すみ</sup>純

## はじめに

植物の根圏に生息し、植物を病害から保護する機能をもつ細菌はバイオコントロール細菌とよばれる。バイオコントロール細菌は、グラム陰性細菌 *Pseudomonas* 属に分類されるものが数多く知られており、中でも *Pseudomonas fluorescens* グループに属するものが大半である。その植物保護のメカニズムとしては主に①他の微生物との栄養の奪い合いに強いこと（競合）、②宿主となる植物への定着により植物側の抵抗性を高めていること（抵抗性付与）、③自身の二次代謝産物として抗菌性物質などのバイオコントロール因子を産生することにより他の微生物を駆逐すること（拮抗）、の三つが挙げられる。この三つは完全に独立したのではなく複合的に関与するケースが多々見られており、例えば競合に強く、かつ拮抗性を有する細菌などが知られている。筆者は主に③を対象として研究を行っており、*Pseudomonas protegens*（近年まで *P. fluorescens* と学名を同じくしていた）の抗菌性制御のメカニズムに着目して、本細菌を用いた植物保護効果の向上を目指している。

一般に *Pseudomonas* 属細菌は二次代謝産物のバリエーションに富んでおり、このことが本属細菌の環境中におけるニッチへの適応能力の高さに貢献している。細菌の増殖の過程では、こうした二次代謝産物は常に生産されるのではなく、緻密な制御の下で調節されているが、そのオン・オフの制御にかかわる因子については不明な点が多い。本稿では、*P. protegens* の二次代謝の制御機構について述べるとともに、それに基づいた本細菌の生存戦略について紹介する。

## I バイオコントロール細菌 *P. protegens* について

*P. protegens* は、近年まで *P. fluorescens* と学名を同じくしていたが、*P. fluorescens* グループの中でもバイオコントロール細菌としての表現型が特にユニークであることなどから“plant protecting bacteria”をその名の由来と

し、新たな学名が提唱された (RAMETTE et al., 2011)。*P. protegens* は、ピシウム属菌、フザリウム属菌、リゾクトニア属菌といった農業上甚大な被害をもたらす植物病原糸状菌および卵菌に対して拮抗性を有することが報告されている (土屋・染谷, 2009)。*P. protegens* のバイオコントロール因子として、2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), pyrrolnitrin (Prn), pyoluteorin (Plt) 等の抗菌性物質が知られており、これらは菌密度の上昇とともに菌体外に産生される。この発現制御に関する研究は、主に Pf-5 株 (アメリカ原産) および CHA0 株 (スイス原産) をモデル系統として世界で広く進められている (HAAS and KEEL, 2003)。これら 2 系統は極めて近縁であり全ゲノム配列が公開されているため、いずれも *Pseudomonas* 属細菌のデータベースサイト (<http://www.pseudomonas.com>) が活用でき、遺伝子の同定等が効率的に行えるという利点がある。特に、Pf-5 株の全ゲノム配列の解読以降 (PAULSEN et al., 2005)、本細菌に関する研究は飛躍的な発展を遂げている。

これまでの報告から *P. protegens* は世界中に広く分布していることが予測されていたものの、アジアおよび国内においては実際の分離例はなく、不明な点が多かった。そこで筆者らは、国内産の蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌より DAPG 生産などを指標にスクリーニングを行い、上述のモデル系統の近縁株として Cab57 株を得た。キュウリ幼苗とその病原菌 *Pythium ultimum* を用いて Cab57 株の植物保護能力を評価したところ、顕著な保護能力を示したことから (図-1)、その研究基盤を整備すべく次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行った。本菌株のゲノムは 6,827,892 bp の環状染色体からなり、GC 含量は 63.3% であることが明らかとなった (TAKEUCHI et al., 2014 a)。16S rRNA 解析および JSpecies による全ゲノム比較解析の結果、本菌株は *P. protegens* と同定された。Pf-5 株、CHA0 株のゲノムサイズはそれぞれ 7.07 Mb, 6.87 Mb であり (PAULSEN et al., 2005; JOUSSET et al., 2014)、これは今日までに解読されている *Pseudomonas* 属細菌の中では最大の部類であるが、Cab57 株もまた、これに近いものであった。*P. protegens* の産生する二次代謝産物は、他の細菌と比較しバリエーションに富むため、こうしたゲノムサイズの大きさにも

Survival Strategies of Biocontrol Strains of *Pseudomonas protegens* in Rhizosphere. By Kasumi TAKEUCHI

(和文キーワード: *Pseudomonas* 属細菌, バイオコントロール, 二次代謝産物, シグナル伝達系)



図-1 *Pseudomonas protegens* Cab57 株のキュウリ幼苗に対する植物保護効果  
無処理 (左), ビシウム菌を接種したもの (中), ビシウム菌接種時 Cab57 株を同時処理したもの (右).

寄与しているものと思われる。また、Cab57 株のゲノム中には、上述の代表的な抗菌性物質をコードするクラスターが高い相同性で保存されていた (TAKEUCHI et al., 2014 a)。

## II *P. protegens* の抗菌性制御シグナル伝達系

*P. protegens* の二次代謝産物は常に生産されるのではなく、緻密な制御の下で調節されている。その生産制御の初期段階で中心的な役割を果たすのは GacS/GacA とよばれる二成分制御系 (Gac : Global activator) とその下流にある調節型 small RNA である (LAPOUGE et al., 2008)。菌密度が上昇すると、sensor kinase である GacS によって response regulator である GacA がリン酸化され、それに伴い下流の調節型 small RNA を介したシグナル伝達系が活性化し、結果として上述のバイオコントロール因子が産生されるようになる。この現象はいわゆるクオラムセンシングの様式に則るものであるが、*P. protegens* のバイオコントロール因子発現機構においては、オートインデューサーに相当する物質が単離、同定されていないなど、不明な点も多い。

*P. protegens* における GacA の発見当初 (LAVILLE et al., 1992)、これを過剰発現させることにより抗菌性二次代謝産物の生産量を上昇させることが期待された。しかし、実際は過剰発現株では正常な増殖を保つことができなかった (BULL et al., 2001)。このことは、GacA タンパク質が菌体内で適切な量を維持することが重要であり、その量を超えてしまうと自身に負荷がかかることを意味する。実際、富栄養下で *P. protegens* の培養を続けると、*gacS* または *gacA* に変異の入った spontaneous mutant が一定の割合で得られることが知られている (BULL et

al., 2001)。このことは、周囲に他の微生物がないような状況では二次代謝産物の生産が却って負担となり、必ずしも GacS/GacA に依存した増殖モードが有効ではないことを示す。また、高温ストレス下では、このシグナル伝達系の発現が抑えられることも報告されている (HUMAIR et al., 2009)。すなわち「のほほん」とした増殖モードの方が有効な状況があると考えられている。

## III 細菌の二次代謝をオフにする因子, Lon プロテアーゼ

上述のように、*P. protegens* の GacS/GacA および small RNA の発現とバイオコントロール因子の発現の正負は連動していることから、small RNA の発現量はバイオコントロール能の有効な指標になり得ると考えた。筆者らはこれまで、*P. protegens* CHA0 株を親株としたトランスポゾンによるランダム変異株のライブラリから、親株と比較し増殖には大差がなく、かつ small RNA の発現量に差の見られた変異株のスクリーニングを行ってきた (TAKEUCHI et al., 2009)。その中から、small RNA の発現量の高まる変異株の原因遺伝子として ATP 依存型プロテアーゼである Lon プロテアーゼをコードする遺伝子 (*lon*) が同定された。*lon* が欠損すると、small RNA およびバイオコントロール因子の発現が亢進していたことから、一連のシグナル伝達系に正に関与することが示唆された (TAKEUCHI et al., 2014 b)。

*lon* 欠損株の抗菌性が高まることについては、*P. protegens* Pf-5 株 (当時は *P. fluorescens* Pf-5 株) において既に報告されていたものの、当時はその原因が不明であった (WHISTLER et al., 2000)。今回、上述のシグナル伝達系への関与が示されたことで、Lon プロテアーゼはこのカスケード中の因子 (タンパク質) の管理を司るものと推測された。Lon プロテアーゼの欠損により、シグナル伝達系全体が亢進するということは、通常ポジティブに関与している因子が Lon プロテアーゼのターゲット候補になりうると考えた。そのようなタンパク質として、GacS/GacA 二成分制御系を構成するそれぞれのタンパク質が考えられたが、原形質膜上にありセンサーとして機能する GacS よりも、細胞質中に存在し、response regulator として機能する GacA のほうがプロテアーゼの管理を受けるという仮説が成立し得るため、GacA を特異的に認識するペプチド抗体を作製し、ウエスタンブロット解析による発現量の比較に用いることとした。

その結果、野生株と比較し、Lon プロテアーゼ欠損株では GacA タンパク質の発現量が高まっていることが明らかとなり、Lon プロテアーゼが GacA タンパク質の不

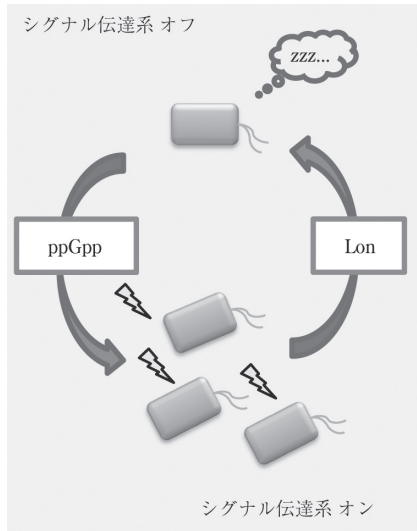


図-2 拮抗細菌の抗菌性制御のシグナル伝達系のオンとオフ

ppGpp はオフからオンに、Lon プロテアーゼはオンからオフに切り替えるのに重要である。

安定化に関与することが示された (TAKEUCHI et al., 2014 b)。さらに、貧栄養条件下においては、Lon プロテアーゼ欠損株での GacA タンパク質の半減期が野生株と比較し増長したことから、本細菌が環境ストレスに応じ Lon プロテアーゼを用いて積極的に GacA タンパク質の分解を行い、一連のシグナル伝達系をオフにすることが示唆された (図-2)。

また、Lon プロテアーゼ欠損株では *Fusarium oxysporum* や *P. ultimum* といった植物病原菌に対する抗菌性も亢進した。しかし、キュウリ幼苗を用いた植物保護能力検定試験においては、Lon プロテアーゼ欠損株は野生株の保護能力を上回ることはなく同等であった。さらに、根圏の菌体数については野生株よりも少なかったことから、欠損株では環境適応能力が低下しており、このことが抗菌性の増大を相殺してしまったと想定される (TAKEUCHI et al., 2014 b)。

一方、シグナル伝達系に正に関与する因子として、ppGpp (グアノシン四リン酸) を同定した。詳細は割愛させていただくが、ppGpp 合成変異株を用いた解析結果から、ppGpp は本細菌の抗菌性のみならず運動能力や定着能といった環境中の適応能力にも影響し、本細菌の総合的なバイオコントロール活性を維持するために重要であることが示された (TAKEUCHI et al., 2012)。拮抗細

菌の一生の中で、一次代謝を主とした通常の生育モードから、どのような「きっかけ」が二次代謝産物生産モードへの切り替えにかかわるかは不明であったが、ppGpp がそうした役割を持つことが示唆された (図-2)。

## おわりに

根圏細菌の生存戦略として、二次代謝産物の生産は自身のニッチの獲得には有効であるが、その生産コストを考えると周囲に敵 (他の微生物) がいない場合など必ずしも必要のない状況では却って負担となるため、シグナル伝達系をオフにすることも大切である。そのようなときに、Lon プロテアーゼによって臨機応変にライフスタイルを変えているのかもしれない。植物根圏という特殊な環境の中で生き残るためには、こうした柔軟性が有効になってくるのであろう。今後、各種機能解析やゲノム解析を通じ、バイオコントロール細菌がその効果を最大限に発揮するにはどのような条件が好ましいかを検討していきたい。

**謝辞** 本研究を進めるにあたり、Dieter HAAS 博士 (ローザンヌ大学)、染谷信孝博士 (農業・食品産業技術総合研究機構) をはじめ、所内外の多くの方々にご協力いただいた。ここに深く謝意を表する。本研究は、農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業 (BRAIN)」、農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業および科学研究費補助金、ならびに農業生物資源研究所 所内研究支援制度による支援を受けたものである。

## 引用文献

- 1) BULL, C. T. et al. (2001): *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 327 ~ 336.
- 2) HAAS, D. and C. KEEL (2003): *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 117 ~ 153.
- 3) HUMAIR, B. et al. (2009): *ISME J.* **3**: 955 ~ 965.
- 4) JOUSSET, A. et al. (2014): *Genome Announc.* **2**: e00322-14.
- 5) LAPOUGE, K. et al. (2008): *Mol. Microbiol.* **67**: 241 ~ 253.
- 6) LAVILLE, J. et al. (1992): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1562 ~ 1566.
- 7) PAULSEN, I.T. et al. (2005): *Nat. Biotechnol.* **23**: 873 ~ 878.
- 8) RAMETTE, A. et al. (2011): *Syst. Appl. Microbiol.* **34**: 180 ~ 188.
- 9) TAKEUCHI, K. et al. (2009): *J. Biol. Chem.* **284**: 34976 ~ 34985.
- 10) ——— et al. (2012): *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**: 1440 ~ 1449.
- 11) ——— et al. (2014 a): *PLoS ONE* **9**: e93683.
- 12) ——— et al. (2014 b): *Environ. Microbiol.* **16**: 2538 ~ 2549.
- 13) 土屋健一・染谷信孝 (2009): 生物防除の基礎「微生物間の相互作用: 抗生」, 微生物と植物の相互作用-病害と生物防除- (百町満朗・對馬誠也 編), ソフトサイエンス社, 東京, p. 35 ~ 43.
- 14) WHISTLER, C.A. et al. (2000): *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2718 ~ 2725.