

植物免疫活性化内生菌を活用した植物培養細胞による 物質生産プロセスの開発

古屋 俊樹
東京理科大学 創域理工学部

研究の目的

植物培養細胞は、植物体と比較して一般に増殖（成長）が速く、また屋内で気候や天候に左右されずに安定して増殖可能なことから、物質生産への応用に有効な手段の一つである。しかしながら、植物培養細胞が有している二次代謝生合成遺伝子群の数からするとこれまでに生産されている化合物はほんの一部であり、多くの遺伝子群は眠っている状態で活用されていない。最近になって、微生物と共培養することにより生物間相互作用に基づいて植物培養細胞の遺伝子発現を誘導することが試みられており、微生物同士の共培養で報告されているようなダイナミックな代謝変化をもたらすことが期待される。植物培養細胞との共培養に用いる微生物としては、真菌が比較的多く報告されている一方で、細菌の報告は少ない。また、微生物との共培養により植物培養細胞の特定の二次代謝産物の生産が高まることを示している報告はあるが、微生物が植物培養細胞の増殖に及ぼす影響や相互作用の詳細はあまり解析されていないのが現状である。

筆者らはこれまでに、アブラナ科植物から植物免疫を活性化する内生細菌 *Delftia* sp. BR1R-2 株（コマツナ由来）、*Arthrobacter* sp. BR2S-6 株（コマツナ由来）、*Pseudomonas* sp. RS1P-1 株（ダイコン由来）を取得している。これらの細菌をシロイヌナズナに内生させたところ、植物病原菌に対する病害抵抗性を向上させることができた。また、3種の細菌はタバコ培養細胞 BY-2 のエリシター誘導性の活性酸素種生成を亢進することも明らかにしている¹⁻³。これらの内生細菌は生物間相互作用により植物の免疫を活性化するため、植物培養細胞の代謝を変化させることもできるのではという着想に至った。

本研究では、BR1R-2 株と BY-2 細胞を用いて、細菌と植物培養細胞の相互作用を詳細に解析した。具体的には、BR1R-2 株との共培養が BY-2 細胞の増殖や代謝に及ぼす影響を解析した。本研究で得られた知見は、植物免疫活性化内生菌を活用した植物培養細胞による物質生産プロセスの開発に有用と考えられる。

方法

BY-2 細胞を 100 mL スケールで 24 時間培養後、BR1R-2 株（OD₆₀₀ 0.2、1 mL）を接種して 28°C で 96 時間、振とう培養した。BY-2 細胞の増殖は湿重量により測定し、死細胞率は Evan Blue 試薬を用いて測定した。代謝産物に関しては、BY-2 細胞を凍結乾燥後、メタノールに懸濁して超音波処理することにより抽出した。抽出後、高速

液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析した。

結果

***Delftia* sp. BR1R-2 株との共培養がタバコ BY-2 細胞の増殖に及ぼす影響の解析**

BR1R-2 株との共培養が BY-2 細胞の増殖に与える影響を解析した。その結果、比較として用いた植物病原菌である軟腐病菌 *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* と共培養すると BY-2 細胞は灰色へと変化し、この植物病原菌は BY-2 細胞の増殖を阻害して細胞死をもたらすことが判明した（図 1）。また、植物に無関係な大腸菌でさえも、BY-2 細胞の増殖を阻害して細胞死をもたらした。これらの現象は、BY-2 細胞が軟腐病菌の病原性因子により攻撃されたことや、BY-2 細胞が軟腐病菌や大腸菌を MAMP（microbe-associated molecular patterns）として認識して激しい防御応答を示したことによると考えられる。これに対してコマツナ内生細菌 BR1R-2 株は、BY-2 細胞の増殖にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。この際に BY-2 細胞は黄土色へと変化し、代謝変化が誘導されていることが示唆された（図 1）。また、共培養中に BR1R-2 株も増殖していることが確認された。以上より、元々植物に内生していた BR1R-2 株は、既に報告されているように植物の成長を阻害しないだけでなく¹、植物培養細胞の増殖も阻害しないことが確認され、共培養に有効な微生物であることが明らかとなった。

***Delftia* sp. BR1R-2 株との共培養がタバコ BY-2 細胞の代謝に及ぼす影響の解析**

BR1R-2 株存在下における BY-2 細胞の色の变化から、代謝変化が誘導されていることが予想されたため、BR1R-2 株との共培養が BY-2 細胞の代謝に与える影響を解析した。BR1R-2 株と共培養した BY-2 細胞から代謝産物を抽出し、HPLC 分析に供した。その結果、HPLC クロマトグラムにおいて、共培養により代謝産物のピークパターンが大きく変化しており、peak 1 の減少と peak 2~6 の増加が検出された（図 2）。peak 1 は、HPLC 分析における保持時間、吸光スペクトルと LC-MS 分析における質量値から、*N*-caffeoylputrescine と同定された。peak 2~6 については、構造の詳細を解析しているところである。以上のように、BR1R-2 株は植物培養細胞の増殖を阻害せずに、その代謝変化を誘導することが明らかとなった。

結論

本研究では、植物免疫活性化内生菌により植物培養細胞の代謝変化を誘導できることを明らかにした。植物免疫活性化内生菌は植物培養細胞の免疫を適度に亢進するため、その増殖を阻害せずに代謝変化を誘導できると考えられる。自然環境下で植物と共生してその免疫を亢進する内生菌は、植物培養細胞にも負の影響を与えることなく免疫亢進の一環として生理活性物質の生産を誘導できるポテンシャルを有するため、植物培養細胞による物質生産プロセスへの応用に有効と考えられる。現

在、異なる内生細菌や植物培養細胞間での比較解析も実施中である。

文献

- 1) Kurokawa, M., Nakano, M., Kitahata, N., Kuchitsu, K., Furuya, T. (2021) An efficient direct screening system for microorganisms that activate plant immune responses based on plant-microbe interactions using cultured plant cells. *Sci. Rep.* **11**: 7396.
- 2) Kaneko, H., Miyata, F., Kurokawa, M., Hashimoto, K., Kuchitsu, K., Furuya, T. (2023) Diversity and characteristics of plant immunity-activating bacteria from Brassicaceae plants. *BMC Microbiol.* **23**: 175.
- 3) Kaneko, H., Furuya, T. (2023) Draft genome sequences of endophytic *Pseudomonas* strains, isolated from the interior of *Brassicaceae* plants. *Microbiol. Resour. Announc.* **12**: e0133722.

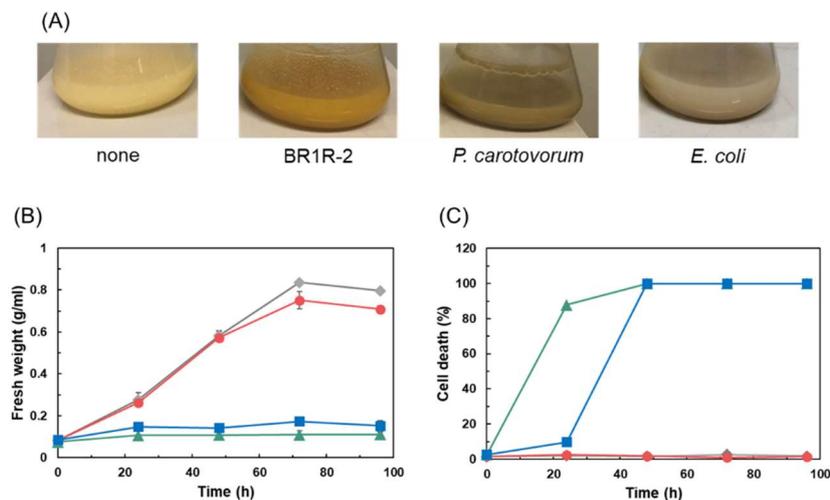


図 1 BR1R-2 株との共培養が BY-2 細胞の増殖に及ぼす影響の解析
各種細菌と BY-2 細胞を共培養した。(A) 共培養 96 時間後の写真、(B) BY-2 細胞の増殖、(C) BY-2 細胞の死細胞率。グレーのダイヤは微生物なし、赤の丸は BR1R-2 株、緑の三角は *P. carotovorum*、青の四角は *E. coli* との共培養を示す。

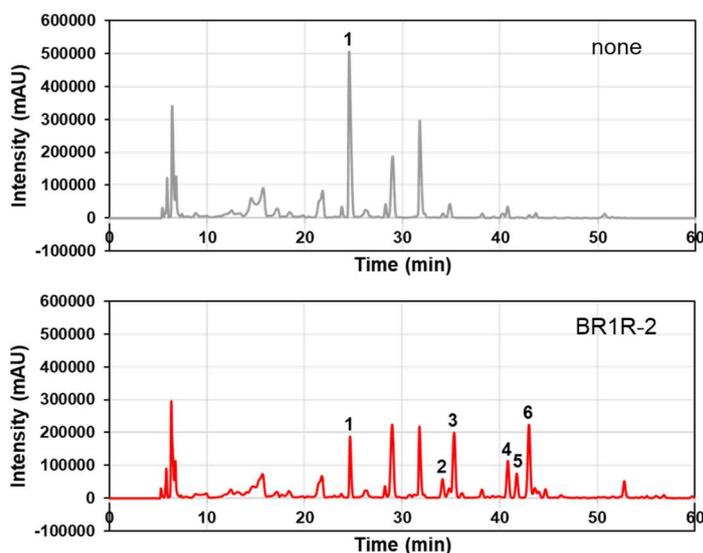


図 2 BR1R-2 株との共培養が BY-2 細胞の代謝に及ぼす影響の解析
BR1R-2 株と 96 時間共培養した BY-2 細胞から代謝産物を抽出し、HPLC 分析に供した。上段のクロマトグラムは微生物なし、下段のクロマトグラムは BR1R-2 株との共培養を示す。