

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06004・19K21146

研究課題名(和文)植物病原菌におけるホウ酸走化性の意義

研究課題名(英文)Studies on boric acid chemotaxis in plant pathogen

研究代表者

緋田 安希子(Hida, Akiko)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・助教

研究者番号：70825760

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文):運動性細菌は化合物を感知して集積・逃避する走化性という性質をもつ。ホウ酸を感知するセンサーは植物病原菌にのみ保存されており、ホウ酸走化性は植物感染に重要と予想された。本研究では、既に同定済みの青枯病菌のホウ酸センサーの情報をもとに、タバコ野火病菌と軟腐病原菌のホウ酸走化性センサーをそれぞれ特定した。タバコ野火病菌を用いた植物接種試験では、野生株とホウ酸走化性欠損株の感染力に有意な差を見出すことはできなかったが、特定した軟腐病原菌のセンサーは既に植物体内への侵入に寄与すると報告されているものであった。このことから、少なくとも軟腐病原菌ではホウ酸走化性は植物感染に重要であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タバコ野火病菌・青枯病菌ともに世界のトップ10植物病原菌(2012年)の1位と2位に位置する世界的に深刻な農業被害をもたらす植物病原菌である。特に青枯病菌は現在も有効な感染防除法が確立されていない病原菌であり、このような細菌の感染機構の理解は新たな感染防除法の確立に寄与すると考えられる。また、ホウ酸走化性については他に一切研究されておらず、もし多くの植物病原菌に共通するようなホウ酸走化性を利用した感染機構の存在が証明できたなら、幅広い植物病原菌に有効な感染防除法の提案にもつながるかもしれない。

研究成果の概要(英文): Motile bacteria sense chemical gradients in environment and swim toward their favorable sites or away from unfavorable sites. The behavior is called chemotaxis. Since BLAST analysis using amino-acid sequence of chemotaxis sensor for boric acid previously identified in *R. solanacearum* showed that boric acid sensors are distributed only among plant pathogens, boric acid chemotaxis might play an important role for infection of plant pathogens. In this study, new boric acid sensors were identified in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *Dickeya dadantii*, respectively. In plant infection assay using *P. syringae* mutant defective in boric acid chemotaxis, no involvement of boric acid chemotaxis in plant infection was observed. However, boric acid sensor of *D. dadantii* had already been reported as protein involved in invasion of plants through wounds. It is therefore strongly suggested that chemotaxis to boric acid is important for plant infection in at least *D. dadantii*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：走化性 ホウ酸 植物病原菌 走化性センサータンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境細菌は周囲の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走化性という性質をもつ。これまでの研究から、ホウ酸が青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の走化性誘引物質であることを見出し、ホウ酸を感知するセンサータンパク質 (Rs_McpB) の特定に成功した。さらに、Rs_McpB のリガンド結合領域のアミノ酸配列を用いた BLAST 解析により、ホウ酸走化性センサーは植物病原菌にのみ特異的に分布する可能性が示された。ホウ酸は植物にも密接に関係する化合物であることから、ホウ酸走化性は植物病原菌が宿主植物へと感染する際に重要な役割を担う走化性である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、植物病原菌においてホウ酸走化性と植物感染の関連を明らかにすることを目的とした。青枯病菌は土壌伝染性の植物病原菌であり根から植物体内へと侵入し感染する。ホウ酸は植物の生育必須栄養素でもあり、植物の栽培用培地にはホウ酸を添加する必要がある。そのため、青枯病菌を用いた場合、ホウ酸が均一に存在する条件下でホウ酸走化性と感染の関連を解析しなくてはならず、適切な評価が困難であると考えられた。そこで、本研究では Rs_McpB ホモログを有し、葉から感染する植物病原菌であるタバコ野火病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 株を用いた解析を試みた。また同様に Rs_McpB ホモログを有する *Dickeya dadantii* 3937 についても解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ホウ酸走化性センサーの特定

タバコ野火病菌の有する Rs_McpB ホモログ (Ps_McpB) については、当該遺伝子を *Escherichia-Pseudomonas* ショットルベクター (pUCP18) に組み込んだ後、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 へ導入することで異種発現させた。D. *dadantii* 3937 については菌株の入手が困難であったため、当該菌株の保有する Rs_McpB ホモログ (Dd_McpB) 遺伝子を人工合成し解析に使用した。人工合成した Dd_McpB 遺伝子を *Escherichia-Ralstonia* ショットルベクター (pRCII) に組み込んだ後、*R. solanacearum* Ps29 ホウ酸走化性欠損株へ導入することで異種発現させた。これら異種発現株のホウ酸への走化性を Computer-assisted capillary assay 法を用いて測定し、Ps_McpB および Dd_McpB がホウ酸センサーであるかを確認した。

(2) タバコ野火病菌における感染試験

タバコ野火病菌のホウ酸走化性欠損株は、ノンマーカージェノ型破壊法により Ps_McpB を欠損させることで取得した。取得した Δ Ps_McpB と野生株を用いてタバコへの接種試験を行い、病原性を比較することで、感染におけるホウ酸走化性の重要性を評価した。タバコ苗へ菌体を接種後、3,5,7 日後の病徴を記録した。また接種 3 日後には葉の断片を採取し CFU 測定を行った。なお、構築した変異株の病原性評価は研究協力者である岡山大学の一瀬勇規教授らの研究グループによって行われた。

4. 研究成果

タバコ野火病菌の野生株はホウ酸に対して青枯病菌と同等の強い誘引応答を示すことが明らかとなった。青枯病菌のホウ酸センサーのホモログである Ps_McpB について異種相補試験を行った結果、当該タンパク質がホウ酸走化性センサーであることが明らかとなった。また、Ps_McpB 欠損株ではホウ酸走化性が完全に喪失していることが確認され、タバコ野火病菌のホウ酸走化

性には Ps_McpB のみが寄与することが示された。そこで Δ Ps_McpB を用いたタバコ苗への接種試験を行った。その結果、Ps_McpB 欠損株は野生株と同程度の病原性を示し、少なくとも本試験条件下ではハウ酸走化性はタバコ野火病菌の植物感染に寄与しないと考えられた。しかし、これについては実験条件を詳細に検討しさらに評価して行く必要があるだろう。

BLAST 解析では他にも多数の植物病原菌においてハウ酸センサータンパク質が推定された。その中のひとつである *D. dadantii* 3937 株の Dd_McpB は 2015 年の報文において、ジャスモン酸走化性センサーであり、植物体への侵入に関与することが示されているものであった。しかしこの報文内ではハウ酸については全く解析されていなかったことから、Dd_McpB 遺伝子を人工合成し、青枯病菌への異種相補試験により解析した結果、Dd_McpB もまたハウ酸センサーであることが明らかとなった。一方でジャスモン酸走化性には寄与しなかった。これらの結果と 2015 年の報文から、*D. dadantii* ではハウ酸走化性が感染時の植物体内への侵入に寄与することが強く示唆された。そのため、青枯病菌やタバコ野火病菌においてもやはりハウ酸走化性は植物感染に寄与する可能性が高いと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 緋田安希子、田島誉久、加藤純一
2. 発表標題 植物病原菌は何を目印に宿主を探す？
3. 学会等名 生物工学若手会夏のセミナー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	一瀬 勇規 (Ichinose Yuki)		
研究協力者	松井 英譲 (Matsui Hidenori)		