

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780042

研究課題名（和文） 植物拮抗細菌が産生するバイオコントロール因子の発現制御機構に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the regulatory mechanisms involved in biocontrol factor expression in plant-associated bacteria

研究代表者

竹内 香純（TAKEUCHI KASUMI）

独立行政法人 農業生物資源研究所・植物・微生物間相互作用研究ユニット・主任研究員

研究者番号：40370663

研究成果の概要（和文）：グラム陰性細菌 *Pseudomonas fluorescens* は植物の根圏に生息し、病原菌と拮抗して植物を保護するバイオコントロール細菌としての特徴を有する。この細菌の拮抗性に関わる抗菌性物質は、Gac/Rsm とよばれるシグナル伝達系に基づき本細菌の二次代謝産物として産生されるが、それらの遺伝子発現を制御するメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、そうした制御に関わる因子を探索するため、Gac/Rsm の変異株を用いたメタボローム解析を行った。さらに、変異株間で蓄積量に差のみられた物質のうち、警告物質 ppGpp について詳細な機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Gram-negative, root-colonizing biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* produces antibiotics as its secondary metabolites through the Gac/Rsm signal transduction pathway, and it contributes to plant protection from pathogens. In this study, metabolomic profiling was performed on Gac/Rsm mutants. Among the metabolites regulated by the Gac/Rsm system, intracellular alarmone ppGpp was characterized in detail.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病害防除、植物拮抗細菌、バイオコントロール、シグナル伝達系、メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌 *Pseudomonas fluorescens* は植物の根圏に生息し、病原菌と拮抗して植物を保護するバイオコントロール細菌として知られている。この細菌の拮抗性に関わる抗菌性物質などのバイオコントロール因子（フログルシノール、ピオルテオリン、AprA プロテアーゼ等）は、*P. fluorescens* 菌の二

次代謝産物として産生される。この因子は自身の生育には直接関与しないものの、Gac/Rsm とよばれるシグナル伝達系によりその発現の調節がなされている（Gac: Global activator, Rsm: Regulation of secondary metabolism）。

しかし、その制御機構については不明な点が多く、特に細胞内因子の関与が示唆されて

いるものの、これまで具体的には明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

P. fluorescens の拮抗性に関わる抗菌性物質をコードする遺伝子は、リプレッサーおよびそれに結合する調節型 small RNA (RsmX, RsmY, RsmZ) によって菌密度依存的に調節されており(図1)、高密度下になって初めて発現する。しかしその誘因となる細胞内シグナル因子や調節因子は明らかになっていない。本研究では、分析化学的および分子生物学的手法を用いて、特に菌体内の代謝産物の中からそうしたシグナル因子および調節因子の探索を行い、最終的に *P. fluorescens* におけるバイオコントロール因子の発現制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究対象としたのは、*P. fluorescens* のモデル系統である CHA0 株である。CHA0 株は全ゲノム配列が既に公開されている *P. fluorescens* Pf-5 株と極めて近縁であるため (Paulsen et al., Nature Biotechnol. (2005) 23: 873-878) データベースが活用可能であり、変異株の作出も行いやすい。

P. fluorescens の野生株および各変異株における代謝産物の比較解析(メタボローム解析)を行うため、まず、各菌株を改変 GCM 液体培地 (Takeuchi et al., J Biol Chem (2009) 284: 34976-34985) にて培養した。菌体密度が OD600=1.7 に達した時点で、メンブレンフィルターにて菌体を回収しメタノール抽出を行った。メタボローム解析は、CE-TOF MS (capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry) により行った。この時、野生株のほか、バイオコントロール能に差のみられる変異株を用い、比較解析を行うこととした。供した変異株は以下の3種類であり、それぞれ3個体ずつサンプリングした。

- ・ GacA 変異株 (一連のシグナル伝達系の上流にて正の制御を行っている GacA の欠損変異株。センサーキナーゼである GacS とともに二成分制御系を司っており、Response regulator として機能する。この変異株ではバイオコントロール能が完全に失われる。図1参照)

- ・ RetS 変異株 (原形質膜上で GacS/A を負に制御する RetS の欠損変異株。RetS は Regulation of exopolysaccharides and type III secretion の略。この変異株では抗菌性が亢進する。図1参照)

- ・ FumA 変異株 (TCA サイクル中の Fumarase をコードする *fumA* 遺伝子の欠損変異株。菌体内のフマル酸の濃度が高くなっており、この変異株も抗菌性が亢進する。)

(Takeuchi et al., 2009)。

次に、各変異株間で蓄積量に差のみられた物質のうち、*P. fluorescens* の拮抗性に関与することが予測される物質に焦点を絞り、過去の文献、および *Pseudomonas* 属細菌の全ゲノム配列の情報をもとに、関連する遺伝子の同定を行った。また、それら遺伝子について相同組換えにより欠損株の作出を行い、拮抗性関連遺伝子の発現パターンを *lacZ* レポータープラスミドを用いて調べた。さらに、それら変異株の実際の抗菌性を明らかにするため、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に対する抗菌性を評価した。

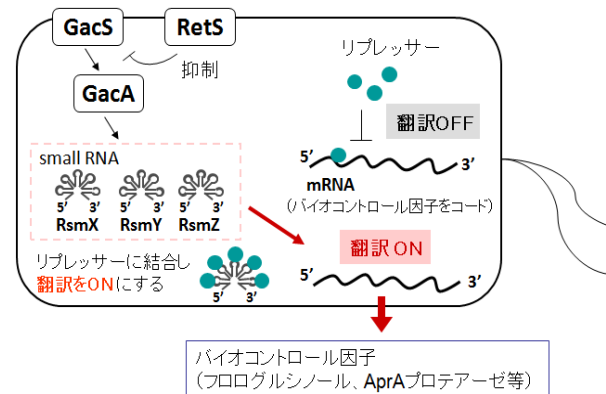


図1: *P. fluorescens* におけるバイオコントロール因子の発現制御機構(図中の GacA および RetS の欠損変異株をメタボローム解析に供した)

4. 研究成果

平成22年度は、*P. fluorescens* の菌体内においてバイオコントロール因子の発現に関与するシグナル物質の探索を行うため、上述の変異株を用いメタボローム解析を行った。なお、年度の前半は、解析に供するサンプル準備のための培養条件の検討を行い、有効な条件を決定することができた。

メタボローム解析では、約200の代謝産物について同定、比較がなされた。解析結果を主成分分析により視覚化したところ、GacA変異株では、野生株と比較し代謝のパターンが著しく異なることが示された。また、GacA変異株と RetS 変異株はそれらの機能上、相反する表現型であるが、メタボローム解析の結果においても、蓄積量の亢進および低下のパターンが逆であったものが多くみられた。さらに、RetS 変異株および FumA 変異株では、欠損させた遺伝子の機能は全く異なるものの、代謝パターンが類似しており、表現型との相関が示唆された。

メタボローム解析では、一般的に1つの遺伝子の欠損だけでは解析結果に大きな差異がみられないことがあるといわれるが、実際に用いた変異株では極めてユニークな代謝パターンを示しており、この戦略の有効性を示していた。

GacA 変異株で野生株との代謝パターンが大きく異なっていたことについては、GacS/GacA 二成分制御系が、二次代謝のみならず、一次代謝の制御にも重要であることを示しており、この点も本研究分野における新たな知見であった（投稿中）。

平成23年度は、前年度行ったメタボローム解析の結果に基づき、GacA変異株とRetS変異株の間で逆の蓄積パターンを示した代謝物質にターゲットを絞り詳細な解析を行うこととした。そうした物質の中の1つにグアノシン4リン酸 (ppGpp) が含まれていた。ppGppは、細菌が飢餓状態に陥った際に警告物質 (alarmon) として機能することが知られているが、近年、病原細菌の病原性等様々な表現型にも関与することが報告されており (Dalebroux et al., Microbiol Mol Biol Rev (2010) 74: 171-199)、*P. fluorescens* の拮抗性における関与について興味をもたれたため、以下の点について解析を進めた。

(1) GacA変異株におけるppGpp合成酵素遺伝子の発現解析

GacA変異株では、ppGppの蓄積が顕著に高まっていたため、その合成遺伝子の発現がGacS/GacAの制御下にあると考えられた。そこで本細菌のppGpp合成酵素遺伝子 $relA$ のプロモーター発現解析を $lacZ$ レポーター遺伝子を用いて行ったところ、野生株と比較して高菌密度下での発現が高まっていた。

(2) ppGpp合成酵素遺伝子 $relA$ 、および合成/分解酵素遺伝子 $spoT$ の欠損変異株の作出
次に、*P. fluorescens*の全ゲノム配列情報をもとに、ppGppの合成等に関与することが推定される遺伝子の欠損変異株の作出を相同組換えにより行った。合成酵素遺伝子 $relA$ 、および合成と分解の双方の機能を有する酵素遺伝子である $spoT$ の欠損変異株（それぞれ $\Delta relA$ および $\Delta spoT$ とする）のほか、それらの二重欠損変異株 ($\Delta relA/spoT$) を作出した。HPLCにより菌体内のppGpp蓄積量を定量したところ、 $\Delta relA$ および $\Delta relA/spoT$ では検出限界レベル以下であり、 $\Delta spoT$ では、野生株とほぼ同程度または若干高い数値を示した。ただし、グルコース最少培地における生育状況から、 $\Delta relA$ ではHPLCでは検出されないレベルのppGppが

蓄積していることが示唆されたが、 $\Delta relA/spoT$ ではppGpp合成能が完全に失われていることが示された。

(3) 各変異株におけるsmall RNAおよびAprAプロテアーゼ遺伝子の発現解析

(2)で作出した変異株のシリーズについて、Gac/Rsmのシグナル伝達経路中の調節型small RNA、ならびにバイオコントロール因子の一つであるAprAプロテアーゼの発現量を野生株と比較した。 $\Delta relA/spoT$ では、small RNA ($RsmY$ および $RsmZ$)、AprAプロテアーゼの発現量がいずれも低下していたことから、ppGppが本細菌のsmall RNAを介し、バイオコントロール能を正に制御している可能性が示唆された。

(4) 各変異株における抗菌性の比較

これらの変異株について、固形培地上における枯草菌 (*B. subtilis*) に対する抗菌性を調べたところ、 $\Delta relA/spoT$ では野生株と比較し抗菌性が顕著に低下していた。ただし、GacA変異株のように抗菌性が完全に失われることはなく、微量の抗菌性物質が生産されているものと思われた。また、 $\Delta relA$ および $\Delta spoT$ では野生株とほぼ同程度の抗菌性を示しており、本細菌の抗菌性が低下するためにはppGppの合成能が完全に失われることが必要であると考えられた。

以上のことから、ppGppの蓄積はGacAにより負に制御を受けているものの、ppGpp自体はGac/Rsmのシグナル伝達系に正に作用し、本細菌の抗菌性に影響することが明らかとなった（投稿中）。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 竹内香純
細菌の力を生かして植物を守る ～拮抗細菌の small RNA の発現を指標にして
バイオサイエンスとインダストリー、Vol. 70、2012、23-26

[学会発表] (計 4 件)

- ① 竹内香純、Dieter Haas、山田小須弥
Pseudomonas fluorescens の拮抗変異株を用いたメタボローム解析
平成23年度 日本植物病理学会大会
2011年3月28日、東京農工大学（東京都）

- ② 濱島弓弦、繁森英幸、山田小須弥、竹内香純、Dieter Haas
Pseudomonas fluorescens CHA0 からの生理活性物質の探索
日本化学会 第4回関東支部大会
2010年8月31日、筑波大学（茨城県）
- ③ Takeuchi K, Yamada K, Haas D
Inactivation of the *gacA* response regulator causes global changes in the metabolism of *Pseudomonas fluorescens*
4th Congress of European Microbiologists (FEMS 2011)
2011年6月27日、Palexpo Geneva Congress Center（スイス ジュネーブ）
- ④ 竹内香純、山田小須弥、Dieter Haas
Pseudomonas fluorescens の拮抗性には ppGpp 合成酵素遺伝子が関与する
平成23年度 日本植物病理学会大会
2012年3月29日、福岡国際会議場（福岡県）

[その他]

ホームページ等

<http://www.nias.affrc.go.jp/org/DivPlant/Plant-Microbe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 香純 (TAKEUCHI KASUMI)

独立行政法人 農業生物資源研究所 植物科学研究領域 植物・微生物間相互作用研究ユニット 主任研究員
研究者番号：40370663

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし