

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570079

研究課題名(和文) 青枯病菌の導管内移動能力と側根誘導現象の解析

研究課題名(英文) The analysis of movement ability of *Ralstonia solanacearum* in planta

研究代表者

藤江 誠 (FUJIE, MAKOTO)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：20274110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌と宿主の相互作用を解析するために、in plantaで青枯病菌の動態をイメージングにより解析する実験系を確立した。細胞壁分解酵素が青枯病菌の移動能力に関係することを確認した。さらに解析を進めるために、ナス科植物のモデルとしてタバコ培養細胞BY-2と青枯病菌の相互作用に着目した。病害応答遺伝子の発現等を調べた結果、BY-2細胞は青枯病菌の宿主のモデルとして機能する事が示された。この相互作用におけるエフェクターの役割を調べるためにpRSSを改変し、大腸菌とのシャトルベクターであるpRES-TGを構築した。pRES-TGを利用してpopABCのプロモーターの発現を解析した。

研究成果の概要(英文)：The experimental system to analyze behaviors *Ralstonia solanacearum* in planta by imaging was established. Furthermore, its attention was paid to the interaction between *R. solanacearum* and tobacco cultured cell BY-2, as a model of a solanaceous plants. As a result of investigating disease response genes, etc., it was confirmed that BY-2 cells functions as a model system. To study the roles of the effectors in this system, pRES-TG, a shuttle vector between *E. coli*, was constructed.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 形態・構造

キーワード：青枯病菌 エフェクター 微生物相互作用 BY-2

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌であるタバコ青枯病菌は、植物体内に侵入後、導管内に侵入、増殖しながら導管内を地上部に向けて移動する。導管内部で増殖した青枯病菌は、菌体外に粘性の多糖類を大量に分泌し、植物は急速な枯死に至る。青枯病菌は植物体の全体に常に蔓延するのではなく、植物体内の一部においてのみ増殖していることが多い。これは、全ての導管が連続に接続しているのではなく、導管システム内において通水は可能でも病原菌の移動を妨げる障壁が存在するためと考えられる。

我々は、薬剤の選択圧がない条件でも安定に青枯病菌に保持されるプラスミドを開発した。このプラスミドを利用して GFP 標識することで、*in planta* の青枯病菌のダイナミズムを追跡可能になり、根と茎の境界部分における物理的な障壁の存在が示唆された。また、青枯病菌感染の場合に側根に類似の器官（側根様器官）が主根に形成される場合があることを見いだしている。

2. 研究の目的

(1) BY-2 細胞を用いたモデル実験系の確立：側根の誘導には、病原性に深い TTSS (Type Three Secretion System) を経由する effector の関与が考えられる。青枯病菌の感染に伴い一連の effector の順序だった発現が行われるが、何らかの原因で制御が乱れると、病原菌と植物細胞の対話が混乱するために、植物細胞の増殖が刺激され側根形成にいたると考えている。この感染過程における effector の発現を比較し、側根誘導に相関のある effector 遺伝子の解析が目的の一つである。解析において植物体全体を用いると、多様な細胞・組織が混在するため、結果の解釈が複雑になってくる。そこで、ナス科植物のモデルとして、タバコ培養細胞 BY-2 に着目する。タバコ BY-2 に青枯病菌を感染させる実験系を構築し、細胞生物学的に解析する。(2) バクテリアの移動・増殖を阻害する構造（導管の不連続性）の解明：根と茎の境界部が、青枯病菌バリアーとして働くことが示唆されているが、実体は不明である。形態学的に境界部での導管システムの構造を検討し、物理的な障壁（導管の不連続性）の存在を検討する。植物への侵入や導管システム内での移動では、青枯病菌は植物細胞壁を分解する酵素を分泌する。青枯病菌の分泌型多糖類分解酵素（セルラーゼ等）を破壊し、移動に必要な遺伝子を決定する。そして、その発現を *in planta* でイメージング解析する系を構築する。

3. 研究の方法

(1) BY-2 細胞を用いたモデル実験系の確立：BY-2 細胞は単細胞に近い増殖様式を示す事

から、観察時の光学条件が植物体内よりはるかに有利であり、感度・解像度の向上が期待できる。まず、当研究室で保持する青枯病菌株のうちタバコ培養細胞に感染する菌株を選抜する。ついで、BY-2 細胞が青枯病菌に反応して、自死する様式や、青枯病菌が BY-2 細胞に吸着する様式をライブイメージングで解明する。最終的には、GFP-effector の融合遺伝子を発現する青枯病菌を BY-2 細胞に感染させ、effector が注入される素過程を解析する。

(2) 導管構造との解析：GFP 標識した青枯病菌の移動を指標にして、根と茎の境界の導管の構造を三次元的に解析する。障壁通過に利用が予想される分泌型細胞壁分解酵素の遺伝子破壊株を利用して、青枯病菌の移動機構を解析する。

(3) 側根誘導現象の解析：寒天培地上での感染系を利用して、側根が誘導される条件等について *in planta* で解析する。

4. 研究成果

(1) 青枯病菌が植物に侵入感染する過程においては、植物の細胞壁を分解する能力が重要である。青枯病菌ゲノムにコードされる細胞壁分解酵素 (CWDE) のうち、セルロースを分解するエンドグルカナーゼに着目して研究を行った。エンドグルカナーゼ破壊株を GFP で安定に標識した株を作製し、トマト芽生えに感染させ、蛍光顕微鏡で菌の感染・増殖の進行をリアルタイムでモニタリングする系を完成させた。菌の植物体内における動態のリアルタイム解析を高感度 CCD カメラにより行った結果、主根と側根の境界、および主根と茎の境界において、菌の移動が遅延・停止する現象を確認した。この現象には、CWDE が関与していると考えられた。エンドグルカナーゼ破壊株においては、(1) virulence、(2) 植物体内での移動速度、(3) 増殖速度、(4) 菌体外多糖の分泌の低下という、4つの指標の低下が確認された。破壊株に野生型遺伝子を相補した株では、指標の低下が抑圧された。また、青枯病菌をトマトの芽生えに感染させると、根から増殖した菌体が漏れだす現象が見られるが、エンドグルカナーゼ破壊株を感染させた場合では、菌体が漏れだす頻度が明らかに低下していた。側根の形成においては、シャーレ内の湿度の影響の関与が大きい可能性が示された。

(2) *R. solanacearum* が植物に感染する素過程を、BY-2 細胞を用いて解析するにあたり、BY-2 細胞が *R. solanacearum* に反応するか、さらに *R. solanacearum* が BY-2 細胞を宿主として認識するのかを確認した。LSD プレートに形成させた BY-2 細胞のカルスの中心に *R.*

solanacearum 1-11 株及びネガティブコントロールとして *E. coli* JM109 株を滴下し、カルスを観察したところ、JM109 株を滴下したカルスは中心部で若干の変化が見られたのみであるのに対し、1-11 株を滴下したカルスでは、全体が茶色に変色した。これは、明らかに 1-11 株を滴下したことによる反応であり、BY-2 細胞が 1-11 株に対し過敏反応等の応答を示したと考えられる。これにより、BY-2 細胞が *R. solanacearum* に反応するということが確認できた。次に、*R. solanacearum* が BY-2 細胞を宿主として認識し、走性があるかどうかを調べた。カルスから離れたところに、1-11 GFP 株およびネガティブコントロールとして JM109 GFP 株を滴下し走性を観察したところ、JM 109 GFP 株の走性は確認できなかったのに対し、1-11 GFP 株はカルスに向かっていくことが観察できた。また、近くに滴下した 1-11 GFP 株ほど走性が大きくなっており、BY-2 細胞から拡散する化学物質に反応していると考えられる。以上より、BY-2 細胞と *R. solanacearum* は互いに反応するということが確認できたので、以後ナス科植物であるタバコのモデルとして BY-2 細胞を用いて実験を行うことにした。

(3) *R. solanacearum* は CWDE を分泌することにより、植物の根の表皮細胞や導管壁の細胞壁を分解することができ、その結果、根および導管への侵入が可能となる。*R. solanacearum* が分泌する 6 種の CWDE の中でも EGL は、植物細胞表面にその基質となる多糖（セルロース）が多く含まれていることから、菌体の感染成立に大きな影響を与えていると推測し、着目した。特に *R. solanacearum* が植物に働きかける最初の段階である、植物細胞への吸着時における EGL の役割に着目し、BY-2 細胞および EGL 破壊株(*egl* 株)を用いて実験を行った。1-11 株の EGL 遺伝子を、カナマイシンカセットを挿入することにより破壊し、さらに GFP 標識用コントラストを導入して、EGL 破壊株(*egl* 株)を作製した。この *egl* 株を用いて走性の検討を同様に行ったところ、1-11 GFP 株と同じ走性パターンを示した。このことから、EGL は BY-2 細胞の感知や走性には直接の関係はないことが示された。吸着実験を行うにあたり、カルスでは形成されるまでに 2 週間程度要するため、BY-2 培養液に 1-11 GFP 株及び *egl* 株、ネガティブコントロールとして JM 109 GFP 株を混合し、BY-2 細胞への菌の吸着を観察した。その結果、JM 109 GFP 株を混合した BY-2 細胞には吸着はほとんど見られなかった。一方、1-11 GFP 株を混合した BY-2 細胞において、1-11 GFP 株の吸着が観察された。また、*egl* 株では、BY-2 細胞

への吸着が 1-11 GFP 株に比べ有意に少なかった。マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を定量した結果からも *egl* 株は、BY-2 細胞への吸着が 1-11 GFP 株に比べ少ないことが確認された。これらのことから、*R. solanacearum* が分泌する EGL が感染の初期段階である植物細胞の吸着に関して、重要な役割をはたしていることが示唆された。

(4) 病害応答遺伝子である PR-1、PR-4、EREBP の発現が、1-11 株と *egl* 株、及び親和性株(C319)と非親和性株(MAFF 106611)でどのような差異があるか解析し、植物の抵抗性と病害応答遺伝子発現の関係を検討するため、定量 PCR を用いて発現量を測定した。BY-2 培養液に 1-11 GFP 株及び *egl* 株、C319 株、それぞれについて経時的に防御遺伝子(EREBP、PR-1、PR-4)の発現量について定量 PCR を用いて定量した。

《EREBP》 EREBP の発現は、親和性株(病原性有)の C319 株で特に増加しており、C319 株からのエフェクター等の攻撃に反応していると考えられる。また、KJ (*egl*) 株では EGL による細胞壁の分解が行われないため、細胞への傷害が 1-11 株より小さいと考え、1-11 株より KJ (*egl*) 株の発現量が低くなると予想していた。しかし、KJ (*egl*) 株では、やや強い発現が認められた一方で、非親和性(病原性なし)の 1-11 株では、弱い発現応答が認められた。

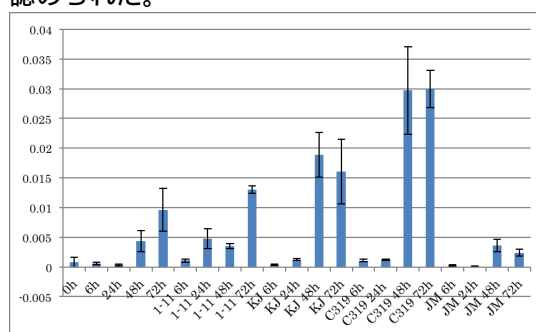


図 1 EREBP の mRNA 発現の定量結果

《PR-1》 病原菌が感染するとサリチル酸が蓄積され、これがシグナル物質として働いて全初身獲得抵抗性(SAR)が誘導される。SAR にはサリチル酸の関与が大きい、サリチル酸の蓄積により発現誘導される防御遺伝子の 1 つが PR-1 である。この PR-1 は C319 株の添加により有意な発現誘導が認められた。

《PR-4》 ジャスモン酸は、傷害や環境ストレスを受けたときに合成され、シグナル物質として働いている。これにより発現する遺伝子の 1 つが PR-4 であるが、青枯病菌感染に関連しては、ほとんど発現していなかった。

EREBP、PR-1 の発現が C319 株により誘導されていることから、BY-2 は、*R. solanacearum* を認識して防御反応を行うことがわかり、青枯病菌感染モデルとして利用可能なことが示された。

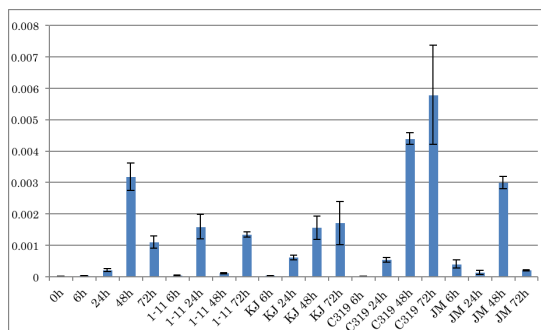


図 2 PR-1 mRNA の発現の定量結果

(5) BY-2 細胞を感染のモデル系として確立するには、感染過程における III 型 effector 等の発現・局在を GFP によるリアルタイムモニタリング等で解析する必要があるが、解析にはゲノムへの組換えよりも迅速・簡便な青枯病菌の形質転換系が必要である。藤江らは青枯病菌に感染する線状ファージのゲノムを改変して、抗生物質による選択圧が存在しない状況でも安定に保持されるプラスミド (pRSS) を開発し、研究に利用してきた。H25 年度においては、このプラスミドを大腸菌とのシャトルベクターに改変する事に成功した (pRES-TG)。

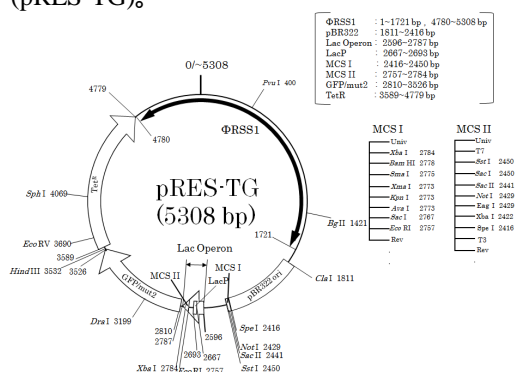


図 3 pRSS を改変した pRES-TG の構造

pRES-TG の安定性について検証した。抗生物質の選択圧がなくても MAFF106611 株や MAFF 211271 株では pRSS と同様に 1 週間以上安定に保持される事が確認できた。

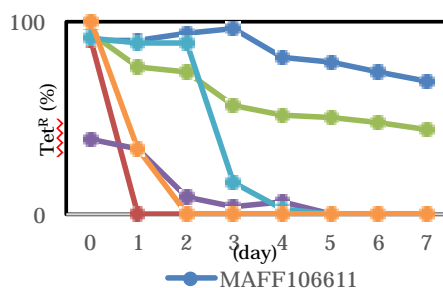


図 4 pRES-TG の青枯病菌体内での安定性
抗生物質無しの液体培地で一定日数の培養後に、プラスミドが保持されている割合を、テトラサイクリン耐性を指標として検定した。横軸は植継ぎ後の日数、縦軸はプラスミドが保持されている割合を示している。

次いで、pRES-TG を利用して青枯病菌の代表的な III 型 effector である popABC オペロンの発現解析を行った。青枯病菌の popABC オペロンのプロモータ (約 500bp) をクローニングし、pRES-TG の Lac プロモーターと入れ替えたプラスミドを構築し (pPpopGFP)、青枯病菌に形質転換した。GFP の発現を指標としてプロモータの活性を解析した結果、CPG 培地等の富栄養の条件では発現が抑制されるが、導管内の条件に近い最小培地では、発現が誘導されることが示唆された。

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 7 件)

(1) Abdelmonim Ali Ahmad, Megumi Ogawa, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie and Takashi Yamada. Characterization of Bacteriophages Cp1 and Cp2, the Strain-Typing Agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *Appl. Environ. Microbiol.* 査読有, 80, 2014, pp77-85. DOI: 10.1128/AEM.02310-13.

(2) Ahmed Askora, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada. Insights into the diversity of ϕ RSM phages infecting strains of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* complex: regulation and evolution. *Mol Genet Genomics.* 査読有, (epub 2014/3/14), DOI 10.1007/s00438-014-0835-3

(3) Hardian S. Addy, Ahmed Askora, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, and Takashi Yamada. The Filamentous Phage ϕ RSS1 Enhances Virulence of Phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on Tomato, *PHYTOPATHOLOGY*, 査読有, Vol. 102,

2012, pp241-245, doi:
10.1094/PHYTO-10-11-0277.
(4) Hardian S. Addy, Ahmed Askora, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, and Takashi Yamada, Loss of Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* Through Infection by ϕ RSM Filamentous Phages, PHYTOPATHOLOGY, 査読有, Vol. 102, 2012, pp469-477, doi: 10.1094/PHYTO-11-11-0319-R
(5)Hardian S. Addy, Ahmed Askora, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, and Takashi Yamada. Utilization of Filamentous Phage ϕ RSM3 to Control Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Disease, 査読有, Vol. 96, 2012, pp1204-1209, doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1023-RE
(6) Ahmed Askora, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, and Takashi Yamada. Resolvase-like serine recombinase mediates integration/excision in the bacteriophage ϕ RSM. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, VOL. 111, 2011, pp109-116, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.10.001.
(7) Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. Fujiwara A, Fujisawa M, Hamasaki R, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Appl Environ Microbiol, 査読有, 77, 2011 pp4155-62. doi: 10.1128/AEM.02847-10.

〔学会発表〕(計4件)

1. 藤江 誠, 磯崎 里奈, 川崎 健, 山田 隆. タバコ培養細胞 BY-2 と植物病原菌の相互作用の解析. 日本植物学会 第77回大会, 2013/9/15 北海道大学札幌キャンパス.
2. 磯崎 里奈, 梶田 浩未, 川崎 健, 山田 隆, 藤江 誠. タバコ培養細胞BY-2を利用した青枯病菌感染モデル系の開発, 日本植物学会 第76回大会, 2012/9/15 兵庫県立大学書写キャンパス.
3. 梶田 浩未, 藤原 亜希子, 川崎 健, 藤江 誠, 山田 隆. 細胞壁分解酵素に着目した青枯病菌の感染メカニズム解明. 日本生物工学会 2011/9/27, 東京農工大学.
4. Makoto FUJIE, Rina ISOZAKI, Hiromi Kajita, Hirofumi TAKAMOTO, Takeru KAWASAKI, Takashi YAMADA. Monitoring the behavior of *Ralstonia solanacearum* cells by GFP labeling during infection process to plant cells. APS(米国植物病理学会)年会, 2011年8月8日, ハワイコンベンションセンター(米国).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 青枯病予防剤および青枯病の予防方法
発明者: 山田 隆、藤江 誠、川崎 健

権利者: 広島大学
種類: 特許
番号: 特開 2012-231731
出願年月日: 2011年4月28日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/ichikou/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤江 誠 (FUJIE MAKOTO)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・
准教授

研究者番号: 20274110

〔研究協力者〕

広島大学・先端物質科学研究科・学生

梶田 浩未 (2012年修士課程修了)

広島大学・先端物質科学研究科・学生

磯崎 里奈 (2013年修士課程修了)