

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780045

研究課題名(和文)植物との相互作用に関わる細菌のセカンドメッセンジャーの機能解明

研究課題名(英文)Characterization of bacterial second messengers involved in the interactions with plants

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は、増殖の過程で菌密度や周辺の環境変化に応じて自身の代謝パターンを柔軟に変える能力を備えている。しかしそうした変化をもたらすセカンドメッセンジャーに関する知見は著しく乏しい。本研究では植物の根圏に生息するバイオコントロール細菌 *Pseudomonas protegens* CHA0 (近年、*Pseudomonas fluorescens* から独立) を対象とし、本細菌の植物保護効果の主因となる抗菌性二次代謝産物の生産制御を支配する低分子化合物の機能を明らかにするため、ppGppの植物保護効果における役割を調べた。さらに、他の分子についても変異株を用いた解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Bacteria are metabolically versatile in response to the environments. But little is known about second messengers involved in this changing. In this study, we focused on biocontrol bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0 (previously called *Pseudomonas fluorescens* CHA0) which suppresses plant diseases by producing extracellular enzymes and secondary metabolites with antibiotic activity in the rhizosphere. We have shown that ppGpp appears to be essential for sustaining epiphytic fitness and biocontrol activity in *P. protegens* CHA0.

研究分野：植物保護科学

キーワード：バイオコントロール細菌 シグナル伝達系 植物保護 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

Pseudomonas 属細菌は環境中に広く生息するが、それは本細菌のニッチへの適応能力の高さに起因する。植物関連細菌においては、宿主となる植物体内や植物表層、そして根圏土壌が細菌にとってのニッチであるが、植物や土壌は常に変化し得る「周辺環境」といえる。本研究で対象とする *Pseudomonas fluorescens* グループに属する細菌は、根圏において他の病原微生物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ものが多く含まれる。本細菌の強みは、他の微生物を駆逐する抗菌性物質（バイオコントロール因子）を産生することであり、これはシグナル伝達系による緻密な制御のもと、本細菌の二次代謝産物として産生されている。具体的には、バイオコントロール因子の発現は RNA 結合タンパク質（リプレッサー）によって通常は負に制御されているが、菌密度が上昇すると、GacS/GacA とよばれる二成分制御系（Gac, Global activator）が活性化し、それにより調節型 small RNA の発現量が増大し、これらが上記リプレッサーに直接結合、捕捉することで結果としてバイオコントロール因子の遺伝子発現を促進する。すなわち、GacS/GacA 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。

2. 研究の目的

バイオコントロール因子は、上述のとおり一連のシグナル伝達系による緻密な制御のもと産生されることがこれまで明らかとなっているが、その誘因となる菌体内のシグナル物質（セカンドメッセンジャー）については、存在が示唆されているものの単離同定には至っていない。本研究では、先行研究により得られた菌体内代謝物質のメタボローム解析結果等に基づき、上記候補物質の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で対象とするのはバイオコントロール細菌のモデル系統 *Pseudomonas protegens* CHA0 株であり、これは近年まで *Pseudomonas fluorescens* と学名を同じくしていたが、“plant protecting bacteria” をその名の由来として新たな学名が提唱された（Ramette et al., Syst Appl Microbiol 2011）。CHA0 株は、全ゲノム配列が既に公開されている *P. protegens* Pf-5 株（旧学名 *P. fluorescens* Pf-5 株、Paulsen et al., Nature Biotechnol. 2005）と極めて近縁であるため、データベースが活用可能であり（www.pseudomonas.com）、変異株の作出も容易である。なお、CHA0 株の全ゲノム配列も 2014 年に決定、公開されたところである（Jousset et al., Genome Announcement 2014）。

CHA0 株の抗菌性を支配するセカンドメッセンジャーを解析するにあたり、先行研究で行ったメタボローム解析結果を生かし、抗菌性への関与が明らかにされた菌体内シグナ

ル物質 ppGpp（グアノシン 4 リン酸）について変異株を用いた植物保護能力検定試験等、詳細な機能解析を行うこととした。植物保護能力検定試験については、キュウリ幼苗とその病原性卵菌（*Pythium ultimum*）を用いた系により評価した。

次に、細菌のセカンドメッセンジャーとして知られるシグナル物質のうち、近年、緑膿菌をはじめとする病原細菌でその機能が重要視されている c-di-GMP（サイクリック di-GMP）についても興味をもたれ、調べることとした。

さらに、CHA0 株に限らず他の近縁の拮抗性 *Pseudomonas* 属細菌にも研究対象を拡げ、新たなセカンドメッセンジャーの探索を行うための研究基盤を整備した。

4. 研究成果

(1) 先行研究で CHA0 株の抗菌性への関与が明らかにされた ppGpp について、その合成酵素遺伝子 *relA*、合成酵素と分解酵素の両方を司る遺伝子 *spoT* の両方を欠損させた二重変異株では、野生株と比較し植物保護能力が顕著に低下することが明らかとなった。さらにキュウリ根圏における定着能力を各菌株のコロニー形成数により比較したところ、二重欠損変異株では野生株と比較し、1 オーダーの低下が見られた。先行研究において、ppGpp は抗菌性物質の発現に正に関与することを明らかにしたが、上述のとおり植物保護能力や根圏定着能力にも作用するため、ppGpp は本細菌のバイオコントロール細菌としての総合的な機能を維持する上で重要であることが示された。

(2) ppGpp は元来、アミノ酸飢餓における警告物質として機能するなど、細菌が受ける様々なストレス下で重要な役割を担うことが報告されていることから、ストレス応答性シグマ因子 RpoS の発現についても興味をもたれた。*lacZ* レポーター遺伝子の発現解析の結果から、*relA/spoT* 二重変異株では、野生株と比較し *rpoS* の発現が低下していたことから、CHA0 株においても、ppGpp が *rpoS* の発現に正に関与することが示された。

(3) CHA0 株のシグナル伝達系への関与に興味をもたれた c-di-GMP について、その機能を明らかにするため、全ゲノム情報が公開されている Pf-5 株における c-di-GMP 合成酵素遺伝子のホモログを検索した。Pf-5 株のゲノム中にはホモログが複数個見出され、それぞれの単独の欠損変異株ではリダンダンシーによる回復の問題があり、また全ての多重変異株の作出は困難であるため、それぞれの遺伝子の過剰発現個体を得て野生株との比較を行うこととした。緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* における報告から、特に合成酵素としての機能が低いとされる遺伝子のホモログを Pf-5 ゲノムから選抜し、CHA0 株のゲ

ノムからのクローニング、および CHA0 株への導入を行った。

シグナル伝達系への関与を明らかにするため、シグナル伝達系の中心的な役割を果たす GacS/GacA 二成分制御系の GacA (response regulator) のタンパク質レベルでの発現解析を行うこととした。GacA タンパク質については、これまで検出した報告例がなかったため、GacA のアミノ酸配列情報をもとにペプチド抗体を作製し、この抗体が GacA タンパク質を特異的に検出することをウエスタンブロット解析にて確認した。c-di-GMP 合成酵素遺伝子の各導入株における GacA タンパク質の発現量を調べたところ、導入株では、野生株と比較して GacA タンパク質の発現量が高まっていたことから、c-di-GMP が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。

(4) CHA0 株以外にも、他の近縁の *Pseudomonas* 属細菌に対象を拡げ、新たなセカンドメッセンジャーの探索のための研究基盤を整備することとした。まず、近縁の *Pseudomonas* 属細菌の中から顕著な植物保護効果を示した系統について、その植物保護能力の制御に関わる因子の探索を試みた。CHA0 株と同様、*gacA* のホモログを単離、同定し、その欠損変異株を作出し、以後の解析に供した。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に対する抗菌性を調べたところ、CHA0 株と同様、*gacA* 欠損変異株では抗菌性が失われることが明らかとなった。次に、調節型 small RNA の一つである RsmZ のプロモーターの発現パターンを評価する系を確立し、その発現が菌密度依存的であること、*gacA* 欠損変異株では発現レベルが著しく低下することを明らかにした。これらの成果をもとに、この *Pseudomonas* 属細菌についても、新たなセカンドメッセンジャーの探索が可能となった。

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 5 件)

Takeuchi K, Noda N, Katayose Y, Mukai Y, Numa H, Yamada K, Someya N (2015) Rhizoxin analogs contribute to the biocontrol activity of a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(3):333-342、査読有

竹内香純 (2015) 拮抗細菌の Gac/Rsm シグナル伝達系のオンとオフ 日本植物病理学会報 印刷中、査読無

Takeuchi K, Tsuchiya W, Noda N, Suzuki R, Yamazaki T, Haas D (2014) Lon protease negatively affects GacA protein stability and

expression of the Gac/Rsm signal transduction pathway in *Pseudomonas protegens*. *Environmental Microbiology* 16(8):2538-2549、査読有

竹内香純 (2013) バイオコントロール細菌の抗菌性制御機構 細菌にしっかり働いてもらうためには. *化学と生物* 51(2):78-80、査読無

Takeuchi K, Yamada K, Haas D (2012) ppGpp controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway sustains biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(11):1440-1449、査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

竹内香純 (2015) *Pseudomonas* 属細菌の調節型 small RNA の発現制御と抗菌性二次代謝産物. 第 88 回 日本細菌学会総会 ワークショップ 細菌感染の non-coding RNA 研究最前線 2015 年 3 月 26 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

竹内香純, 野田なほみ, 片寄裕一, 向井喜之, 沼寿隆, 山田小須弥, 染谷信孝 (2015) *Pseudomonas* sp. Os17 の植物保護能力にはリゾキシソキシン類縁体が寄与する. 平成 27 年度日本植物病理学会創立 100 周年記念大会 2015 年 3 月 29 日、明治大学駿河台キャンパス(東京都千代田区)

Takeuchi K, Tsuchiya W, Noda N, Suzuki R, Yamazaki T, Haas D (2014) Lon protease negatively affects GacA protein stability and expression of the Gac/Rsm signal transduction pathway in *Pseudomonas protegens*. XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions 2014 年 7 月 7 日、Rhodos Palace (ロードス、ギリシャ)

竹内香純 (2014) Lon プロテアーゼによる GacA タンパク質の不安定化は環境ストレス依存的に起きる. 第 87 回 日本細菌学会総会 2015 年 3 月 28 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

竹内香純 (2014) バイオコントロール細菌の抗菌性制御のメカニズム. 平成 25 年度 近畿中国四国農業試験研究推進会議 病害虫推進部会 問題別研究会 2014 年 3 月 3 日、福山市生涯学習プラザ(広島県福山市)

Takeuchi K, Tsuchiya W, Noda N, Suzuki R, Yamazaki T, Haas D (2013) Lon protease negatively regulates the Gac/Rsm signal transduction pathway in *Pseudomonas protegens* CHA0. 14th International Conference on Pseudomonas 2013 年 9 月 8 日、University of Lausanne (ローザンヌ、スイス)

竹内香純, 土屋渉, 野田なほみ, 鈴木倫太郎, 山崎俊正, Haas D (2013) *Pseudomonas fluorescens* の Gac/Rsm を介した抗菌性制御機構には Lon プロテアーゼが負に関与する. 平成 27 年度日本植物病理学会大会 2013 年 3 月 28 日、岐阜大学 (岐阜県岐阜市)

Takeuchi K (2013) Small RNA-dependent regulatory mechanisms of antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens*. 第 86 回 日本細菌学会総会 ワークショップ Plant-associated bacteria--自然免疫回避から、病原性・共生・拮抗への分化-- 2013 年 3 月 18 日、幕張メッセ 国際会議場 (千葉県千葉市)

Takeuchi K, Yamada K, Haas D (2012) ppGpp controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway sustains biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions 2012 年 7 月 30 日、国立京都国際会館 (京都府、京都市)

〔図書〕(計 3 件)

竹内香純 (2014) 植物根圏に生息する *Pseudomonas* 属細菌の抗菌性制御メカニズムとその利用. バイオコントロール研究会 (13):55-62

竹内香純 (2014) 拮抗細菌の二次代謝を制御する因子の探索. 植物感染生理談話会論文集 (49):105-112

竹内香純 (2014) 細菌が「のほほんモード」に戻るとき-拮抗細菌のシグナル伝達系のオンとオフ- 植物細菌病談話会論文集 (26):119-128

〔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