

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660035

研究課題名(和文)植物病原細菌の化学物質による感染行動制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of an infection behavior by chemotactic regulation of phytopathogenic bacteria

研究代表者

一瀬 勇規 (ICHINOSE, Yuki)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号：50213004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* には45前後の走化性センサータンパク質(mcp)遺伝子が存在しており、多くの化合物に対して走化性応答を示す可能性が高い。まず、高い運動能を有する *P. s. pv. tabaci* 6605がカイネチンなど10の化合物に対し正の走化性を示すことを明らかにした。次に植物病原性 *Pseudomonad* に特有な27 mcp遺伝子について、各欠損変異株を作出したところ、mcp4, mcp15b, mcp24の欠損変異株ではカイネチンに対する応答性が低下した。これらの遺伝子のコードするMCPはカイネチンに対するセンサータンパク質である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plant pathogenic bacterium, *Pseudomonas syringae* has about 45 genes encoding chemotaxis sensor protein (methyl-accepting chemotaxis protein, MCP). This indicates that *P. syringae* responds to a variety of chemoattractants. In this study, we revealed that highly motile phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 (Pta6605) showed positive chemotactic response to 10 compounds including kinetin. *P. aeruginosa*, a closely related bacterium to *P. syringae*, has only about 13 mcp genes. Thus we selected 27 mcp genes that are specific to *P. syringae* and not existed in *P. aeruginosa*. We generated mutant strains which lost each 27 mcp gene in Pta6605. Although most of the mcp mutants respond to kinetin as well as WT strains, only mutants for mcp4, mcp15b and mcp24 reduced the responsibility. These results indicate that these MCPs seem to be sensor proteins required for kinetin perception.

研究分野：植物病理学

キーワード：タバコ野病病菌 走化性 MCP 植物ホルモン 有機酸

1. 研究開始当初の背景

植物病原細菌を Infiltration 法等により強制的に細菌懸濁液を植物細胞間隙に注入した場合には、運動能の有無による病原力の違いは明確ではないが、葉にスプレーで接種する方法、培養土に冠水する方法など自然界の感染に類似した方法で接種した場合には、運動能欠損株の病原性は明らかに低下する (Ichinose et al. JGPP, 79: 285 [2013])。植物病原細菌は気孔や水孔などの自然開口部や傷口から植物細胞間隙に侵入し、病原性を発揮するが、この侵入は、従来偶発的で、細菌の病原性に積極的な方向性を有す運動能 (走性) は必要ないと思われてきた。しかしながら、Melotto et al. (Cell, 126: 969 [2006]) は、トマト斑葉細菌病菌が、閉鎖した気孔ではなく、開いた気孔の周辺に集合することを報告しており、本菌の病原力に走性が必要とされる可能性が示唆されている。また、*Ralstonia solanacearum* の走化性遺伝子 *cheW*, *cheA* や、走気性遺伝子 *aer1/aer2* の欠損変異株は培養土への冠水接種法で病原力が低下した (Yao and Allen, J. Bacteriol. 188: 3697 [2006]; Yao and Allen, J. Bacteriol. 189: 6415 [2007])。しかしながら、感染の現場において何に対して病原細菌が正の走性を示しているか、あるいは負の走性が存在するかなどは全く明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、植物病原細菌が傷口などから拡散しえる各種アミノ酸、有機酸や植物ホルモンに対し、正の走化性を示すか否かを検証し、病原力における走化性の役割を明らかにする。具体的には、高い運動能力を保持する *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 (*Pta6605*) が正の走化性を示す誘引物質を特定する。さらに、病原力におけるその役割を解明するとともに、それら誘引物質に対する受容体である走化性センサー MCP の遺伝子 (*methyl-accepting chemotaxis protein, mcp*) を同定する。

3. 研究の方法

本研究では半活物寄生性細菌の代表として、研究代表者がその高い運動能力と強い病原力からモデル病原菌として解析している *Pta6605* を解析した。まず、NARISHIGE のプレー PC-10 を使ってガラスキャピラリー (G-1) から走化性試験に用いるキャピラリーを作成した。次に、各種の誘引物質候補化合物を各種濃度で溶解後、等量の熱溶解させ

た 2% アガロースと混合し、そこに作成したキャピラリーを浸漬させ、誘引物質候補化合物を充填させたキャピラリーを作成した。本キャピラリーを NARISHIGE のマイクロマニピレーターに装着して、顕微鏡下でキャピラリーの先端に集合する細菌数を計測した。誘引物質候補化合物としては、各種有機酸、アミノ酸、植物ホルモンなどを解析した。

本菌の各種 *mcp* 遺伝子を欠損させた変異株は以下の方法で作出した。全塩基配列が解読済みの *P. syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000, *P. s.* pv. *phaseolicola* (*Pph*) 1448A, *P. s.* pv. *syringae* (*Psy*) B728a ではそれぞれ 45 前後の *mcp* 遺伝子が存在することが知られている (<http://beta.pseudomonas.com>)。一方、*Pta6605* のゲノム DNA のドラフトシーケンスが解読済みであるが、*mcp* 遺伝子の同定はなされていない。そこで、*Pto*DC3000 などの *mcp* 遺伝子のオルソログを *Pta6605* のドラフトシーケンスから検索した。その結果、*Pta6605* においても少なくとも 45 の *mcp* 遺伝子が存在することが明らかとされた。そこで、これらの *mcp* 遺伝子のうち、近縁種の動物病原細菌である緑膿菌 *P. aeruginosa* には存在しない 27 個の *mcp* 遺伝子を植物病原細菌特有の *mcp* 遺伝子として選抜し、*Pta6605* でのゲノム DNA からクローニングした。各 *mcp* 遺伝子の上流 1 kb と下流 1 kb を含む領域を高正確性の耐熱性 DNA ポリメラーゼである KOD FX を用いて PCR を行い、増幅された PCR 産物の 3' 末端にアデニンを付加させた後、pGEM-T Easy にクローニングした。その後、インサート DNA 上に外向きに 2 本の PCR プライマーを設計し、Inverse PCR 法により *mcp* 遺伝子のオープンリーディングフレームの全て、あるいはその一部を欠損させたプラスミドを構築した。なお、本 PCR では用いたプライマーの 5' 端に pGEM-T Easy ベクターを含む PCR 産物内部には存在しない制限酵素部位を付加させておき、PCR 後にその制限酵素で消化させ、self-ligation を行った。また、その制限酵素で消化させる際に、別の制限酵素である *DpnI* でも同時に消化した。*DpnI* はアデニンがメチル化された GATC 配列を認識して消化する酵素であるため、PCR 産物には作用せず、PCR の鋳型であるプラスミドを選択的に消化するため、形質転換後に目的の DNA を有するクローンを効率よく選抜することができる。このようにして、各 *mcp* 遺伝子の読み枠全て、あるいはその一部を欠損させた変異 DNA を作成し、その後、接合・変異導入用プラスミドベクター pK18mobSacB

にサブクローニングし、大腸菌 S17-1 に形質転換した。このプラスミドを保有する大腸菌 S17-1 をカナマイシン添加 LB 液体培地で 1 晩 37 で培養するとともに、ナリジクス酸耐性の *Pta6605* をナリジクス酸添加の KB 液体培地で 1 晩 27 で培養した。翌日、それぞれの培養菌液を遠心後、半量の KB 培地に懸濁し、両菌を混合した。再び遠心操作を繰返し、少量の KB 培地に懸濁した。この操作によりそれぞれの抗生物質を除くとともに菌体の洗浄・濃縮を行った。その後、接合のため、抗生物質を含まない KB 固形培地を用意し、その上にオートクレーブ滅菌済みのニトロセルロースメンブラン (1 cm) を静置し、30~40 μ L の上記細菌混合懸濁液をスポットした。クリーンベンチ内でニトロセルロースメンブラン上の液体培地を乾燥させた後、1 晩 27 で静置した。翌日、1 枚のニトロセルロースメンブランにつき、250 μ L 程度の KB 培地を加え、懸濁させた後、量を変えて、カナマイシンとナリジクス酸を添加した KB 培地の上にスプレッドした。2 日後に生えてきた細菌はカナマイシン耐性遺伝子を有する pK18*mobSacB* が組み込まれたナリジクス酸耐性の *Pta6605* である。この時点における菌株は、野生型の *mcp* 遺伝子に加え、内部欠損を有する変異 *mcp* 遺伝子を共に有していることを PCR により確認した。これらのコロニーは、更に 10%スクロースを含む KB 培地にスプレッドし、*SacB* 遺伝子を含む DNA 領域を相同組換えにより欠失させた。この 2 回目の相同組換えの際に、野生型 *mcp* 遺伝子が *SacB* 遺伝子と共に欠失した場合、*mcp* 欠損変異株が作出される。この方法により 27 個の *mcp* 遺伝子を欠損させた変異株シリーズを作出した。

次に、*Pta6605* の野生株に加え、作出した 27 個の *mcp* 変異株を用いて、同定した誘引物質に対する走化性をキャピラリーアッセイで検証した。まず、作出した各 *mcp* 変異株については 5%の酵母抽出液に対して野生株と同様な走化性を示すことを確認してから、実験を行った。

4 . 研究成果

まずタバコ野火病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 (*Pta* 6605)の野生株を用いて各種化合物に対する走化性を解析した。その結果、*Pta* 6605は、アスコルビン酸、ギ酸、クマリン酸、ホウ酸、グリシン、アスパラギン酸、カイネチン、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、ジャスモン酸メチル、インドール-3-酢酸

に対して正の走化性を示す一方、酢酸、サリチル酸、桂皮酸、葉酸に対しては走化性を示さないことを明らかにした。

Pta 6605のドラフトゲノムシーケンスと全塩基配列が確定済みの *Pto*DC3000、*Pph*1448Aや、*Psy*B728aのゲノム解析から *Pta* 6605にも少なくとも45個の走化性センサータンパク質遺伝子 (methyl accepting protein (*mcp*) 遺伝子) が存在することが判明した。このうち、近縁の動物病原細菌である緑膿菌には存在しない *mcp* 遺伝子を 27 個特定し、*Pta*6605のゲノムDNAから 27 個の *mcp* 遺伝子について、前後の配列とともにクローニング後、それぞれの遺伝子内部を欠損させた合計 27 種類の変異株の作出に成功した。

次に、正の走化性を示したカイネチンに対し、各種 *mcp* 変異株の応答を解析したところ、 Δ *mcp4*、 Δ *mcp15b*、 Δ *mcp24*ではカイネチン応答が顕著に低下した。 Δ *mcp4*、 Δ *mcp15b*、 Δ *mcp24*は酵母抽出物に対しては野生株と同様な正の走化性を示したことから、MCP4、MCP15b、MCP24がカイネチンに対するセンサータンパク質である可能性が示された。また、強い正の走化性を示したアスコルビン酸に対する応答は Δ *mcp10* 変異株で著しく減少した。このことから MCP10 がアスコルビン酸に対するセンサータンパク質である可能性が示唆された。

一方で、*mcp* 変異株の中で Δ *mcp6*、 Δ *mcp8*、 Δ *mcp9*では様々な走化性誘因物質に対し野生株より高い走化性を示した。このことは特定の MCP の欠損が、べん毛合成能や他の *mcp* 遺伝子の発現増高等を引き起こす可能性を示唆している。本研究により予定していた全ての *mcp* 欠損変異株を作出し、走化性誘因物質を特定できたため、予定していた走化性研究の基盤を構築できた。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

山田 創・杉原由佳・山本幹博・松井英譲・能年義輝・豊田和弘・一瀬勇規 . *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 の走化性の解析 . 平成 27 年度日本植物病理学会感染生理談話会 . 2015.8. 24-26. 松山 .

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

5. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 勇規（ICHINOSE YUKI）

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号：50213004

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し