

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07318

研究課題名(和文)植物保護細菌の新規バイオコントロール因子の探索と機能の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel biocontrol factors from plant-protecting bacteria

研究代表者

竹内 香純 (Takeuchi, Kasumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：40370663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性細菌 *Pseudomonas protegens* は植物の根圏に生息し、植物を保護する役割をもつことから植物保護細菌とよばれる。本細菌の強みは他の微生物を駆逐する抗菌性二次代謝産物を産生することであり、その産生は Gac/Rsm シグナル伝達系により緻密な制御を受けている。本研究では、*P. protegens* と近縁系統間での比較ゲノム解析により新規バイオコントロール因子の関連候補遺伝子を同定し機能解析を行った。また、*P. protegens* CHA0 株のメタボローム解析の結果から、GABA が Gac/Rsm の制御を受けており、本細菌のバイオフィーム形成等の機能に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The Gram-negative species of *Pseudomonas protegens* are known as plant-protecting bacteria, as they suppress the growth of pathogenic microbes in rhizosphere by producing antimicrobial secondary metabolites via the Gac/Rsm signal transduction pathway. In this study, we identified the novel gene clusters which are involved in potential biocontrol activities. Furthermore, from the metabolome data obtained previous study, we suggest an important role of GABA in the Gac/Rsm-regulated niche adaptation of *P. protegens* CHA0 to plant roots.

研究分野：植物保護科学

キーワード：植物保護細菌 バイオコントロール シグナル伝達系 二次代謝産物 一次代謝産物 ゲノム解析 *Pseudomonas* 属細菌 根圏

1. 研究開始当初の背景

植物の根圏には病原微生物を含む多様な微生物が生息しているが、他の微生物との競合に強く、その結果として植物を保護する役割をもつ微生物も存在する。本研究で対象とするグラム陰性細菌 *Pseudomonas protegens* (*P. fluorescens* グループに属する) は、そうした特徴を有することからバイオコントロール細菌あるいは植物保護細菌とよばれており、*P. protegens* の強みは他の微生物を駆逐する抗菌性物質を産生することにある。*P. protegens* は近年まで *Pseudomonas fluorescens* と学名を同じくしていたが、*P. fluorescens* グループの中でもそうした表現型が特にユニークであることから、植物保護細菌すなわち “plant protecting bacteria” をその名の由来とし、新たな学名として提唱された (Ramette et al., *Syst Appl Microbiol* 2011)。

抗菌性物質は、本細菌の二次代謝産物として産生されており、重要なバイオコントロール因子として自身のニッチの獲得に貢献している。*P. protegens* のモデル系統である Pf-5 株 (アメリカ原産) および CHA0 株 (スイス原産) はゲノムサイズが比較的大きく、特に Pf-5 株は今日までゲノムが解読されている *Pseudomonas* 属細菌の中でも最大の部類の 7.07 Mb であることが知られているが、それは自身の産生する二次代謝産物がバリエーションに富むことに起因する (Paulsen et al., *Nat Biotechnol* 2005)。*Pseudomonas* 属細菌の二次代謝産物の産生制御機構は、GacS/GacA とよばれる二成分制御系と、その下流にある調節型 small RNA (RsmX/Y/Z) によるシグナル伝達系 (Gac/Rsm) が中心的な役割を果たしており、研究代表者はこれまでそのシグナル伝達系のオン/オフに関わる因子を複数明らかにしてきた (Takeuchi et al., *Mol Plant-Microbe Interact* 2012, Takeuchi et al., *Environ Microbiol* 2014)。

Pf-5 株の全ゲノム配列が公開されて以降、このシグナル伝達系の制御下にある代謝産物合成酵素遺伝子の探索が、ゲノムマイニングとよばれる手法に基づいて飛躍的に進められている。特に有用微生物においては、従来の天然物の単離、精製方法では同定が困難であった物質についても、物質の構造予測が可能となったことにより同定が効率的に行われ、また同時にその合成酵素遺伝子もセットで同定されるため、極めて有効なアプローチといえる。

2. 研究の目的

上述の代謝制御に関する研究は既知のモデル系統を対象として精力的に進められているものの、それ以外の近縁系統に関する情報は極めて乏しいのが現状である。さらに、*P. protegens* と同種の系統さえ、土壤中に普遍的に生息すると予測されながら、特にアジアにおいては実際の単離例は殆んどなかった。そこで申請者は全国各地の圃場の植物根圏

から単離された *Pseudomonas* 属細菌を対象とし、*P. protegens* と同定された Cab57 株、および近縁系統である Os17 株、St29 株 (この 2 系統は同一種) について全ゲノム解読を行ったところである (Takeuchi et al., *PLoS One* 2014, Takeuchi et al., *Mol Plant-Microbe Interact* 2015)。*Os17* 株と *St29* 株は、*P. protegens* とは亜種程度に異なるものの、高い抗菌性と植物保護能力を有しており、本系統に特異的な新規植物保護因子の存在が推察された。また、*P. protegens* CHA0 株の先行研究におけるメタボローム解析の結果から、Gac/Rsm シグナル伝達系が一次代謝産物の制御にも関与する知見が得られており (Takeuchi et al., *Mol Plant-Microbe Interact* 2012) 新たな研究展開が見込まれた。

以上のことから、本研究ではゲノムデータに基づき新規植物保護因子の探索と解析を行うとともに、当該一次代謝産物の制御機構と機能について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Pseudomonas sp. *Os17* 株および *St29* 株の新規バイオコントロール因子を探索するため、まず、既知の *P. protegens* との比較ゲノム解析を行う。系統間で差異が明らかとなった遺伝子領域のうち、*Os17* 株および *St29* 株のみに特異的な領域を同定する。それらの領域のうち、二次代謝産物の合成酵素遺伝子予測プログラムにおいてヒットする遺伝子クラスターを特定し、その欠損変異株を作出する。野生株と欠損変異株について抗菌性等を比較し、当該遺伝子のバイオコントロール能力への影響を明らかにする。

一次代謝制御の解析では、先行研究で得られたメタボローム解析等の結果に基づき GABA (γ-アミノ酪酸) の菌体内濃度が *gacA* 変異株で顕著に蓄積していたことに着目し GABA アミノ基転移酵素 (GABAT) をコードする遺伝子 (*gabT*) の発現パターンを明らかにする。さらに、*gabT* 欠損変異株を用いた解析により GABA が本細菌の機能に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *Pseudomonas protegens* Cab57 株と、その近縁種 *Pseudomonas* sp. *Os17* 株および *St29* 株の比較ゲノム解析を行い、後者 2 株に共通する遺伝子クラスター (4 つ以上の遺伝子から構成されるものに絞り込む) を複数明らかにした。機能予測解析の結果に基づき、抗菌性に関与すると考えられる新規タンパク質をコードする遺伝子に着目し、*Os17* 株において解析を進めた。大腸菌リコンビナントタンパク質を作製し、X 線結晶構造解析により立体構造を明らかにした。また、このリコンビナントタンパク質を抗原とし、ポリクローナル抗体を得て、ウエスタンブロット解析により菌体中のタンパク質の発現パターンを検

出することに成功した。

(2) *P. protegens* では、抗菌性に関する因子の発現は Gac/Rsm シグナル伝達系により制御されるが、Os17 株にも同様のシグナル伝達系の機能が保存されており、*gacA* 欠損変異株において抗菌性が低下することを確認している。今回、上述のタンパク質遺伝子の発現が Gac/Rsm シグナル伝達系の制御下にあるか否かを明らかにするため、プロモーター領域を単離し、*lacZ* レポーター遺伝子を用い活性を調べたところ、*gacA* 欠損変異株では発現レベルが顕著に低下したことから、他の抗菌性二次代謝産物と同様にシグナル伝達系の制御下にあることが示された。また、上述の抗体を用いたウエスタンブロット解析では、*gacA* 欠損変異株において当該タンパク質の発現量が低下したことから上述のプロモーター解析の結果が支持された。さらに、欠損変異株を作成し枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に対する抗菌性を調べたところ、野生株と比較し抗菌性が低下したことから、Os17 株の抗菌性に当該遺伝子が関与することが示唆された。

(3) 先行研究で得られた *Pseudomonas protegens* CHA0 株のメタボローム解析等の結果では、GABA の菌体内濃度が *gacA* 変異株において顕著に高まっていた。Gac/Rsm シグナル伝達系は通常、遺伝子発現に対してプラスに作用することから、仮説として本物質の異化に関わる酵素遺伝子が Gac/Rsm シグナル伝達系によりプラスに制御されており、そのことが *gacA* 変異株での GABA の蓄積につながると考えた。異化に関わる酵素として、GABA アミノ基転移酵素 (GABAT) が知られており、それをコードする遺伝子 (*gabT*) の解析を進めた。*gabT* の欠損変異株 ($\Delta gabT$) では野生株と比較し GABAT 酵素活性が低下すること、また HPLC を用いた定量解析により $\Delta gabT$ では GABA の蓄積量が高まることを確認した。*gacA* 変異株でも GABAT 酵素活性が野生株と比較し低下していた。

gabT のプロモーター領域に着目したところ Gac/Rsm シグナル伝達系の制御下にあることの指標となる GGA モチーフとよばれる領域を見出した。そこで当該領域を単離し、*lacZ* レポーター遺伝子を用いプロモーター活性を調べたところ、*gacA* 変異株において低下したことから、GABA の異化には Gac/Rsm シグナル伝達系がプラスに関与していることが示された。

(4) 植物保護細菌において GABA が果たす役割について調べるため、バイオフィーム形成能に着目した。*P. protegens* CHA0 株の *gacA* 変異株では、バイオフィーム形成能が低下することが知られている。野生株と $\Delta gabT$ に外因性 GABA を加えたところ、濃度依存的にバイオフィーム形成能が低下するとともに浮

遊状態が促進され、その傾向は $\Delta gabT$ でより顕著であった (図)。さらに、キュウリ根圏における定着能が野生株と比較し亢進したことから、GABA は本細菌の環境適応に重要な役割を果たしていることが示唆された。

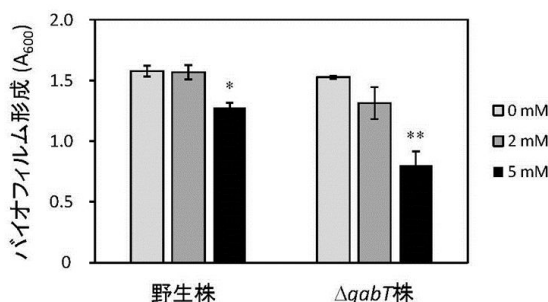


図. 植物保護細菌のバイオフィームの検出。

GABA を各濃度にてタイタープレートに添加し、*Pseudomonas protegens* CHA0 株および *gabT* 欠損変異株 ($\Delta gabT$) を一晩静置培養後、クリスタルバイオレット染色し、溶出液を吸光度測定 (波長 600 nm) に供しバイオフィーム形成能を比較した。GABA の処理によりバイオフィーム形成能が低下し、*gabT* 欠損変異株 ($\Delta gabT$) ではその傾向が顕著であった。*, **は GABA 無処理区 (0 mM) と比較してそれぞれ 5% 水準、1% 水準で優位差があることを示す。

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 6 件)

Takeuchi K. GABA, a primary metabolite controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway, favors a planktonic over a biofilm lifestyle in *Pseudomonas protegens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 34(2): 161-168 (2018)、査読有
DOI: 10.1094/MPMI-05-17-0120-R

竹内香純「シュドモナス～基礎と応用をつなぐ」*アグリバイオ* 16(2): (2018)、査読無

Morohoshi T, Yamaguchi T, Xie X, Wang WZ, Takeuchi K., Someya N. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production. *Microbes and Environments* 32(1): 47-53 (2017)、査読有
DOI: 10.1264/jsme2.ME16162

染谷信孝、諸星知広、竹内香純「*Pseudomonas protegens* - 植物の守護者と命名された細菌」*土と微生物* 71(2): 37-43 (2017)、査読無

竹内香純「バイオコントロール細菌 *Pseudomonas protegens* の根圏における生存戦略」**植物防疫** 69(6): 374-376 (2015)、査読無

竹内香純「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** 81(2): 105-110 (2015)、査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

竹内香純、土屋渉、染谷信孝、山崎俊正. ゲノムマイニングによる *Pseudomonas* sp. Os17 の抗菌性関連遺伝子の探索と解析. 平成 30 年度日本植物病理学会大会 (2018)

竹内香純、Dieter Haas. GABA は *Pseudomonas protegens* の浮遊状態を促進する. 平成 29 年度日本植物病理学会大会 (2017)

Junpei Hisakatsu, Xiaonan Xie, Kasumi Takeuchi, Nobutaka Someya, Tomohiro Morohoshi. Complete genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* and the triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine antibiotic production. International Union of Microbiological Societies (2017)

諸星知広、山口貴人、謝肖男、竹内香純、染谷信孝. 植物由来 *Pseudomonas chlororaphis* の抗菌物質フェナジン生産における Quorum Sensing 多重制御機構の解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017)

染谷信孝、諸星知広、海野佑介、窪田昌春、竹内香純. 「植物の守り菌」- 日本産 *Pseudomonas protegens* の探索と機能解析. 環境微生物系学会合同大会 (2017)

久勝順平、染谷信孝、竹内香純、諸星知広. 植物保護効果を有する *Pseudomonas* 属細菌による抗菌物質生産制御機構の解析. 第 69 回日本生物工学会大会 (2017)

Kasumi Takeuchi. Survival strategies of plant-protecting bacteria in rhizosphere. Current and Future Trends in Food and Agricultural Immunology. The 2nd International Symposium (2016) 招待講演

竹内香純、Dieter Haas. *Pseudomonas protegens* の Gac/Rsm を介した一次代謝制御. 平成 28 年度日本植物病理学会大会 (2016)

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. 根圏より単離した *Pseudomonas protegens* とその近縁系統の比較ゲノム解析によるバイオコ

ントロール因子の同定. 植物微生物研究会第 25 回研究交流会 (2015)

Kasumi Takeuchi. Comparative genome analysis of the *Pseudomonas protegens* and closely related strains. *The Definitive Pseudomonas Workshop* (2015) 招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 植物保護能力を有する微生物
発明者: 竹内(山田)香純、野田なほみ、片寄裕一、向井喜之、沼寿隆、染谷信孝
出願人/特許権者: 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2015-118395、特開 2017-000088
出願年月日: 2015 年 6 月 11 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://www.naro.affrc.go.jp/nias/introduction/chart/0403/index.html>

<https://researchmap.jp/read0079398>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 香純 (TAKEUCHI, Kasumi)
農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 植物・微生物機能利用研究領域 植物微生物機能ユニット 上級研究員
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

(4) 研究協力者

染谷 信孝 (SOMEYA, Nobutaka)
農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門 野菜生産システム研究領域 生産環境ユニット 上級研究員