

令和元年5月27日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14861

研究課題名(和文)植物病原細菌多剤排出ポンプの病原力としての役割

研究課題名(英文) Role of multi-drug efflux pump transporters on virulence in phytopathogenic bacteria

研究代表者

一瀬 勇規 (Ichinose, Yuki)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：50213004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) 6605の主要な多剤排出ポンプトランスポーターMexAB-OprMとMexEF-OprNの病原力としての役割を解析した。mexB変異株，mexF変異株，mexBmexFの2重変異株はアセトバニロン，カテコール，クマリンにより増殖が抑制され，タバコに対する病原力が低下した。これらの結果は，MexAB-OprMとMexEF-OprNがアセトバニロン，カテコール，クマリンを排出し，Pta6605の病原力発現において重要な役割を担っていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病原細菌には複数種の多剤排出ポンプトランスポーター遺伝子が存在しているが，その病原力における役割はよく理解されていなかった。本研究により複数の多剤排出ポンプが植物由来の抗菌性物質の排出を担っていることが明らかになった。また，多剤排出ポンプは菌体密度感知分子の排出にも関わっていることが初めて明らかにされた。病原力を高める多剤排出ポンプや菌体密度感知機構の制御機構の解明は新たな植物病害管理方法の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)： We investigated the role of resistance-nodulation-division (RND) superfamily, MexAB-OprM and MexEF-OprN on virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) 6605. The sensitivity to plant-derived antimicrobial compounds was investigated in mexB and mexF mutant strains. Bacterial growth was inhibited by acetovanillon, catechol and coumarin in mexB and mexF mutant strains, and virulence of these mutant strains are impaired. The mexAB-oprM was constitutively expressed and activated in mexF mutant, and silenced expression of mexEF-oprN in WT strain was activated in mexB mutant. These results indicate that MexAB-OprM and MexEF-OprN in Pta6605 may exclude acetovanillone, catechol, and coumarin, and MexAB-OprM and MexEF-OprN complemented their function each other. When mexT was overexpressed in Pta6605 WT strain, the expression of mexEF-oprN was activated and accumulation of AHL was cancelled. This result indicates that MexEF-OprN is a negative regulator of AHL accumulation in Pta6605.

研究分野：植物病理学，植物病原学，細菌生理学

キーワード：多剤排出ポンプ 菌体密度感知機構 MexAB-OprM MexEF-OprN

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで *P. syringae* pv. *tabaci* を用いて、べん毛遊泳能の欠損株  $\Delta fliC$  や  $\Delta motABCD$  は多剤排出ポンプ Resistance-nodulation-division (RND) superfamily の一つ MexEF-OprN の遺伝子発現が著しく増高することを見いだした。これら変異体では、菌体密度感知分子であるアシルホモセリンラクトン(AHL)の合成が阻害され、病原力が低下した (Taguchi et al. Microbiol. 156: 72 [2010]; Kanda et al. MGG, 285:163 [2011])。一方、タイプ IV 線毛を欠損させた  $\Delta pilA$  変異株では表面運動能を失うと共に、同時に *mexAB/oprM* の遺伝子発現が増高し、病原力が低下した (Taguchi and Ichinose MPMI 24: 1001 [2011])。これらの結果は、べん毛や線毛による運動能が“さまざまな多剤排出ポンプ遺伝子の発現ならびに病原力”に影響を及ぼすことを示している。しかしながら、多剤排出機構が病原力に与える影響に関しては、不明な点が多い。このように、植物病原細菌の多剤排出ポンプ遺伝子の発現制御機構並びに病原力における役割については殆ど明らかでない状況であった。

### 2. 研究の目的

申請者は *Pseudomonas syringae* のべん毛遊泳能が失われた変異株では、多剤排出ポンプトランスポーター遺伝子 *mexEF/oprN* の発現が著しく増高する一方、菌体密度感知分子“アシルホモセリンラクトン(AHL)”の合成が阻害され、病原力が低下すること、また、タイプ IV 線毛の変異株では、別の多剤排出ポンプトランスポーター遺伝子 *mexAB-oprM* の発現が増高することを見出していた。*mexAB-oprM* の変異株は、抗生物質耐性や感染時の増殖能の低下を導くことが報告されているが (Stoitsova et al. AEM 74: 3387 [2008])、詳細は明らかでなく、多剤排出ポンプトランスポーターの病原力における役割には依然として不明な点が多い。そこで、本研究では 2 組の多剤排出ポンプ MexAB-OprM, MexEF-OprN の病原力における役割と発現制御機構、特にべん毛・線毛運動能との関連を明らかにし、植物病原細菌の感染戦略を紐解く。

### 3. 研究の方法

(1) MexAB-OprM と MexEF-OprN の多剤排出ポンプトランスポーター変異株の作出と多剤耐性能や病原力を含む表現型解析

*P. syringae* pv. *tabaci* の *mexB* 欠損変異株 ( $\Delta mexB$ )、*mexF* 欠損変異株 ( $\Delta mexF$ )、それらの 2 重変異株について様々な生育阻害物質に対する耐性能 (多剤耐性能) 宿主タバコに対する病原力、遺伝子発現プロファイルの解析を実施した。また、網羅的な遺伝子発現プロファイルの解析ではマイクロアレイ解析を用いた。

(2) 植物接種時・各種化合物処理時における *mexAB-oprM* と *mexEF-oprN* の遺伝子発現解析

KB 培養条件下における *mexAB-oprM* と *mexEF-oprN* の遺伝子発現を定量 RT-PCR とマイクロアレイによって解析した。また、植物接種時における *mexAB-oprM* と *mexEF-oprN* の発現は、定量 RT-PCR の他、*mexE*, *mexA* の各プロモーター活性を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性でモニターできるレポーター遺伝子導入株を用いて解析した。

(3) *mexEF-oprN* の高発現による AHL 生産の阻害実証試験

*Pta6605* の  $\Delta fliC$  変異株における AHL 合成能の欠損要因を探るため、 $\Delta fliC$  にトランスポゾン挿入させ、AHL 合性能を回復した菌株を選抜したところ、*mexEF-oprN* の破壊により AHL 合成能が回復することを見出した。上述したように、 $\Delta fliC$  変異株では、*mexEF-oprN* が高発現しており、この結果は、*mexEF-oprN* の高発現が AHL 生産を阻害することを示唆している。そこで、以下の二つの実験系により *mexEF-oprN* の発現と AHL 生産との関連性について追求した。1) まず、AHL 生産能を失活した各種変異株 ( $\Delta fliC$ ,  $\Delta motCD$ ,  $\Delta gacA$ ,  $\Delta aefR$ ) に *mexEF-oprN* の変異を導入することにより AHL 生産に及ぼす影響を解析した。2) 次に AHL を生産する野生株で転写制御因子遺伝子である *mexT* を高発現させることによる AHL 生産への影響を解析した。

(4) べん毛欠損  $\Delta fliC$  変異株における *mexEF-oprN* 発現増高機構及びタイプ 4 線毛欠損  $\Delta pilA$  変異株における *mexAB-oprM* 発現増高機構の解析

べん毛を欠損した  $\Delta fliC$  変異株で *mexEF-oprN* の発現が増高する機構を追求するため、*mexE* 遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子を連結させたキメラ遺伝子を  $\Delta fliC$  変異株や野生株に導入し、その後、トランスポゾン挿入させ、 $\Delta fliC$  変異株では *mexE* の発現が低下した株を、野生株では *mexE* の発現が増高した株を選抜して、発現制御機構の解明を目指した。同様に、タイプ IV 線毛を欠損した  $\Delta pilA$  変異株で *mexAB-oprM* の発現が増高する機構もトランスポゾン挿入変異によりその手がかりを得ようとした。

### 4. 研究成果

*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Pta*) 6605 をモデル細菌として、2 つの主要な多剤排出ポンプ MexAB-OpeM と MexEF-OprN の病原力としての役割を解析した。*mexB* 欠損変異株と *mexF* 欠損変異株さらに *mexB*, *mexF* の 2 重欠損株を作出し、遺伝子発現プロファイル、各種抗菌性物質に対する感受性、宿

主タバコに対する病原力を解析した。また、*mexAB-oprM*, *mexEF-oprN* の発現解析をマイクロアレイ、RT-PCR、レポーター遺伝子 *lacZYA* をプロモーターに連結させ、β-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法で解析した。

(1) *mexB* 欠損変異株, *mexF* 欠損変異株, *mexB*, *mexF* 2重欠損株の各種抗菌性物質に対する感受性解析

野生株に加え、*mexB* 変異株、*mexF* 変異株とその2重変異株を用いてファイトアンティシピンやファイトアレキシンなどの植物由来抗菌性物質に対する感受性を軟寒天培地を用いた生育阻止斑形成試験で解析した。終夜培養した各菌株を軟寒天培地と混合後、プレーティングした。その上に5 μLの各種化合物を浸み込ませたペーパーディスクを置床した。0.9 M t-桂皮酸, 0.5 M p-クマル酸, 1 M アセトシリゴン, 1 M スコポレチン, 1 M クロロゲン酸, 0.3 M フロレチン, 1 M ナリンゲニン, 200 mg/ml (+)-カテキンは顕著な生育阻止斑を形成しなかったが, 2 M アセトバニロン, 1 M カテコール, 1 M クマリンでは阻止斑が形成された。阻止斑の大きさは2 M アセトバニロン, 1 M カテコールの場合, WTより $\Delta mexB$ ,  $\Delta mexF$ で大きく,  $\Delta mexB\Delta mexF$ ではそれと同等以上であった。1 M クマリンの場合, 阻止斑は $\Delta mexB$ はWTより若干大きく,  $\Delta mexB\Delta mexF$ でより大きくなった。これらの結果は, MexAB-OprMとMexEF-OprNがアセトバニロン, カテコールを排出していること, クマリンはMexAB-OprMによって排出されていることを示唆している。

(2) *mexB* 欠損変異株, *mexF* 欠損変異株, *mexB*, *mexF* 2重欠損株の病原力解析

*mexB* 変異株, *mexF* 変異株の病原力が野生株と異なるかをインフィルトレーション, 浸漬法などの接種方法で比較したが, 安定したデータを得ることが困難であった。そこで Ishiga et al. (2017)のFlood Assayをタバコに応用した方法を開発した。MS培地で無菌播種したタバコ実生を2週間後に1/10濃度のスクロースMS培地に移植し, 翌日濃度を調整した細菌懸濁液で浸漬させる。全ての葉が浸漬したら細菌懸濁液を除き, 乾燥後インキュベーションした。本法により再現性の高い安定した結果が得られるようになり, *mexB* 変異株, *mexF* 変異株, *mexB*, *mexF* 2重欠損株のいずれを接種した場合も, 野生株接種の場合と比べて病徴がマイルドで, 細菌増殖が低下することが判明した。これらの結果は, MexAB-OprMとMexEF-OprNはPta6605の病原力発現において重要な役割を担っていることを示している。

(3) *mexAB-oprM*, *mexEF-oprN* の遺伝子発現の解析

*mexB* 変異株, *mexF* 変異株の遺伝子発現プロファイルを野生株と比較解析したところ, *mexF* 欠損変異株では*mexAB-oprM*の発現が増高した一方, タイプIII分泌システム(T3SS)関連遺伝子の発現が低下した。逆に*mexB*欠損変異株では*mexEF-oprN*並びにABCトランスポーター等の遺伝子発現が増高し, *psyl*など菌体密度感知システム関連遺伝子群の発現が低下した。また, これまで各種変異株で実施してきたマイクロアレイ解析の結果からも, *mexAB-oprM*は構成的に発現しているが, *mexEF-oprN*は殆ど発現していないこと, *mexEF-oprN*はべん毛繊維フラジェリン遺伝子を欠損して運動できない*fliC*変異株などでは, 高発現していることが判明した。以上の結果から, MexAB-OprMとMexEF-OprNは互いに補完的に機能することが推察された。

また, *mexE*プロモーター, *mexA*プロモーターのそれぞれに*lacZYA*を連結させたキメラ遺伝子(*mexA::lacZYA*, *mexE::lacZYA*)を構築し, Pta6605野生株に導入し, タバコ葉に接種後, プロモーター活性をβ-ガラクトシダーゼの測定によってモニターした。*mexA::lacZYA*を導入した場合, 接種4日後にわずかなβ-ガラクトシダーゼの活性があったが, *mexE::lacZYA*を導入した場合, β-ガラクトシダーゼの活性は検出されなかった。*mexB*変異株に加え*mexF*変異株にも病原力の低下は観察されたため, 両多剤排出ポンプは共に病原力に必要なと考えられたが, *mexAB-oprM*に比べ*mexEF-oprN*の発現量は少ないか, あるいは解析時にはまだ十分に発現が誘導されていなかった可能性が考えられる。

(4) *mexEF-oprN*の発現がAHL生産・蓄積に及ぼす影響

AHL生産能を失活した各種変異株( $\Delta fliC$ ,  $\Delta motCD$ ,  $\Delta gacA$ ,  $\Delta aefR$ )では*mexEF-oprN*が高発現していることが知られている。これらの変異株に $\Delta mexF$ 変異を導入したところ, AHL生産が復活した。このことは*mexEF-oprN*の高発現がAHL生産に阻害的に働くことを示唆している。そこで, 広宿主範囲プラスミドベクターであるpDSK519に*mexT*を組み込み, Pta6605の野生株に導入したところ, 構成的に*mexT*, *mexEF-oprN*の発現が増高し, AHLの生産がキャンセルされた。このことからMexEF-OprNがAHL合成における負の制御因子として機能することが確認された。*mexT*高発現株でのAHL合成酵素遺伝子*psyl*の発現は低いと考えていたが, 予想に反して野生株やpDSK519だけを導入した菌株と同様レベルで発現していた。このことから*mexT*高発現株でAHLが検出されないのは, AHLが合成されていなかったのではなく, 合成されてもすぐに排出されたため蓄積しないためであると推察した。

(5) べん毛欠損 $\Delta fliC$ 変異株における*mexEF-oprN*発現増高機構及びタイプ4線毛欠損 $\Delta pilA$ 変異株における*mexAB-oprM*発現増高機構の解析

*mexE*遺伝子のプロモーターに*lacZYA*レポーター遺伝子を連結させたキメラ遺伝子トランスポゾンと一緒に $\Delta fliC$ 変異株に導入し, β-ガラクトシダーゼ活性が増高しない変異株を探索したが, 十分な数のトランスポゾン挿入株が得られず, *mexEF-oprN*の高発現の原因となるような遺伝子の同定はできなかった。同様に, タイプIV線毛を欠損した $\Delta pilA$ 変異株で*mexAB-oprM*の発現が増高する機構もトランスポゾン挿入変異によりその手がかりを得ようとしたが, 期待されるトランスポゾン挿入株は得られなかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

著者名: Sawada, T., Eguchi, M., Asaki, S., Kashiwagi, R., Shimomura, K., Taguchi, F., Matsui, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda K., and Ichinose, Y.

論文標題: MexEF-OprN multidrug efflux pump transporter negatively controls *N*-acyl-homoserine lactone accumulation in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605

雑誌名: Molecular Genetics and Genomics

査読の有無: 有

発行年: 2018, 293: 907-917.

掲載論文の DOI: [doi.org/10.1007/s00438-018-1430-9](https://doi.org/10.1007/s00438-018-1430-9)

[学会発表](計11件)

(1)

発表者名: 西村隆史・一瀬勇規・原田みのり・松井英讓・山本幹博・能年義輝・豊田和弘

発表標題: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* の RND タイプ多剤排出トランスポーターの病原  
力における機能解析

学会等名: 平成 31 年度日本植物病理学会大会

発表年: 2019. 3. 18-20.

招待講演の有無: 無

国際学会の有無: 無

(2)

発表者名: 田阪洋昌・山本 悟・松井英讓・山本幹博・能年義輝・豊田和弘・一瀬勇規

発表標題: *Pseudomonas syringae* の菌体密度感知機構の解析 ( 3 ) PsyR とアシルホモセリンラクトン  
による遺伝子発現制御機構

学会等名: 平成 30 年度日本植物病理学会大会

発表年: 2018. 3. 25-27.

招待講演の有無: 無

国際学会の有無: 無

(3)

発表者名: 中津有紀子・松井英讓・山本幹博・能年義輝・豊田和弘・一瀬勇規

発表標題: *Pseudomonas syringae* の菌体密度感知機構の解析 ( 4 ) 菌体密度に応じた遺伝子発現制御

学会等名: 平成 30 年度日本植物病理学会大会

発表年: 2018. 3. 25-27.

招待講演の有無: 無

国際学会の有無: 無

(4)

発表者名: 一瀬勇規・松井英讓・石賀康博・山本幹博・能年義輝・豊田和弘

発表標題: *Pseudomonas syringae* の菌体密度感知機構の解析 ( 2 )

学会等名: 平成 29 年度日本植物病理学会関西西部会

発表年: 2017. 9. 19-20.

招待講演の有無: 無

国際学会の有無: 無

(5)

発表者名: Ichinose, Y., Matsui, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y. and Toyada, K.

発表標題: Quorum sensing and MexEFOprN multidrug efflux transporter in *Pseudomonas syringae*

学会等名: Asian Conference on Plant Pathology

発表年: 2017. 9. 13-15.

招待講演の有無: 有

国際学会の有無: 有

(6)

発表者名: 丸山望・石賀貴子・石賀康博・別役重之・尾花望・一瀬勇規・野村暢彦

発表標題: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* の運動性と病原性との関連に関する解析

学会等名: 日本植物学会第 81 回大会

発表年: 2017. 9. 8-10.

招待講演の有無: 無

国際学会の有無: 無

(7)

発表者名：一瀬勇規・澤田貴博・高田基弘・山本 悟・藤山友里・中津有紀子・田阪洋昌・下村洪祐・田口富美子・松井英讓・山本幹博・能年義輝・豊田和弘  
発表標題：Pseudomonas syringae の菌体密度感知機構と多剤排出ポンプの病原力における役割  
学会等名：第 27 回植物細菌病談話会  
発表年：2016.10.24-25.  
招待講演の有無：有  
国際学会の有無：無

(8)

発表者名：澤田貴博・山本幹博・松井英讓・能年義輝・豊田和弘・一瀬勇規  
発表標題：Pseudomonas syringae pv. tabaci 6605 における AHL 合成制御機構並びに MexEFoprN 多剤排出ポンプの病原力における役割の解析  
学会等名：平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会  
発表年：2016.9.29-30.  
招待講演の有無：無  
国際学会の有無：無

(9)

発表者名：山本 悟・藤山友里・高田基弘・松井英讓・山本幹博・能年義輝・豊田和弘・一瀬勇規  
発表標題：Pseudomonas syringae の菌体密度感知機構の解析 ( 1 )  
学会等名：平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会  
発表年：2016.9.29-30.  
招待講演の有無：無  
国際学会の有無：無

(10)

発表者名：山本 悟・藤山友里・高田基弘・松井英讓・山本幹博・能年義輝・豊田和弘・一瀬勇規  
発表標題：Pseudomonas syringae の菌体密度感知機構の解析  
学会等名：平成 28 年度日本植物病理学会感染生理談話会  
発表年：2016.8.10-12.  
招待講演の有無：無  
国際学会の有無：無

(11)

発表者名：石賀貴子，石賀康博，秋田智美，清川達則，丸山望，尾花望，別役重之，一瀬勇規，野村暢彦  
発表標題：植物病原細菌一細胞可視化系を用いた集団微生物学的観点からの病原性の理解と解明  
学会等名：平成 28 年度日本植物病理学会感染生理談話会  
発表年：2016.8.10-12.  
招待講演の有無：無  
国際学会の有無：無

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

(1)

著者名 ( 五十音順 ) : 一瀬勇規・大島研郎・久保康之・高野義孝・竹本大吾・柘植尚志・中屋敷均・増田税・吉田健太郎 ( 日本植物病理学会 編著 )  
出版社：講談社  
書名：植物たちの戦争  
発行年：2019  
総ページ数：262  
ISBN：978-4-06-515216-4

(2)

著者名：一瀬勇規・澤田貴博・高田基弘・山本 悟・藤山友里・中津有紀子・田阪洋昌・下村洪祐・田口富美子・松井英讓・山本幹博・能年義輝・豊田和弘  
出版社：日本植物病理学会  
書名：植物細菌病談話会論文集 ( 第 27 号 ) Pseudomonas syringae の菌体密度感知機構と多剤排出ポンプの病原力における役割  
発行年：2016

総ページ数：118

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等なし

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：松井 英議

ローマ字氏名：Matsui Hidenori

所属研究機関名：岡山大学

部局名：環境生命科学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：20598833

### (2)研究協力者：該当無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。