

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02209

研究課題名(和文)植物保護細菌の二次代謝制御シグナルの認識機構の解明

研究課題名(英文)Studies on signal transduction pathway of regulation of secondary metabolism in plant-protective 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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の根圏に生息する蛍光性シュードモナス属細菌*Pseudomonas protegens*とその近縁系統は、菌体外酵素や抗菌性二次代謝産物を産生し周囲の病原微生物を駆逐することから植物保護細菌として機能する。本課題では抗菌性物質の合成酵素遺伝子の発現を制御する因子として、亢進シグナルを同定した。RNA-seq等による解析の結果、水処理区と比較し当該化合物の処理区では、病原菌の生育抑制に寄与すると予測される遺伝子クラスターの発現レベルが亢進していた。さらに卵菌類*Pythium ultimum*が感染する環境下において、当該化合物との共存により植物保護細菌の効果が高まることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物保護細菌が周辺環境の変化に応じて遺伝子発現の調節を行っていることをRNA-Seq等により解析したことにより、網羅的な発現変動パターンの精査なデータの取得に成功した。これは植物保護能力との機能の相関を示す重要な成果であるとともに、遺伝子発現制御の新規メカニズムを示したものである。シグナル認識に関わる因子については推定遺伝子を同定し引き続き解析を行っている。また本課題で同定した亢進シグナルについて、植物保護細菌とともに土壌に処理したところ、農業上問題となっている卵菌類による土壌病害に対し植物保護細菌の効果を高めることが明らかになったことから、農業利用に資する成果となった。

研究成果の概要(英文)：Pseudomonas protegens and other root-colonizing fluorescent pseudomonads are effective strains that suppress plant diseases by producing several extracellular enzymes and secondary metabolites with antibiotic activities. Based on the findings of RNA-seq gene expression data analysis of *P. protegens*, we identified and characterized an effective molecule that regulates the expression of genes supposed to be involved in secondary metabolism. This molecule increases the biocontrol efficacy of *P. protegens* for the suppression of soil-borne pathogen caused by oomycete *Pythium ultimum*. These results suggest an important role of this molecule in the niche adaptation and disease suppressive activity of *P. protegens* in the rhizosphere.

研究分野：植物保護科学、植物病理学、細菌学

キーワード：植物保護細菌 二次代謝制御 シグナル物質 抗菌性物質 調節型small RNA

1. 研究開始当初の背景

植物の根圏に生息するシュードモナス属細菌 *Pseudomonas protegens* は、多様な抗菌性二次代謝産物を産生し周囲の病原微生物を駆逐することから植物保護細菌とよばれる。抗菌性物質の合成酵素遺伝子の発現は、調節型 small RNA を中心とした二次代謝制御系により制御されているが、研究代表者らはこれまで、一連の制御系が常に稼動するのではなく、周辺環境に応じてオン・オフが切り替わることを明らかにした。オンに関わる亢進シグナル物質として一次代謝産物、二次代謝産物のいずれもが含まれていることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では調節型 small RNA の発現を指標として上述のシグナル物質を明らかにするとともに、複数系統の比較ゲノム解析等によりシグナル認識に関わる分子を同定し、本細菌の包括的制御による植物保護能力の強化に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) シグナル物質としての活性を有することが見込まれるアミノ酸等の一次代謝産物(約30物質)を *P. protegens* に処理し、調節型 small RNA (*rsmZ*) の発現をモニタリングする。*rsmZ* の発現の強弱と抗菌性二次代謝産物の産生レベルは連動しており有効なマーカーとなることから、研究代表者が確立した GFP レポーター遺伝子 (*rsmZ-gfp*) を *P. protegens* に導入しマイクロプレートリーダーにて発現レベルの比較を行う。活性が認められた物質の代謝経路に関する遺伝子の変異株を作出し、当該物質の菌体内濃度と *rsmZ* の発現量、および二次代謝産物の合成酵素遺伝子の発現量に相関関係があることを確認する。

(2) 研究代表者および研究分担者の各種変異株を用いた予備的な実験から、*P. protegens* が産生する抗菌性二次代謝産物の中に、シグナル(B)として機能するものを見出している。本研究では当該物質の合成酵素遺伝子の欠損変異株に *rsmZ-gfp* を導入し、野生株との比較解析を行い変異株において *rsmZ* の発現量が低下することを確認する。また、シグナル B および他の二次代謝産物の産生量についても定量し、欠損変異株にて低下することを確認する。

(3) シグナル認識に関わる分子の同定については、*P. protegens* の複数系統の中にシグナルに対する反応性がみられない系統を得ており、センサーが欠落していることが推察されることから、これらの系統間で比較ゲノム解析を行い、当該センサーをコードする遺伝子を同定する。

(4) (1) および (2) の方法で明らかにしたシグナル物質の効果を検証すべく、植物保護能力の評価を行う。研究代表者が確立した方法に基づき当該物質の付与による効果を確認する。さらにシグナル物質の応答性遺伝子を RNA Seq 解析等により明らかにし、作用機構の解明に資する。

4. 研究成果

(1) 活性を有することが見込まれる一次代謝産物を *P. protegens* に処理し、調節型 small RNA (*rsmZ*) の発現をモニタリングした。GFP レポーター遺伝子 (*rsmZ-gfp*) を *P. protegens* に導入し発現レベルの比較を行った。その結果、亢進シグナル A の特定に成功した。また当初の予定では計画していなかった化合物 X が、発現レベルを低下させることを見出した。

(2) 活性を有することが見込まれる二次代謝産物(亢進シグナル B)について、関連する合成酵素遺伝子の欠損変異株を作出した。亢進シグナル B の検出法についてはこれまで確立していなかったため、まずは野生株において産生に適した培地組成および培養条件を検討し、HPLC により検出可能な条件を決定し、欠損変異株において検出されないことを確認した。他の抗菌性二次代謝産物二種についても HPLC による定量法を確立するとともに、亢進シグナル B の合成酵素遺伝子の欠損変異株において、いずれの抗菌性二次代謝産物も産生量が低下することが明らかとなった。このことから亢進シグナル B が他の二次代謝産物の産生にも作用することが示唆された。

次に、変異株に *rsmZ-lacZ* (LacZ をレポーターとするプラスミド) を導入し、その発現レベルについて野生株との比較を行った。また、亢進シグナル B に対する反応性の異なる野生株の系統を得たことから、系統間の比較ゲノム解析を行い、アノテーション解析の結果、

高反応性の系統に特異的に存在する推定センサーをコードする遺伝子を複数見出した。これらの遺伝子がシグナル認識に関わる分子をコードする可能性を考慮し、引き続き解析を進める。

(3)(2)にて作出した欠損変異株を用い、系統間の比較トランスクリプトーム解析を遂行した。その結果、高反応性の系統では、合成酵素遺伝子欠損変異株のRNA Seqのプロファイルにおいて、上述の Gac/Rsm のシグナル伝達系の制御下にあるとされる遺伝子群の発現が一律、低下することが明らかとなった。

(4)(1)にて特定した亢進シグナル A を用い、植物保護細菌とともに病害土壌（卵菌類 *Pythium ultimum* を病原菌とする）に処理し、キュウリ幼苗に対する植物保護効果を評価した。評価は、植物重量（fresh weight）による比較にて行った。その結果、亢進シグナル A との共存により植物保護細菌の保護効果が高まることが明らかとなった（図1）。

亢進シグナル A 単独処理では植物保護効果はみられないことから、当該物質が細菌の機能向上に寄与することが裏付けられた。なお、これとは別に化合物 X が細菌の機能低下に関与することも明らかとなった（図1）。

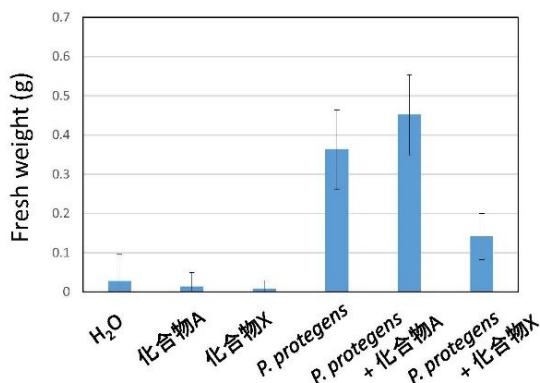


図1 植物保護細菌によるキュウリ幼苗の病害防除効果と化合物Aによる促進効果

(5) 亢進シグナル A について、植物保護細菌の効果を高めることが明らかになったことから、亢進シグナル A が作用する細菌側の遺伝子の特定を試みた。RNA Seq による比較解析の結果、水処理区と比較し亢進シグナル A の処理区では、病原菌の生育抑制に寄与する菌体外酵素の合成遺伝子クラスターの発現が亢進していた。この菌体外酵素は、上述の Gac/Rsm 制御系の制御下にあることは既知であったが、その亢進シグナルについては今回新たに明らかとなった。今後、当該遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行い、亢進シグナル A に対するプロモーター活性を解析する。

(6) 亢進シグナル A によるバイオフィーム形成能と浮遊細胞の割合を調べたところ、濃度依存的にバイオフィーム形成能が高まることが明らかとなった。バイオフィーム形成能はクリスタルバイオレット染色法にて評価した。化合物 X についても同様の解析を行ったところ、こうした効果はみられなかった。以上のことから、亢進シグナル A による植物保護細菌の機能向上のメカニズムの一端が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Someya Nobutaka, Kubota Masaharu, Takeuchi Kasumi, Unno Yusuke, Sakuraoka Ryohei, Morohoshi Tomohiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Diversity of Antibiotic Biosynthesis Gene-possessing Rhizospheric Fluorescent Pseudomonads in Japan and Their Biocontrol Efficacy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/j sme2.ME19155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasumi Takeuchi, Nobutaka Someya	4. 巻 53
2. 論文標題 An overview of recent genomic research on biocontrol Pseudomonad strains isolated from the field in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japan Agricultural Research Quarterly	6. 最初と最後の頁 87-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasumi Takeuchi, Wataru Tsuchiya, Zui Fujimoto, Kosumi Yamada, Nobutaka Someya, Toshimasa Yamazaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Discovery of an Antibiotic-Related Small Protein of Biocontrol Strain Pseudomonas sp. Os17 by a Genome-Mining Strategy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.605705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryohei Sakuraoka, Nobutaka Someya, Kasumi Takeuchi, Tomohiro Suzuki, Tomohiro Morohoshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Comparative Genome Analysis Reveals Differences in Biocontrol Efficacy According to Each Individual Isolate Belonging to Rhizospheric Fluorescent Pseudomonads	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/j sme2.ME21034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹内香純、姜昌杰、小木曾真佐代、瀬尾茂美
2. 発表標題 植物保護細菌によるダイズ茎疫病の防除効果に対するグルタミン酸の影響
3. 学会等名 令和4年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内香純、諸星知広、染谷信孝
2. 発表標題 植物生育促進効果を有する <i>Pseudomonas</i> sp. Sm006 のゲノム解析
3. 学会等名 令和3年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内香純、染谷信孝、諸星知広
2. 発表標題 <i>Pseudomonas protegens</i> の抗菌性変異株の比較トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 令和2年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷信孝、竹内香純、諸星知広
2. 発表標題 植物保護細菌における二次代謝産物産生能間クロストーク
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kasumi Takeuchi, Wataru Tsuchiya, Nobutaka Someya, Toshimasa Yamazaki
2. 発表標題 Identification of antibiotic-related genes of biocontrol strain <i>Pseudomonas</i> sp. Os17 by genome mining strategies
3. 学会等名 第11回 国際PGPR研究会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内香純、瀬尾茂美
2. 発表標題 植物保護細菌の調節型small RNAの発現と病害防除効果に対するアミノ酸の影響
3. 学会等名 平成31年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内香純
2. 発表標題 細菌の生存戦略から学んだこと
3. 学会等名 アカデミアで活躍されている女性研究者から在学生への助言～岡山大学農学部同窓会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 染谷信孝、竹内香純、諸星知広	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学と生物：日本農芸化学会誌	5. 総ページ数 8
3. 書名 植物保護能力を有する蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の機能と生態：植物保護細菌の多彩な武器	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 ダイズの土壌伝染性病害防除方法	発明者 竹内香純、姜 昌杰、 瀬尾茂美	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-045151	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 植物成長促進又は植物保護の能力を有する微生物	発明者 竹内香純、染谷信孝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-206870	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 植物の土壌伝染性病害防除方法	発明者 竹内香純、瀬尾茂美	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、欧州17/046726、米国19785141.3	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

農研機構 生物機能利用研究部門 作物生長機構研究領域 作物病害制御機構グループ https://www.naro.go.jp/laboratory/nias/introduction/chart/0601/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	諸星 知広 (Morohoshi Tomohiro) (90361360)	宇都宮大学・工学部・准教授 (12201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------