

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06045

研究課題名(和文) 網羅的スクリーニング法を用いた黒斑細菌病菌の病原性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of black spot bacterial disease using a comprehensive screening method

研究代表者

石賀 康博 (Ishiga, Yasuhiro)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50730256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：キャベツ黒斑細菌病を引き起すアブラナ科植物黒斑細菌病菌の病原性に必要な遺伝子をスクリーニングした結果、既知の病原因子である3型分泌装置などに加えて、アミノ酸代謝、脂質代謝、炭水化物代謝、核酸代謝などの一次代謝に関わる遺伝子が特定された。さらに、宿主により異なる病原因子が必要とされていることが示唆された。加えて、多くの病原因子が葉の表面での増殖や侵入に関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果から、アブラナ科植物黒斑細菌病菌の感染に必要な多くの病原因子が葉の表面での増殖や侵入に関与することが示唆された。さらに、気孔の開閉をめぐる植物と病原細菌の攻防が感染の成否をめぐる重要な局面となっていることが示唆された。植物病原細菌の多くは気孔を侵入場所としており、さらに、いくつかの糸状菌も気孔を侵入場所としているため、気孔防御の活性化は、様々な植物病害防除への応用が可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：We identified virulence genes related not only to type 3 secretion system (T3SS), but also to primary metabolisms including amino acids, lipids, carbohydrates and nucleic acids based on mutant screening of *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*. Furthermore, our results suggest that different virulence factors are required depending on the host. In addition, our results suggest that many virulence factors are involved in leaf surface growth and invasion.

研究分野：植物病理学

キーワード：アブラナ科植物黒斑細菌病 キャベツ 気孔防御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的には、植物病害の大半は糸状菌病によるものであるが、近年、国内外において細菌病の大発生が報告されている。その理由として、細菌病に対する有効な防除手段がないことが挙げられる。細菌病の防除には、現在でも銅を主成分とした殺菌剤が使用されているという現状がある。このような状況の中、近年長野県を中心としたキャベツ産地においてキャベツ黒斑細菌病の大発生が問題になっている。したがって、キャベツ黒斑細菌病を含めた細菌病に対する有効な防除手段の開発が必須である。そのためには、基盤となる植物-植物病原菌の相互作用の解明が不可欠である。そこで本研究では、植物病原細菌が、なぜ特定の植物を発病させることができるのかという「病原性とはなにか」という学術的「問い」に対して、アブラナ科植物黒斑細菌病菌 (*Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*) の病原性を構築する病原力に必要な遺伝子を網羅的に単離、機能解析することにより答えを導き出していけるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、*P. cannabina* pv. *alisalensis* (*Pcal*)の病原性を構築する個々の病原力関連遺伝子を網羅的に単離、機能解析することにより病原性機構の全体像を明らかにする。具体的には、(1) *Pcal* の変異体ライブラリーからの病原力低下株の選抜、(2) 病原力関連遺伝子の網羅的同定、(3) 病原力因子の機能を明らかにすることにより、*Pcal* の病原性機構の全体像を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Pcal* の変異体ライブラリーの作製および病原力低下株の選抜

① *Pcal* の変異体ライブラリーの作製

pBSLCl (Sawada et al., 2018) を保持する *E. coli* S17-1 を *Pcal* と接合することにより、トランスポゾンの導入および変異株の作成を行った。

② 接種試験による病原力低下株の選抜

それぞれの変異株を本葉2葉期のキャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) (品種：金系201号) 幼苗に対して 5×10^7 CFU/ml の濃度にて浸漬接種を行い、5日後に病徴のスコアリングを行った。

③ 変異遺伝子の同定

それぞれの変異株から精製されたゲノムDNAを制限酵素で切断し、トランスポゾン挿入部分のプラスミドレスキューを行った。その後、M13FWプライマーを用いてトランスポゾン挿入位置の配列を決定した。シーケンス解析により特定した遺伝子配列と *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 (現 *P. cannabina* pv. *alisalensis* ES4326) (Sarris et al., 2013) の遺伝子配列との相同性を P. Genome DB BLAST search (<http://www.P.com/blast/setnblast>) により解析し、トランスポゾンの挿入位置を同定した。

(2) シリンジ接種による病原力因子の解析

① キャベツでのシリンジ接種試験

それぞれの変異株を本葉2葉期のキャベツ幼苗に対して 5×10^5 CFU/ml の濃度の細菌をシリンジによりアポプラスト内に直接注入接種し、5日後に病徴のスコアリングを行った。

(3) エンバクに対する接種による両宿主に共通の病原力因子の単離

① エンバクでの接種試験

それぞれの変異株を発芽後約2週間のエンバク (*Avena strigosa*) (品種：ヘイオート) に対して 5×10^7 CFU/ml の濃度にて浸漬接種を行い、4日後に病徴のスコアリングを行った。

(4) 病原性を構築する病原力因子の機能の解明

① 植物内細菌増殖の解析

接種したキャベツおよびエンバクの2葉を採集し、重量の測定を行なった。採集した葉は、10% v/v H_2O_2 に3分間沈めて表面殺菌した後、滅菌水で3回洗浄し、磨砕した。滅菌水を加えた磨砕液を段階希釈し、KB培地上にスポットした。2、3日後に、コロニー数の計測を行い、葉のグラム当たりのコロニー数 (CFU/g) を算出した。

② 細菌および植物の遺伝子発現解析

キャベツとエンバクに対して *Pcal* (1×10^8 CFU/ml)を浸漬接種し、それぞれ接種 4 時間、24 時間、48 時間後に、植物と細菌の RNA を RNAiso Plus (TaKaRa)を用いて抽出した。リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR)は、Ishiga and Ichinose (2016)を参考にして行なった。*Pcal* の遺伝子発現の標準化には、*outer membrane porin F (oprF)*および *recombinase A (recA)*を遺伝子発現の標準化に使用した。キャベツの *UBIQUITIN EXTENSION PROTEIN 1 (BoUBQ1)*、エンバクの *Actin (AsAct)*をそれぞれの遺伝子発現の標準化に使用した。

③ 気孔防御の解析

キャベツとエンバクの葉を 5 mm 四方の断片にし、stomatal opening buffer (10 mM MES-KOH, 20 mM KCl, pH 6.3) (Lee et al. 2013)に浮かべた。処理 4 時間後、*Pcal* 野生株および変異株の細菌懸濁液 (1×10^8 CFU/ml) に移して、再度浮かべた。接種 1 時間後、および 4 時間後に Nikon optical microscope (Eclipse 80i) を用いて、葉の裏表面を画像化し、ImageJ により、気孔の開口径の測定を行なった。

④ コロナチンの定量解析

Pcal 野生株および変異株は、HS medium optimized for coronatine production (HSC; (Palmer and Bender 1993)培地にて、5 日間振盪培養した。遠心分離により得た培養上清を HPLC により解析した。

4. 研究成果

(1) *Pcal* の変異体ライブラリーの作製および病原力低下株の選抜 (Fig. 1)

1,040 株のトランスポゾン挿入による *Pcal* の変異株を、本葉 2 葉期のキャベツに接種し、53 株の病原力低下を示した変異株を同定した。変異遺伝子を同定した結果、既知の病原力因子としては、3 型分泌装置、4 型分泌装置、多剤排出ポンプなどが同定された。また、Hypothetical protein のような機能が未知な因子も特定された (Sakata et al., 2019)。それらに加え、転写因子やシグナル分子をはじめとする調節因子や環境ストレス応答にかかわる細胞外多糖、細胞壁合成に関わる因子が特定された。アミノ酸代謝、脂質代謝、炭水化物代謝、核酸代謝などの一次代謝に関わる因子も病原力に関与していることが示唆された。

(2) シリンジ接種による病原力因子の解析 (Fig. 2)

浸漬接種によるスクリーニングによって同定された病原力因子が、細菌の Epiphytic phase で必要とされているのか、あるいは、Endophytic phase で必要とされているのかを解析するため、キャベツに対してシリンジ接種を行った。予想に反し、シリンジ接種でも病原力低下を示した株は、浸漬接種で病原力低下を示した 53 株のうち 9 株であった。それらの 9 株は、Tryptophan synthase subunit alpha、3-phosphoglycerate dehydrogenase、N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase、Polynucleotide phosphorylase/polyadenylase、Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase

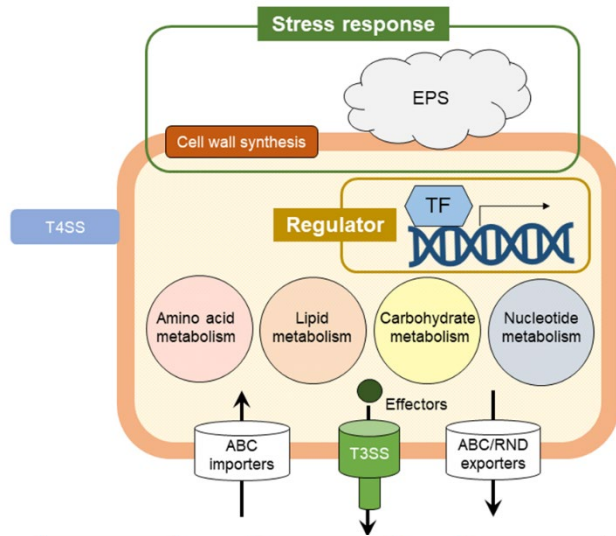


Fig. 1 スクリーニングにより特定した *Pcal* の病原力因子

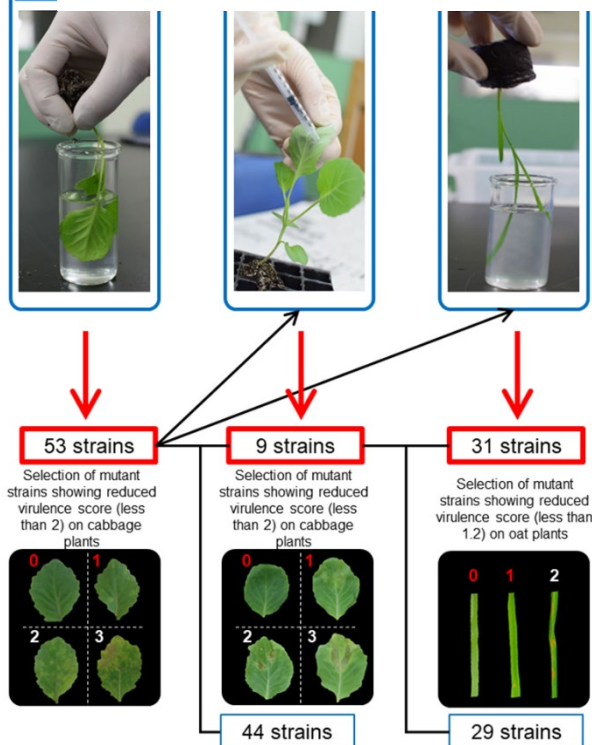


Fig. 2 浸漬接種およびシリンジ接種による変異株のスクリーニング

ATPase subunit、T3SS proteins HrcQb、D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase、Polyphosphate kinase、DNA topoisomerase IIIをコードする遺伝子に変異が挿入されていた。

(3) エンバクに対する接種による両宿主に共通の病原力因子の単離 (Fig. 2)

Pcal KB211 はエンバクに対しても病原力を示す (Ishiyama et al., 2013)ことが大きな特徴であるため、キャベツに対して病原力低下を示した 53 株についてエンバクに対する接種試験を同様の浸漬接種法で行った。その結果、それら 53 株のうちエンバクに対しても病原力低下を示した株は 31 株であった。また、これらの 31 株の中に、キャベツのシリンジ接種で病原力低下を示した 9 株が含まれた (Sakata et al., 2019)。

(4) 病原性を構築する病原力因子の機能の解明

① トリプトファン生合成変異株の解析

Pcal の病原力におけるトリプトファン生合成酵素の機能を解析するために、トリプトファン生合成遺伝子 *Tryptophan synthase subunit alpha (trpA)* 変異株の解析を行った。はじめに、野生株および *trpA* 変異株をキャベツおよびエンバクに対して、浸漬接種を行なった。野生株を接種したキャベツでは、壊死病斑および黄化が観察された。一方で、*trpA* 変異株を接種したキャベツでは病徴が全く観察されなかった。さらに、野生株に比べ、*trpA* 変異株では植物内細菌数も有意に減少した。エンバクにおいても同様に、*trpA* 変異株において、病徴形成低下と植物内細菌数の減少が確認された (Sakata et al., 2021a)。

野生株と *trpA* 変異株の感染時における病原力遺伝子の発現プロファイルを解析した結果、3 型分泌装置関連遺伝子およびコロナチン生合成関連遺伝子の発現は、野生株と比較して *trpA* 変異体での発現が低下していた。また、トリプトファン生合成遺伝子の発現プロファイルを解析した結果、*trpB*、*trpE*、*trpG*、および *trpI* は、野生株と比較して *trpA* 変異体において発現上昇が認められた (Sakata et al., 2021a)。

野生株と *trpA* 変異株を、ダイコン、ブロッコリー、ハクサイなどのいくつかの宿主植物に浸漬接種し、植物内細菌解析した結果、*trpA* 変異株を接種したすべての宿主植物での病徴発現と細菌増殖の減少が認められた。これらの結果は、TrpA が複数の宿主植物における病原性に強く寄与することを示唆している (Sakata et al., 2021a)。

② RND トランスポーター変異株の解析

Pcal の病原力における RND トランスポーターの機能を解析するために、RND トランスポーター変異株 (NU19) の解析を行った。はじめに、野生株および NU19 をキャベツに対して、浸漬接種を行なった。野生株を接種した植物では、壊死病斑および黄化が観察された。一方で、NU19 を接種したキャベツでは壊死病斑はみられず、黄化も減少した。さらに、接種 3 日後および 5 日後において、野生株に比べ、NU19 では植物内細菌数も有意に減少した。

キャベツの遺伝子発現解析から、*Pcal* 感染時においてファイトアレキシンであるブラシニン生合成関連遺伝子の発現が優位に上昇することを明らかにした。さらに、遺伝子発現の上昇に付随してブラシニン生合成も上昇することを明らかにした。この結果は、ブラシニンが *Pcal* 感染に対するの防御応答として機能することを示唆している。そこで次に、RND トランスポーターが、ブラシニンの排出に関与するかをブラシニン感受性試験により検証した。その結果、NU19 のブラシニン含有液体培地における増殖率は野生株と比較して有意に低下していた。この結果は、RND トランスポーターがブラシニン耐性に寄与していることを示唆している。

③ コロナチン生産変異株の解析

Pcal の病原力における植物毒素コロナチンの機能を解析するために、コロナチン生合成遺伝子 *cmxA* 欠損株 ($\Delta cmxA$) 作出し、コロナチンを生産しないことを HPLC により確認した。次に、野生株および $\Delta cmxA$ をキャベツおよびエンバクに対して、浸漬接種を行なった。野生株を接種したキャベツでは、壊死病斑および黄化が観察された。一方で、 $\Delta cmxA$ を接種したキャベツでは壊死病斑はみられず、黄化も減少した。さらに、接種 3 日後および 5 日後において、野生株に比べ、 $\Delta cmxA$ では植物内細菌数も有意に減少した。エンバクにおいても同様に、 $\Delta cmxA$ において、病徴形成低下と植物内細菌数の減少が確認された (Sakata et al., 2021b)。

コロナチンによる気孔の再開が観察されるのかを確認するため、野生株および $\Delta cmxA$ を接種し、接種 1 時間後と接種 4 時間後の気孔応答を観察した。キャベツに対して、野生株を接種した場合、接種 1 時間後には、気孔開口幅が有意に減少し、接種 4 時間後には、気孔の再開が見られた。エンバクに対して野生株を接種した場合においても、接種 1 時間後には、気孔の開口幅が有意に減少し、接種 4 時間後には、再び気孔の開口が観察された。一方で、キャベツおよびエンバクに対して、 $\Delta cmxA$ を

接種した際には、接種 4 時間後も気孔は閉鎖したままであった (Sakata et al., 2021b)。

野生株および $\Delta cmaA$ を接種した際のサリチル酸量を定量したところ、野生株を接種した場合と比較して、サリチル酸量は有意に増加した。一方で、エンバクでは、*Pcal* 接種によるサリチル酸量の変化は少なく、接種 24 時間後において、野生株と $\Delta cmaA$ を接種した場合で、サリチル酸量に有意な差は見られなかった。しかしながら、エンバクにおいても、接種 48 時間後では、 $\Delta cmaA$ を接種した場合で野生株よりサリチル酸量が有意に上昇した。サリチル酸防御応答のマーカ―遺伝子の発現について解析した結果、両宿主において $\Delta cmaA$ を接種した場合に有意に遺伝子発現が上昇した (Sakata et al., 2021b)。これらの結果から、キャベツおよびエンバクの両宿主において、コロナチンはサリチル酸を介した防御応答を抑制していることが示唆された。

(5) まとめ

本研究により、キャベツに対する *Pcal* KB211 の病原力因子を網羅的に把握することができた。また、宿主により異なる病原力因子が必要とされていることが示唆された。さらには、コロナチンを含めた多くの病原力因子が *Epiphytic phase* で必要とされており、葉の表面での増殖や侵入に関わっていることが示唆された。以上のことから、細菌病の防除において、侵入を防ぐことは非常に重要であるといえる。Ishiga et al. (2019) および Sakata et al. (2020) では、プラントアクティベーターのアシベンゾラル-S-メチル (Acibenzolar-S-methyl; ASM) が、気孔免疫を向上させていることが示された。ASM を処理すると、*Pcal* KB211 による気孔の再開口がおこらず、病徴を抑えることが明らかにされた。このように侵入をターゲットとした防除法は有効であり、*Epiphytic phase* において重要とされている病原力因子の機能解析は、将来有効な防除法の開発に繋がると考えられる。加えて、*Endophytic phase* で必要とされている病原力因子はキャベツ、エンバクの両者の病原力に大きく関与していることも示唆された。今後、今回特定されたそれぞれの病原力因子の機能解析を進めるとともに、キャベツとエンバクに対する感染機構の差異を明らかにすることにより、*Pcal* KB211 の病原力の全体像を解明し、防除技術の開発へと繋げていきたい。

【引用文献】

- ① Ishiga, T., Sakata, N., Ugajin, T. and Ishiga, Y. (2021) Acibenzolar-S-methyl and probenazole control bacterial blight disease of cabbage by activating stomatal-based defense in different timing manners. *J. Gen. Plant Pathol.* 87, 30–34.
- ② Ishiga, Y. and Ichinose, Y. (2016) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* OxyR is required for virulence in tomato and Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29:119-131.
- ③ Sakata, N., Ishiga, T., Saito, H., Nguyen, V. T. and Ishiga, Y. (2019) Transposon mutagenesis reveals *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* optimizes its virulence factors for pathogenicity on different hosts. *PeerJ.* 20;7:e7698.
- ④ Sakata, N., Ishiga, T., Taniguchi, S. and Ishiga, Y. (2020) Acibenzolar-S-methyl activates stomatal-based defense systemically in Japanese radish. *Front. Plant Sci.* 11:565745.
- ⑤ Sakata, N., Ishiga, T., and Ishiga, Y. (2021a) *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* TrpA is required for virulence in multiple host plants. *Front. Microbiol.* 12: 659734.
- ⑥ Sakata, N., Ishiga, T., Masuo, S., Hashimoto, Y. and Ishiga, Y. (2021b) Coronatine contributes to *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* virulence by overcoming both stomatal and apoplastic defenses in dicot and monocot plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 34:746-757.
- ⑦ Sarris, P. F., Trantas, E. A., Baltrus, D. A., Bull, C. T., Wechter, W. P., Yan, S., Ververidis, F., Almeida, N. F., Jones, C. D., Dangl, J. L., Panopoulos, N. J., Vinatzer, B. A., and Goumas, D. E. (2013) Comparative genomics of multiple strains of *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*, a potential model pathogen of both monocots and dicots. *PLOS ONE.* 8:e59366
- ⑧ Sawada, T., Eguchi, M., Asaki, S., Kashiwagi, R., Shimomura, K., Taguchi, F., Hidenori, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda, K., and Ichinose, Y. (2018) MexEF-OprN multidrug efflux pump transporter negatively controls N-acyl-homoserine lactone accumulation in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Mol. Genet. Genom.* 293:907–917.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakata Nanami, Ishiga Takako, Ishiga Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Pseudomonas cannabina pv. alisalensis TrpA Is Required for Virulence in Multiple Host Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.659734	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 Sakata Nanami, Ishiga Takako, Masuo Shunsuke, Hashimoto Yoshiteru, Ishiga Yasuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Coronatine contributes to Pseudomonas cannabina pv. alisalensis virulence by overcoming both stomatal and apoplastic defenses in dicot and monocot plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions?	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/MPMI-09-20-0261-R	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 Sakata Nanami, Ishiga Takako, Saito Haruka, Nguyen Viet Tru, Ishiga Yasuhiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Transposon mutagenesis reveals Pseudomonas cannabina pv. alisalensis optimizes its virulence factors for pathogenicity on different hosts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7698 ~ e7698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.7698	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26件（うち招待講演 0件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Sakata, N., Ishiga, T. and Ishiga, Y.
2. 発表標題 Transposon and deletion mutagenesis of Pseudomonas cannabina pv. alisalensis identifies genetic forces driving pathogenicity
3. 学会等名 Plant health 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakata, N., Ishiga, T. and Ishiga, Y.
2. 発表標題 Transposon and deletion mutagenesis of <i>Pseudomonas cannabina</i> pv. <i>alisalensis</i> identifies genetic forces driving pathogenicity
3. 学会等名 Psyringae 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田七海、原口巧、石賀貴子、石賀康博
2. 発表標題 アブラナ科植物黒斑細菌病菌の病原力におけるRND型トラスポーターの役割の解明
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 別役重之、別役恵理子、坂田七海、石賀貴子、石賀康博
2. 発表標題 <i>Pseudomonas</i> 細菌集団におけるコロナチン合成の不均一性が植物への病原性に重要である
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 坂田七海、石賀貴子、榊尾俊介、石賀康博
2. 発表標題 コロナチンは <i>Pseudomonas cannabina</i> pv. <i>alisalensis</i> の単子葉類および双子葉類への感染における重要な病原力因子である
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakata, N., Saito, H., Ishiga, T., Ichinose, Y. and Ishiga, Y.
2. 発表標題 Exploring virulence factors of <i>Pseudomonas cannabina</i> pv. <i>alisalensis</i>
3. 学会等名 13th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田七海、齋藤悠香、石賀貴子、一瀬勇規、石賀康博
2. 発表標題 アブラナ科植物黒斑細菌病菌の病原力因子の探索
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田七海、石賀貴子、齋藤悠香、一瀬勇規、石賀康博
2. 発表標題 トランスポゾン挿入変異株を用いた宿主間におけるアブラナ科植物黒斑細菌病菌の病原力因子の解明
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田七海、石賀貴子、石賀康博
2. 発表標題 <i>Pseudomonas cannabina</i> pv. <i>alisalensis</i> の病原力におけるコロナチンの役割の解明
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 坂田七海、井野大貴、石賀貴子、石賀康博
2. 発表標題 キャベツ黒斑細菌病の防除に資するアミノ酸の探索
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------