

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15434

研究課題名（和文）細菌挙動の理解に向けた走化性センサータンパク質のリガンド徹底解明

研究課題名（英文）Studies on chemotactic receptors in bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*

研究代表者

緋田 安希子 (Hida, Akiko)

広島大学・統合生命科学研究科（先）・助教

研究者番号：70825760

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：運動性細菌は自身の保有するセンサータンパク質によってさまざまな化合物を感知し、集積・逃避する走化性という性質を有する。本研究では、青枯病菌の保有する22種類の走化性センサーを対象として、何を感知し、いつ使われるのかに焦点を当て解析を行うことで、これまで機能解明されていた8つのセンサーの他に新たに3つのセンサー機能を解明し、さらに植物存在下で特異的に発現の向上するセンサーを特定した。この結果から、本細菌が22センサーの発現を制御し、植物感染時に特定の走化性を利用す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

青枯病菌は世界的に深刻な農作物被害をもたらしている植物病原細菌であり、現在有効な防除法の確立が求められている。そのような病原菌について、植物感染時の挙動を理解することは重要である。特に、植物体内に侵入した後の挙動についてはよく研究されているが、走化性のように感染に先立つ挙動についてあまり研究されておらず、“走化性”という視点での本病原菌の挙動の理解は新たな感染防除法の提案につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Motile bacteria sense chemical gradients in the environment through chemoreceptors and swim toward their favorable locations or away from unfavorable locations. This behavior is known as chemotaxis. In this study, 22 chemoreceptors of bacterial wilt pathogen were investigated, focusing on their ligand(s) and expression. The ligands of three chemoreceptors were newly identified. In addition, the expression pattern of 22 chemoreceptors in the presence of plant roots was revealed. These results suggest that the pathogen controls the expression level of its chemoreceptors and uses chemotaxis to specific compound(s) in plant infection.

研究分野：応用微生物学

キーワード：走化性 青枯病菌 走化性受容体 MCP

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動性細菌は周囲の化合物を感知して、集積または忌避する性質を有しており、これを“走化性”という。走化性は栄養源の探索や有害物質からの逃避といった一般的な行動だけでなく、感染や共生といった生物間相互作用においても重要な役割を担うとされている。

Methyl-accepting chemotaxis proteins (MCP) と呼ばれる走化性センサータンパク質がリガンドとなる物質を感知することで、鞭毛回転が制御され、走化性が生じる。大腸菌はたった5種類のMCPしか有しないのに対し、環境細菌はより多くのMCPを有している。例えば、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)では26種類、*Pseudomonas putida*では27種類、*Pseudomonas syringae*では50種近くものMCPを保有する。この事実から、環境細菌はこれらMCPを駆使することで多くの物質を嗅ぎ分け、各細菌に適した行動をとっているものと想像できる。そのため、各細菌における走化性の解明(特に、走化性の起点となるMCPのリガンド解明)は、その細菌の環境中での挙動を知る有力な手掛かりになると考えられる。しかし、このように多くのMCPを保有する環境細菌において、すべてのMCPリガンドが解明された細菌は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、深刻な農業被害をもたらしている植物病原細菌である青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* に焦点を当て、当該病原細菌の保有する22のMCP (Mcp01 ~ Mcp22) [そのうち8つのMCP (6つの化合物センサーと2つの走気性センサー) については本研究開始時点で既に機能特定済み] について、そのすべてのリガンド特定を目指した。加えて、各MCPがいつ使われるのか、その発現パターンを解析し、リガンドデータと照らし合わせることで、環境中での本細菌の挙動について考察することを目的とした。

3. 研究の方法

3 - 1) リガンド解析 - 複合試料を用いたスクリーニング

複数の物質が含まれる試料(複合試料)を試験物質として、computer-assisted capillary assay 法による走化性測定を行った。アガロースと混合した試験物質を毛細管現象によりキャピラリーに吸引させ固定化したのち、当該キャピラリーを顕微鏡視野下にて菌懸濁液に挿入し、キャピラリー先端の開口部に集積した菌数を計測することにより、走化性を測定した。この測定を適切なMCP破壊株または相補株を用いて行うことで、複合試料を感知するMCPの特定を試みた。

なお、複合試料としては、牛乳、豆乳、漢方、果物ジュース、液体肥料、複合培地成分、生野菜の破砕液を用いた。

3 - 2) リガンド解析 - Thermal shift assay を用いたスクリーニング

MCPの推定リガンド領域(LBD)をコードするDNA配列をpET28b(+)ベクターに組み込んだMcp_LBD発現用プラスミドを作製し、当該プラスミドを導入した大腸菌BL21(DE3)を用いて、Mcp_LBDを過剰発現させた。超音波破砕にてタンパク質を抽出し、His-tagによりMcp_LBDタンパク質を精製した。当該Mcp_LBDおよび蛍光色素(SYPRO Orange)を、化合物プレート(Phenotype Microarray Plates; BIOLOG)に含まれる化合物と混合し、リアルタイムPCRの装置にて昇温時の蛍光の変動を解析することで、各化合物存在下での解析対象Mcp_LBDのT_m値を求めた。化合物非存在下と比べて、T_m値の上昇が見られた化合物をリガンドであると推定した。

3 - 3) 発現解析

プラントボックスで1週間栽培したトマトの苗に根部のみが浸る程度の菌懸濁液を加え、人工気象器内で8時間保持した。その後、回収した苗の根部を滅菌水に浸して軽く洗浄したのち、新しい滅菌水の入ったチューブに根部が浸るように苗を移し、ボルテックスによって根表面に付着した菌体を脱落させた。この溶液からRNAを抽出し、22種類のmcpに対応したプライマーを用いたqRT-PCRにより、植物根存在下における22mcpの発現を解析した。

4. 研究成果

4 - 1 - 1) カルボン酸を感知するMCPの特定

機能未知の14のMCPについて、そのリガンドを特定するために、リガンド既知の6つの化合物センサーの多重破壊株(PSD6)を用いて、複合試料に対する走化性を測定した。その結果、いずれの複合試料に対しても強い走化性応答が確認され、上記の複合試料には機能未解明の14のMCPのいずれかによって感知されるリガンド物質が含まれることが明らかとなった。そこでまずは、用いた複合試料の中で成分が最も単純であると考えられた液体肥料について、先の6MCPを含む14MCPが破壊されたPSD14の走化性を測定した。その結果、応答が完全に解消することが確認されたことから、プラスミドにて各MCPを再導入したところ、Mcp10が液体肥料成分を感知するMCPであることが判明した。さらに含有成分を予測し解析を進めたところ、クエン酸(液体肥料にはキレート剤として含有されていると予想)を含むカルボン酸がMcp10のリガンドであることが明らかとなった。

4 - 1 - 2) ギ酸を感知する MCP の特定

上記の解析を行う中で、Mcp09 をプラスミドにて高発現させた株が、対照として用いた試験物質を含まないキャピラリーに対して走化性を示すことを発見した。この現象から、試験物質の固定化に用いていた“アガロース”の加水分解物中に Mcp09 のリガンド物質が含まれることを見出した。アガロースは多糖であるため、当該加水分解物の薄層クロマトグラフィーによる分画・分析や、糖類を中心とした走化性測定を行ったが、Mcp09 のリガンド特定には至らなかった。そこで、Mcp09_LBD タンパク質を精製し、Thermal shift assay による In vitro でのリガンドスクリーニングを、190 種類の化合物に対して実施した。その結果、Mcp09 のリガンドとしてギ酸が浮上し、走化性測定の結果、確かに Mcp09 がギ酸走化性に関与することが確認された。実際にアガロース加水分解物中のギ酸を定量したところ、数 mM のギ酸が含まれていることが判明し、これは糖の脱水と再水和により生成したものと考えられた。この時点では走化性物質としてのギ酸の報告はなく（この後すぐに別の細菌で報告されてしまったが）、新規の走化性物質の発見につながった。

4 - 1 - 3) Asp, Glu を感知する MCP の特定

新たな MCP のリガンドを特定するために、PSD6 を親株として上記解析でリガンドの特定された Mcp10 および Mcp09 をコードする遺伝子を破壊した MCP の八重破壊株(PSD8)を作製した。PSD8 を用いて、4 - 1 - 1 と同様にして、再び複合試料に対する走化性測定を実施した。その結果、PSD8 では多くの複合試料に対してあまり強い応答を示さなくなっていたが、ニンジンやピーマンの破砕液、複合培地である Tryptic soy broth(TSB)に対しては強い走化性を示すことが確認された。そこで、この中で最も成分の想定しやすい TSB に焦点を当て解析を行うこととした。PSD8 に、残る *mcp* 遺伝子をそれぞれ追加で破壊した MCP 九重破壊株ライブラリを構築し、走化性測定を行ったところ、TSB への走化性応答には Mcp19 が関与することが明らかとなった。さらなる解析により、TSB に含まれるアミノ酸成分のうち Asp と Glu が Mcp19 の主要なリガンドであることが判明した。青枯病菌において 20 種すべてのアミノ酸を感知するセンサーはすでに特定されていたが、Mcp19 はそれとは異なり、その他のアミノ酸への走化性は誘導せず、Asp と Glu に特異的センサーであることが示され、本細菌は環境に応じて異なるタイプのアミノ酸センサーを使い分けていることが示唆された。

以上の結果を含めた 22 MCP の特性化状況を表 1 に示す。本研究で目標としていたすべての MCP のリガンド特定は達成できなかったが、上記の 2 つの手法を組み合わせることで、今後すべてのリガンド特定も可能になると考えている。

表 1 22 MCP のリガンド

MCP 番号	リガンド/機能
01	20アミノ酸
02	
03	L-酒石酸
04	
05	クエン酸
06	
07	
08	
09	ギ酸
10	カルボン酸
11	
12	
13	
14	L-リンゴ酸
15	
16	
17	
18	
19	Asp, Glu
20	走気性
21	
22	走気性

4 - 2) 22 MCP の発現

細菌の挙動の理解には、各 MCP が“何を感知するのか”というリガンド解析に加え、“いつ使うのか”という発現解析も重要であると考えられる。そこで、宿主植物であるトマトの根の存在下および非存在下における 22 *mcp* 遺伝子の発現を qRT-PCR によって解析した。その結果、22 MCP のうち、10 MCP について、トマト根存在下で有意な発現向上が見られた(図 1)。その中には、本研究開始前に特性化されていた 4 つの MCP (Mcp01、Mcp05、Mcp16、Mcp14) が含まれており、そのうちの Mcp14 による L-リンゴ酸走化性は既に本細菌の植物感染に関与することが証明されている。このことから、本解析で発現の上昇した MCP は、Mcp14 と同様に植物への感染に関与する可能性が高いと考えられた。

本研究において新たに特性化されたカルボン酸センサーMcp10、ギ酸センサーMcp09 もトマト根存在下で発現が向上しており、L-リンゴ酸に加え、これら物質に対する走化性も植物感染に重要である可能性が示唆された。また、本研究の中では特性化に至らなかった Mcp15 や Mcp21 で

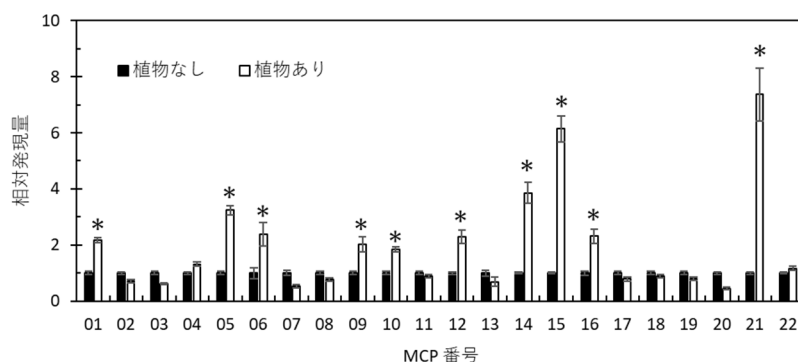


図 1 トマト根存在下における 22 MCP の発現変動 (*有意に発現の上昇した MCP)

は、6~8 倍も発現が向上しており、今後これらの MCP のリガンドが解明されれば、本細菌がどのような物質を標的として植物へ感染しているのか、その全貌が明らかになってくるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 才崎周平, 緋田安希子, 田島誉久, 加藤純一
2. 発表標題 アガロース加水分解物を認識する細菌走化性センサーの特性化
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第59回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東口海斗, 緋田安希子, Asmaa Ali Ahmed Ibrahim, 田島誉久, 加藤純一
2. 発表標題 複合試料を用いたRalstonia solanacearumの走化性センサーの特性化
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第59回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 才崎 周平、緋田 安希子、田島 誉久、加藤 純一
2. 発表標題 「アガロース加水分解物」への走化性 リガンドの特定 -
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東口海斗, 緋田安希子, Asmaa Ali Ahmed Ibrahim, 田島誉久, 加藤純一
2. 発表標題 複合試料を活用するRalstonia solanacearumの走化性センサーの特性化
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2022 (第6回講演会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 才崎周平, 緋田安希子, 田島誉久, 加藤純一
2. 発表標題 細菌のギ酸走化性に関する研究
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2022 (第6回講演会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東口 海斗, 緋田 安希子, 田島 誉久, 加藤 純一
2. 発表標題 複合試料を活用したRalstonia solanacearum の走化性センサーの特性化
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度 広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Asmaa Ali Ahmed, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Junichi Kato
2. 発表標題 Identification and characterization of chemosensors for aspartic acid in Ralstonia pseudosolanacearum Ps29
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度 広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 才崎 周平, 緋田 安希子, 田島 誉久, 加藤 純一
2. 発表標題 Pseudomonas protegensのギ酸走化性の特性化
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度 広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 緋田 安希子
2. 発表標題 植物関連細菌の走化性に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第65回講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Asmaa Ali Ahmed, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Junichi Kato
2. 発表標題 Identification and characterization of chemosensors for aspartic acid and glutamic acid in <i>Ralstonia solanacearum</i>
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会 2023年度大会
4. 発表年 2023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
---------	---------