

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780063

研究課題名（和文）植物病原菌のクオラムセンシングによる病原性発現機構の解析と防除技術への応用

研究課題名（英文）Identification of the expression mechanism of the virulence factors by quorum sensing in plant pathogen and its application

研究代表者

諸星 知広（MOROHOSHI TOMOHIRO）

宇都宮大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90361360

研究成果の概要（和文）：多くの植物病原性細菌はアシル化ホモセリンラクトン（AHL）をシグナル物質とした情報伝達機構（クオラムセンシング）により病原性の発現を制御している。本研究では、モデル病原菌としてタマネギ病原菌 *Pantoea ananatis* SK-1 株を用い、クオラムセンシングに制御される因子を探索したところ、SK-1 株において菌体外多糖（EPS）生産および菌体凝集が AHL を介したクオラムセンシングにより制御することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Many plant pathogens have a quorum-sensing system, a cell-cell communication mechanism that depends on cell population density. Several kinds of *N*-acylhomoserine lactone (AHL) have been identified as signal compounds involved in this mechanism. In this study, we attempted to identify the unknown factors, which were regulated by AHL-mediated quorum sensing in the plant pathogen *Pantoea ananatis* SK-1. As the results, it was revealed that the production of extracellular polysaccharide (EPS) and cell aggregation were regulated by AHL-mediated quorum sensing in *P. ananatis* SK-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：クオラムセンシング、アシル化ホモセリンラクトン、植物病原菌、*Pantoea ananatis*、quorum sensing、acylhomoserine lactone、plant pathogen

1. 研究開始当初の背景

細菌は単独で活動するだけでなく、情報伝達シグナル物質の一種であるアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を菌体外に放出し、周囲の細菌とコミュニケーションを図っている。実際には、AHL を介して周囲の個体密度を感知しており、個体密度が一定の値を超えると、様々な遺伝子の発現が活性化される

ようになる。このような細胞間情報伝達機構をクオラムセンシングと呼ぶ。これまでの報告により、グラム陰性植物病原菌の多くが AHL を生産し、クオラムセンシングにより病原性因子の発現を制御することが明らかになっている。クオラムセンシングが正常に働かない植物病原菌は病原性因子の発現が見られず、宿主植物に対する病原性が極度に低

下する。これらの事実から、クオラムセンシングの阻害は農薬などに代わる新しい植物防疫技術に繋がるとして注目を集めている。

Pantoea ananatis は、イネやタマネギ、メロンといった農作物の病原菌として知られているが、その主要な病原性因子の特定には至っていない。また、病原性 *P. ananatis* のほとんどが AHL を生産することが明らかとなっているが、クオラムセンシングに制御される因子はほとんど明らかにされていない。過去の研究により、タマネギ葉の壊死誘導を引き起こす *P. ananatis* SK-1 株の AHL 合成遺伝子を破壊すると、タマネギ葉への壊死誘導が完全に消失するが、AHL を添加することで、再び壊死誘導を示すようになることが明らかとなり、未知の病原性因子がクオラムセンシングにより制御されている可能性が示唆された。そこで、SK-1 株のクオラムセンシングに制御される因子を網羅的に解析することで、これまでに明らかにされていない主要な病原性因子を新たに発見出来る可能性があるだけでなく、クオラムセンシング阻害技術を適用することで、病原性抑制に有効である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、植物病原菌 *P. ananatis* SK-1 株の AHL を介したクオラムセンシングにより制御される病原性因子を明らかにするとともに、それら病原性因子の遺伝子レベルでの発現制御機構を明らかにし、クオラムセンシングを標的とした新しい植物防疫技術の確立に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株および培地

大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株は LB 培地を用いて 37°C で培養した。*P. ananatis* SK-1 株(野生株)、SK-021 株(*eanI* 破壊株)、SK-EPS1 株(*rcaA* 破壊株)、SK-EPS2 株(*rcaB* 破壊株)、SK-33M 株(*yeeJ* 破壊株)は LB 培地またはトリプチケースソイ培地 (TSB 培地) を用いて 30°C で培養した。培地に添加する AHL には、3-オキソヘキサノイルホモセリンラクトン (3OC6-HSL) を使用した。

(2) トランスポゾン変異株の取得

各種遺伝子破壊株の作成は、トランスポゾン変異導入法にて行った。トランスポゾン変異を引き起こすプラスミド pOT182 をエレクトロポレーション法にて SK-1 株に導入し、染色体にランダム変異導入を試みた。SK-1 株は TSB 培地にて一晚培養し、培養液 1 ml を新しい TSB 液体培地 100 ml に加え、30°C で約 3 時間培養した。培養液は遠心分離 (10,000 \times rpm, 4°C, 5 分) により上清を取り除き、

10%グリセリンで菌体を 3 回洗浄し、最終的に 1 ml の 10%グリセリンに菌体を再懸濁した。菌体懸濁液に pOT182 プラスミド溶液を混合し、エレクトロポレーション法により SK-1 株に導入した。エレクトロポレーション後の菌体懸濁液は、10 μ g/ml のテトラサイクリンを含む LB 寒天プレート上でコロニーを形成させ、トランスポゾン変異株とした。

(3) 菌体外多糖 (EPS) 生産の観察

EPS 生産を確認するための EPS 生産検定培地として、アラビノース、キシロース、グルコース、スクロース、フルクトース、マルトースを 2.5 g/l となるように添加した LB 寒天培地を作製した。SK-1 株及び各種変異株は、糖を添加していない LB 寒天培地上でコロニーを形成させ、各 EPS 生産検定プレート上にストリークし、30°C で一晚インキュベートした。EPS 生産はコロニー周辺の粘調性により判断した。

(4) EPS 生産制御遺伝子のクローニング

EPS 生産制御遺伝子である *rcaA* を増幅するためのプライマーとして、*rcaA*-1 (5'-ACC GAA AGT GAG ATC TGG ATC GCT AAT CC-3') および *rcaA*-2 (5'-AAA TTG GTG AGG GTC GCT AAC ATG CCA ACG TGT CGT CG-3') を使用し、*rcaB* を増幅するためのプライマーとして、*rcaB*-1 (5'-CTA TGC TCA ATT TGA CAC CGG GCA AAC AGC-3') および *rcaB*-2 (5'-GAC CTT AGA CGT GTT GAA AAC AAC GCT GGG-3') を使用した。PCR 増幅を行うため、DNA ポリメラーゼには Go Taq (プロメガ) を使用し、熱サイクルは 94°C で 30 秒、60°C で 30 秒、72°C で 2 分を 27 サイクルで行った。取得した PCR 増幅産物は pJN105Z ベクターの制限酵素 *EcoRI* サイトに挿入し、さらに pKRP10 プラスミドを *HindIII* で消化することにより切り出したクロラムフェニコール耐性遺伝子カセットを *HindIII* サイトに挿入した。これらのプラスミドは、エレクトロポレーション法により SK-1 株及び各種 EPS 生産変異株に導入した。

(5) 菌体凝集の観察および凝集率の算出

菌体凝集を確認するため、SK-1 株及び各種変異株は TSB 培地で 20 時間培養し、培養液を室温で 20 分間静置し、目視にて菌体凝集を観察した。凝集現象を定量的に解析するために培養液の凝集率 (AI) を求めた。AI の計算は下記の式を用いて行なった。

$$AI (\%) = 100 \times \{ (OD_{total} - OD_{sup}) / OD_{total} \}$$

以下に詳細な計算方法を示す。SK-1 株及び各種変異株は TSB 液体培地で一晚培養した。新しい TSB 液体培地に一晚培養液を 1% 植菌し、30°C で 20 時間培養を行った。培養液全

体の菌体濁度として、波長 600 nm の吸光度 (OD_{total}) を測定した。次に、1 ml の培養液を低速遠心分離 ($700 \times g$, 2 分) し、上清の菌体濁度 (OD_{sup}) を測定して計算式に値を代入することで凝集率 AI を算出した。

(6) RT-PCR による凝集抑制遺伝子 *yeeJ* の転写制御の解析

SK-1 株及び AHL 合成遺伝子破壊株は TSB 培地にて一晚培養し、培養液 40 μ l を新しい TSB 液体培地 4 ml に加え、30°C で約 10 時間培養した。菌体からの全 RNA の抽出には、ISOGEN (ニッポンジーン) を使用し、混入 DNA は DNase により分解した。逆転写には 80 ng の全 RNA を使用し、ReverTra Ace (東洋紡) を使用して cDNA を調製した。凝集抑制遺伝子 *yeeJ* の内部配列を増幅するためのプライマーとして、*yeeJ*-F (5'-CTG ACA TCC GGC AGG GTT TGT ATT GCT ACC-3') および *yeeJ*-R (5'-CGA CCA TAG CTG CCA CGT TGT TTG GCG ATA-3') を使用した。PCR 増幅を行うため、DNA ポリメラーゼには Go Taq を使用し、熱サイクルは 94°C で 30 秒、60°C で 30 秒、72°C で 90 秒を 28 サイクルで行った。

4. 研究成果

(1) SK-1 株の EPS 生産に関わる因子の探索

SK-1 株は TSB 培地上でコロニーを形成させると、粘調性のある EPS を生産するが、LB 培地上では、このようなコロニー形状は示さず、EPS を生産しない。LB 培地と TSB 培地の成分の違いの一つにグルコースの存在がある。そこで、グルコースを添加した LB 培地に SK-1 株を植菌したところ、EPS 生産が観察されることが明らかとなった。次に、LB 培地に様々な糖を添加して EPS 生産を調べたところ、SK-1 株はグルコース以外にも、スクロース、フルクトースの添加により EPS 生産が誘導されることが明らかになった。SK-1 株の *eanI* 遺伝子破壊株 (SK-02I 株) は、TSB 培地上では EPS を生産しないが、1 μ M 30C6-HSL を添加した TSB 培地上では EPS を生産することが明らかとなっている。しかしながら、30C6-HSL を添加しても LB 培地に糖を加えない培地では EPS 生産は見られなかった (図 1)。

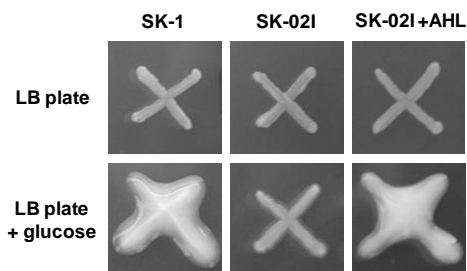


図 1 SK-1 株及び SK-02I 株による EPS 生産と AHL 及び糖の添加の影響

以上より、SK-1 株は 30C6-HSL と糖の両方が存在する条件でのみ EPS を生産することが明らかとなった

(2) SK-1 株の EPS 生産変異株の取得および制御遺伝子の探索

SK-1 株の EPS 生産を制御する遺伝子の変異株を作成するため、SK-1 株にトランスポゾンプラスミド pOT182 を導入してランダム変異を行い、EPS 生産変異株を探索したところ、2 株の EPS 非生産変異株 (SK-EPS1 株及び SK-EPS2 株) を取得することに成功した。SK-EPS1 株のトランスポゾン挿入部分を特定したところ、植物病原菌 *P. stewartii* の *rcsA* と呼ばれる遺伝子と高い相同性を示すことが明らかになった。PCR により、SK-1 株の *rcsA* 相同遺伝子の全長を取得し、全塩基配列を決定したところ、*P. stewartii* の RcsA とアミノ酸レベルで 99.5% の相同性を示すことが明らかになった。SK-EPS2 株のトランスポゾン挿入部分を特定したところ、植物病原菌 *Erwinia amylovora* の *rcsB* と呼ばれる遺伝子と高い相同性を示すことが明らかになった。PCR により、SK-1 株の *rcsB* 相同遺伝子の全長を取得し、全塩基配列を決定したところ、*E. amylovora* の RcsB と 97.7% の相同性を示すことが明らかになった。*rcsA* および *rcsB* は *E. amylovora* や *P. stewartii* で EPS 生産のポジティブレギュレーターとして働いていることが明らかになっており、SK-1 株においても *rcsA* や *rcsB* が QS による EPS 生産に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

(3) SK-1 株の EPS 生産における *rcsA*, *rcsB* 及びクオラムセンシングの影響

SK-1 株における *rcsA* および *rcsB* の役割についてさらに解析するために、SK-1 株、SK-02I 株、SK-EPS1 株、SK-EPS2 株で *rcsA* または *rcsB* を過剰発現させ、30C6-HSL およびグルコースを添加した培地での EPS 生産について調査を行った。その結果を表 1 に示す。*rcsA* を過剰発現させると、SK-1 株や SK-EPS1 株でもグルコースが存在しない LB 培地で EPS を生産することが明らかになった。しかし、SK-02I 株で *rcsA* を過剰発現させても、AHL とグルコースの両方が存在しないと EPS を生産しないことが明らかになった。一方で、*rcsB* を過剰発現させると、全ての株でグルコース及び AHL が存在しなくても EPS を生産することが明らかになった。以上の結果から、EPS 生産は *rcsA* と *rcsB* の両者により制御されているが、*rcsB* の発現のみが AHL を介したクオラムセンシングに制御されている可能性が示唆された。

表1 *rcsA* 及び *rcsB* を発現させた SK-1 株変異株における EPS 生産への AHL 及び糖の影響

	Genes on plasmid	LB	LB +AHL	LB +Glc	LB +AHL +Glc
SK-1	-	-	-	+	+
	<i>rcsA</i>	+	+	++	++
	<i>rcsB</i>	+	+	++	++
SK-02I	-	-	-	-	+
	<i>rcsA</i>	-	-	-	+
	<i>rcsB</i>	+	+	++	++
SK-EPS1	-	-	-	-	-
	<i>rcsA</i>	+	+	++	++
SK-EPS2	-	-	-	-	-
	<i>rcsB</i>	+	+	++	++

(4) SK-1 株の菌体凝集に関わる遺伝子の探索

SK-1 株と SK-02 株の培養液を室温で静置すると、SK-1 株は培養液中の菌体が分散しているのに対し、SK-02I 株では凝集沈殿現象が見られ、凝集率 AI の値が 96% と高い値を示した。SK-02I 株培養液に前もって 1 μ M 3OC6-HSL を添加すると、SK-1 株と同等の凝集率まで低下したことから、SK-1 株の菌体凝集は AHL を介したクオラムセンシングにより負に制御されることが明らかとなった。SK-1 株の菌体凝集を制御する遺伝子の変異株を作成するため、SK-1 株にトランスポゾンプラスミド pOT182 を導入してランダム変異を行い、構成的に凝集する変異株を探索したところ、1 株の変異株 (SK-33M 株) を取得することに成功した。SK-33M 株のトランスポゾン挿入部分を特定したところ、*P. ananatis* LMG 20103 株のアドヘシン様タンパク質をコードする *yeeJ* と呼ばれる遺伝子と高い相同性を示すことが明らかになった。

(5) クオラムセンシングによる *yeeJ* 遺伝子の転写制御の解析

AHL を介したクオラムセンシングによる *yeeJ* の転写制御を解析するため、RT-PCR 解析を行った。本培養 10 時間後の全 RNA から cDNA を調製し、*yeeJ* の内部配列を元に PCR を行ったところ、SK-1 株では *yeeJ* の発現が見られたが、SK-02I 株では発現が全く見られなかった。SK-02I 株に 0.1 または 1 μ M の 3OC6-HSL を添加したところ、1 μ M の添加で *yeeJ* の発現が見られ、この濃度は SK-02I 株が菌体凝集を示さなくなる濃度と一致していた。以上より、*yeeJ* の転写は AHL を介したクオラムセンシングにより制御されており、発現した YeeJ により菌体凝集が阻害されている可能性が示唆された。

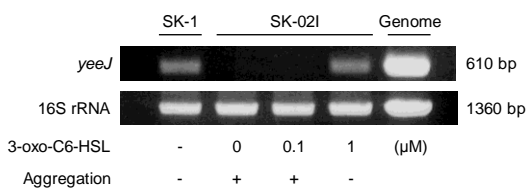


図3 SK-1 株及び SK-02 株による *yeeJ* 発現の RT-PCR

(6) 結言

本研究では、モデル病原菌である *P. ananatis* SK-1 株が EPS 生産と菌体凝集を AHL を介したクオラムセンシングにより制御することを始めて明らかにした。EPS 生産と菌体凝集は両方とも直接病原性とは関連しないが、SK-1 株の AHL 合成遺伝子破壊株がタマネギ葉への病原性を完全に消失することから、今後もクオラムセンシングに制御されるフェノタイプを網羅的に解析することで、未知の主要病原性因子の発見につながると期待される。

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 2 件)

- ① T. Morohoshi, K. Oseki, T. Ikeda, Exopolysaccharide production is influenced by sugars, *N*-acylhomoserine lactone and transcriptional regulators RcsA and RcsB, but does not affect pathogenicity in the plant pathogen *Pantoea ananatis*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 75, 997-999 (2011) 査読有り
- ② T. Morohoshi, Y. Ogata, T. Ikeda, Cell aggregation is negatively regulated by *N*-acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing in *Pantoea ananatis* SK-1, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 566-569 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 諸星知広, 菊池健太, 緒方優二, 上岡夏海, 池田幸, *Pantoea ananatis* の Quorum Sensing に制御される病原性因子の探索, 平成 24 年度日本植物病理学会大会, 2012 年 3 月 28~30 日 (福岡国際会議場)
- ② T. Morohoshi, Y. Ogata, T. Ikeda, Cell aggregation is regulated by *N*-acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing in the plant pathogen *Pantoea ananatis*, Asian Congress on Biotechnology 2011 (ACB-2011), May 11-15, 2011 (Shanghai, China)
- ③ 諸星知広, 緒方優二, 池田幸, 植物病原菌 *Pantoea ananatis* における菌体凝集のクオラムセンシングによる制御, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 25~28 日 (京都女子大学)
- ④ N. Kamioka, T. Morohoshi, T. Ikeda, The production of carotenoid pigments

is regulated by acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing in *Pantoea ananatis*, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), December 15-20, 2010 (Honolulu, USA)

- ⑤ 緒方優二, 諸星知広, 池田宰, 植物病原菌 *Pantoea ananatis* における菌体凝集のクオラムセンシングによる制御, 日本生物工学会 2010 年度大会, 2010 年 10 月 27~29 日 (宮崎シーガイア)
- ⑥ 諸星知広, 大関貴恵美, 池田宰, 植物病原菌 *Pantoea ananatis* の菌体外多糖生産に関わる遺伝子群の解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 27~30 日 (東京大学)
- ⑦ 大関貴恵美, 諸星知広, 池田宰, 植物病原菌 *Pantoea ananatis* のクオラムセンシングによる菌体外多糖生産制御機構の解析, 日本生物工学会 2009 年度大会, 2009 年 9 月 23~25 日 (名古屋大学)

[その他]

生物工学研究室ホームページ

<http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸星 知広 (MOROHOSHI TOMOHIRO)

宇都宮大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90361360

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし