

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14892

研究課題名（和文）広範な病害抵抗性開発に向けたER-細胞膜接着部位と細菌の相互作用機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the interaction mechanism between ER-plasma membrane contact sites and bacteria to confer broad-spectrum resistance

研究代表者

石川 一也 (Ishikawa, Kazuya)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：10791642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で、細菌の感染時にER-細胞膜接着部位を介して感染する細菌種を同定するには至らなかった。一方で、植物環境を模倣した培地を作成し、簡便に植物上での増殖に必要な細菌因子について調査する実験系を確立した。本系を用いて、大腸菌とアブラナ科軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* で共通の、植物環境中での増殖に必要な遺伝子を明らかにした。さらに、本研究実施の過程で、植物病原細菌が動物病原細菌と同様に植物のヘムを収奪し利用している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した植物環境を模倣した培地は、植物中での生育に必要な細菌因子の探索に用いることができる。また、植物病原細菌が動物病原細菌と同様に植物のヘムを収奪し利用している可能性が示唆されたことは非常に興味深い。ヘムは植物と細菌の双方に必須な補酵素である一方で、不足しがちな分子であることから病原体と動物宿主の間では、ヘムを巡る分子攻防が行われていることが知られている。広範な病原体に対する植物抵抗性の付与のターゲットとして、ヘムが有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, I failed to identify the bacterial species that infect using the ER-plasma membrane contact sites. On the other hand, I developed a culture medium that mimics the plant environment to easily investigate bacterial factors responsible for growth in plants. Using this system, we successfully identified genes responsible for growth in the plant environment that are common to *Escherichia coli* and *Pectobacterium carotovorum*, a pathogen of soft rot disease on Brassica. Furthermore, it was suggested that plant pathogenic bacteria acquire heme from plants in the same way as animal pathogenic bacteria. These developed techniques and findings contribute to elucidating the factors required for bacterial growth on plants.

研究分野：植物保護

キーワード：植物病原細菌 ER-細胞膜接着部位 病害抵抗性 大腸菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 農作物は糸状菌(カビ)、細菌、ウイルスなどの病原体に感染することによって病気になり、収量を減じる。これまでに多くの病原体について植物との相互作用メカニズムが研究され、抵抗性作物が育種されているが、それらのほとんどが特定の病原体の感染・増殖ステップを特異的に抑制するものである。このような抵抗性作物は、甚大な被害をもたらしている特定の病気を暫定的に抑制するには優れているが、効果範囲が狭く対象の病原体以外を防除できないことが課題であった。

(2) ER・細胞膜接着部位は ER・細胞膜間の脂質交換や、細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性の維持に機能していると考えられている。申請者らは、植物の ER・細胞膜接着部位が SYNAPTOTAGMIN 1、5、7 と呼ばれる 3 つの因子から構成されていることを見出し、SYNAPTOTAGMIN 1、5、7 をすべて欠損した植物は、特定のウイルスに抵抗性を発揮することを発見した。また、他の研究グループは、ER・細胞膜接着部位が糸状菌の感染に必要であることを報告している。しかし、細菌と ER・細胞膜接着部位の関係については研究が不十分であった。

2. 研究の目的

(1) ER・細胞膜接着部位を介して感染する細菌種を調査し、ER・細胞膜接着部位との相互作用に関わる細菌因子を同定することで、ER・細胞膜接着部位を介した細菌感染の分子メカニズムを明らかにする。

(2) ER・細胞膜接着部位と細菌の関係が示唆されなかった場合には、広範な抵抗性を付与するための技術の開発や、ターゲットとなる可能性のある細菌・植物相互作用システムの解明を行い、新規病害抵抗性開発の基盤を形成する。

3. 研究の方法

(1) ER・細胞膜接着部位を欠損したシロイヌナズナに各種細菌の接種を行い、感染の抑制が見られるか検証する。

(2) 細菌の植物中での生育に必要な普遍的要因を同定する技術開発を行う。具体的には植物環境を模倣した培地によるスクリーニング系を開発する。

(3) 細菌の生育を、向上もしくは抑制する新規植物由来物質の探索を行う。

4. 研究成果

(1) ER・細胞膜接着部位と細菌感染の関係の調査

本研究では、SYNAPTOTAGMIN 1、5、7 をすべて欠損した ER・細胞膜接着部位が大きく減少している変異体シロイヌナズナ tripleKO に対し、植物病原細菌を摂取したが、細菌の感染には差が見出されなかった。

tripleKO へ 2 種の細菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)、*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

を接種したが、いずれも生菌数が微増し、ER・細胞膜接着部位の欠損植物が抵抗性を示すという期待とは反する結果が得られた(図1)。本研究を開始したのちに、ER・細胞膜接着部位の 1 つの因子 SYNAPTOTAGMIN 5 を欠損した植物で、植物病原細菌

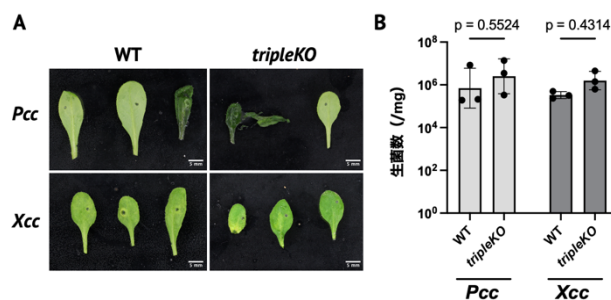


図1. シロイヌナズナ葉への *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) と *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)の接種実験。(A) 接種 68 時間後の接種葉。(B) 生菌数。

Pseudomonas syringae pv *tomato* の感染が増加するという研究が報告された。本研究で得られた結果は、この結果と一致しており、ER・細胞膜接着部位は細菌の感染には、抑制的に機能していることが考えられる。これは ER・細胞膜接着部位が、ウイルスや糸状菌の感染を促進的するように機能していることと反対の結果である。以上のことから、ER・細胞膜接着部位を欠損させることで、広範囲の植物病原に抵抗性を有する植物を作成することは困難だと考えられた。しかし、ER・細胞膜接着部位が細菌を含めた病原体の感染と密接な関係があることが示され、どのようなメカニズムで ER・細胞膜接着部位を欠損した植物での細菌感染効率が向上するか、以後解析を行う予定である。

(2) 植物環境模倣培地を用いた遺伝子スクリーニング実験

本研究遂行の過程で、コントロールとして用いた大腸菌をシロイヌナズナに接種した際に、植物上で長期生存が可能であることを発見した。このことから、大腸菌にも植物環境で耐久・増殖するメカニズムが存在し、大腸菌をモデルとして細菌の植物環境における生育に重要な要素を調べることができると考えた。さらに簡便な実験法として、卵菌類の培養などに用いられる V8 juice を元にした V8 培地を作成し、植物環境を模倣した培地として、大腸菌の遺伝子欠損ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、特定の amino 酸合成能を欠損した大腸菌の生育が著しく低下することが分かった(図2)。さらにこの amino 酸合成能を欠損したアブラナ科軟腐病菌 *P. carotovorum* も、植物環境を模倣した培地での生育が低下することが明らかとなった。以上のことから、大腸菌をモデル細菌として、細菌の植物環境における生育に重要な要素を調べることができ、簡便な実験系を確立できたと考えている。現在はこの変異型 *P. carotovorum* をシロイヌナズナに接種して病原性が低下するか確認している。

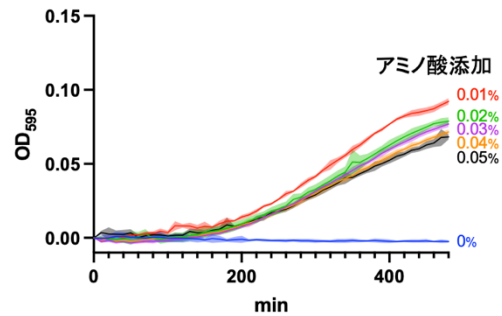


図2. V8 培地における、特定の amino 酸合成遺伝子を欠損した大腸菌の生育曲線。

(3) 植物病原細菌のヘム利用能の発見

研究実施の過程で、植物病原細菌が動物病原細菌と同様に植物のヘムを収奪し利用している可能性が示唆された。アブラナ科軟腐病菌 *P. carotovorum* について、最小培地にヘムを添加した場合に著しく生育が向上することを発見した(図3)。一方で、動物病原細菌である大腸菌 O157 Sakai 株で同様の実験を行った場合には、生育は反対に低下した。これは、植物病原細菌である *P. carotovorum* は動物病原体よりも潜在的なヘム利用能が高いことを示唆している。ヘムは植物と細菌の双方に必須な補酵素である一方で、不足しがちな分子であることから病原体と動物宿主の間では、ヘムを巡る分子攻防が行われていることが知られている。本研究の結果から、植物病原細菌と植物の間にもヘムを介したやりとりが存在するのではないかと推察している。

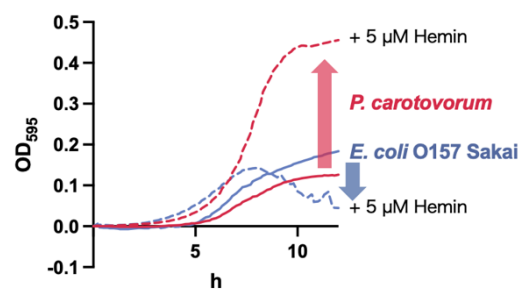


図3. 最小培地にヘム塩化物 (Hemin) を添加した場合の大腸菌 O157 Sakai 株と、*P. carotovorum* の増殖曲線。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ishikawa Kazuya, Konno Ryota, Hirano Satoyuki, Fujii Yuta, Fujiwara Masayuki, Fukao Yoichiro, Kodama Yutaka	4. 巻 111
2. 論文標題 The endoplasmic reticulum membrane-bending protein RETICULON facilitates chloroplast relocation movement in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 205 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15787	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 Ichikawa Shintaro, Kato Shota, Fujii Yuta, Ishikawa Kazuya, Numata Keiji, Kodama Yutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Organelle Glue: A Molecular Tool to Artificially Control Chloroplast-Chloroplast Interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 3190 ~ 3197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.2c00367	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 Ichikawa Shintaro, Ishikawa Kazuya, Miyakawa Hitoshi, Kodama Yutaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Live cell imaging of the chloroplast outer envelope membrane using fluorescent dyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.462	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 Ishikawa Kazuya, Shirakawa Riko, Takano Daiki, Kosaki Tomoki, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara	4. 巻 204
2. 論文標題 Knockout of <i>ykcB</i> , a Putative Glycosyltransferase, Leads to Reduced Susceptibility to Vancomycin in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e0038722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jb.00387-22	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 Ishikawa Kazuya, Kobayashi Makoto, Kusano Miyako, Numata Keiji, Kodama Yutaka	4. 巻 42
2. 論文標題 Using the organelle glue technique to engineer the plant cell metabolome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 599 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-023-02982-2	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 Shirakawa Riko, Ishikawa Kazuya, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara	4. 巻 18
2. 論文標題 Knockout of ribosomal protein RpmJ leads to zinc resistance in Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0277162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0277162	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 Ishikawa Kazuya, Xie Xiaonan, Osaki Yasuhide, Miyawaki Atsushi, Numata Keiji, Kodama Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Bilirubin is produced nonenzymatically in plants to maintain chloroplast redox status	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadh478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adh4787	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 Inamoto Takuho, Furuta Kazuyuki, Han Cheng, Uneme Mio, Kano Tomonori, Ishikawa Kazuya, Kaito Chikara	4. 巻 290
2. 論文標題 Short chain fatty acids stimulate dendrite elongation in dendritic cells by inhibiting histone deacetylase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5794 ~ 5810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16945	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 Ishikawa Kazuya、Kodama Yutaka	4. 巻 65
2. 論文標題 Bilirubin Distribution in Plants at the Subcellular and Tissue Levels	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 762 ~ 769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcae017	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 Kano Tomonori、Ishikawa Kazuya、Furuta Kazuyuki、Kaito Chikara	4. 巻 371
2. 論文標題 Knockout of adenylosuccinate synthase purA increases susceptibility to colistin in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fnae007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnae007	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 Uneme Mio、Ishikawa Kazuya、Furuta Kazuyuki、Yamashita Atsuko、Kaito Chikara	4. 巻 19
2. 論文標題 Overexpression of the flagellar motor protein MotB sensitizes <i>Bacillus subtilis</i> to aminoglycosides in a motility-independent manner	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0300634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0300634	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 Ishikawa Kazuya、Kodama Yutaka	4. 巻 63
2. 論文標題 オルガネラグレー技術による植物メタボロームの人為操作	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 247 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.247	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 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白川璃子、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソームタンパク質RpmJの欠損は大腸菌の亜鉛耐性を導く
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚岡武人、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌ubiE遺伝子の欠損はプロタミンに対する耐性を導く
3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田希穂、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌のtusA欠損は陽イオン性界面活性剤に対する耐性を引き起こす
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井梨奈、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌RpoBの変異は酸化ストレス感受性化とマクロファージ内での生菌数低下をもたらす
3. 学会等名 第66回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小崎智己、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 つまようじ由来成分は枯草菌のペリクル形成を促進する
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三好裕介、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 枯草菌の酸化ストレス耐性機構の解析
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樽木洋平、古田和幸、石川一也、垣内力
2. 発表標題 樹状細胞の抗原提示とサイトカイン産生に対する枯草菌生菌の影響解析
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 狩野智徳、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 枯草菌ytpI遺伝子欠損による大腸菌増殖阻害メカニズムの解明
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 采女美生、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 細菌の運動性の変化が薬剤効果に及ぼす影響
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白川璃子、小崎智己、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソームタンパク質の欠損による大腸菌の亜鉛耐性化機構の解析
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 垣内力、石川一也
2. 発表標題 モデル植物シロイヌナズナを感染モデルとして利用する試み
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川一也、垣内力
2. 発表標題 植物の細菌感染モデル動物としての可能性
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 采女美生、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 べん毛モータータンパク質MotB の過剰発現は 枯草菌のアミノグリコシド感受性を導く
3. 学会等名 第17回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川一也、山口咲季、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 植物環境での生存に関わる大腸菌遺伝子の研究
3. 学会等名 第35回微生物シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 狩野智徳、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌のAMP合成酵素PurAの欠損はコリスチン感受性を導く
3. 学会等名 第35回微生物シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白川璃子、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソームタンパク質RpmJの欠損は亜鉛排出トランスポーターをタンパク質レベルで増加させる
3. 学会等名 第76回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白川璃子、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソーム関連遺伝子が欠損した大腸菌は亜鉛排出トランスポーターZntAの増加により亜鉛耐性を示す
3. 学会等名 第76回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口咲季、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 wzxEは植物環境中での大腸菌の生存に必要な遺伝子である
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本凌吾、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 グラム陽性細菌のグリセロ糖脂質の蓄積はダプトマイシン耐性をもたらす
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 采女美生、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 枯草菌のべん毛モータータンパク質MotBが運動性とは無関係に抗菌薬の効果を増強する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川晋太郎、加藤翔太、藤井雄太、石川一也、沼田圭司、児玉豊
2. 発表標題 葉緑体間相互作用を人工的に制御するオルガネラグルー技術の開発
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川一也、小林誠、草野都、沼田圭司、児玉豊
2. 発表標題 オルガネラ接着技術を用いた植物メタボロームの人為的操作の試み
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川一也、謝肖男、宮脇敦史、沼田圭司、児玉豊
2. 発表標題 ピリルピンは葉緑体内で非酵素的に生産される
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 狩野智徳、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌のアデニロコハク酸合成酵素PurAの欠損は過分極を導くことで抗生物質感受性を変化させる
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・薬学部 分子生物学分野ホームページ
<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/bunsei/>

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