

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380028

研究課題名(和文)植物病原細菌における病原性遺伝子発現制御機構のグローバルネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of global network of regulatory mechanism in virulence-related gene expression of phytopathogenic bacteria

研究代表者

一瀬 勇規 (ICHINOSE, YUKI)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：50213004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：Pseudomonas syringaeの運動能を担うべん毛とタイプIV線毛はそれぞれ菌体密度感知分子であるアシルホモセリンラクトン(AHL)とcAMPの合成に必要であり、AHLの合成には転写因子AefRとPsyRが、cAMPの合成には転写因子Vfrを必要とした。前者の欠損は多剤排出ポンプ遺伝子mexEF/oprNの、後者の欠損はmexAB/oprMの発現を高め、薬剤耐性能が高まった。PsyRとVfrはhrp遺伝子の発現制御にも関わることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Motility in Pseudomonas syringae requires flagella and type IV pili (T4P). Flagella and T4P are required for production of acyl homoserine lactones (AHL), quorum sensing molecules and cAMP, respectively. Production of AHL and cAMP also requires transcription factors AefR and PsyR and Vfr, respectively. Defect of aefR or psyR resulted in the enhancement of multidrug efflux pump genes mexEF/oprN, whereas defect of vfr resulted in the enhancement of another pump genes mexAB/oprM. Enhancement of both pump genes activated multidrug tolerance. PsyR and Vfr are also involved in the regulation of hrp gene expression.

研究分野：植物病理学

キーワード：病原性遺伝子 転写因子 菌体密度感知機構 HrpタイプIII分泌システム

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は、タバコ野火病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* をモデル植物病原細菌として、べん毛やタイプ IV 線毛による運動能、菌体密度感知システムやシデロフォアの生産が病原性に必要であることをそれら遺伝子の欠損変異株を解析することにより明らかにしてきた。一方、ある病原力関連遺伝子の欠損変異株は、欠損遺伝子と直接関連しない表現型に影響を及ぼしていることが判明し、病原力関連遺伝子の発現は複雑なネットワークにより制御されていることが推察されていたが、その制御機構には不明な点が多い状況であった。例えば、べん毛運動能を欠損した *fliC* 変異株、*fliD* 変異株、*motABCD* 変異株は共に本菌の菌体密度感知分子であるアシルホモセリンラクトン (AHL) の合性能を失い、べん毛運動能が低下するフラジェリン糖鎖欠損変異株では AHL 合成能が低下した。さらに AHL 合成能が失活あるいは低下した変異株では共に多剤排出ポンプ遺伝子である *mexEF/oprN* の発現が増高した。一方、タイプ IV 線毛の欠損変異株では AHL 合成能に影響を及ぼすことは無かったが、*hrp* タイプ III 分泌システム関連遺伝子の発現が低下した。

2. 研究の目的

病原力に関連する転写因子を同定し、それら転写因子が標的とする病原力遺伝子と転写制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 病原力関連転写因子遺伝子の欠損変異株の作出と表現型解析

以下に記載の転写因子遺伝子を解析対象とした。

AefR: AHL 合成に必要な転写因子

PsyR (AhlR): 菌体密度感知機構の転写因子

Vfr (Virulence factor regulator): cAMP 結合性転写因子

MarR (multiple antibiotic resistance regulator) 及び **Rieske** (2Fe-2S) cluster-containing protein: 多剤耐性遺伝子の制御因子候補

ArsR1: Vfr 制御性転写因子

OxyR: 活性酸素ストレス応答遺伝子制御因子

遺伝子欠損変異株は、まず当該遺伝子を PCR クローニングし、ORF を除去後、接合用プラスミドに導入し、接合と相同組換えにより得た。表現型解析として、増殖能、軟寒天培地上における swimming, swarming 運動能、AHL 合成能、多剤耐性能、RT-PCR やマイクロアレイによる遺伝子発現解析、宿主植物に対する病原力試験などを実施した。

(2) クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

psyR 遺伝子並びに *vfr* 遺伝子の 3'末端に FLAG のコード配列を導入した菌株を作出し、

抗 FLAG 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によりそれぞれの標的遺伝子の同定を試みた。

(3) ゲルシフトアッセイ

PsyR の推定標的遺伝子プロモーターに対し、ゲルシフトアッセイにより結合配列の絞り込みを行った。

4. 研究成果

(1) 病原力関連転写因子遺伝子欠損変異株の解析

MarR (multiple antibiotic resistance regulator) 及び **Rieske** (2Fe-2S) cluster-containing protein

AHL を生産しない変異株では *psyI*, *psyR* 近傍の遺伝子の発現が極端に抑制されることが判明している。これらの遺伝子の中には *marR* 転写因子遺伝子や **Rieske** (2Fe-2S) クラスターを含む推定の転写因子遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の機能を明らかにするため、それぞれの遺伝子を欠損させた変異株を作出したところ、軟寒天培地上における swimming, swarming 運動能が低下し、酸素ストレス下における生存率が低下した。さらに電子顕微鏡観察から細胞膜が損傷を受けていることが判明し、2つの変異株の宿主に対する病原力は低下した。これらの遺伝子は高菌体密度条件下における環境ストレス耐性に機能していると推測された。

Vfr (Virulence factor regulator)

緑膿菌 *P. aeruginosa* では cAMP 結合性転写因子 Vfr が病原性に必要であることが報告されている。*P. syringae* においても *vfr* 遺伝子は存在するが、その機能は不明である。そこで *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 において Δvfr 変異株を作出したところ、宿主タバコに対する病原力が顕著に低下した。また、軟寒天培地上における swimming, swarming 運動能をほぼ失った。 Δvfr 変異株は AHL 合性能を保持していたが、多剤排出ポンプ遺伝子 *mexAB/oprM* の発現が増高し、抗生物質に対する耐性が増高した。また、*hrp* タイプ III 分泌システム関連遺伝子やシデロフォア関連遺伝子の発現が低下した。これらの表現型はタイプ IV 線毛遺伝子の欠損変異株 $\Delta pilA$ の表現型に類似していた。

AefR

AHL の生産に TetR ファミリー転写因子 AefR の必要性が *P. syringae* pv. *syringae* B728a などで報告されている。*P. syringae* pv. *tabaci* 6605 において $\Delta aefR$ 変異株を作出したところ、増殖能が低下し、AHL 合性能を失活した。また、多剤排出ポンプ遺伝子の一つである *mexEF/oprN* の転写が著しく活性化し、クロラムフェニコールなどの抗生物質に対して耐性を示した。さらに軟寒天培地上における swarming 運動能並びに宿主タバコに対する病原力が低下した。

PsyR (AhlR)

P. syringae pv. *tabaci* 6605 の $\Delta psyR$ 変異株で

は野生株より *hrp* タイプ III 分泌システム (T3SS) 関連遺伝子の発現が増高していた。一方、本菌の菌体密度感知分子であるアシルホモセリンラクトン (AHL) の合成酵素遺伝子 *psyl* を欠損させた Δ *psyl* では T3SS 関連遺伝子の発現増高は認められないが、AHL を添加すると発現が増高した。これらのことから、PsyR は T3SS 関連遺伝子のリプレッサーとして機能する可能性が推測された。 Δ *psyl* 変異株で発現が増高した T3SS 関連遺伝子には *hrpL* は含まれていたが、*hrpL* の発現に必要とされる *hrpRS* の増高は認められなかったことから PsyR の標的は *hrpL* と推測された。

OxyR

OxyR は酸化ストレス応答性転写因子として知られている。*P. syringae* pv. *tomato* DC3000 において Δ *oxyR* 変異株を作出したところ、過酸化水素への感受性が高まり、宿主植物トマトおよびシロイヌナズナに対する病原力の低下が認められた。OxyR は活性酸素種を制御する鍵分子として機能していると考えられた。

ArsR1

vfr 欠損変異株は表面運動能並びに発病能力が低下したが、マイクロアレイ解析により *arsR* (arsenic repressor) 1 の発現が野生株と比較して約 14 倍に増高していることが判明した。ArsR はヒ素耐性に関わる転写因子として同定され、金属耐性、色素や毒素生産、病原力、バイオフィーム形成などを制御すると報告されているが、植物病原細菌における知見は殆どない。*arsR1* 欠損変異株は、軟寒天培培地上における運動能、宿主タバコに対する発病能力が低下した。また、マイクロアレイ解析の結果から *arsR1* 欠損変異株では多くの type III secretion system (T3SS) 関連遺伝子の発現が半分以下に抑えられていた。これらの結果から、ArsR はべん毛運動と T3SS 関連遺伝子の発現に関わる病原力制御因子であると考えられた。

(2) 病原力関連転写因子の DNA 結合能の解析

Vfr

Vfr-FLAG 菌から ChIP 法により単離した DNA 断片は次世代シーケンサーにより DNA 配列を解読する。その後、既知のゲノム DNA 配列と比較するため、ゲノム配列が既読の *P. syringae* 菌の解析が望まれる。本解析では *P. syringae* pv. *syringae* B728a の *vfr* 遺伝子に FLAG コード配列を連結させ、抗 FLAG 抗体を用いて Vfr が特異的に結合する DNA 断片を分析した。なお、コントロールには野生型 B728a 株に抗 FLAG 抗体を処理した。シーケンシング解析の結果、*hrpL* の他 20 程度の遺伝子のプロモーターにピークを認めた。

PsyR

P. syringae pv. *syringae* B728a で *psyR* 遺伝子の 3' 端に FLAG のコード配列を付加させた菌株では AHL 合成能を失ったことから、

PsyR-FLAG タンパク質は菌体密度感知機構の転写因子として機能しないと推定された。そこで、PsyR の分析では、*P. syringae* pv. *syringae* B728a での分析を断念し、これまでに Δ *psyl* 変異株のマイクロアレイ解析を含む表現型解析がなされている *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 (*Pta6605*) で実施することとした。そこで、大腸菌を用いて組換え PsyR タンパク質を調製し、PsyR が転写制御を行うと考えられている AHL 合成酵素遺伝子 *psyl* と *hrpL* 遺伝子のプロモーターに対し、大腸菌で発現させた PsyR の組換えタンパク質を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、PsyR は *psyl* プロモーターの 153 bp と *hrpL* プロモーターの 126 bp と結合することが示された。さらに上述のプロモーターを合成 DNA で 60 bp に分割した DNA 断片にも結合することが認められた。また、これらの結合は AHL の添加により阻害された。以上のことより、本菌の PsyR は *psyl*, *hrpL* に対しリプレッサーとして機能し、PsyR は AHL 存在下で転写抑制活性を失うと考えられた。

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 5 件)

Taguchi, F., Inoue, Y., Suzuki, T., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Yoshiteru, N., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2015) Characterization of quorum sensing-controlled transcriptional regulator MarR and Rieske (2Fe-2S) cluster-containing protein (Orf5) that are involved in resistance to environmental stresses in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. 査読有 *Mol. Plant Pathol.* 16 (4) 376-387. DOI: 10.1111/mpp.12187.

一瀬勇規・田口富美子・向原隆文 (2014) *Pseudomonas syringae* の病原性と病原力因子. 査読有 日本植物病理学会報 80 (Special Issue) 1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.3186/jjphytopath.80.S97>

Taguchi, F. and Ichinose, Y. (2013) Virulence factor regulator (Vfr) controls virulence-associated phenotypes in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 by a quorum sensing-independent mechanism. 査読有 *Mol. Plant Pathol.* 14 (3) 279-292. DOI: 10.1111/mpp.12003

Ichinose, Y., Taguchi, F., Mukaiharu, T. (2013) Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. 査読有 *Journal of General Plant Pathology* 79 (5) 285-296. DOI: 10.1007/s10327-013-0452-8

Kawakita, Y., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2012) Characterization of each *aefR* and *mexT* mutant in *Pseudomonas syringae* pv.

tabaci 6605. 査読有 *Mol. Genet. Genomics* 287: 473-484. DOI: 10.1007/s00438-012-0693-9

〔学会発表〕(計 12 件)

高田基弘・田口富美子・山本幹博・能年義輝・豊田和弘・稲垣善茂・一瀬勇規, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 の菌体密度感知機構転写制御因子 PsyR による *psyl* 並びに *hrpL* の転写制御. 平成 27 年度日本植物病理学会大会 東京 2015. 3. 29-31.

石賀康博・一瀬勇規・澤田貴博, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 の酸化ストレス応答性転写因子 OxyR は本菌の病原性に貢献する. 平成 27 年度日本植物病理学会大会 東京 2015. 3. 29-31.

Yuki Ichinose and Fumiko Taguchi, Characterization of transcriptional regulator MarR and Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* involved in virulence and resistance to environmental stresses. 3rd Korea-Japan joint Symposium, Pusan, Korea, 2014. 10. 23-24.

澤田貴博・田口富美子・山本幹博・稲垣善茂・能年義輝・豊田和弘・一瀬勇規, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* における病原力制御因子 ArsR1 の機能解析. 平成 26 年度日本植物病理学会関西支部会 富山, 2014. 9. 27-28.

一瀬勇規・田口富美子, <招待講演> *Pseudomonas syringae* の病原性関連遺伝子の発現制御ネットワーク. 平成 26 年度植物感染生理談話会 仙台 2014. 8. 6-8.

Yuki ICHINOSE, Fumiko TAGUCHI, Characterization of transcriptional regulator MarR and Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* involved in virulence and resistance to environmental stresses. IS-MPMI 2014 XVI International Congress, Rhodes, Greece, 2014. 7. 6-10.

Yuki ICHINOSE, Fumiko TAGUCHI, Regulation of motility-mediated virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. The 13th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria (ICPPB), Shanghai China, 2014. 6. 8-13.

小倉敬右・田口富美子・山本幹博・能年義輝・豊田和弘・稲垣善茂・一瀬勇規, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a の病害力制御因子 Vfr の標的遺伝子のクロマチン免疫沈降法による探索. 平成 25 年度日本植物病理学会大会 札幌 2014. 6. 2-4.

田口富美子・井上優子・山本幹博・稲垣善茂・豊田和弘・白石友紀・一瀬勇規, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* における

ストレス応答に關与する転写制御因子 MarR の機能解析. 平成 25 年日本植物病理学会関西支部会 岡山, 2013. 9. 26-27.

一瀬勇規・田口富美子, *Pseudomonas syringae* の病原性と環境応答. 第 86 回日本細菌学会総会 千葉 2013. 3. 18-20.

田口富美子・一瀬勇規, *Pseudomonas syringae* の Vfr による病原性制御は、菌体密度感知機構に依存しない. 第 86 回日本細菌学会総会 千葉 2013. 3. 18-20.

井上優子・田口富美子・一瀬勇規, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* の多剤耐性制御因子 MarR の機能解析. 第 86 回日本細菌学会総会 千葉 2013. 3. 18-20.

〔図書〕(計 0 件)

該当無し

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬勇規 (ICHINOSE YUKI)

岡山大学・大学院環境生命科学研究所・教授
研究者番号: 50213004

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し