

植物病原細菌 *Pantoea ananatis* の病原性因子の探索と発病抑制ファージΦ2の遺伝子構造解析

UEDA, Kenji / 植田, 健史

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

59

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2018-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00021633>

植物病原細菌 *Pantoea ananatis* の病原性因子の探索と 発病抑制ファージΦ2の遺伝子構造解析

THE EXPLORATION OF A VIRULENCE FACTOR OF *PANTOEA ANANATIS* AND THE ANALYSIS OF
GENETIC STRUCTURE OF BACTERIOPHAGE PHI2 THAT SUPPRESSES THE PATHOGENESIS.

植田健史

Kenji UEDA

指導教員 大島研郎

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Pantoea ananatis is a Gram-negative bacterium that causes severe disease in economically important agricultural crops such as rice and onion. Although several virulence factors of *P. ananatis* have been reported, the details of its molecular mechanism have not been clarified yet. The aim of this study is to elucidate the virulence mechanism by the exploration of an unknown virulence factors of *P. ananatis*. As a result, we found that the gene for colanic acid biosynthesis was involved in the virulence of *P. ananatis*. Moreover, we analyzed the genetic structure of bacteriophage phi2 that suppresses the pathogenesis of bacterial palea browning of rice caused by *P. ananatis*. As a result, the bacteriophage phi2 was presumed to belong to the family *Myoviridae* in the order *Caudovirales*. This is the first report of the bacteriophage of *Myoviridae* that specifically infects *P. ananatis*.

Key Words : *Pantoea ananatis*, virulence factors, bacteriophage

1. 緒言

Pantoea ananatis(*P. ananatis*)はグラム陰性細菌の一種で、イネやタマネギなど経済的に重要な作物に感染して病気を引き起こす分離株が知られている。*P. ananatis*による被害が各地で報告されているにもかかわらず、その病原性に関する詳細な報告は少ない。また、植物病原細菌の病原性因子として一般的に知られている2, 3, 4型分泌機構を*P. ananatis*は持たないため、その病原性メカニズムに興味を持たれている。そこで本研究では、*P. ananatis*の病原性因子を探索し、そのメカニズム解明に向けた新たな知見を得ることを目的とした。

一方、*P. ananatis*によるイネ内穎褐変病をバクテリオファージ(ファージ)によって発病抑制できることが、ポッド及び圃場試験で実証されている[1]。しかし、そのファージの形状、遺伝子構造などは明らかになっていない。本研究では、防除利用に向けたファージの詳細解明を目的としてゲノム構造の解析を行った。

2. 実験方法

(1) *P. ananatis*の病原性因子の探索

本実験では3つの菌株を使用した。1つは、イネから分

離されたAZ200124株(MAFF番号106629)、もう1つは同じくイネから分離されたNR53株(MAFF番号301720)で、この2つは病原性を有する。残る1つはNR97株(MAFF番号301722)で、こちらは同様にイネから分離されたが病原性を有さない。本実験では病原性因子の探索のため、AZ200124株とNR53株にEz-Tn5トランスポゾンを導入し変異株を作出後、タマネギ切片に接種してNR97株接種時と同様な症状となる弱毒株を選抜した。得られた弱毒株に対して、Universal Genome Walker Kit(Takara Bio)を用いてトランスポゾン挿入位置を特定した。また上記の3菌株のゲノムを次世代シーケンサーMiseq(Illumina)を用いてシーケンスし、その解析結果をトランスポゾン挿入位置特定等に使用した。

(2) *P. ananatis*に感染するファージの解析

ススキの穂から分離されたファージAZ200457株(以下Φ2)を用いて形態観察、及び遺伝子構造解析を行った。ファージの形状をネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡で観察した。また、抽出したファージのDNAを次世代シーケンサーMiseqを用いてシーケンスを行い、得られたリードをCLC Genomics Workbench上でアセンブルして全塩基配列を決定した。その配列に対して微生物ゲノ

ムアノテーションツール MiGAP によるアノテーションを行った。得られた解析データと他のファージの塩基配列を比較し、ファージΦ2株の分類を明らかにした。

3. 結果および考察

(1) *P. ananatis* の病原性因子の探索

約 900 の変異株を用いたスクリーニングの結果、5 つの弱毒株を選抜した。トランスポゾンの挿入位置を特定したところ、4 つの遺伝子がノックアウトされていた (図 1)。このうちの 3 つは PASVIL[2] と呼ばれる特異的の病原性決定領域に存在する、*pepM*、*yxeK*、*leuC* 遺伝子であった。*pepM* は phosphoenolpyruvate mutase をコードしておりリン酸の転移に関わる。*pepM* は一部の抗生物質産生に必須とされ、*P. ananatis* においても自身に有利となるような物質の産生に関わっていると考えられる。*yxeK* は monooxygenase をコードしており水酸化、生理活性物質の代謝などに関与する。また、*YxeK* は外膜タンパクとして物質の分泌に関与することが報告されている。そのため、*yxeK* がノックアウトされたことにより病原性に関わるような物質を分泌できず、弱毒化した可能性も考えられる。*leuC* はロイシン生合成に関与する遺伝子である。しかし、ゲノム中の他の位置にロイシン生合成に関する完全な生合成遺伝子群が存在すること等から、ロイシン生合成とは別の、病原性に関連する機能を持つ可能性が考えられている [2]。残りのノックアウト遺伝子は NAD-dependent epimerase をコードする遺伝子 *rfbB* であり、ヌクレオチド糖の代謝に関与すると考えられる。blast による相同性解析の結果、*rfbB* は *wcaG* 遺伝子と高い相同性が認められた。*WcaG* は GDP-L-フコースシンターゼとして働き、コラン酸生合成に関与している [3]。大腸菌において、コラン酸は植物体上でのコロニー形成に重要であるとされている [4]。また、グラム陰性植物病原細菌 *Pectobacterium* では *wcaG* が植物に対する病原性に関与することが報告されている [5]。そして、*rfbB* 変異株に対して *rfbB* 相補株を作出し、タマネギ切片に接種したところ病原性の回復が認められた (図 2)。これらのことから、*P. ananatis* においても *rfbB* が病原性に関与している可能性が考えられる。今後は、*rfbB* 変異株と野生株の菌体外多糖を抽出・分析し、変異株と野生株間の菌体外多糖の違いを比較することで、より詳細な病原性のメカニズムを解明していきたい。

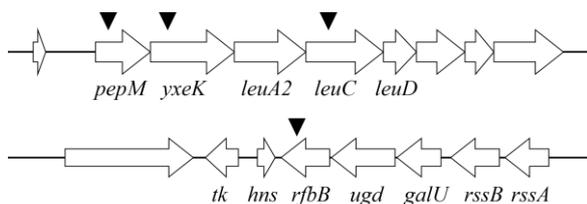


図 1 *P. ananatis* 弱毒株のトランスポゾン挿入位置



図 2 *rfbB* 変異株の相補試験結果. 左から野生株 (NR53), 変異株 (NR53 Δ *rfbB*), 相補株 (NR53 Δ *rfbB* + *rfbB*) .

(2) ファージΦ2株の詳細説明

透過型電子顕微鏡観察の結果、Φ2 は大きく細長い頭部と尾構造を持つことが確認された (図 2)。これは phage T4 と類似した形状であるため、Φ2 は *Caudovirus* 目 *Myovirus* 科に属することが示唆された。また、遺伝子構造解析の結果、全長 176,635 bp、GC 含量平均 49.3%、推定 ORF 数 161、tRNA を 5 種コードしていることが判明した (図 3)。Terminase 遺伝子のアミノ酸配列を用いた系統解析の結果、T4-like headful のファージとクラスターを形成したため、T4-like viruses と呼ばれるグループに属することが示唆された。T4-like viruses は 39 のコア遺伝子を持つが [6]、Φ2 はこれらのうち 38 個のコア遺伝子と相同性の高い遺伝子をコードしていた。Φ2 がコードしていなかったコア遺伝子 Gp37 は長い尾繊維の先端部を形成し、ファージ-細菌間の相互作用に重要な遺伝子であることが知られている。そのため、Φ2 ではファージ-*P. ananatis* 間の相互作用に関わる遺伝子が他に存在すると考えられる。Φ2 は *P. ananatis* に特異的に感染するファージとしては初めての報告であり、併せて考えると、Φ2 が既知の T4-like viruses とは異なる宿主認識機構を有している可能性が示唆された。

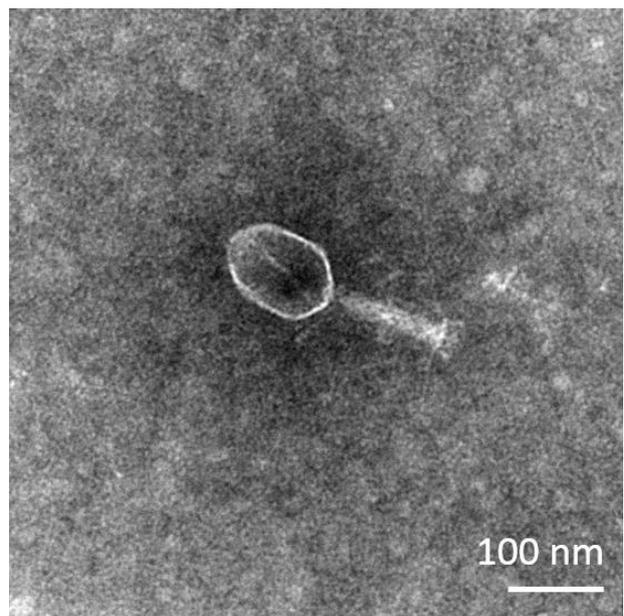


図 3 Φ2 の TEM 像

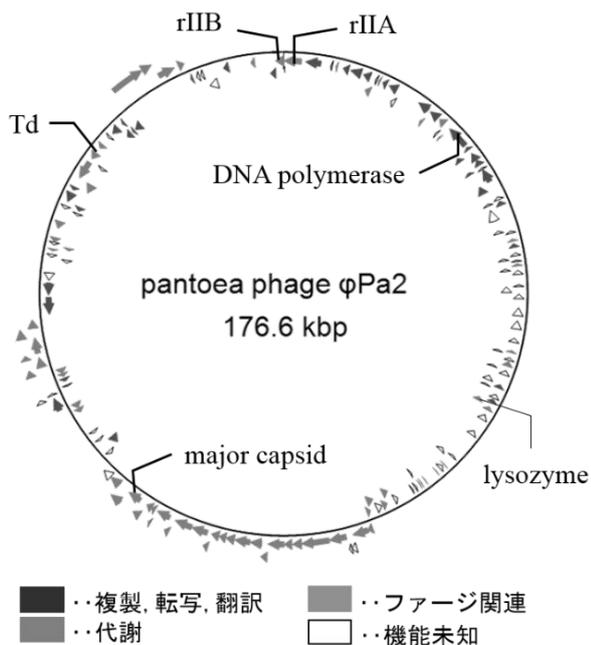


図4 φ2の遺伝子地図

謝辞: 本研究を行うにあたり、菌株の提供及びご助言頂いた元 農研機構 野菜茶研の畔上耕児様、並びに法政大学 植物医科学専修の皆さまに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Azegami, K. : Suppressive effect of bacteriophage on bacterial palea browning of rice caused by *Pantoea ananatis*, Journal of General Plant Pathology, Vol.79, pp.145-154, 2013
- 2) 瀧川雄一: 植物病原細菌 *Pantoea ananatis* の病原性決定因子について, 植物感染生理談話会論文集, Vol.50, pp.1-10, 2015
- 3) Stevenson, G. et al. : Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid, Journal of Bacteriology, vol.178, pp.4885-4893, 1996
- 4) Ranjit, D. K. and Young, K. D. : Colanic Acid intermediates prevent de novo shape recovery of *Escherichia coli* spheroplasts, calling into question biological roles previously attributed to colanic acid, Journal of Bacteriology, vol.198, pp.1230-1240, 2016
- 5) Islam, R. : NAD-dependent epimerase/dehydratase affects cell surface properties, virulence and extracellular enzyme production in the soft rot phytopathogen, *Pectobacterium carotovorum*, ProQuest Dissertations and Theses, 2016
- 6) Petrov, V. M. et al. : Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution, Virology Journal, vol.7, article 292, 2010