

植物生育促進性根圏細菌Pseudomonas chlororaphisの抗菌活性に関わる遺伝子の探索

蒲谷, 浩乃 / Kabaya, Hirono

(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/10.15002/00021634>

植物生育促進性根圏細菌 *Pseudomonas chlororaphis* の抗菌活性に関わる遺伝子の探索

SEARCH FOR GENES INVOLVED IN ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT GROWTH PROMOTING
RHIZOBACTERIUM *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*

蒲谷浩乃

Hirono Kabaya

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植物医科学領域修士課程

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are the rhizosphere bacteria that can suppress the growth of phytopathogenic fungi and promote plant growth. *Pseudomonas chlororaphis* is one of PGPR, and has been reported to suppress *Pythium* root rot disease. In this study, we screened *Pseudomonas chlororaphis* mutants whose antifungal activity was decreased. By the identification of the mutation site of these mutant strains, we found that *typA* and *tex* genes were involved in the antifungal activity. In addition, we got a mutant strain that showed an increased swarming activity, and found that *lon1* gene was involved in this activity.

Key Words : PGPR, antifungal activity

1. 緒言

根圏に生育する細菌の中には植物の生育を促進するものがあり、それらのことを植物生育促進性根圏細菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)、略して PGPR と呼ぶ。PGPR は拮抗作用により病原体・有害微生物の生育を抑制するとともに、植物ホルモンの抵抗性を誘導する。

Pseudomonas chlororaphis (以下 *Psc*) は PGPR の一つであり、*Pythium* 等による作物の病害を軽減する効果が知られている。*Psc* はクロロラフィンなどの抗菌性物質を産生して菌類の生育を抑制するが、抗菌性物質の生合成を制御する分子メカニズムの詳細は不明である。

本研究では、*Psc* の抗菌作用誘導プロセスに関わる遺伝子を明らかにし、*Psc* の生物的防除への応用に向けた知見を得ることを目的とした。

2. 実験方法

(1) 培養条件

a) 液体培養・平板培養

Psc は 37°C、LB 平板培地上で 7 日間培養した。また、37°C、LB 液体培地で 4 日間培養した。蛍光色素の観察の際には KingB 培地を用いて培養した。

b) 対峙培養

対峙菌として *Sclerotium rolfsii* (白絹病菌) および *Pythium* .sp *Brrpy02* (根腐れ病菌) を用いた。LB 平板培地の両端に本菌と対峙菌をそれぞれ接種し、25°C で培養

し、7 日間観察を行った。

c) シロイヌナズナとの培養

9 cm シャーレ上で上部から 2 cm の箇所に播種 7 日後のシロイヌナズナの苗を置き、そこからさらに 5 cm 下に本菌を接種した。23°C、MS 平板培地上で 8 日間程度観察した。接種から 4 日後、8 日後に根の生育を計測した。

(2) 変異株の作出・スクリーニング

カナマイシン耐性遺伝子含有トランスポゾン(Tn5)をエレクトロポレーションで *Psc* 野生株に導入し、遺伝子変異株を作出した。作出した各遺伝子変異株を *Sclerotium rolfsii* と対峙培養し、抗菌活性による阻止円に差異がある株をスクリーニングした。抗菌活性は、阻止円の形成率から判断した。各阻止円の形成率は ImageJ を用いて培地全体面積と阻止円の面積を測定し、その比率から計算した。

$$\text{阻止円形成率(\%)} = \frac{\text{阻止円面積}}{\text{全体面積}} \times 100 \quad (1)$$

(3) 変異遺伝子の特定

スクリーニングで選抜した変異株におけるトランスポゾン挿入位置を Universal Genome Walker を用いて解析した。

3. 結果及び考察

(1) 阻止円形成能が低下した変異株

トランスポゾンを導入した 387 個の変異株について対峙培養試験を行ったところ、2 個の阻止円形性能低下株が得られた (A4 株、および B31 株)。続いて、各変異株の阻止円を計測し、阻止円形成率 (%) を求めた (図 1)。

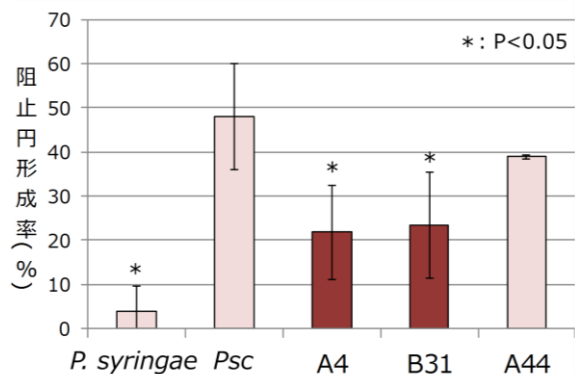


図 1 全体面積のうち阻止円の占める割合 (%)
P. syringae: 非拮抗細菌 *Pseudomonas syringae*
Psc: *Pseudomonas chlororaphis* 野生株
 A4: 抗菌活性の低い変異株
 B31: 抗菌活性の低い変異株
 A44: 同時に得られた抗菌活性に変化のない変異株

その結果、A4 株および B31 株は野生株と比較して有意に阻止円形成率が低いことがわかった。同属菌であり抗菌活性を持たない *Pseudomonas syringae* と比較すると抗菌活性はまったく無くなったわけではないことがわかる。また、同時に得られた抗菌活性に変化を示さない A44 変異株と比較しても有意な差が認められた。

a) A4 変異株

A4 株におけるトランスポゾン挿入部位を特定した。その結果、Transcription accessory protein 遺伝子 (*tex*) の内部に Tn5 が挿入されていた。(図 2)。

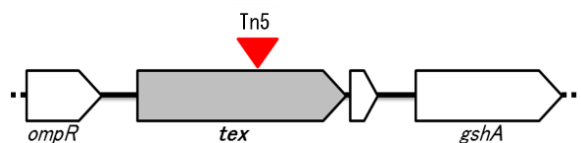


図 2 A4 変異株の Tn5 挿入部位周辺遺伝子構造

tex は *Bordetella pertussis* において RNA ポリメラーゼ RpoA の働きを補助する役割を果たす。これより、A4 変異株においても何らかの転写に関わる作用が正常に働かなくなった可能性が考えられた。

b) B31 変異株

B31 変異株におけるトランスポゾン挿入部位を特定した。その結果、GTP-binding protein 遺伝子 (*typA*) の内部に Tn5 が挿入されていた (図 3)。

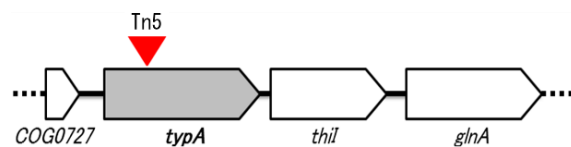


図 3 B31 変異株の Tn5 挿入部位周辺遺伝子構造

typA は *Pseudomonas aeruginosa* において抗菌ペプチドの産生に関わる遺伝子であり、*Psc* の阻止円形性能にも抗菌ペプチド等の産生が関与する可能性が考えられた。

(2) Swarming 変異株

阻止円形成能に差はないが、通常のコロニーを形成せずに培地全体に広がるように生育する 3196 変異株を得た。図 4a において右側の 3196 株は、同時に得られた他の 3195、3197、3198 株と比べて異なる生育をしていることがわかる。

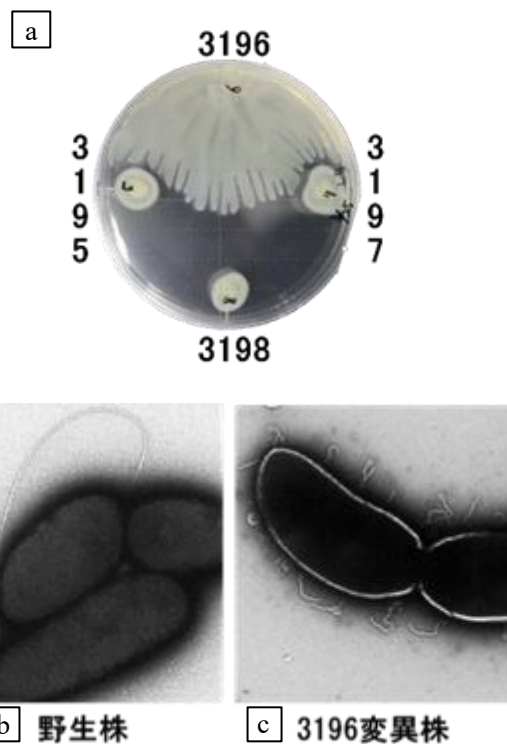


図 4 3196 変異株の性状

- a: 平板培地における各変異株の生育の様子
- b: *Psc* 野生株の電子顕微鏡写真
- c: 3196 株の電子顕微鏡写真

この動きは swarming と呼ばれる細菌の運動に類似しており興味もたれたため、調査を行った。3196 株は平板培地上で特徴的な増殖をするため、増殖速度あるいは運動能が関与しているのではないかと考え、まず液体培地中における増殖速度を測定・比較した。その結果、野生株と 3196 株では増殖速度に差異は見られなかった。そこで運動能が変化している可能性があると考え、電子顕微鏡を用いて鞭毛の観察を行った (図 4b,c)。その結果、

3196株では野生株と比較して菌体周囲の鞭毛数が増加していた一方、長さは短くなっていた。

3196株のトランスポゾン挿入部位を特定したところ、プロテアーゼ遺伝子 *lon1* の内部にトランスポゾンが挿入されていることがわかった (図5)。

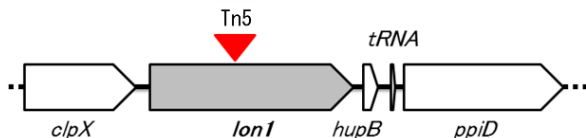


図5 3196変異株のTn5挿入部位周辺遺伝子構造

Proteus mirabilis の研究において *lon* 遺伝子を破壊するとフラジェリンや鞭毛の遺伝子発現が活性化し、swarming 能が上昇することが知られている(1)。3196株のswarming 能にもフラジェリンや鞭毛の発現上昇が関与する可能性が考えられた。これは電子顕微鏡での観察結果と一致する。3196株は鞭毛の発現が上昇し、菌体周囲の鞭毛が増加し、運動能にも差異が現れたと考えられる。

(3) 植物生育促進効果

シロイヌナズナを用いて *Psc* による植物生育促進効果を調査した。その結果、*Psc* はシロイヌナズナの側根の生育を促進することがわかった。続けて、生育促進作用が細菌の産生する揮発性物質と関連があるか調査した。①菌体と植物体を区切る、②シャーレに植物を置き蓋に菌体を置く、の2種類の試験を行った結果、いずれの方法でも側根の生育促進が認められた (図6)。これらの結果から、*Psc* が産生する何らかの揮発性物質が側根の生育を促進する可能性が示唆された。

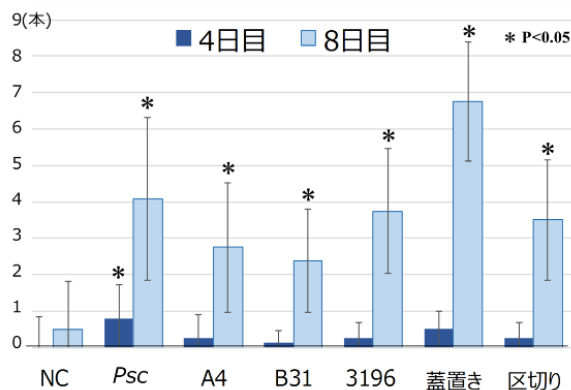


図6 *Psc* によるシロイヌナズナ側根の増加数

蓋置き：シャーレに植物を置き蓋に菌体を置いた。
区切り：菌体と植物体を区切った。

また、上記3種の変異株を用いて生育促進効果試験を行った。その結果、いずれの変異株においても生育促進効果に大きな差異は認められなかった。*Psc* の植物生育促進作用は抗菌作用や運動能とは独立した経路によって機能している可能性が考えられた。

謝辞：本研究の遂行に当たり、様々なご指導を頂きました畔上耕児先生(元農研機構 野菜茶研)、石川成寿先生(法政大学)、協力して頂いた皆様へ心から御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Clemmer, K. *et al.*: The Lon protease regulates swarming motility and virulence gene expression in *Proteus mirabilis*. *J. Microbiol.*, 57: 931-937, 2008.
- 2) Bhattacharyya, P. N. & Jha, D. K.: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 1327-1350, 2012.