

トウカエデ首垂細菌病Erwinia sp. Ta27株の ドラフトゲノム解析およびプラスミドpETa1 に関する研究

安井, 理美 / YASUI, Satomi

(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/10.15002/00021638>

トウカエデ首垂細菌病菌 *Erwinia* sp. Ta27 株の ドラフトゲノム解析およびプラスミド pETa1 に関する研究

STUDY ON GENE STRUCTURE OF PLASMID PETA1 FROM ERWINIA SP. TA27,
THE CAUSATIVE AGENT OF BACTERIAL SHOOT DROOPING DISEASE OF ACER BUERGERIANUM.

安井理美

Satomi YASUI

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博士前期課程

Erwinia sp. Ta27 is the causal agent of bacterial shoot drooping disease of *Acer buergerianum*. Draft genome analysis of Ta27 by next generation sequencing revealed that the genome showed 60~80% identity with other *Erwinia* species. Sequence comparison of a 46 kbp plasmid called pETa1 revealed that pETa1 is the most similar to pEB170 from *E. billingiae*. To estimate a pathogenicity of the plasmid, we constructed Ta27 (Δ pETa1) mutant strain whose pETa1 was removed by plasmid curing. Ta27 (Δ pETa1) indicated a decreased pathogenicity to *Acer buergerianum* compared with Ta27, suggesting that pETa1 is involved in the pathogenicity.

Key Words : plasmid, *Erwinia*

1. 緒言

トウカエデ (*Acer buergerianum*) は中国東南部原産のカエデ科の落葉高木である。樹形や葉色の変化が美しい、公害に比較的強い等の理由から、各県の主要道路や公園に、緑化樹として植栽された[1]。

トウカエデ首垂細菌病菌 (*Erwinia* sp.) は、トウカエデに水浸状の病斑や褐変、新梢の湾曲、落葉、枯死などを引き起こす病原細菌である。発生生態や感染機構には不明な点が多く、防除法も確立されていない。これまでの研究により、東京都西東京市のトウカエデから単離された *Erwinia* sp. Ta27 株 (以下、Ta27 株と省略) は、全長 46 kbp のプラスミド pETa1 を保持することが明らかにされている (救仁郷, 2015)。本研究では、首垂細菌病の防除に向けて、Ta27 株のドラフトゲノムを解析するとともに、pETa1 と病原性との関連性を調べた。

2. 方法

(1) Ta27 株のゲノム、プラスミドのシーケンス

次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて Ta27 株のゲノム DNA をシーケンスし、得られたリードを CLC Genomics Workbench (CLC bio) でアセンブルした。近縁の *Erwinia* 属細菌のゲノム上の遺伝子と相同な遺伝子が

Ta27 株のドラフトゲノム上に存在するかどうかを、tblastn を用いて解析した。近縁の *Erwinia* 属細菌として、*E. amylovora* CFBP1430, *E. amylovora* ATCC49946, *Erwinia* sp. Ejp617, *E. billingiae* Eb661, *E. pyrifoliae* Ep1/96, *E. tasmaniensis* Et1/99 を使用した。また、これらの近縁種が持つプラスミドと pETa1 を解析ソフト *mauve* で比較した。

(2) pETa1 キュアリング株の作製と接種試験

pETa1 と病原性との関連性を評価するため、プラスミドの不和合性を利用して pETa1 を持たない Ta27 株 (pUErep1) (以下、キュアリング株) を作出した。また、ルシフェラーゼ遺伝子群を持つプラスミド pAKGlux2 を作成し、Ta27 株とキュアリング株に導入することで、Ta27 株 (pAKGlux2) (以下、Ta27 発光株) と Ta27 株 (pUErep1, pAKGlux2) (以下、キュアリング発光株) を作出した。Ta27 発光株およびキュアリング発光株をトウカエデへ接種し、病徴を観察するとともに LAS-4000 (GE ヘルスケア) を用いて発光イメージを取得し、細菌の局在を調べた。

3. 結果

次世代シーケンスで得られた約 750 万リードを、既にゲノム解読されている *E. amylovora* ATCC49946 株のゲノムにマッピングしたところ、約 52% のリードがマッピング

された。近縁の *Erwinia* 属細菌が持つ遺伝子と相同な遺伝子がコードされるかを調べた結果、*E. amylovora* や *E. tasmaniensis* とは 79% のオーソログを共有していた。一方、約 20~30% の遺伝子については Ta27 株のドラフトゲノム上には認められず、Ta27 株ゲノムの遺伝子構成が他の *Erwinia* 属細菌のものとは異なることが明らかとなった (図 1)。

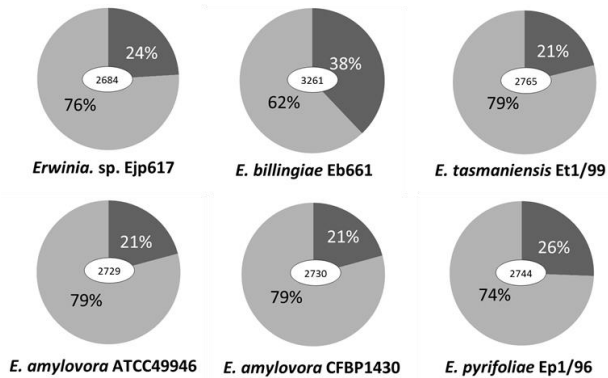


図 1 Ta27 株のゲノムと近縁種ゲノムのオーソログ遺伝子の割合。円中央の数字は各近縁種のゲノムにコードされている全遺伝子数。■: オーソログの割合。■: 非オーソログの割合。

近縁種とのプラスミド比較解析の結果、*E. amylovora* と *E. pyrifoliae* のプラスミド同士は全体的に相同性が高いことが示された。また、pETa1 の複製起点周辺の配列は、植物内生菌である *E. billingiae* のプラスミド pEB170[2] の複製起点周辺の領域と相同性が高かった (図 2)。

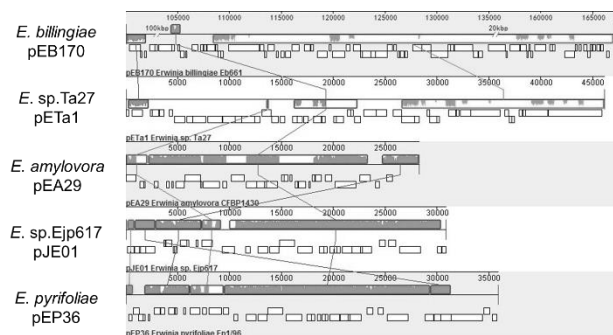


図 2 他の *Erwinia* 属菌が持つプラスミドと pETa1 の比較解析

pETa1 上の遺伝子を調べた結果、近縁の *Erwinia* 属細菌ではプラスミドではなくゲノム上にのみコードされる遺伝子 (*leuD*, *leuC*, *tolC* など) が pETa1 上に存在することが示唆された。また、近縁種のゲノムやプラスミドには存在しない、Ta27 株特異的な遺伝子が集まる領域も認められた (図 3)。

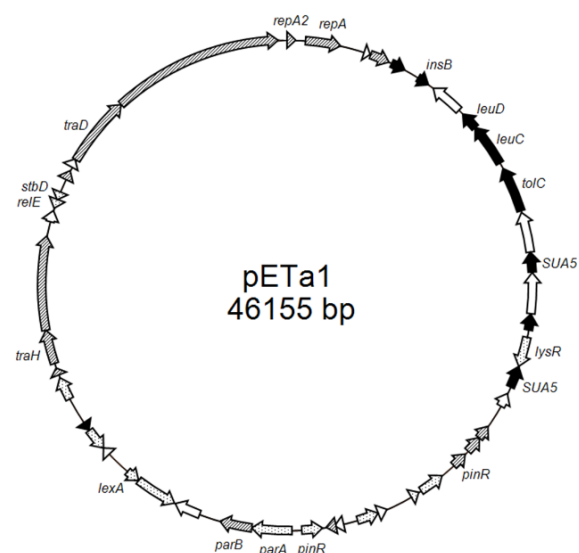


図 3 pETa1 の遺伝子マップ。各遺伝子のオーソログが近縁の *Erwinia* 属細菌のゲノムやプラスミドに存在するかどうかにより色分けした。■: 近縁種のゲノム上にオーソログが存在する。▨: 近縁種のプラスミド上にオーソログが存在する。▤: 近縁種のゲノム、プラスミドの双方にオーソログが存在する。□: 近縁種にオーソログが存在しない。

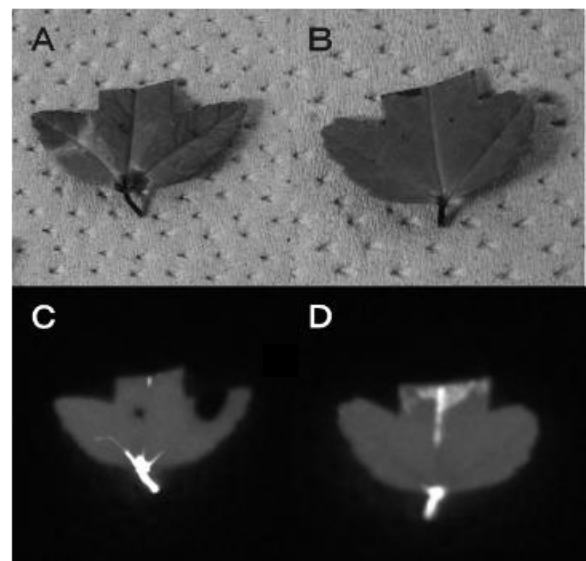


図 4 ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Ta27 株の接種 2 週間後の病徴 (A, B) と、LAS-4000 で観察した細菌の局在 (C, D)。A: Ta27 発光株感染トウカエデの病徴。B: Ta27 キュアリング発光株感染トウカエデの病徴。C: Ta27 発光株感染トウカエデの発光イメージ。D: Ta27 キュアリング発光株感染トウカエデの発光イメージ。

トウカエデへの接種試験の結果、Ta27 発光株と Ta27 キュアリング発光株を比較すると、細菌の侵入の程度に差はなかったが、病徴の程度には有意差が見られた。

Ta27 発光株の方が Ta27 キュアリング発光株に比べて病原性が強い傾向が観察された (図 4, 表 1).

表 1 Ta27 株を接種したトウカエデ葉の観察結果

接種に用いた細菌株	細菌が侵入した葉の数	病徴が出た葉の数
	接種葉の数 (14dpi)	接種葉の数 (30dpi)
Ta27発光株 (pETa1有り)	$\frac{16}{26}$	$\frac{10^*}{30}$
Ta27キュアリング発光株 (pETa1無し)	$\frac{12}{26}$	$\frac{2^*}{30}$

* 二群の比率の差の検定 $p < 0.1$

4. 考察

プラスミド解析の結果, pETa1 は *E. amylovora* や *E. pyrifoliae* のプラスミドよりも, *E. billingiae* の pEB170 に系統が近いと考えられた.

pETa1 を失ったキュアリング株では, 病原性が低下していたことから, pETa1 上にコードされる遺伝子が首垂細菌病菌の病原性に関わることが示唆された.

また, pETa1 には, Ta27 株特異的な遺伝子が集まる領域が存在していたことから, この領域にトウカエデへの感染に必要な遺伝子がコードされている可能性が考えられた.

謝辞: 本研究を行うにあたり, 元法政大学 植物医科学専修 救仁郷 圭祐氏, そして協力していただいた皆様に, 心より感謝を申し上げます.

参考文献

- 1) 堀江 博道・菅田 重雄 (1987): 東京都におけるトウカエデ首垂細菌病の発生状況と防除, 森林貿易, VOL.36, No.12, 213-217.
- 2) Kube, M. *et al.* (2010): Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*, BMC Genomics, 11, 393.