

### 野菜類軟腐症状を引き起こすPectobacterium 属細菌の病原性因子に関する研究

TAKAMATSU, Yukina / 高松, 由希菜

---

(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)

60

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2019-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022113>

# 野菜類軟腐症状を引き起こす *Pectobacterium* 属細菌の 病原性因子に関する研究

IDENTIFICATION OF THE VIRULENCE FACTORS OF *PECTOBACTERIUM* SP.  
CAUSING BACTERIAL SOFT ROT.

高松 由希菜

Yukina TAKAMATSU

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

*Pectobacterium* sp. causes the bacterial soft rot diseases in a wide range of plant species. In this study, random gene-knockout with transposon was conducted to explore genes involved in pathogenicity. As a result, I found 38 mutant strains of which pathogenicity was decreased. The determination of mutated genes revealed that 10 genes such as glycosyltransferase, RNA-binding protein *hfq* and Tol-Pal system are necessary for complete virulence.

**Key Word** : *Pectobacterium* sp., bacterial soft rot, glycosyltransferase, *hfq*, Tol-Pal system

## 1. 緒言

*Pectobacterium* 属細菌は植物に軟腐症状を引き起こす多犯性の病原細菌である。夏期の高湿多湿環境で発病が助長されるほか、貯蔵病害としても問題となる。本細菌の病原性に関わる因子として、細胞壁分解酵素やクオラムセンシング機構などが知られている。しかし、本細菌の病原性メカニズムは非常に複雑であり、その構成因子には不明なものも多く存在する。本研究では、*Pectobacterium* 属細菌の病原性因子を同定し、軟腐病防除に向けた新たな知見を得ることを目的とする。

## 2. 方法

### (1) 材料

野生株として、下記の3株を用いた。

- *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* MAFF212028
- *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* MAFF730290
- *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* サクラソウ分離株 PR1

### (2) 変異株の作出

野生株のコンピテントセルに、Ez-Tn5 トランスポゾン (Epicentre 製) をエレクトロポレーション法で導入し、無作為に遺伝子に変異した株を多数作出した。

### (3) 弱毒株のスクリーニング

各変異株をハクサイに接種し、野生株に比べ病原性が有意に低下した株(弱毒株)をスクリーニングした。

### (4) swarming 能の調査

細菌の運動性(swarming)を調査するため、0.3 % Agar 含有のLB培地で細菌を培養しコロニーの広がりを観察した。

### (5) 変異遺伝子の特定

Universal Genome Walker Kit (TaKaRa Bio 製) を用いて、各弱毒株のトランスポゾン挿入位置を特定した。

### (6) 相補株の作製

弱毒株において変異していた遺伝子の元の遺伝子(相補遺伝子)を PCR によって野生株の DNA から増幅した。Mighty Cloning Reagent Set (TaKaRa Bio 製) を用いてプラスミドに相補遺伝子を挿入し、弱毒株のコンピテントセルに導入した。プラスミドの保持を確認した株を相補株とした。各相補株をハクサイに接種し病原性の強さを調査した。

## 3. 結果および考察

### (1) 弱毒株の変異遺伝子の特定

トランスポゾン挿入によって作製した約 5000 株の変異株の中から、スクリーニングによって 38 株の弱毒株を得た。それぞれの変異株におけるトランスポゾン挿入位置を

特定したところ表1, および図1の結果が得られた.

## (2) 相補株の性状

変異株に正常な遺伝子を導入した相補株の病原性を調査したところ, 表1の結果が得られた. 相補株の病原性が野生株と同程度まで回復した遺伝子について, その遺伝子が病原性発現に直接関与していることが示唆された. 一方, 病原性の回復が見られなかった相補株では, トランスポゾン挿入位置より下流の遺伝子の発現に影響が出ている可能性や, 変異した遺伝子が相補遺伝子の働きを阻害している可能性などが考えられる.

表1. 弱毒株の性状, および相補株の病原性

変異株	トランスポゾン挿入遺伝子	swarming	相補株の病原性
MAFF212028由来			
proK2-44	glycosyltransferase	-	+
proK2-328		-	+
proK2-516		-	+
proK2-845		-	+
proK2-888		-	+
proK2-1863		-	+
proK2-806	FlhP	-	-
proK2-975	FlgI	-	-
proK2-1176	FlhD	-	+
proK2-1278	FlhM	-	-
proK2-1339	FlgB	-	-
proK2-1377	FlhR	-	+
proK2-1398	FlhB	-	+
proK2-168	transcriptional regulator	+	-
proK2-447	RNA-binding protein Hfq	+	+
proK2-484	3-isopropylmalate dehydrogenase	-	-
proK2-526	translocation protein TolB	+	+
proK2-562	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	+	-
proK2-725	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	-	NA
proK2-756	phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase	+	-
proK2-1068	multidrug transporter	+	-
proK2-1075	hypothetical protein	+	+
proK2-1274	dTDP-4-dehydroxymannose reductase	-	-
proK2-1305	upper stream of ornithine carbamoyltransferase	+	+
proK2-1316	ketol-acid reductoisomerase	+	+
proK2-1628	ornithine carbamoyltransferase	+	-
proK2-1843	chemotaxis protein CheA	-	-
MAFF730290由来			
51236	acylhomoserine lactone synthetase LasI	+	NA
61005	two-component system / histidine kinase	+	NA
61041	upper stream of UDP-N-acetyl-mannosamine dehydrogenase	+	NA
61048	protein disulfide isomerase	+	NA
61052	Type II secretion system subunit F	+	NA
61079	hypothetical protein	+	NA
61086	ADP-L-glycerol-D-mannoheptose-6-epimerase	+	NA
0825 Kan37	transcriptional regulator SlyA	+	NA
0825 Kan54	flagellar biosynthesis protein FlhD	-	NA
サクランウ分離株PR1由来			
174	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	+	+
186	carbamoyl phosphate synthase CarB	+	+

swarming 能: 有(+), 無(-).

相補株の病原性: 正常な遺伝子の相補によって病原性が上昇した株(+), 上昇しなかった株(-), 未相補株(NA).

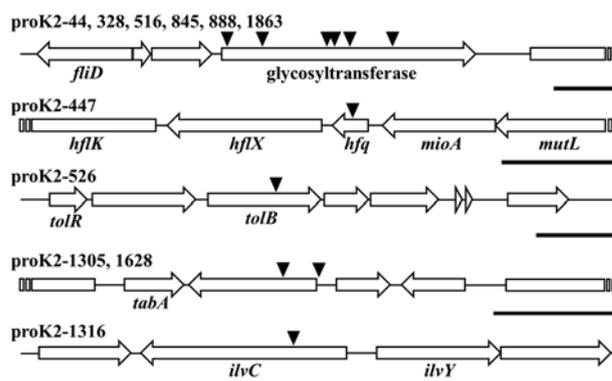


図1. トランスポゾン周辺の遺伝子地図  
矢頭(▼)はトランスポゾン挿入位置を示す.  
遺伝子地図におけるバーは1 kbpを示す.

### (a) glycosyltransferase 変異株

proK2-44, 328, 516, 845, 888, 1863 では glycosyltransferase の遺伝子に変異が挿入されていた(図1). glycosyltransferase はタンパク質の糖鎖修飾を触媒する酵素であり, *Pseudomonas* 属細菌では鞭毛の糖鎖修飾に関与している (Takeuchi *et al.*, 2003). そこでこれらの変異株の運動性を調べたところ, いずれの変異株も正常な swarming 能を失っており, また野生株に比べ鞭毛の本数, および長さが低下していた(図2, 図3). 一方, 相補株では病原性, swarming 能共に野生株と同程度に回復した. 以上の結果から, *Pectobacterium* 属細菌の glycosyltransferase は鞭毛形成および運動性に関与することが示唆された.

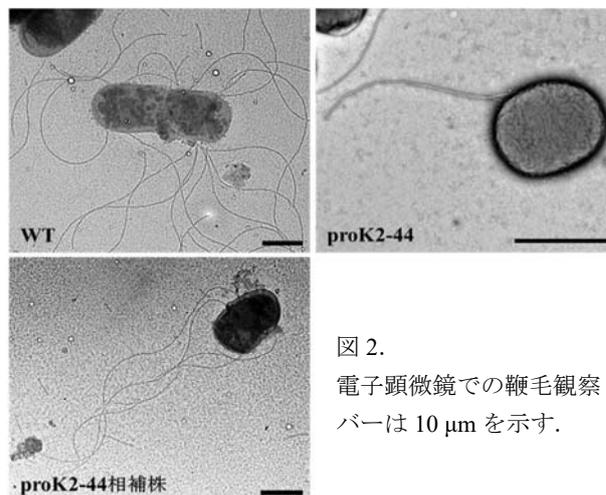


図2.  
電子顕微鏡での鞭毛観察  
バーは10 μmを示す.

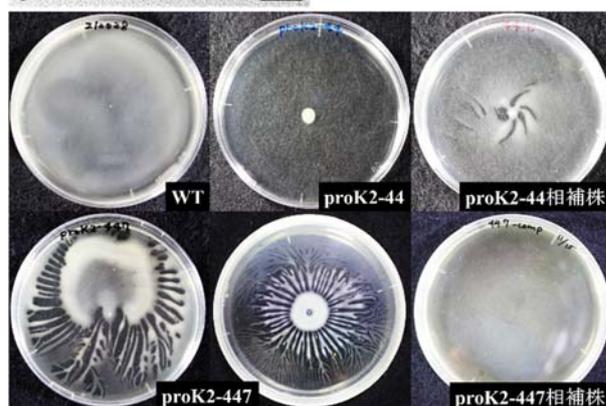


図3. swarming 能の観察

## 参考文献

- 1) Takeuchi, K. *et al.* (2003) : Journal of Bacteriology, Vol. 185
- 2) Wang *et al.* (2018) : Molecular Plant-Microbe, Vol. 31
- 3) Dubuisson, J-F *et al.* (2005) : Microbiology, Vol. 151

### (b) proK2-447

本弱毒株では RNA 結合タンパク質 Hfq の遺伝子に変異が挿入されていた(図 1)。Hfq は *Pectobacterium* 属細菌の病原性を制御するツーコンポーネントシステムやクオラムセンシング、および運動能に関与する FlhDC の上流の制御因子である(Wang *et al.*, 2018)。本弱毒株はユニークな swarming 様式を示し、相補株では野生株と同様の swarming 様式に回復した(図 3)。本株の病原性の低下が運動能の変異によるものか、Hfq 下流の病原性制御機構が影響しているのかについては今後調査が必要である。

### (c) proK2-526

本弱毒株では Tol-Pal system の構成因子 TolB の遺伝子に変異が挿入されていた(図 1)。Tol-Pal system は外膜の形状を正常に保つ機能を持つ。植物病原細菌 *Dickeya dadantii* において、Tol-Pal system が変異すると細胞外酵素の分泌量が減少することが知られており(Dubuisson *et al.*, 2005)、本弱毒株でも膜上で機能する分泌装置が正常に働かず、病原性が低下した可能性が考えられる。

### (d) proK2-1305

本弱毒株では ornithine carbamoyltransferase の遺伝子に変異が挿入されていた(図 1)。これは尿素生成系の酵素をコードする遺伝子の一つである。

### (e) proK2-1316

本弱毒株では ketol-acid reductoisomerase の遺伝子に変異が挿入されていた(図 1)。これはバリン、ロイシン、イソロイシンの生合成酵素をコードする遺伝子の一つである。

## 4. まとめ

本研究により、*Pectobacterium* 属細菌の病原性発現には glycosyltransferase による鞭毛の糖鎖修飾、RNA 結合タンパク質 Hfq、および Tol-Pal system 等が関与することが示唆された(図 4)。

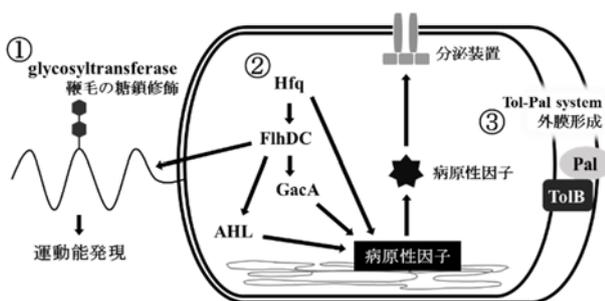


図 4. glycosyltransferase, Hfq, Tol-Pal system の機能模式図  
①:proK2-44 etc., ②:proK2-447, ③:proK2-526 の変異箇所  
AHL :アシルホモセリンラクトン(クオラムセンシング)  
GacA :応答制御因子 (ツーコンポーネントシステム)

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご援助いただいた元 農業茶研 畔上耕児様、並びに法政大学 植物医科学専修の皆様 に厚く御礼申し上げます。