

野菜類軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* の TolB, および CdiI の機能解析

ISOBE, Yuta / 磯邊, 優太

(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. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

63

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2022-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00025424>

野菜類軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* の TolB, および CdiI の機能解析

FUNCTIONAL ANALYSIS OF TOLB AND CDII OF PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM SUBSP. ODORIFERUM, A CAUSATIVE AGENT OF BACTERIAL SOFT ROT

磯邊優太

Yuta ISOBE

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 carotovorum subsp. *odoriferum* (*Pco*) causes the bacterial soft rot diseases in a wide range of plant species. Our previous study has shown that TolB and CdiI are involved in the virulence of *Pco*, but their role in the virulence remains unknown. In this study, we conducted the functional analysis of TolB and CdiI. As a result, we showed that TolB contributes to stability of outer membrane, motility, drug resistance and secretion of plant cell wall-degrading enzymes. Furthermore, our results revealed that immune protein CdiI protects bacteria from the self-toxicity of CdiA. Finally, we demonstrated that CDI system is regulated by signal transduction mediated by cAMP and quorum sensing.

Key Words : *Pectobacterium carotovorum*, bacterial soft rot, *tolB*, *cdiI*

1. 緒言

Pectobacterium carotovorum subsp. *odoriferum* (以下 *Pco*) 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。*Pco* の病原性には TolB, および CdiI が関与することが以前の研究から示唆されている[1]。大腸菌の研究から, TolB は Tol-Pal システムの構成因子であり, 細胞外膜の安定性に必要であることが知られている[2]。また, CdiI は接触依存性増殖阻害システム (CDI システム) の構成因子であり, 毒素タンパク質 CdiA から自身を守る免疫タンパク質として機能することが知られている[3]。しかし, *Pco* の TolB, および CdiI が同様の機能を有するかどうかは不明であった。本研究では, *Pco* の TolB, および CdiI の機能を解析し, 病原性との関わりを調査した。

2. 手法

(1) 病原性試験

野生株, 変異株, および相補株をハクサイ切片に接種し, 病徴面積を比較した。

(2) 細胞形態の観察

野生株, 変異株, および相補株を 1% PTA 染色液で染色し, 透過型電子顕微鏡で観察した。細胞の長径, および短径の長さを比較した。

(3) 運動能の調査

0.3%寒天を含む半固体 LB 培地で野生株, 変異株, および相補株を培養し, コロニーの広がりを観察した。

(4) 薬剤感受性の調査

薬剤を添加した LB 培地で野生株, 変異株, および相補株を培養し, 生育不能になる薬剤濃度 (最小発育阻止濃度, 以下 MIC) を比較した。

(5) 細胞壁分解酵素活性の定量

基質を添加した培地に各株の培養上清を滴下した。培養後, 基質が分解された範囲を比較した。

(6) 回復株の作製

cdiI 変異株のコンピテントセルを作製し, エレクトロポレーション法によってトランスポゾン (Ez-Tn5 <DHFR-1>) を導入した。ハクサイに対する病原性が回復した二重変異株を選抜した。Universal Genome Walker Kit (TaKaRa) を使用して, 二重変異株のトランスポゾン挿入位置を特定した。

(7) 増殖能の調査

各株を LB 培地で振とう培養した。1 時間ごとに濁度 (OD600) を測定した。

(8) 発現量の解析

LB 培地で培養した菌体, および各株を接種したハクサイから RNA を抽出した。各サンプルにおける *cdiA* の発現量を翻訳伸長因子遺伝子 EF-Tu を内部標準とした定量 PCR によって測定した。

3. 結果および考察

(1) 病原性試験

tolB 変異株, および *cdiI* 変異株による病徴面積は野生株よりも減少した. また, 各々の相補株による病徴面積は野生株と同程度に回復した (data not shown).

(2) 細胞形態の観察

tolB 変異株の長径, および短径の長さは野生株よりも短くなり, *tolB* 相補株の短径の長さは野生株と同程度に回復した (図 1a, b). これらの結果から, TolB が正常な細胞形態の維持に必要であることが示唆された.

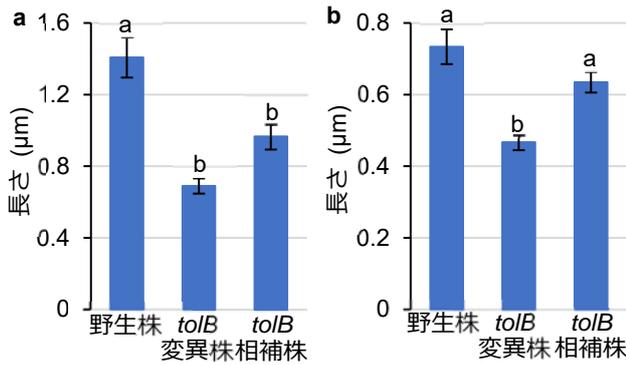


図1 細胞形態の比較. a 細胞の長径の長さ. b 細胞の短径の長さ. 異なるアルファベットは有意差を示す (Tukey 検定, $p < 0.05$, $n = 20$).

(3) 運動能の調査

tolB 変異株の運動能は野生株よりも低下し, *tolB* 相補株の運動能は野生株と同程度に回復した (図 2). これらの結果から, TolB が運動能に必要であることが示唆された.

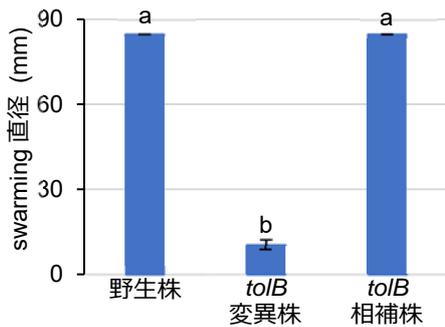


図2 運動能の比較. 異なるアルファベットは有意差を示す (Tukey 検定, $p < 0.05$, $n = 3$).

(4) 薬剤感受性の調査

tolB 変異株の SDS, およびノボビオシンに対する MIC は野生株よりも低下し, *tolB* 相補株の SDS, およびノボビオシンに対する MIC は回復した (表 1). これらの結果から, TolB が薬剤耐性に必要であることが示唆された.

表1 各株の最小発育阻止濃度

薬剤	最小発育阻止濃度 (μg/ml)		
	野生株	<i>tolB</i> 変異株	<i>tolB</i> 相補株
SDS	>50000	6250	>50000
ノボビオシン	400	200	400
バルベリン	>2000	>2000	>2000

*太字は薬剤耐性が低下した試験区を示す.

(5) 細胞壁分解酵素活性の定量

tolB 変異株のペクチン酸リアーゼ, ポリガラクトツロナーゼ, セルラーゼ, およびプロテアーゼの活性は野生株よりも低下した (図 3). これらの結果から, TolB が細胞壁分解酵素の働きに必要であることが示唆された.

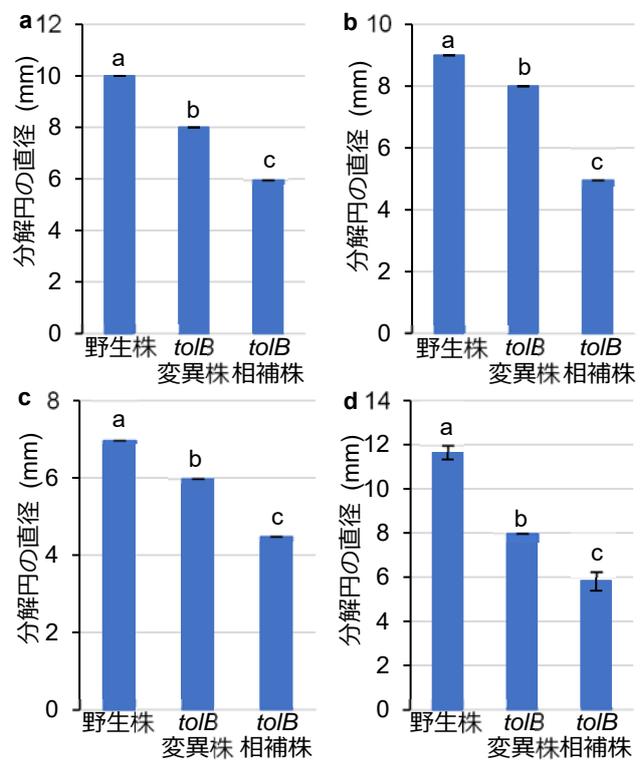


図3 細胞壁分解酵素活性の定量. a ペクチン酸リアーゼの活性. b ポリガラクトツロナーゼの活性. c セルラーゼの活性. d プロテアーゼの活性. 異なるアルファベットは有意差を示す (Tukey 検定, $p < 0.05$, $n = 3$).

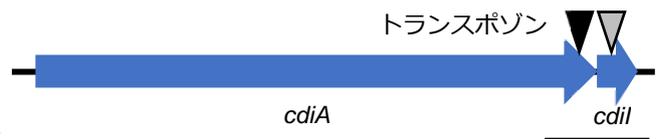


図4 二重変異株のゲノムにおけるトランスポゾン挿入位置. 三角形はトランスポゾン挿入位置を示す. スケールバーは 1 kbp を示す.

(6) 回復株の作製

cdiI 変異株の病原性が回復した二重変異株が得られた。二重変異株では *cdiI* に加えて、毒素タンパク質をコードする *cdiA* 遺伝子の内部にトランスポゾンが挿入されていた (図 4)。

(7) 増殖能の調査

LB 培地での *cdiI* 変異株の増殖速度は野生株よりも低下し、相補株の増殖速度は *cdiI* 変異株よりも向上した。また、*cdiA/cdiI* 変異株の増殖速度は *cdiI* 変異株よりも向上した (data not shown)。これらの結果から、*cdiI* 変異株の病原性の低下は、CdiA による自己毒性によって引き起こされる可能性が考えられた。

(8) 細胞形態の観察

LB 培地上での *cdiA* の発現量は対数増殖期と比較して定常期に増加した (図 5a)。また、ハクサイ上における *cdiA* の発現量は、培地における定常期と比較して増加した (図 5a)。近縁種の *D. dadantii* では *cdi* 遺伝子が植物体上でのみ働くことが報告されており [4]、*Pco* の *cdi* 遺伝子は *D. dadantii* と異なる制御系を持つ可能性が考えられた。また、*cyaA* 変異株、および *luxR* 変異株の *cdiA* の発現量は野生株と比較して増加した (図 5b)。これらの結果から、*cdiA* の発現は *CyaA*、および *LuxR* によって抑制されることが示唆され、クオラムセンシングを介して *cdi* システムが制御される可能性が考えられた (図 6)。

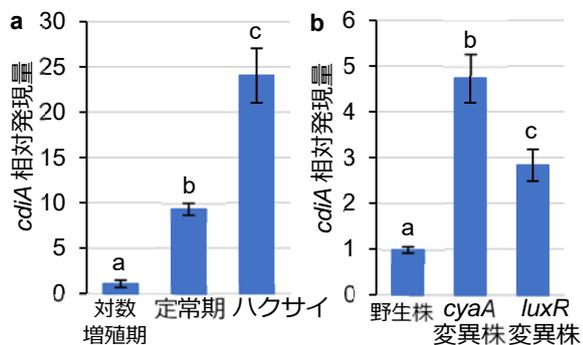


図 5 *cdiA* の発現量の解析. a: 培地, およびハクサイにおける *cdiA* の発現量. b: 変異株の *cdiA* の発現量. 異なるアルファベットは有意差を示す (Tukey 検定, $p < 0.05$, $n = 3$).

4. まとめ

本研究により、*Pco* の TolB は細胞形態の維持、運動能、薬剤耐性、および細胞壁分解酵素の働きに必要であることが示唆され、これらの要因が病原性に必要である可能性が考えられた。また、*Pco* の CdiI は毒素タンパク質 CdiA から自身を守る免疫タンパク質として機能し、*cdiI* 変異株では自己毒性によって病原性が低下した可能性が考えられた。さらに、*Pco* の *cdi* 遺伝子はクオラムセンシングによって制御される可能性が考えられた (図 6)。

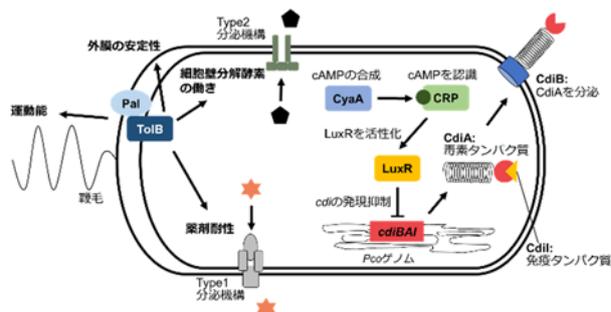


図 6 *Pco* の TolB, および CdiI の役割

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご援助いただいた法政大学 濱本宏先生、並びに法政大学大 応用植物科学科の皆様には厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 高松由希菜：野菜類軟腐症状を引き起こす *Pectobacterium* 属細菌の病原因子に関する研究, 法政大学大学院紀要 理工学・工学研究科編, Vol.60, pp.1-3, 2019
- Lazzaroni, J. C. et al.: The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability, *FEMS Microbiology Letters*, Vol.177, pp.191-197, 1999
- Aoki, S. K. et al.: Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*, *Science*, Vol.309, pp.1245-1248, 2005
- Aoki, S. K. et al.: A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria, *Nature*, Vol.468, pp.439-442, 2010