

# トウカエデ首垂細菌病菌(*Erwinia* sp. Ta27) のプラスミドpETa1の機能解析

TAKAHASHI, Tomoya / 高橋, 智哉

---

(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/10.15002/00025426>

# トウカエデ首垂細菌病菌(*Erwinia* sp. Ta27)の プラスミド pETa1 の機能解析

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PLASMID PETA1 FROM  
ERWINIA SP. TA27, A CAUSAL AGENT OF SHOOT DROOPING DISEASE

高橋智哉

Tomoya TAKAHASHI

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

*Erwinia* sp. Ta27 is a causal agent of bacterial shoot drooping disease of *Acer buergerianum*. Ta27 has the plasmid called pETa1. To estimate the role of the plasmid, Ta27\_cur strain was created by removing pETa1. Ta27\_cur strain showed reduced proliferation during plant infection. In addition, drug resistance was decreased in Ta27\_cur strain compared to wild-type strain. This may be due to the effect of TolC and MFS transporter encoded in pETa1. Moreover, the expression of these transporters was upregulated during plant infection. These results suggest that pETa1 may play a role in protecting Ta27 from antimicrobial agents during plant infection.

**Key Words** : plasmid, *Erwinia*

## 1. 緒言

トウカエデ首垂細菌病菌(*Erwinia* sp.) はトウカエデ (*Acer buergerianum*) に水浸状の病斑や褐変, 新梢の湾曲, 枯死などを引き起こす病原細菌である[1]. 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.

東京都西東京市のトウカエデから分離された *Erwinia* sp. Ta27(以下, Ta27 と省略) は約 46 kbp のプラスミド pETa1 を持つ. 次世代シーケンサーによる解析の結果, pETa1 にはトランスポーターとして知られる *tolC*, MFS トランスポーター (以下, *mfs* と記述), *tolC* の排出システムのコンポーネントとして知られる *hlyD* がコードされることが分かっている(救仁郷, 2015)(図 1).

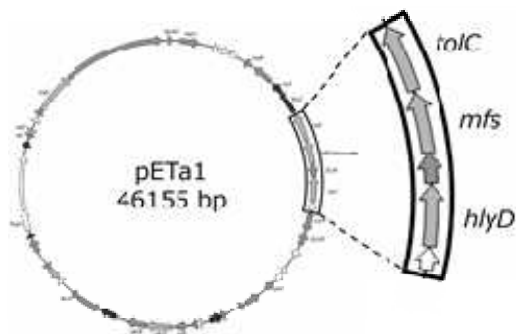


図 1. pETa1 の遺伝子地図. 黒枠は相補用プラスミド pRUltra に導入した領域を示す.

同じ *Erwinia* 属細菌である *E. amylovora* ではプラスミドが病原性に関わることが分かっているが, pETa1 が Ta27 に与える影響は不明であった. 本研究では首垂細菌病の防除に向けて, pETa1 が Ta27 の性状に及ぼす影響を調べることを目的とした.

## 2. 手法

### (1) pETa1 のキョアリング

pETa1 の有無による Ta27 の性状の変化を評価するため, プラスミドの不和合性を利用して pETa1 を持たない Ta27 (以下, Ta27\_cur と省略) を作出した.

### (2) 発光株の作出

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 と Ta27\_cur それぞれの株へ導入することで, Ta27 (pAKGlux2) と Ta27\_cur (pAKGlux2) を作出した.

### (3) トウカエデ葉への接種

Ta27 (pAKGlux2) および Ta27\_cur (pAKGlux2) をトウカエデ葉へ接種し, 3 日おきに ImageQuant LAS 4000 (Cytiva) を用いて発光イメージを取得し, 細菌の局在を調べた.

### (4) 植物感染時における生菌数の測定

Ta27 および Ta27\_cur をトウカエデ葉に接種した. 接種 5 日後と 9 日後に再分離を行い, 培地上に生じたコロニーから植物感染時における生菌数を測定した.

### (5) 相補株の作出

pETa1 にコードされる *tolC*, *mfs*, および *tolC~hlyD* の領域を相補するプラスミド pUEtoIC, pRUmfs, pRUtra を作成した。それらのプラスミドを Ta27 に導入し、相補株 Ta27 (pUEtoIC), Ta27 (pRUmfs), Ta27 (pRUtra) を作出した。

### (6) 薬剤耐性試験

96 穴プレートに試験する抗生物質を添加した LB 培地を分注し、そこへ菌液を加えることで各株の抗生物質への MIC (最小発育濃度) を決定した。

### (7) 遺伝子発現量の測定

LB 培地中で対数増殖期、定常期に達した Ta27 およびトウカエデ感染時の Ta27 から RNA を抽出、cDNA を逆転写し、各遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR で遺伝子の発現量を測定した。

## 3. 結果

接種試験の結果、葉脈に沿って Ta27 (pAKGlux2), Ta27\_cur (pAKGlux2) が局在する様子が観察された (図 2)。

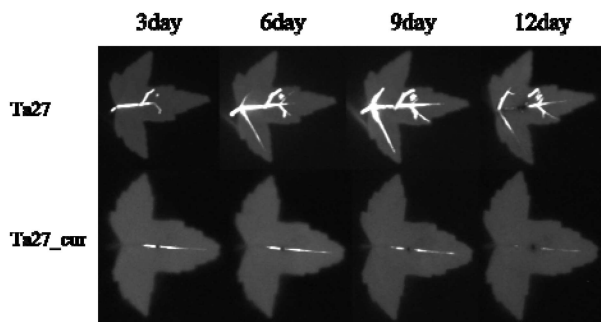


図 2. 接種葉における生物発光の様子

一般に *Erwinia* 属細菌は道管で増殖する傾向があり、*E. amylovora* は道管を侵すことが分かっている。本研究において Ta27 も同様の性質を持つことが示唆された。また、これらの株間で感染率に差は見られなかった。

次に植物感染時の CFU を測定した結果、接種 5 日後、9 日後のいずれも Ta27\_cur の生菌数が Ta27 と比較して有意に減少していることが明らかとなった (図 3)。

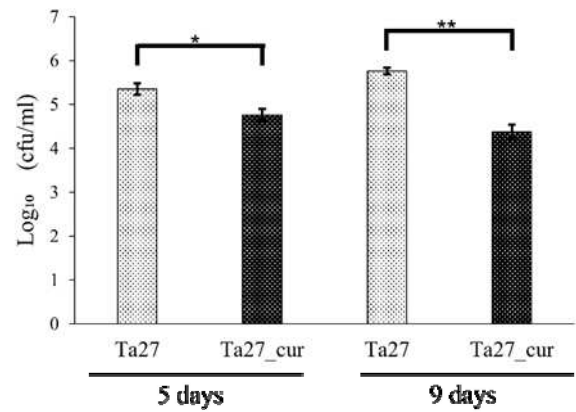


図 3. 植物感染時における生菌数の比較。縦軸は log<sub>10</sub> を示す。\* : P<0.05 \*\* : P<0.005

このことから pETa1 が植物感染時における Ta27 の増殖を促進することが示唆された。

続いて、Ta27, Ta27\_cur, 相補株を用いて薬剤耐性試験を行った (表 1)。

表 1 各株の MIC。太字は薬剤耐性の回復が見られた試験区を示す。

Antibiotics	MIC(μg/ml)				
	Ta27	Ta27_cur	Ta27 (pUEtoIC)	Ta27_cur (pRUmfs)	Ta27_cur (pRUtra)
Kanamycin	6.25	3.12	3.12	3.12	<b>6.25</b>
Spectinomycin	6.25	3.12	3.12	3.12	3.12
Streptomycin	3.12	1.56	1.56	<b>3.12</b>	<b>3.12</b>
Trimethoprim	1.88	0.94	0.94	0.94	0.94

pETa1 を欠損した Ta27\_cur ではカナマイシン、スペクノマイシン、ストレプトマイシン、トリメトプリムに対する耐性が低下し、これらの薬剤の MIC が Ta27 と比較して 1/2 に減少した。一方で、*tolC* のみを相補した Ta27 (pUEtoIC) の薬剤耐性能は Ta27\_cur と有意な差は見られなかった。また、*mfs* を相補した Ta27\_cur (pRUmfs) ではストレプトマイシンへの耐性が Ta27 と同程度に回復した。加えて *tolC~hlyD* 領域を相補した Ta27\_cur (pRUtra) では、ストレプトマイシン耐性に加えてカナマイシンへの耐性が Ta27 と同程度に回復した。これらの結果から pETa1 にコードされるトランスポーターは Ta27 にとって有害な物質を排出することが示唆された。

トランスポーター (*tolC*, および *mfs*) が植物感染時に発現しているかをリアルタイム PCR で調べた。その結果、定常期、および植物感染時における *tolC*, *mfs* の発現量は対数増殖期と比較して有意に増加した (図 4)。

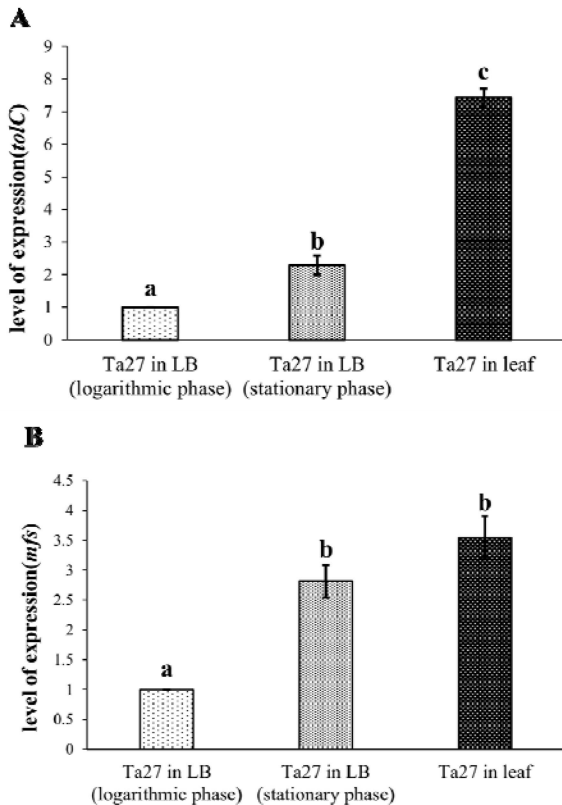


図4. 遺伝子発現量の比較

A : *tolC* 発現量 B : *mfs* 発現量 定常期での発現量を基準とし, log<sub>2</sub> 比で示した. アルファベットは Tukey 検定を示す (P<0.05).

これは pETa1 にコードされる *tolC* や *mfs* の遺伝子発現が植物感染時に活性化されることを示唆した。

#### 4. 考察

トウカエデ葉における CFU 測定の結果において, Ta27 が Ta27\_cur より有意に増殖が見られる点について, pETa1 にコードされている *tolC* や *mfs* などのトランスポーターの影響に着目した. 細菌が持つトランスポーターは薬剤や抗菌性物質など細菌にとって有害な物質を菌体外へ排出し, 細菌を保護するという役割を持つ[2]. そのため, pETa1 にコードされるトランスポーターも同様にトウカエデの産生するファイトアレキシンなどの抗菌性物質から Ta27 を保護している可能性が考えられた。

薬剤耐性試験では pETa1 にコードされるトランスポーターが薬剤の排出を行うことが明らかとなり, 上記の仮説を支持した. また, Ta27 (pUEtolC) では耐性の回復が見られなかった. この点について, *tolC* は他の細菌において, 内膜トランスポーターおよび *tolC* と内膜トランスポーターの橋渡しをするタンパク質の 3 つが複合体を形成し働くことが知られている[3]. そのため, 単体では機能しないことが考えられた. 加えて, *tolC* ならびに *hlyD*, *mfs* を相補した Ta27\_cur (pRUltra) では薬剤耐性の回復に加え, 排出可能な薬剤が増加した. このことから, *tolC* は *hlyD* や *mfs* と協働して働く可能性が考えられた。

本研究において pETa1 を持つことで, 植物感染時における増殖能が向上することが明らかとなった. さらに pETa1 にコードされるトランスポーターが Ta27 の薬剤耐性の向上に寄与することや異物の排出を行うことが示唆された. また, それらのトランスポーターは植物感染時に発現が促進されることが判明した. 以上のことから, pETa1 はその役割の 1 つとして植物感染時に植物の産生する抗菌性物質から Ta27 を保護することで, その増殖を補助することが考えられた。

#### 5. 謝辞

本研究を行うにあたり, 菌株を分譲していただいた法政大学生命科学部応用植物科学科 濱本 宏先生、元法政大学植物医科学専修 救仁郷 圭祐氏、安井 理美氏、前田 典之氏、ご援助を賜りました植物医科学専修の皆様へ厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 堀江 博道・菅田 重雄: 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, pp. 213-217, 1987
- 2) Richard A. Dixon: Natural products and plant disease resistance, Nature, Vol. 411, pp. 843-847, 2001
- 3) Vassilis, K. et al.: Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export, Nature, Vol. 405, pp. 914-919, 2001