

平成 27 年度 研究経過報告書

研究者名

山口 公志

研究課題名

植物病原性細菌を標的とした農薬の開発に向けた新規スクリーニング法の確立

研究目的・内容

病原菌は植物の防御反応を抑制するため、植物の細胞内に侵入すると免疫抑制能を有するタンパク質（エフェクター）を宿主細胞内へと送りこみ、エフェクターが宿主の免疫因子の機能を阻害することにより、感染を拡大する。このような病原性細菌にとって、エフェクタータンパク質を注入するための分泌装置は自身の病原性を発揮するために必須である。本研究では、トマトに感染する *Pseudomonas* 属のトマト斑点細菌病とイネに感染する *Xanthomonas* 属のイネ白葉枯病菌の 2 種類の病原性細菌を実験対象とし、高分子化合物ライブラリーを用いて、「病原性細菌の三型分泌装置の形成を阻害する薬剤」を選抜するための実験系の確立と薬剤スクリーニングを行うことを目的とした。

研究の経過

① 三型分泌装置の遺伝子発現をモニターできる病原性細菌の作出

三型分泌装置を構成するタンパク質をコードする *hrp* 遺伝子群は、栄養源の少ない *hrp* 遺伝子群の発現誘導培地上で、その転写が誘導される。本実験では、この誘導培地で転写誘導がすでに報告されている、トマト斑点細菌の *HrpL* 遺伝子とイネ白葉枯病菌 *HrcU* 遺伝子の各プロモーターを本研究に利用した。それぞれの病原性細菌からゲノムを抽出し、特異的なプライマーを用いて、*HrpL* プロモーター予想領域（243bp）と *HrcU* プロモーター予想領域（651bp）を PCR により単離した。単離した両プロモーター領域を、*GUS* 遺伝子をもつ *pHM1* ベクターに導入することで 両プロモーターと *GUS* を連結した発現ベクターを製作した。エレクトロポレーション法により、これらの発現ベクターを各病原性細菌に形質転換し、本研究に用いる生物材料を準備した。

② 病原性細菌内の *GUS* 発現をモニターする実験系の確立

本研究では、*GUS* 活性を高感度でモニターする実験系が必要とされる。*pHM1-HrcUpro-GUS* を導入したイネ白葉枯病菌を用いて、高感度で活性を検出できる *GUS* 基質の選択とそれに適した検出方法の最適化を行った。実験条件として、*HrcU* の発現を誘導することがすでに報告されている *MME* 培地を *GUS* の発現誘導培地として用いた。また栄養源が豊富な *NBY* 培地での *GUS* 活性の値をネガティブコントロールとし、本実験系を評価した。*GUS* の基質には、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-Gluc)、4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide hydrate (4-MUG)、4-Nitrophenyl β -D-glucuronide (4-NPG) を供試した。X-Gluc を基質に用いて、色素形成の強度で *GUS* 活性を判定した結果、*MME* 培地における顕著な青色の色素形成が誘導された。この結果から、導入したコンストラクト由来の *GUS* 活性を指標に *hrp* 遺伝子群の誘導をモニターできるこ

とが示された。しかし、この方法では GUS 活性を定量的に測定することはできないため、次の実験には GUS 活性を蛍光強度で定量的に測定できる 4-MUG と吸光度で GUS 活性を定量的に測定できる 4-NPG を実験に利用し、MME 培地で誘導される GUS 活性を測定した。4-MUG を反応系に加えた場合、菌数と反応時間に比例した蛍光量の増加が観測された。MME 培地添加時の蛍光量は NBY 培地添加時の蛍光量と比較して有意な差は確認されたが、MME 培地によって誘導される GUS 活性は低かった。そこで基質を 4-NPG を変更し同様な実験を行った結果、MME 培地添加時の GUS 活性は NBY 培地での活性値よりも顕著に高く誘導された。以上の結果から、4-NPG を基質として利用した三型分泌装置の形成誘導を検出する実験系の構築を行うことができた。

本研究と関連した今後の研究計画

今回構築したイネ白葉枯病菌を用いた実験系を、pHM1-HrpLpro-GUS を導入したトマト斑点細菌を用いた実験に応用できるかを検討する。また、MME 培地以外にも hrp 遺伝子誘導培地はすでにいくつか報告されている。今後、より高く GUS 活性を誘導する培地の条件を検討する。さらに、今回構築した実験系は、96 穴プレートを利用することが可能であり、多検体のケミカルを効率よくスクリーニングすることができる。現在、放線菌由来のケミカルライブラリーの利用を検討している段階である。今後、これらのライブラリーを用い、病原性細菌の三型分泌装置の形成を阻害する薬剤のスクリーニングをおこなっていく予定である。

(平成 28 年 3 月 31 日現在)