

## 研究成果報告書

研究分野:新農学生命科学

研究課題:病原細菌の DNA 修復機構と宿主生体防御機構との相互作用

農学研究院生物資源開発管理学部門

生物的防除学講座天敵微生物学分野 飯山和弘

遺伝育種学講座蚕学分野 李 在萬

### 緒言

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、土壌中、水中等の環境中に存在するグラム陰性桿菌である。本菌は脊椎動物、無脊椎動物、植物等の生物種に日和見的に感染することが知られている。われわれはこれまで本菌のカイコ *Bombyx mori* に対する病原力に関する研究を行い、ある種の DNA 修復関連遺伝子が本菌の病原力発揮のために重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。細菌のみならずあらゆる生物には損傷した DNA を修復する複数の機構が存在している。DNA 修復機構の研究は単独で詳細に行われているが、病原微生物において本機構の病原力への関与は、未だ詳細に検討されていない。そこで本研究において、緑膿菌 DNA 修復関連遺伝子変異株を多数作出し、カイコへの病原力に及ぼす影響について検討した。

### 材料と方法

#### 使用した細菌、培地およびプラスミド

緑膿菌 *P. aeruginosa* PAO1 を親株として使用した。また大腸菌 *Escherichia coli* DH5 および S17-1 はそれぞれ遺伝子操作の際の宿主菌およびプラスミド接合伝達の際の供与菌として使用した。これら細菌の増殖には Luria-Bertani (LB) 培地を使用した。また抗生物質は、50 µg/ml アンピシリン (Amp), 50 µg/ml カナマイシン (Km), 5 µg/ml および 200 µg/ml (それぞれ大腸菌および緑膿菌) ゲンタマイシン (Gm) を使用した。さらに pGEM-T Easy (プロメガ), pK18/*mobsacB* (Dr. Mathias Keller より分譲) および pHP45 *aac* (Dr. Marie-Hélène Blondelet-Rouault より分譲) をそれぞれ、クローニングベクター、カウンターセクション用ベクターおよび *aac* カセットの由来源として使用した。

#### 変異株の作出

PAO1 株のゲノム DNA を CTAB 法により抽出した。目的遺伝子の全長あるいは一部を PCR 増幅し、

pGEM-T Easy に TA クローニングした。得られたプラスミドを制限酵素処理あるいはインバース PCR により開裂化し、適当な制限酵素で pHP45 *aac* より切り出した *aac* カセットを挿入した。*aac* 挿入により破壊した目的遺伝子を含む断片をカウンターセクションベクターである pK18*mobsacB* にベクター置換した。得られたプラスミドにより大腸菌 S17-1 株を形質転換した。S17-1 形質転換体を供与菌，PA01 株を受容菌として，二者接合法により，プラスミドを伝達させた。10%スクロースおよび Gm を含む LB 培地で選抜することにより，目的遺伝子の破壊株を得た。

### 接種試験

蚕種(錦秋×鐘和)を上田蚕種から購入し，人工飼料により生育させた。接種試験には4齢2日目のカイコを供試した。接種菌はLB液体培地で終夜培養した後，新鮮なLB培地 3 mlに 3  $\mu$ lの培養液を継代培養した。OD<sub>660</sub> nm (OD<sub>660</sub>)の値が 0.5 になるまで培養した後，滅菌水で希釈し，約 10<sup>5</sup> cells/mlに調整した。この希釈細菌懸濁液 10  $\mu$ lをカイコに注射することにより接種した。接種後，経時的に死亡率を調査した。1変異株あたり，10 頭，3反復行った。

### 増殖試験

各変異株をLB液体培地で終夜培養した後，新鮮なLB培地 3 mlに 3  $\mu$ lの培養液を継代培養した。OD<sub>660</sub>の値が 0.1 になるまで培養した後，さらにLB培地 3 mlに 30  $\mu$ lの培養液を継代培養した。1 時間毎に OD<sub>660</sub>を測定した。なおOD<sub>660</sub>はアドバンテックTVS062CAバイオフォトレコーダーを用い，自動測定した。

## 結果および考察

### DNA 修復関連遺伝子変異株の病原力

PA01 株を親株として，DNA 修復関連遺伝子の変異株 30 株を得た。この内，23 株を接種試験に供試した。その結果，23 変異株中8 変異株(#26, #27, #29, #30, #52, #54, #62, #76)において，病原力が親株と比較して 50%未満に低下していた(図1)。

ある遺伝子の不活化は増殖能の低下を引き起こし，それが原因で病原力の低下を引き起こすことがある。一般に増殖能に関与する遺伝子は，病原性関連遺伝子の範疇には含まれない。そこで，病原力の低下した 8 菌株の増殖能について検討した。その結果，#27, #52 および#54 において，増殖力の低下が認められた(図2)。そのため，これら 3 変異株における病原力の減少は，増殖力の低下が一因である可能性が示唆された。しかし，この増殖力の低下が病原力低下の唯一の原因か否かを詳細に検討する必要がある。また他の 5 菌株に関しては，DNA 修復機構の不全が病原力低下を引き起こした可能性が強く示唆された。今後，宿主-病原体相互作用における当該遺伝子の役割を明らかにする必要がある。

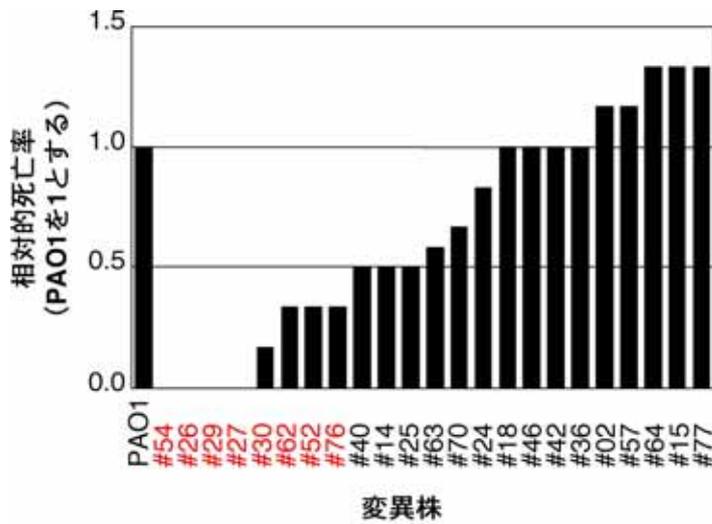


図1 DNA修復関連遺伝子変異株のカイコに対する病原力  
4 齢 2 日目のカイコ（錦秋×鐘和）に変異株 $10^3$  cellsを注入接種  
接種 2 週間後における死亡率をもとに算出

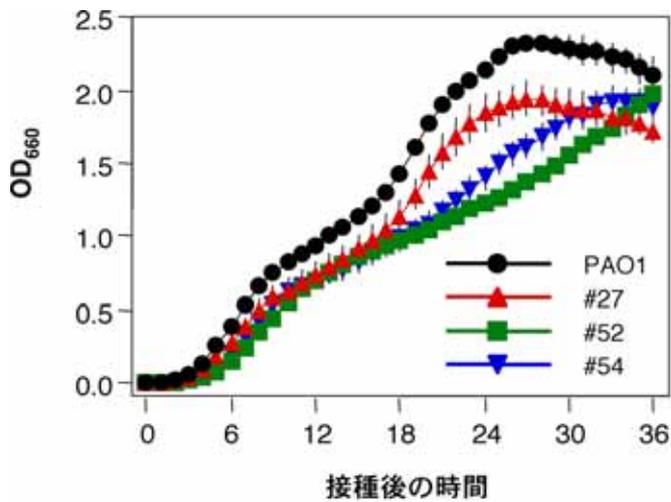


図2 *P. aeruginosa* 変異株のLB培地中での増殖  
親株と比較して増殖力が減少した変異株のみ表示