

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04477

研究課題名(和文) 知られざるジャンボファージの世界：農業へのインパクト

研究課題名(英文) The hidden world of jumbo phages

研究代表者

山田 隆 (Yamada, Takashi)

広島大学・先端物質科学研究科・名誉教授

研究者番号：40230461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌ジャンボファージ4種(RSL2-RSL5)についてゲノム解読、粒子プロテオミクス、遺伝子系統解析、感染特性解析、トマトを用いた感染予防効果実験を行なった。ファージ界において、RSL2・RSL3とRSL4のクラスターはともに緑膿菌ファージphiKZと同クレードを形成することがわかった。RSL1 (RSL5) は最大のファージGに近く、まったく独立した位置づけとなった。4種のファージに共通した特徴は長い感染サイクル(4-6h)であり、宿主菌集団と持続的共存することで病原菌のバイオコントロールにおいて有利となる。実際植物実験で、ファージ処理は何れも長期にわたり高い予防効果を発揮した。

研究成果の概要(英文)：Ralstonia jumbo phages RSL2-RSL4 have been characterized for their genomic, proteomic, phylogenetic, and virological features. Phylogenetically, RSL2, RSL3, and RSL4 are closely related to Pseudomonas jumbo phage phiKZ, whereas RSL5 is similar to RSL1 and related to Bacillus phage G. These 4 phages share a common long-lasting infection cycle with host Ralstonia cells, which gives a huge advantage for them to be utilized as biocontrol agents with sustainable effects on plant diseases (bacterial wilt).

研究分野：微生物工学

キーワード：青枯病 Ralstonia solanacearum ジャンボファージ ゲノム研究 バイオコントロール

1. 研究開始当初の背景

(1) ジャンボファージの発見：次世代シーケンサーの活用、メタゲノムプロジェクトの展開によって環境から新規な微生物、ウイルスが次々と発見されている。2013年には巨大「パンドラウイルス」が発見され (Science 341:281-286) そのゲノム 2.5Mb (マイコプラズマの3倍) と粒子形態、増殖様式は既成のウイルス概念を一変させた。広島大学山田らもバクテリオファージ界の「パンドラウイルス」にも相当するような「ジャンボファージ」をタイ国から発見した。山田らは、化学農薬に代替するバイオコントロール技術として「農作物青枯病(病原菌 *Ralstonia solanacearum*)」バクテリオファージの活用を検討してきた。自然界より多数のファージを分離し高度な特徴付けと実用特性を調べた。2012年より2年間にわたってタイ国チェンマイのトマト農場でのファージ探索を行った結果、予期せず幾つかの大型ファージを発見した。それらは従来の最大青枯病菌ファージ RSL1 (240kbp) の約2倍の大きさ(450kbp)を示した。これら超大型ファージから学術的新知見および新規活用技術が期待される。(2) ジャンボファージの特徴：大型ウイルスを検出する技術が進み(濾過条件、低濃度トップアガーブランクアッセイ等)最近数年、大きなファージが世界各地で報告されるようになった。データベース検索で少なくともゲノムサイズ200kbp以上のものが6種類検出される。*Pseudomonas aeruginosa* ファージ  $\phi$ KZ (280kbp), *Vibriophage* KVP40 (245kbp), *P. aeruginosa* phage EL (211kbp), *Stenotrophomonas maltophilia* Phage  $\phi$ SMA5 (250kbp), *Yersinophage*  $\phi$ R1-37 (270 kbp), *Klebsiella* phage Rak2 (346kbp)。これらの大型ファージは構造上 Myoviridae に属するがゲノム配列、300以上のコード遺伝子には共通性が乏しく系統的關係は不明である。多くの遺伝子はデータベース上に相同配列が無い。ジャンボファージと定義された(Hendrix, R., Curr Topics Microbiol Immunol 328,229-240, 2009) これらファージ：の研究は始まったばかりであり、新規な遺伝子機能、粒子構成、感染機構、宿主相互作用、生態系への影響等々が興味深い。

(3) ジャンボファージの有用性：農業分野ファージ技術は既に米国農務省(USDA)で認可され実用化されており (Agrophage™, Omnilytic), 日本でも早晚植物工場等の必須技術となる。青枯病菌に感染するジャンボファージ RSL1 は病害バイオコントロール剤として一般的なファージに比して特に以下の利点を有する：(i) 広い宿主域(22/22;100%),

(ii) 持続的制菌；実験室培養条件で2週間以上も安定的に青枯病増殖を抑制する、(iii) 高い環境持続性；土壌環境、植物根圏で長期にわたり安定して存在できる、(iv) 高い温度耐性；(v) 高いトマト保護効果：ファージ処理トマトでは、青枯病菌感染 1.5 月後も健全に生長した。フィールド検証実験でも非常に安定した良好な結果が出ている(沖縄県農業研究センター)。このように植物の生長初期段階での RSL1 処理は青枯病予防に極めて効果的であることが判明した。RSL1 の利点の背景には、ジャンボファージならではの長い感染サイクル(4.5h)、宿主菌の増殖に正負に働く様々な遺伝子の共存、特殊な粒子構造(5種のタンパク質からなるカプシド)、感染サイクル中での宿主プロファージ誘導等が考えられる。新たに発見された4種のジャンボファージには、これらに加えてさらにユニークな特徴が期待される。

2. 研究の目的

タイ(チェンマイ)のトマト農場から分離した青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)超巨大(ジャンボ)ファージ4種(RSL2,RSL3,RSL4,RSL5 最大ゲノム 450kbp)について、高度な特徴付け(ゲノミクス、プロテオミクス、Cryo-EM 解析、DNA ミクロアレイ)を行い、それらの感染特性とともに青枯病防除剤としての評価を行う。一般にジャンボファージは宿主域が非常に広く持続的な細菌増殖抑制能力を有する。土壌環境において粒子は高い安定性を示す。その分子基盤をゲノム遺伝情報より得る。また、ごく最近知られ始めた謎の多いジャンボファージ各種(様々な宿主)の起源と進化を理解するため、これら青枯病ファージ情報を仲介としてデータベースのジャンボファージ情報(増加傾向)を解析し「ジャンボファージ」の体系化(新パラダイム)を行う。

3. 研究の方法

初年度に4種の新ジャンボファージゲノム解読を行い(次世代シーケンサーによる)ゲノム遺伝子構成(地図とレパートリー)を明らかにする。各遺伝子について感染期特異的発現を DNA マイクロアレイにより塗り分ける(初年度 RSL2, RSL3, 次年度以降 RSL4, RSL5)。トマトを用いた感染系で各ファージによる防除効果の有効性を評価する(有効性と発現遺伝子相関を検討)。特に持続的感染期における防除効果と発現遺伝子の相関を明らかにする。次年度以降にファージタンパク質のプロテオーム解析を行い、Cryo-EM 観察による詳細構造とタンパク質の粒子位置づけを行う。最終的にデータベースに蓄積しているジャンボファージデータを抽出し、青枯病ファージとの比較において系統解析し、ジャンボファージの系統樹を作成する(総説発表)。青枯病菌ジャンボファージ第1号と

して、ゲノムサイズ 240kbp(ユニーク配列 231kbp)の RSL1 について、感染特性、粒子構成、遺伝子機能、環境下安定性、トマト防除効果など基礎データを既に得ている。これと比較できる形で新たなファージ RSL2, RSL3, RSL4, RSL5 についてデータを得る。具体的には以下の各項目の研究を順次実行し、新規特徴を明らかにする。

(1) 全ゲノム解読と遺伝子アノテーション。ゲノムマップ作成。データベース登録(山田、川崎担当)。(2) 全構成遺伝子カテゴリー比較(山田、川崎担当)。(3) ファージ粒子プロテオミクス：構造タンパク質の同定とゲノムマップ上への位置づけ(山田担当)。(4) Cryo-EM によるファージ粒子の高次構造解析(RSL1, RSL2 は既に済み、RSL3, RSL4, RSL5 について構造的特徴を明らかにする)(山田担当)。(5) 各ファージについての感染特性解析(単ステップ増殖解析)。

(6) DNA マイクロアレイを用いた感染ステージ特異的発現遺伝子の検出(RSL2,RSL3,RSL4,RSL5 を年度ごとに振り分けて行う)(山田、川崎担当)。(7) 各ファージについてトマトを用いた青枯病菌感染防除効果の評価(山田、藤江担当)。(8) 各ファージについて自然環境下での安定性評価(山田、藤江担当)。(9) DNA ポリメラーゼ配列によるジャンボファージの網羅的系統解析(データベースにあるゲノムサイズ 200kbp 以上のファージすべてを解析対象とする)(山田担当)。(10) カプシドタンパク質によるジャンボファージの網羅的系統解析(データベースにあるゲノムサイズ 200kbp 以上のファージすべてを解析対象とする)(山田担当)。これにより、ジャンボファージ全体の体系化(新パラダイム)とその中での青枯病菌ジャンボファージの位置づけ、特徴付けができる。

#### 4. 研究成果

当初の計画に従い、4種のファージについて各々の特徴づけを進め、系統的相互関係がほぼ明らかになりジャンボファージ界の概要を示すことができた。(1)ゲノム解読については、RSL(AP014693),RSL3(AP017925),RSL4(AP017924)を完了し、通常の次世代シーケンサーでは解読不能のRSL5について、ランダムプライマーを用いて逆転写後イルミナシーケンサー解析を行った。117kb断片の塩基配列決定により、RSL5がRSL1(AB366653)に非常に近いことが判明した(配列相同性>95%)。ゲノム修飾に起因し最終解読は困難であるが実際のサイズは250kbp前後と予想される。PFGEによる~450kbpもの巨大ゲノムサイズは、未知のゲノム修飾に起因すると思われる。自然界のファージには宿主との関係において様々なゲノム修飾を有するものがあり、

それらはPFGEにおいて異常な挙動を示す可能性がある。この修飾によりゲノムは次世代シーケンサー等では解読不能である。メタゲノム解析等においてはこの点を留意する必要がある。(2)プロテオミクス：RSL2, RSL3, RSL4について粒子プロテオミクスを完了し、データベース登録をした(2報論文発表)。RSL3, RSL4では、粒子中にRNAPタンパク質を含み、感染時にゲノムとともに宿主細胞に導入され、宿主非依存的にファージ遺伝子を発現する状況を証明した。この宿主非依存性が広い宿主域の大きな要因と推定される。RSL2粒子のCryoEM像により、粒子内部のbubble-gram構造を確認した。多種の粒子構造たんぱく質がジャンボファージの環境安定性に寄与していると予想される。(3)感染特性：4種のファージに共通した特徴は長い感染サイクル(4-6h)と比較的小さいバーストサイズ(30-60pfu/cell)である。このサイクルは宿主菌集団とファージの持続的共存を意味し、病原菌のバイオコントロールにおいては有利な特性となる。(4)トマトを用いた青枯病菌防除効果：ファージ処理は何れも長期にわたり高い予防効果を発揮した。特にRSL4とRSL5の効果は安定していた。ファージは特異性が高く、動植物にも安全であるデータを得た。(5)系統解析：RSL2とRSF1のクラスターはRSL3とRSL4のクラスターとともに緑膿菌ファージphiKZと同一クレードを形成した。RSL1(RSL5)は最大のゲノムを有するファージGに近く、まったく独立した位置づけとなった。さらにXanthomonasファージXacN1(385kbp)のゲノム解読を行い、最新のデータベースを用いた系統解析を行なった。その結果、新たな350kbp以上のゲノムを有する超大型ファージの系統が明らかとなった(Sci Rep発表)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Genki Yoshikawa, Ahmed Askora, Romain Blanc-Mathieu, Takeru Kawasaki, Yanze, Li, Miyako Nakano, Hiroyuki Ogata, and Takashi Yamada (2018) Xanthomonas citri Jumbo Phage XacN1 Exhibits a Wide Host Range and High Complement of tRNA Genes. Scientific Reports, 8:4486. (査読有り)
2. Numfon Rakkhumkaew, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, and Takashi Yamada (2018) Chitin synthesis by Chlorella Cells infected by Chloroviruses: Enhancement by adopting a slow growing virus and treatment with aphidicolin. Journal of Bioscience and Bioengineering, 125:311-315. (査読有り)

3. Ahmed Askora, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada (2017) Lysogenic Conversion of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* by the P2virus phiRSY1. *Frontiers in Microbiology*, 8:2212. (査読有り)

4. Abdekmonim A. Ahmad, Makoto Kawabe, Ahmed Askora, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, and Takashi Yamada (2017) Dynamic Integration and Excision of Filamentous Phage XacF1 in *Xanthomonas citri* pv. *citri*, the Causative Agent of Citrus Canker Disease. *FEBS OpenBio* 7: 1715-1721. (査読有り)

5. Takeru Matsui, Genki Yoshikawa, Tomoko Mihara, Orawan Chatchawankanphanich, Takeru Kawasaki, Miyako Nakano, Makoto Fujie, Hiroyuki Ogata, and Takashi Yamada (2017) Replications of Two Closely Related Groups of Jumbo Phages Show Different Level of Dependence on Host-encoded RNA Polymerase. *Frontiers in Microbiology*, 8:10101(査読有り)

6. E. M. Adriaenssens, J. H. Kuhn, A. M. Kropinski, Takashi Yamada (2016) Technical Report: To create one (1) new genus, Rslunavirus, including one (1) new species, within the Myoviridae.. ICTV Taxoprop, 043a-dB. (査読なし)

7. E. M. Adriaenssens, J. H. Kuhn, A. M. Kropinski, Takashi Yamada (2016) Technical Report: To create one (1) new genus, Rsl2virus, including two (2) new species, within the Myoviridae.. ICTV Taxoprop, 042a-dB(査読なし)

8. 川崎 健, 山田 隆 (2016) バイオよもやま話：いまどき？いまこそ！プラークアッセイ 新奇ジャンボファージ取得のためのプラークアッセイのすゝめ-日本生物工学会誌 94:492-495. (査読なし)

9. Tomoko Mihara, Mohamed A. Nasr-Eldin, Orawan Chatchawankanphanich, Anjana Bhunchoth, Namthip Phironrit, Takeru Kawasaki, Miyako Nakano, Makoto Fujie, Hiroyuki Ogata, Takashi Yamada (2016) A *Ralstonia solanacearum* phage phiRP15 is closely related to Viunlikeviruses and encodes 19 tRNA-related sequences. *Virology Reports*, 6: 61-73. (査読有り)

10. Erlia Narulita, Hardian Susilo Addy, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada (2016) The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in phage infection in *Ralstonia solanacearum*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 469: 868-872. (査読有り)

11. Anjana Bhunchoth, Romain Blanc-Mathieu, Tomoko Mihara, Yosuke Nishimura, Ahmed Askora, Namthip Phironrit, Chalida Leksomboon, Orawan Chatchawankanphanich, Takeru Kawasaki, Miyako Nakano, Makoto Fujie, Takashi Yamada (2016) Two Asian jumbo phages, phiRSL2 and phiRSF1, infect *Ralstonia solanacearum* and show common features of phiKZ-related phages. *Virology*, 494:56-66. (査読有り)

12. Takeru Kawasaki, ErliaNarulita, Minaho Matsunami, Hiroki Ishikawa, Mio Shimizu, Makoto Fujie, Anjana Bhunchoth, Namthip

Phironrit, Orawan Chatchawankanphanich, Takashi Yamada (2016) Genomic diversity of large-plaque-forming podoviruses infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Virology*, 492:73-81. (査読有り)

13. A. Bhunchoth, N. Phironrit, C. Leksomboon, O. Chatchawankanphanich, S. Kotera, N. Narulita, T. Kawasaki, M. Fujie, T. Yamada (2016) Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *J. Appl. Microbiol.*, 118:1023-1033.(査読有り)

【学会発表】(計 10 件)

1. Alaaeldin M. Saad、Ahmed M. Soliman, Takeru Kawasaki, Hirofumi Nariya, Tadashi Shimamoto, Takashi Yamada, (2018) Full genome sequencing of polyvalent bacteriophage as one of T4- family member. ASM Microbe 2018.6.7-11 (Atlanta, GA, USA) (国際学会)

2. Alaaeldin M. Saad、Ahmed M. Soliman, Hirofumi Nariya, Tadashi Shimamoto, Takashi Yamada, Takeru Kawasaki (2017) 第69回日本生物工学会大会(東京)2017年9月11日～9月14日、早稲田大学

3. 吉川元貴、R. Blanc-Mathieu, 緒方博之、山田 隆 (2016) カンキツかいよう病菌に感染する大型ファージXacN1のゲノム解析による特徴づけ, 第31回日本微生物生態学会大会, 2016年10月22日～2016年10月25日, 横須賀市文化会館

4. 川崎 健, 三原知子, 緒方博之, 藤江 誠, 山田 隆 (2016) 青枯病菌に感染する Viunlikevirus, RP15の単離と解析. 平成28年度日本生物工学会大会, 2016年09月28日～2016年09月30日, 富山国際会議場

5. 山田 隆 (2016) 植物病原菌に対するファージ療法、日本細菌学会総会ワークショップ WS22 (ファージルネッサンス) 2016年3月23日～2016-3月25日、大阪国際交流センター

6. E. Narulita, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada (2015) Genomic diversity of large-plaque-forming podoviruses infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* International Meeting: Molecular Genetics of Bacteria and Phages (国際学会) 2015年08月04日～2015年08月08日 University of Wisconsin-Madison, WI, USA

7. E. Narulita, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada (2015) Importance of PilQ on the infection by several types of bacteriophages. 第67回日本生物工学会大会, 2015年10月28日～2015年10月28日, 鹿児島

8. 安田太輝, 杉村祐哉, 山田 隆, 藤江 誠, 川崎 健 (2015) ファージを利用した青枯病防除技術の開発：ジャンボファージ及び T7 型ファージの有効性, 第67回日本生物工学

会大会, 2015年10月28日~2015年10月28日, 鹿児島城山観光ホテル

9. 松井 健、山田 隆、川崎 健、藤江 誠 (2015) 青枯病菌に感染するジャンボファージの解析と青枯病防除への利用, 第67回日本生物工学会大会, 2015年10月28日~2015年10月28日, 鹿児島城山観光ホテル

10. 川崎 健、藤江 誠, 山田 隆 (2015) 宿主病原性に影響を与える溶原性繊維状ファージRSSの溶原/誘発機構の解析, 第67回日本生物工学会大会2015年10月28日~2015年10月28日, 鹿児島城山観光ホテル

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
生命分子情報学研究室 広島大学先端物質科学研究科

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/chikou/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 隆 (YAMADA TAKASHI)  
広島大学・大学院先端物質科学研究科・  
名誉教授  
研究者番号: 40230461

(2)研究分担者

藤江 誠 (FUJIE MAKOTO)  
広島大学・大学院先端物質科学研究科・  
准教授  
研究者番号: 20274110  
川崎 健 (KAWASAKI TAKERU)  
広島大学・大学院先端物質科学研究科・

助教

研究者番号: 00510299

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )