

令和元年6月17日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07616

研究課題名(和文) 植物病原菌と密接に関わる繊維状ファージの解析と利用

研究課題名(英文) Analysis and utilization of filamentous phage closely related to plant pathogens.

研究代表者

川崎 健 (Kawasaki, Takeru)

広島大学・先端物質科学研究科・助教

研究者番号：00510299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌は重要な農作物を多数含む50科200種以上の植物に感染し被害を与える土壌伝染性の植物病原細菌である。この病原菌は雨水等によって容易に拡散してしまう上、長期に渡って土壌に潜伏するため対策が困難である。

溶原性ファージの感染/溶原化が宿主の性質に影響を与える例が報告されている。以前私たちのグループは青枯病菌において繊維状ファージの感染による病原性の増強を報告した。このファージについて宿主への影響を調べた。

また、このファージを利用したプラスミドは、極めて安定に宿主に保持され、有用である。しかしながら、そのコピー数はわずか1コピーであり、遺伝子の多量発現には向いていない。その改良を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青枯病菌は重要な農作物を多数含む200種以上の植物に感染し被害を与える土壌伝染性の植物病原細菌である。この青枯病菌と密接に関わるRSSタイプファージは、感染後の宿主の病原性に変化を与える。今回この現象について解析することで、青枯病菌の病原性について理解を深めることができた。

また、このRSSタイプファージから極めて安定なプラスミドを作成することができる。このプラスミドはその安定性から非常に有用であり、すでに世界6カ国へ提供しているが低コピー数という問題があった。今回はこのプラスミドを多コピー化することに成功し、これにより遺伝子の多量発現に向けたツールを提供できた。

研究成果の概要(英文)：Ralstonia solanacearum is a soil-borne phytopathogenic bacterium that is causable agent of lethal bacterial wilt, more than 200 species in 50 botanical families, including economically important crops. This phytopathogen is easily spread by rainwater and can survive for many years in the soil.

Recently, there are some reports of phage infection/lysogenization affects for host behaviors. Previously, our group has reported enhancement of R. solanacearum virulence by infection of filamentous phage. We researched the effect of the phage infection/lysogenization for the host.

In addition, we developed a plasmid using this phage. This plasmid is very stable in host and is useful. However, its copy number is only one copy in a host cell, which is not suitable for high-level gene expression experiment. So we tried to increase the copy number of the plasmid.

研究分野：農学

キーワード：バクテリオファージ 植物病原菌 青枯病菌 分子生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

溶原生活環ファージは宿主に一方的に寄生するだけでなく、宿主の生存、伝播に有利な機能を与える例も知られている。また、多くの動植物病原細菌の病原性が、ファージやプラスミドなどの移動性因子の介在によって伝播している証拠が報告されている。繊維状ファージについては近年まで溶原化の例は知られていなかったが、2000 年前後からコレラやペスト等の動物病原菌繊維状ファージについて、感染による宿主の病原性の獲得あるいは増強が報告されるようになった。

一方、植物病原菌に感染する繊維状ファージによるこれらの現象についての知見は乏しく、我々のグループによる報告が初めてである。

いままでに、病原性を増強させる RSS1 ファージ、減少させる RSM1、RSS0 ファージについて報告をしている。RSS1 と RSS0 は、同一の青枯病菌株から誘発されるファージであるが、宿主ゲノムからの切り出され方が 2 タイプある。6662 nt と 7288 nt であり、RSS0 は ORF13 を持つ。この ORF13 内に宿主 dif site と類似する配列が存在し、その配列を利用して溶原化している。この attP site は、宿主の dif site とは 1 bp の相違があり、これによって溶原化後は、133aa が Lys(AAA) Stop(TAA) となり遺伝子の長さが変化する。RSS0 はこの変化により宿主の生理活性への影響をコントロールしていると予想される。

また、この RSS1 および RSM1 ファージからプラスミドを作成したところ、RSM1 については安定性が低いプラスミドしか作製できなかったが、RSS1 については極めて高い安定性を示すプラスミドが得られ、選択圧をかけられない状況においても長期間にわたって安定に保持されることを報告している。一方、このプラスミドのコピー数は 1 細胞あたり 1 コピーしかなく、遺伝子を高発現させる用途には向いていなかった。

### 2. 研究の目的

病原性を増強する RSS1 と、逆に減少させる RSS0 を感染させた宿主について、その生理活性(コロニー性状、菌体外多糖生成、運動性、バイオフィーム形成能、抗生物質耐性、増殖速度、病原遺伝子発現、病原性等)を解析し、これらファージの感染/溶原化による宿主への影響を解析する。また、

また、極めて安定ながら、低コピー数な RSS1 由来プラスミドについて、高コピー化を試みる。一般的に、安定で低いコピー数のプラスミドは、そのコピー数を変化させることは難しいと言われているが、コピー数が増加した RSS1 変異株を取得できたため、これを利用して高コピープラスミドを作製し、低コピープラスミドとの違いについて比較を行う。

### 3. 研究の方法

病原性変化について：RSS0 は RSS1 と比べ、626 nt 長く、ORF13(DNA-binding transcription regulator protein と相同性を示し、転写因子と予想される)を保持する。さらにこの ORF13 は、attP を含むが、宿主の attB のコア配列とは 1 bp 異なることで、宿主に溶原化した後、遺伝子の長さが変化する(ORF13 156 aa、ORF13' 131 aa)。そこで、この遺伝子によって違いが生じていると推測し、ORF13 および ORF13' を発現プラスミドに導入し青枯病菌に導入し、宿主の生理活性変化を比較する。また、ファージ感染宿主と未感染宿主の変化についても解析する。

プラスミドの改変について：通常の RSS1 ファージは、淡い濁ったプラークを呈する。ところが、クリアなプラークを呈する変異株を取得した。この変異株について調べたと

ころ、宿主内に存在するプラスミド様ファージゲノムのコピー数が増加していた。そこで、この変異ファージを元にプラスミドを作製し、高コピープラスミドを作製する。さらに、低コピープラスミドとの比較を行い、どのような変異が起きているか解析する。

#### 4. 研究成果

病原性変化について：ORF13 を発現プラスミドに導入し青枯病菌に導入するとポイントミューテーションが入った変異プラスミドしか取得できない。このことからこの ORF は青枯病菌において有害であり、厳密な発現制御を行う必要がある。そこで、この ORF が影響を及ぼさない大腸菌内でカセットを作製した。さらに lac リプレッサーやコールドショックプロモーター等を用いたが、残念ながら安定性に乏しい結果となった。

また、RSS0 感染株は運動性（鞭毛運動、線毛運動）が低下する。この、宿主運動性の低下について調べたところ、細胞表面から、鞭毛、線毛が減少していた。鞭毛運動の低下については fliC の転写抑制による鞭毛形成阻害によるものであることを明らかとした。一方、線毛については pilA の発現は行われているが線毛自体は形成されないことが判明した。

運動性を向上させるファージの発見：青枯病菌に溶原化するファージによる宿主運動性の変化は、基本的に減少させるものしか報告されていなかった。しかし、今回の研究期間中に、運動性を向上させるファージ RSY1 を発見した。

プラスミドの改変について：コピー数が増加した変異ファージについて、複製関連領域を PCR で増幅し、カナマイシン耐性遺伝子、GFP 遺伝子と ligation した後、エレクトロポレーションで宿主株に導入した。得られた形質転換体を調べたところ、通常の RSS1 由来プラスミドと比べて 3 倍程度のコピー数を示した。その後、より高濃度の抗生物質添加培地によるスクリーニングを繰り返したところ元のプラスミドと比べ 20 倍程度のコピー数まで増加させることに成功した。一方でこのプラスミドの安定性は低下しており、抗生物質非存在下では容易に脱落することが判明した。このことから、この改変プラスミドは植物体内でのモニタリング用ではなく、青枯病菌で目的遺伝子の高発現用として用いることができると思われる。また、このプラスミドの配列を決定したところ、その変化は ORF3 に集中していた。さらに、元の RSS1 由来プラスミドにこれらの変異を導入するとコピー数が変化することを確認した。

これらについてまとめた。

この研究期間に 9 報の論文と著書 1 報を発表した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

##### 1. 査読有り。

Saad AM, Askora A, Soliman AM, Nariya H, Kawasaki T, Fujie M, Shimamoto T, Yamada T. 2018

Full genome sequence of a polyvalent bacteriophage infecting strains of Shigella, Salmonella, and Escherichia.

Arch Virol., Nov;163(11):3207-3210

##### 2. 査読有り。

Saad AM, Soliman AM, Kawasaki T, Fujie M, Nariya H, Shimamoto T, Yamada T. 2018

Systemic method to isolate large bacteriophages for use in biocontrol of a wide-range of pathogenic bacteria.

J Biosci Bioeng., Jul 23. 127(1):73-78

3. 査読有り。

Yoshikawa G, Askora A, Blanc-Mathieu R, Kawasaki T, Li Y, Nakano M, Ogata H, Yamada T. 2018

*Xanthomonas citri* jumbo phage XacN1 exhibits a wide host range and high complement of tRNA genes.

Sci Rep., Mar 14;8(1):4486

4. 査読有り。

Rakkhumkaew N., T. Kawasaki, M. Fujie, T. Yamada. 2018

Chitin synthesis by *Chlorella* cells infected by chloroviruses: Enhancement by adopting a slow-growing virus and treatment with aphidicolin

J Biosci Bioeng., Mar;125(3):311-315

5. 査読有り。

Askora A., T. Kawasaki, M. Fujie T. Yamada. 2017

Lysogenic Conversion of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* by the P2virus RSY1

Front Microbiol., Nov. vol.8 article2212

6. 査読有り。

Abdelmonim A. Ahmad, M. Kawabe, A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie, T. Yamada. 2017

Dynamic integration and excision of filamentous phage XacF1 in *Xanthomonas citri* pv. *citri*, the causative agent of citrus canker disease

FEBS open bio., Sep. 19;7(11):1715-1721

7. 査読有り。

Matsui T, G. Yoshikawa, T. Mihara, O. Chatchawankanphanich, T. Kawasaki, M. Nakano, M. Fujie, H. Ogata, T. Yamada. 2017

Replications of Two Closely Related Groups of Jumbo Phages Show Different Level of Dependence on Host-encoded RNA Polymerase.

Front Microbiol., Jun 13;8:1010

8. 査読有り。

Mihara, T., M. A. Nasr-Eldin, O. Chatchawankanphanich, A. Bhunchoth, N. Phironrit, T. Kawasaki, M. Nakano, M. Fujie, H. Ogata and T. Yamada. 2016

A *Ralstonia solanacearum* phage phiRP15 is closely related to Viunlikeviruses and encodes 19 tRNA-related sequences. *Virology Reports*, 6: 61-73

9. 査読有り。

Bhunchoth, A., R. Blanc-Mathieu, T. Mihara, Y. Nishimura, A. Askora, N. Phironrit, C. Leksomboon, O. Chatchawankanphanich, T. Kawasaki, M. Nakano, M. Fujie, H. Ogata and T. Yamada 2016

Two Asian jumbo phages,  $\phi$ RSL2 and  $\phi$ RSF1, infect *Ralstonia solanacearum* and show common features of  $\phi$ KZ-related phages.

*Virology*, 494: 56-66.

10. 査読無し。

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-

生物工学会誌, 続・生物工学基礎講座 Vol.94(8):492-495

〔学会発表〕(計 3件)

第70回日本生物工学会大会

2018年9月5日-7日

大阪府吹田市

ジャンボファージ RSP13 の特殊なゲノム DNA の解析

川崎健、Meslhi Alaaeldin、山田隆

第69回日本生物工学会大会

2017年9月11日-14日

Smart utilization of jumbo phages for biological control of zoonotic diseases.

Alaaeldin M. Saad, Ahmed M. Soliman, Hirofumi Nariya, Tadashi Shimamoto,

Takashi Yamada, Takeru Kawasaki

第68回日本生物工学会大会

2016年9月28日-30日

富山市

青枯病菌に感染する Viunalikevirus、RP15 の単離と解析

川崎健、三原和子、緒方博之、藤江誠、山田隆

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/ichikou/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。