

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780082

研究課題名(和文)植物病原菌の生存戦略における繊維状ファージ

研究課題名(英文) Infection of filamentous phages causes several physiological changes to the phytopathogenic bacterium.

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000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。青枯病対策として、農薬や輪作、耐病性品種の利用などが行われているが、環境への影響や経済性の問題が存在している。今回の科学研究費助成事業で、植物病原菌に繊維状のファージが感染した際に引き起こされる様々な現象を報告した。それらは繊毛による運動性の変化や、細胞外多糖の蓄積量の変化、そして病原性の変化であった。

RSSタイプのファージは病原性を増加させる。RSMタイプのファージは病原性を失わせる。ということが判明した。将来的にはRSMタイプファージの青枯病対策への利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The phytopathogenic gram-negative bacterium *Ralstonia solanacearum* causes lethal bacterial wilt more than 200 species in 50 botanical families, including economically important crops. Although some management strategies are tried to control this disease such as chemicals control, crop rotation and resistant plants, they are unfriendly to the environment and economics. We reported that infection of filamentous type phages (RSS type and RSM type) causes several physiological changes to host cells, including motility, amount of extracellular polysaccharide and especially virulence.

In the case of RSS infection: increase of virulence. In the case of RSM infection: loss of virulence. RSM type phages may serve as a tool to control bacterial wilt.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：分子生物学 植物病原菌 青枯病菌 ファージ

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。M13 に代表され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などの重要な病原菌において繊維状ファージが溶原化し、それによって病原性の獲得あるいは増強が起きることが報告されていた。それらの繊維状溶原化ファージによる病原性の増加に関する研究は動物病原菌において始まったばかりであり、植物病原菌においては当研究が初めてのものであった。

2. 研究の目的

繊維状の溶原化ファージによる病原性の獲得、増加に関する研究はまだ知見に乏しく、特に植物病原菌に対するものは知られていない。その一方で様々な植物病原菌においても、ゲノムプロジェクトにより類似プロファージ配列の存在が明らかとなりつつあり、このことから植物病原細菌の世界においてもこれらファージの重要性の高さが予想される。青枯病菌に溶原化している RSS タイプと RSM タイプのファージについて宿主に与える影響について解析し、ファージと宿主との相互作用、共生進化について明らかにして行き、さらに、応用的に青枯病被害の防除・予防へ役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

青枯病菌ゲノム上に溶原化している RSS タイプファージ配列の溶原化部位の同定、比較を行う(複数の株について)。得られた配列を利用し、相同性組換えにより本配列を除去し、宿主の増殖速度、運動性、バイオフィルム形成能、さらに植物体に接種した際の病原性について解析を行う。RSS配列を除去した青

枯病菌に対し改変RSS1ファージを感染させ、病原性等について比較を行う。さらに再溶原化条件の検討(RSMファージはInt/attPをコードしているが、予備研究においてRSSファージの溶原化はInt/attP系や宿主XerC/D系とは異なる機構によると推定されている)、溶原化した株についての解析を行う。また、同様の実験をRSM様ファージについても行い比較、検討を行う。

これらの結果から青枯病菌病原性等に対する繊維状ファージの影響を明らかにする。

4. 研究成果

溶原化 RSS1 ファージ配列の両端からインバース PCR を行い、溶原化領域について取得、解析を行った。この配列情報を元に、抗生物質耐性マーカーを持つ相同組換えコンストラクトを作製し、これを用い溶原化配列の除去を試みた。その結果、特定の部位に抗生物質耐性マーカーが挿入された株のみが単離された。この部位について詳細な解析をしたところ、野生株 RSS1 ファージ配列の溶原化領域の両外側に、ファージ関連配列および dif サイトが存在することを発見した。このことから、自然界から単離した RSS1 のオリジナルとして、完全長の RSS0 ファージを推定した。予定していた研究とは異なるが、非常に興味深い発見であることからさらなる研究を行った。人意的に誘発させたところ、RSS1 (6662 nt) と同時に 626 nt 長いファージ RSS0 (7288 nt) としても誘発・機能することが判明した。すなわち、溶原化機構が未知であった RSS1 ファージは、オリジナルとして RSS0 が存在し、このファージが溶原化、誘発を繰り返し、かつ、高い頻度で不完全長 RSS1 として誘発する(そしてこのファージはおそらく溶原化不能)ことが示唆された。この延長された領域には、新たな ORF (ORF13 : DNA-binding transcription regulator protein と相同性を示し、転写制御因子と予想される。156 aa。)が存在して

いた。RSS 様ファージ配列が溶原化している株に、さらに RSS1 ファージが感染できる (immunity が働かない) 一方で この ORF13 を有する RSS0 ファージには immunity が働き、溶原化株に感染できなくなることが判明した。さらに、完全長 RSS0 が感染し、プラスミド状で複製している場合 (完全長 ORF13) は、今までとは逆に宿主の病原性を減少させること。溶原化している株 (短縮型 ORF13) には病原性があり RSS0 に対し immunity が働くこと等のデータが得られた。そこで、ORF13 およびファージ感染、溶原化による宿主への影響を明らかにする必要が生じた。これについて、平成 26 年度に採択していただいた「繊維状ファージの感染ステージによる宿主の病原性変化」(若手研究(B))として研究して行く。

また、宿主の病原性を増加させる RSS1 とは逆に、病原性を低下させる RSM3 ファージについては、その病原性変化に寄与している領域が ORF15 のリプレッサー様タンパク質であり、これが宿主のクオラムセンシング遺伝子 (phcA) に作用することにより病原性の減少を招いていることを明らかとし、論文として発表した。

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 9 件)

全て査読あり

(1) Askora, A., T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada.

Insights into the diversity of RSM phages infecting strains of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*

complex: regulation and evolution

Mol. Genet. Genom. (2014) in press.

doi 10.1007/s00438-014-0835-3

(2) Ahmad A. A., M. Ogawa, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada.

Characterization of Bacteriophages Cp1 and Cp2, the Strain-typing Agents for

Xanthomonas axonopodis pv. citri

Appl. Environ. Microbiol. 80(1):77-85

doi: 10.1128/AEM.02310-13. Epub 2013 Oct 11.

(3) Rakkhumkaew, N., S. Shibatani, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2013. Hyaluronan synthesis in cultured tobacco cells (BY-2) expressing a chlorovirus enzyme: Cytological studies.

Biotech. Bioeng. 110(4):1174-1179

doi: 10.1002/bit.24783

(4) Effantin, G., R. Hamasaki, T. Kawasaki, M. Bacia, T. Yamada and G. Schoehn. 2013. Cryo-electron microscopy 3D structure of the jumbo phage RSL1 infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*

Structure 21(2):298-305

doi: 10.1016/j.str.2012.12.017.

(5) Rakkhumkaew, N., T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2012. Prolonged synthesis of hyaluronan by *Chlorella* cells infected with chloroviruses. J. Biosci. Bioeng.

115(5):527-531

doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.11.012.

(6) Addy, H. S., A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2012. Utilization of Filamentous Phage RSM3 to Control Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Disease.

96(8):1204-1209

doi: 10.1094/PDIS-12-11-1023-RE

(7) Addy, H. S., A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2012. Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by RSM filamentous phages. Phytopathology.

102(5):469-477

doi: 10.1094/PHYTO-11-11-0319-R

(8) Addy, H. S., A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2011. The filamentous phage RSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on Tomato. *Phytopathology*. 102(3):244-251

doi: 10.1094/PHYTO-10-11-0277

(9) Fujiwara, A., M. Fujisawa, R. Hamasaki, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2011. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(12):4155-4162.

doi: 10.1128/AEM.02847-10

〔学会発表〕(計 21 件)

2013 年 9 月 18-20 日 第 65 回日本生物工学会大会 広島国際会議場 (7 件)

(1) クロレラがコードする 2 つの鞭毛関連遺伝子はストレス条件下で発現する
熊谷徳泰、川崎健、藤江誠、山田隆

(2) 青枯病菌に感染する T7 型ファージゲノムのダイナミックな再編成

小寺星、藤原亜希子、川崎健、藤江誠、山田隆

(3) 青枯病菌に感染する T7 型ファージの系統解析

松浪美奈穂、川崎健、藤江誠、山田隆

(4) 青枯病菌ジャンボファージ RSL1 の構造と機能に関する研究

竹内秀樹、川崎健、藤江誠、山田隆

(5) 青枯病菌繊維状ファージ RSM の宿主制御機構に関する研究

藪谷祐司、川崎健、藤江誠、山田隆

(6) カンキツかいよう病菌に感染するファージの分離と解析：広島産レモンの保護

小川恵、川崎健、藤江誠、山田隆

(7) シロイヌナズナを用いた植物ミオシン遺伝子の解析

古川雄斗、辻翔平、川崎健、藤江誠、山田隆

2013 年 2 月 6-8 日 Tomato Breeder's Roundtable 2013 Chiang Mai, Thailand

(8) Detection of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* using bacteriophages

Takeru Kawasaki, Takashi Yamada

2012 年 10 月 23-26 日 第 64 回日本生物工学会大会 神戸国際会議場 (8 件)

(9) 青枯病菌に感染する T7 型ファージゲノムのダイナミックな再編成

小寺星、藤原亜希子、川崎健、藤江誠、山田隆

(10) 青枯病菌に感染する 3 種の T7 型ファージの系統解析と感染実験

松浪美奈穂、川崎健、藤江誠、山田隆

(11) バクテリオファージ耐性青枯病菌における変異遺伝子解析

藤澤真理子、藤原亜希子、川崎健、藤江誠、山田隆

(12) RSL 型ジャンボファージの構造解析と持続的宿主抑制機構

濱崎良介、藤原亜希子、川崎健、藤江誠、山田隆

(13) RSS 型繊維状ファージは XerCD/dif 機構によって宿主ゲノムに組み込まれる

田坂友一、川崎健、藤江誠、山田隆

(14) Prolonged Synthesis of Hyaluronan by *Chlorella* Cells Infected with Chloroviruses

Numfon Rakkhumkaew, Shigeo Shibatani,
Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi
Yamada

(15) クロレラ鞭毛関連遺伝子の発現解析
熊谷徳泰、川崎健、藤江誠、山田隆

(16) クロレラウイルス遺伝子組換え技術の
開発
竹本有希、川崎健、藤江誠、山田隆

2011年9月26-28日 第63回日本生物工学
学会大会 東京農工大学小金井キャンパス(5
件)

(17) 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* に
おけるファージ耐性機構についての網羅的
解析
藤澤真理子、藤原亜希子、川崎健、藤江誠、
山田隆

(18) 青枯病菌の病原性を賦活化するファ
ージ RSS の遺伝子解析
田坂友一、川崎健、藤江誠、山田隆

(19) タバコ培養細胞 BY-2 を利用した青枯
病菌感染モデル系の開発
磯崎里奈、梶田浩未、川崎健、藤江誠、山田
隆

(20) 巨大ファージ RSL1 と青枯病菌
Ralstonia solanacearum の相互作用に関する
研究
濱崎良介、藤原亜希子、川崎健、藤江誠、山
田隆

(21) Molecular mechanism of hyaluronan
synthesis on tobacco cultured-cells
(BY-2) exerted by chlorovirus enzymes

Numfon Rakkhumkaew, Shigeo Shibatani,
Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi
Yamada

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)

名称: 青枯病予防剤および青枯病の予防方法
発明者: 山田 隆、藤江 誠、川崎 健
権利者: 広島大学
種類: 特許
番号: P120008092
出願年月日: 平成23年4月28日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
[http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/
ichikou/](http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/ichikou/)

6. 研究組織
(1) 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