

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380049

研究課題名(和文)ジャンボファージによる青枯病菌の持続的制圧

研究課題名(英文)Sustainable control of bacterial wilt by jumbo phage technology

研究代表者

山田 隆 (Yamada, Takashi)

広島大学・先端物質科学研究科・教授

研究者番号：40230461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ジャンボファージRSL1による青枯病防除機構として以下のものを見いだした。(1)制菌時における宿主菌のtwitching運動性の低下、病原性の低下を明らかにした。(2)制菌時に高発現する12個のファージ遺伝子のうちorf105, orf106, orf121, orf133, orf134, orf137, orf209を宿主菌内で高発現させ、前3者が増殖促進効果、後2者(特にorf137)が増殖抑制効果を示す事を見いだした。(3)制菌時にRSL1が宿主菌溶原化RSSファージの誘導をおこす事を見いだした。(4)RSL1に対する宿主抵抗性はLPS変化に起因し、これにより宿主病原性は低下する。

研究成果の概要(英文)：Four major mechanisms have been found to effects host virulence after infection by RSL1: (1) twitching motility and associated virulence were affected in the host cells, (2) among 12 RSL1 genes enhanced during prolonged infection, orf105, orf106, and orf121 worked for growth activation but orf137 and orf209 strongly inhibited the growth, (3) RSL1 induced RSS prophages in the host cells, and (4) phage resistance working in the host was associated with LPS structure and function, so that resistant cells all lost virulence because of LPS deficiency.

研究分野：応用微生物学

キーワード：bacteriophage bacterial wilt Ralstonia solanacearum biocontrol resistance cost prophage induction growth inhibition loss of virulence

1. 研究開始当初の背景

**(1) ファージセラピー、ファージバイオコントロール:**

近年の抗生物質・薬剤耐性菌の蔓延が引き金となり、病原菌を自然界の天敵ファージを用いて駆除する技術(ファージセラピー、ファージバイオコントロール)の研究・技術開発が欧米を中心に急速に再燃している。農業分野においても、農薬の過剰使用による環境汚染・生態系破壊、残存農薬による健康への悪影響に加え、消費者の食に対する信頼を回復すべく、2002年の農薬取締法改正後、農薬使用・開発のあり方が厳しく問われている。最も重要な植物病害の一つに青枯病がある。青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)は、ナス科やマメ科等経済的に重要な農作物を含む50科200種以上の植物に感染し、温暖な地域を中心に世界的に甚大な被害をもたらしている(ジャガイモ被害、年間950億ドルの損失)。その防除に使用されてきた主農薬は劇物であるクロルピクリンや臭化メチルであったが、後者はオゾン層破壊物質であり、2005年に生産/使用中止となっている。地球温暖化傾向も拍車をかけ青枯病菌の蔓延と農作物生産低下による地球規模の食糧不足が危惧されている。ここに病原菌に高い特異性を示す、安全かつ持続的な代替農薬・防除技術の開発が強く望まれている。その有力候補として、青枯病菌特異的バクテリオファージの利用に着目した。

**(2) 青枯病菌ジャンボファージ RSL1 の発見とゲノム解析:**

これまでに、レース、biovar, phylotype の異なる青枯病菌計18株を宿主として自然界より多数のファージを分離し、12種について感染特性、ゲノム解読による高度な特徴付けを行っている。その中の一種 RSL1 は広い宿主域を持つ myovirus であり、231,255bp の大型ゲノムを有し343個の遺伝子をコードしていた。このように大きなゲノム(>200 kbp)を有するファージは非常に珍しく、特にジャンボファージと呼ばれている。従来知られているファージ増殖に必要な遺伝子セットに加えて NAD 代謝系、ポリアミン合成系、糖鎖転移酵素、アシル基転移タンパク質、各種トランスポータタンパク質等々興味深い遺伝子候補が見出された。機能未知の多数の遺伝子に加えてこれら代謝系遺伝子群はゲノム領域 I に結集していた。宿主との相互作用におけるこれら付加遺伝子の機能が大変興味深い。

**(3) RSL1 による青枯病菌の持続的生育抑圧と病害発生予防:**

異なるタイプのファージ三種(RSA1, RSB1, RSL1)の単独、および混合剤(phage cocktail)を用いて各種青枯病菌株の増殖を調べた結果、phage cocktail を用いた耐性菌抑制は長期間にわたる青枯病菌

コントロールには必ずしも有効ではなく、RSL1 の単独感染で持続的細菌増殖抑制が見られた。RSL1 感染による持続的細菌増殖抑制効果に注目し、実験室レベルでのトマトを用いた青枯病菌モニタリングとファージによる予防効果を予備的に調べた。トマト実生を用いた青枯病菌接種(コントロール)では、24時間後に導管内侵入・増殖が顕著となり、72時間で菌体が主根から漏出し、96時間で胚軸と、小葉は完全にしおれた。一方、ファージ処理トマトでは、細菌接種後120時間でも細菌侵入・増殖は顕著とならず、側根が生長し288時間後も病徴は皆無であった。その後、ポット移植したトマトは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。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、日本でも早晚植物工場等の必須技術となろう。

**(4) ファージと細菌の進化に関する研究の現状及びジャンボファージの発見:**

最近数年、次々と大きなファージが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5種類検出される。*Pseudomonas aeruginosa* ファージ φKZ (280 kbp), *Vibriophage* KVP40 (245 kbp), *P. aeruginosa* phage EL(211 kbp), *Stenotrophomonas maltophilia* Phage φSMA5 (250 kbp), *Yersinophage* φR1-37(270 kbp)。これらの大型ファージには今のところ共通構造、遺伝子構成は見られず系統的関係は不明である。これらファージ(ジャンボファージと定義: Hendrix, Curr Topics Microbiol Immunol 328,229-240, 2009)の研究は始まったばかりであり、新規な感染機構、宿主相互作用、生態系への影響が興味深い。

2. 研究の目的

抗生物質・薬剤耐性菌の蔓延が引き金となり、病原菌を自然界の天敵ファージを用いて駆除する技術の研究・開発が急速に再燃している。農作物の重大な病害である青枯病の病原菌を持続的に制圧できるファージ(RSL1)を自然界より分離した。一般にファージによる溶菌では、耐性菌が早晚出現するが、この特殊なファージ(231kbpのゲノムを有するジャンボファージ)の場合は、ファージ・宿主の共存状態が継続し宿主細胞の増殖が抑制される(新機構)。その結果、青枯病の発病を持続的に抑止できる。この共存状態について、(1)宿主菌の生理的(病原性)変化、(2)ファージ遺伝子の発現と機能、(3)プラスミド様因子の誘導、(4)ファージ耐性とその解除等の解析を

行う。これにより、ジャンボファージ（稀少な存在）と宿主菌の相互作用に関する学術的新知見を得て、持続的な病原菌の制圧モデルとして特徴付けする。

### 3. 研究の方法

ジャンボファージ RSL1 と青枯病菌の共存状態（持続的平衡状態）をファージ側と宿主側相方から解析し、その機構を明らかにする。ファージ側からは DNA マイクロアレイ法を用いて活性化遺伝子（12 個）に加えて不活性化遺伝子を特定し、特に活性化遺伝子についてクローニング、宿主細胞への導入により機能を解明する。また、これまでに検出している誘導型プラスミドの塩基配列解析によりその由来（ファージか宿主か）を明らかにするとともに、その機能を調べる。宿主菌のファージ耐性に対する解除機構も活性化遺伝子の機能との関係から調べる。宿主側からは、生理学的変化（増殖性、コロニー性状、twitching motility、凝集性、バイオフィーム形成、菌体外多糖生成、グルカナーゼ活性 etc）、病原性、ファージ耐性変化（トランスポゾン変異法を適用）を調べる。24 年度は主として検出に主眼をおき、25 年度以降はそれらの詳細な解析を行う。山田を研究総括者とし、ファージ側解析を川崎、宿主側解析を藤江が担当する。

### 4. 研究成果

当初計画に従い、平成 24 年度には以下の成果を得た。(1) 制菌時における宿主菌の twitching 運動性の低下、病原性の低下を明らかにした。また、(2) 制菌時に高発現する 12 個のファージ遺伝子のうち *orf105*, *orf106*, *orf121*, *orf133*, *orf134*, *orf137*, *orf209* を宿主菌内で高発現させ、前 3 者が増殖促進効果、後 2 者（特に *orf137*）が増殖抑制効果を示す事を見いだした。さらに、(3) 制菌時に宿主菌に検出されるプラスミド様因子が溶原化 RSS ファージの誘導に由来する事を見いだした。RSS 原型ファージは宿主菌病原遺伝子 (*phcA*, *phcB*, *hrpB*, *egl*, *pilT* etc) の抑制制御を行うことが判明し、ファージによる青枯病原菌制圧の重要な機構の一環が明らかとなった。EZ-Tn5<sup>TM</sup><KAN-2>Tnp Transposome<sup>TM</sup> Kit によるトランスポゾン変異株のうち 3 種が RSL1 耐性を示した。何れも LPS 合成系の変異株であり、耐性と同時に病原性を失っていた。平成 25 年度の成果は以下の通りである。(1) RSL1 共存状態で誘導されるプラスミド様因子が溶原化 RSS ファージ由来であることが判明し、塩基配列決定によりプラスミド切り出し部位 (*attL/attR:attB*) が宿主 *dif* 部位である事を確定した。これにより、RSS ファージの宿主組み込み機構が XerC/D 系による事が明らかとなった。(2) RSL1 の h-変異株を UV 照射法、NTG 法により取得したが容易に戻り変異することが判明した。この理由

に興味を持たれる (RSL1 は極めて安定な変異修復機構を有する)。(3) トランスポゾンノックアウトライブラリーの解析から RSL1 の宿主吸着に LPS が関与する事が明らかとなり、RSL1 耐性株は LPS 変異により病原性を失うことが判明した。(3) 電子顕微鏡を用いたファージ構造因子の解析を行ない、特殊な頭部構成による熱安定性、と 6 型分泌系に關与する尾部構造を明らかにした。平成 26 年度には RSL1 の極めて高いゲノム DNA 安定性の理由として計 13 個の DNA 修復関係遺伝子を検出しその重要性を確認した。またフィールド実験における RSL1 の青枯病予防効果について統計学的に有意なデータを得た。RSL1 から得られた情報を基に、自然界ファージサンプル調査を行い新たに計 5 種のジャンボファージを発見することができた。これらファージは何れも独特な特徴を示し、バイオコントロールツールとしての利用が大いに期待される。

### 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 14 件)

1. 山田 隆(2014) 青枯病菌の繊維状ファージ：病原性の諸刃の剣．植物細菌病談話会論文集 26:46-53. (査読なし)
2. 山田 隆(2014) ファージを利用した青枯病防除技術の開発：巨大ファージ RSL1 と繊維状ファージ RSMs の有効性．化学と生物 Vol. 52 (6)371-379. (査読なし)
3. Ahmad, A.A., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2014) A Novel filamentous phage causes loss of virulence to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* the causative agent of citrus canker disease. *Frontiers in Microbiology* 5: 321:1-11, doi:10.3389/fmicb.2014.00321. (IF=3.941) (査読付き)
4. Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T. (2014) Insights into the diversity of  $\phi$ RSM phages infecting strains of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* complex: regulation and evolution. *Mol. Genet. Genom.* 289(4):589-598, Doi:10.1007/s00438-014-0835-3. (IF=2.831) (査読付き)
5. Ahmad A. A., Ogawa, M., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2014) Characterization of Bacteriophages Cp1 and Cp2, the Strain-typing Agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 89(1): 77-85. (IF=3.952) (査読付き)
6. Yamada, T. (2013) Filamentous phages of *Ralstonia solanacearum*: Double-edged swords for pathogenic bacteria. *Front. Microbiol.* 4:325, 1-7 doi: 10.3389/fmicb.2013.00325. (IF=3.941) (査読付き)
7. Rakkhumkaew, N., Shibatani, S., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2013) Hyaluronan

Synthesis in Cultured Tobacco Cells (BY-2) Expressing a Chlorovirus Enzyme: Cytological Studies. *Biotech. Bioeng.* 110(4):1174-1179. (IF=4.164)(査読付き)

8. Rakkhumkaew, N., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2013) Prolonged Synthesis of Hyaluronan by *Chlorella* Cells Infected with Chloroviruses. *J. Biosci. Bioeng.* 115(5): 527-531.(IF=1.869) (査読付き)

9. Effantin, G., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Bacia, M., Yamada, T. and Schoehn, G. (2013) Cryo-electron microscopy 3D structure of the jumbo phage RSL1 infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Structure* 21(2):298-305.(IF=6.794) (査読付き)

10. Askora, A., Abdel-Haliem, M.E.F., and Yamada, T. (2012) Site-specific recombination systems in filamentous phages. *Mol. Genet. Genom.* 287(6): 525-530.(IF=2.831) (査読付き)

11. Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2012) Utilization of Filamentous Phage  $\phi$ RSM3 to Control Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 96(8): 1204-1209.(IF=2.742) (査読付き)

12. Blanc, G., Yamada, T., Van Etten, J.L. et al. (他 18 名). (2012) The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biology* 13: 1-12, R39 DOI:10.1186/gb-2012-13-5-r39. (IF=10.5) (査読付き)

13. Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2012) Loss of Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through Infection by  $\phi$ RSM Filamentous Phages. *Phytopathology* 102(5):469-477.(IF=2.97) (査読付き)

14. Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2012) The filamentous phage  $\phi$ RSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on tomato. *Phytopathology* 102(3): 244-251. (IF=2.97) (査読付き)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 山田隆、青枯病菌の繊維状ファージ：病原性の諸刃の剣、日本植物病理学会、植物細菌病談話会、2014年10月9日、岡山レスパール藤ヶ鳴

2. Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. Molecular characterization of a new filamentous phage infecting *Ralstonia solanacearum* with a wide host range. 第66回日本生物工学会大会、2014.09.09, 札幌

3. Erlia Narulita, 他4名、Isolation and genomic characterization of new T7-like phages infecting *Ralstonia solanacearum* from Thailand. 第66回日本生物工学会大会、2014.09.10 札幌

4. 園元貴也、川崎健、藤江誠、山田隆、緒方

博之(広島大学)青枯病菌とファージのダイナミックな相互作用の解析。第66回日本生物工学会大会、2014.09.10、札幌

5. 小寺 星、他4名、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、第65回日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場

6. 松波美奈穂、川崎健、藤江誠、山田隆、青枯病菌に感染する3種の T7 型ファージの系統解析、第65回日本生物工学会大会、2013年9月24日、広島国際会議場

7. 竹内秀樹、川崎健、藤江誠、山田隆、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、第65回日本生物工学会大会、2013年9月24日、広島国際会議場

8. 薮谷祐司、川崎健、藤江誠、山田隆、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、第65回日本生物工学会大会、2013年9月24日、広島国際会議場

9. Yamada T. History and progress of phage biocontrol in agriculture. 1<sup>st</sup> Intl. Symp. "Challenge of Red Queen", 65<sup>th</sup> Annu Meeting of JSB, 2013.09.18, Hiroshima

10. 山田隆、ファージを利用した青枯病防除儀靴の開発、平成25年度野菜茶業試験研究推進会議 野菜病害虫部会野菜病害虫研究会、2013年11月22日、農業食品産業総合研究機構野菜茶業研究所、津市

11. 小寺 星、他4名、青枯病菌 T7 型ファージゲノムのダイナミックな再編成、第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場

12. 松波美奈穂、川崎健、藤江誠、山田隆、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、第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場

13. 藤澤真理子他4名、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、第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場

14. 濱崎良介他4名、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、第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場

15. 田坂友一、川崎健、藤江誠、山田隆、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、第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

Yamada, T. InTech-Open Access Publisher Bacteriophages of *Ralstonia solanacearum* : their diversity and utilization as biocontrol agents in agriculture. In : Bacteriophage (I. Kurtboke, Ed.) ISBN 978-953-51-0272-4 (2012) 113-139.

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/ichikou/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・  
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