

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21580095

研究課題名 (和文) 青枯れ病菌巨大ファージと病原性の解析

研究課題名 (英文) Characterization of ϕ RSL1-encoded genes controlling the host virulence

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

研究成果の概要 (和文)：青枯れ病菌巨大ファージ RSL1 ゲノムに検出した 343 個の遺伝子を対象に DNA マイクロアレイ解析を行い、感染期における 4 つの発現パターンを検出しゲノムマップ上に塗り分けた。持続的感染期に発現する 12 個の遺伝子を同定し、宿主菌増殖抑制/活性化制御等に関する機能解析を行い興味深い新規知見を得て、当初の目的を達成できた。病原細菌を薬剤を使わずファージを用いて持続的に制御する新システムとして重要と思える。

研究成果の概要 (英文)：Based on DNA microarray analysis, 343 genes encoded by *R. solanacearum* jumbo phage ϕ RSL1 were characterized to be expressed in the early, early-intermediate, intermediadte-late, and late stages. The ϕ RSL1 genome consists of four gene-cluster regions where region I mainly contains early-intermediate genes, while most intermediate-late genes are located within regions II and IV. Bacterial cells infected with ϕ RSL1 were steadily maintained at a low level of cell density over a long period. Under these conditions, 12 ϕ RSL1 genes were shown to be highly expressed and regulate the host growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：微生物機能、ゲノム、ファージ、植物病理、マイクロアレイ、

1. 研究開始当初の背景

多くの動植物病原細菌の病原性遺伝子は、バクテリオファージやプラスミドなどの移動性遺伝因子によって伝播し、個別細菌によって獲得されたものであるという証拠が、細菌ゲノム解析から明らかにされつつある。病原性遺伝子解析とその機能解明による、病気の防除・予防を講じるにあたってバクテリオ

ファージの関与を避けて通ることは出来ない。青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)は、世界中の経済的に重要な作物を含む多数の植物に感染して枯死させる土壌伝染病細菌であり、この病原菌を汚染土壌から除去することは極めて困難である。自然環境下でこの病原菌をコントロールする因子として、申請者等はバクテリオファージを自然界から多

数分離し、その特性を明らかにしてきた。その中の一種、RSL1(Myovirus)は珍しく巨大な dsDNA ゲノムを有していた。ゲノム塩基配列 231,255bp を決定し計 343 個の ORF を検出してあった。データベース相同性検索では、ファージ構造タンパク質、DNA 複製・修復、遺伝子発現制御、ヌクレオチド生合成等ファージ機能関連遺伝子の他に、NAD 代謝系、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。特に病原性との関係においてタイプ III 分泌系の関連遺伝子に興味を持たれた。一般的な小型ファージにおいては、宿主細菌機能に影響する遺伝子の許容スペースはごく限定されているが、このウイルスの場合は特別である。病原性はもとより各種代謝系を通じて、青枯病菌の race, biovar 等の変化・進化に大きく寄与している可能性があった。またウイルス遺伝子は未知の遺伝子の宝庫であり、多くの新発見が期待できた。特記すべきは、RSL1 の様な大型ファージの発見であり、最近数年来、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 ϕ KZ (280 kbp; J. Mol. Biol. 317, 1-19, 2002), Vibriophage KVP40 (245 kbp; J. Bacteriol., 185, 5220-5233, 2003), *P. aeruginosa* phage EL(211 kbp, J. Mol. Biol., 354, 536-545, 2005), *Stenotrophomonas maltophilia* Phage ϕ SMA5 (250 kbp, Appl Environ. Microbiol., 71, 1387-1393, 2005), Yersinophage ϕ R1-37(270 kbp; Microbiology, 151, 4093-4102, 2005). 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關係は不明である(ϕ KZ と EL は同族)。ここに RSL1(231kbp)の位置づけに興味を持たれた。

2. 研究の目的

RSL1 ゲノムに検出した計 343 個の遺伝子全てについて、DNA マイクロアレイ法によりファージ感染時における発現性、発現タイミングを確定し、さらに特徴的なものについてその機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

青枯病菌巨大ファージ RSL1 の dsDNA ゲノム 231,255 bp に検出した計 343 個の遺伝子個々について特異的部分を PCR 増幅し DNA マイクロアレイを作製する。この DNA アレイを用いて、ファージ RSL1 感染初期、

中期、後期における宿主細胞内転写物の cDNA をプローブに各遺伝子の発現性を定量評価する。さらに、RSL1 個別遺伝子 (特に高度に発現する遺伝子、ならびに NAD 生合成系、硫黄代謝系、キチナーゼ、タイプ III 分泌系等の関連遺伝子) をクローニングし宿主菌で発現させ、病原性に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

当初の研究目的、計画に従い以下の成果を得た。青枯れ病菌ファージ RSL1 ゲノム (231, 255 bp) に検出した 343 個の遺伝子 (ORF) について、DNA マイクロアレイ法により感染期における発現性を調べ、初期遺伝子クラスター、早期遺伝子クラスター、中期遺伝子クラスター、後期遺伝子クラスターに分けマップ上に塗り分けた (図 1)。また発現領域 (強発現・弱発現)、非発現領域の塗り分けも出来た。有意発現遺伝子についてはその系統学的位置づけを ClustalW によって行った。これらの結果の一部については論文 (Virology, 398, 2010, 135-147) に詳述した。RSL1 ゲノムは遺伝子の配向性、遺伝子発現パターンから 4 つの領域に区別され、基本的に 2 種の異なるレプリコンの合体により進化したものと推定された。

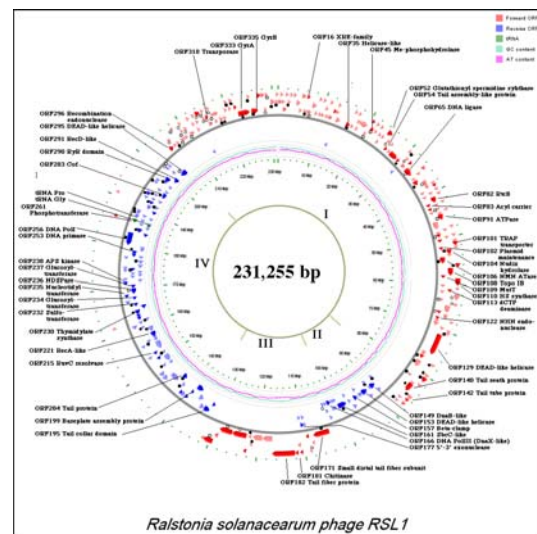


図1. 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* に感染する巨大ファージ RSL1 (ゲノムサイズ 231, 255 bp) のゲノム遺伝子マップ。遺伝子の配向性から I-IV の領域に区別できる。DNA マイクロアレイ解析の結果から 343 個の遺伝子のうち明確な初期-中期発現型 (白丸) と中期-後期発現型 (黒丸) を示すものを塗り分けてある。前者は領域 I, III に集中し、後者は領域 II-IV に集中した。

さらに、343 個の遺伝子の中で RSL1 の持続的感染期に特に強く発現する遺伝子 12 種を

DNAマイクロアレイ法で同定した(図2)。それらのうち3種(ORF106、NAD合成系遺伝子；ORF137、未知遺伝子；ORF179、holin遺伝子)を大腸菌にクローニングし、さらにpRSS13を用いて青枯れ病菌に導入し影響を調べた。ORF106は異なる菌株で増殖促進効果を示し、一方、ORF137は明確な増殖抑制を示した。

holin遺伝子は、大腸菌の増殖を阻害した。RSL1ファージ感染により宿主青枯れ病菌は運動性を失い、菌体外多糖、菌体外グルカナーゼ等病原因子を低下させ、トマトへの感染能力を完全に失った。RSL1ファージ感染は宿主菌を完全に溶菌することなく、ファージと菌体の共存状態が保持された(平衡状態)。この状態でファージ耐性菌の増殖をORF137のような増殖阻害因子が抑制していると推定された。すなわちRSL1の有する多くの遺伝子は、宿主菌の生理状態に作用し従来知られていないファージ・宿主菌共存状態の維持に働くと思われる。ファージと菌体の共存状態は結果的に植物に対する病原性の喪失につながり、安定

φRSL1-青枯れ病菌平衡状態(感染30h)におけるマイクロアレイ解析

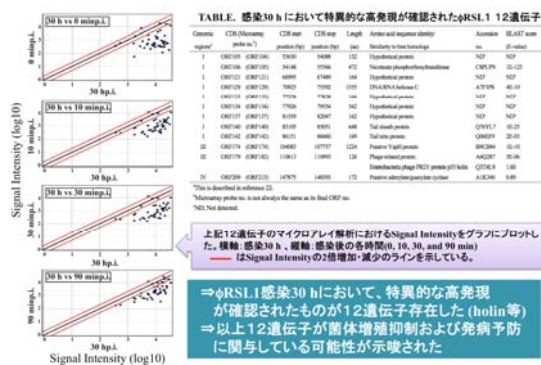


図2. 青枯れ病菌ファージRSL1感染後30h後、持続的平衡状態における高発現ファージ遺伝子の同定(DNAマイクロアレイ解析)。高発現する12遺伝子は、感染の何れの時期においても発現性が高く、ファージRSL1感染において重要な機能を有すると思われる。また、細胞内で単独に発現させた場合、ORF106、ORF137等は明らかに細菌の増殖を抑制し、耐性菌の出現と急激な増殖をコントロールする機能を有すると推定される。

的な青枯れ病のバイオコントロールを行うことができる。この青枯れ病菌の持続的コントロール効果は他のファージには見られないRSL1ファージ固有の特長であり、実用性の上から極めて興味深い。この結果について論文投稿し、米国微生物学会誌Appl Environ Microbiol誌に掲載受理された。

このように青枯れ病菌巨大ファージRSL1ゲノムに検出した343個の遺伝子に発現パター

ン塗り分け、機能解析の当初目的を達成できた。これらの結果について論文を作成し投稿中である(Appl Environ Microbiol)。また、DNAマイクロアレイ解析データはデータベースに登録済みである(GSM567022~GSM567026；GSE23017；GPL10654)。

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8件)

1. Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T., Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages.,Appl. Environ. Microbiol. 査読あり,2011, In press.
2. Askora, A., Kawasaki, T. Fujie, M., Yamada, T., Resolvase-like serine recombinase mediates integration/excision in the bacteriophage φRSM.,J. Biosci. Bioeng., 111,査読あり、2011,pp109-116.
3. 山田 隆 生物間相互作用(共生・寄生)の分子機構解析とバイオテクノロジーへの利用、日本生物工学会誌 88、査読なし、2010,pp48-53.
4. Fujie M.,Yamada, T. et al. Monitoring growth and movement of *Ralstonia solanacearum* cells harboring plasmid pRSS12 derived from bacteriophage RSS1, J. Biosci. Bioeng., 109, 査読あり、2010,pp153-158.
5. Yamada, T., Fujie, M. et al., A jumbo phage infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* defines a new lineage of the Myoviridae family, Virology,398, 査読あり、2010,pp135-147.
6. Ogura, K. Yamada, T. et al.,Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action, J. Biol. Chem.,284, 査読あり、2009, pp35572-35579.
7. Askora, A., Fujie, M., Yamada, T. et al., Host recognition and integration of filamentous phage RSM in the phytopathogen, *Ralstonia solanacearum*, Virology, 384, 査読あり、2009, pp69-76.
8. Kawasaki, T.,Fujie, M., Yamada, T. et al., Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage RSB1, a T7-like wide-host-range phage, J. Bacteriol., 191, 査読あり、2009,pp422-427.

[学会発表](計14件)

1. 濱崎良介、藤江 誠、山田 隆、他2名、巨大ファージ RSL1 と青枯れ病菌 *Ralstonia solanacearum* の相互作用に関する研究、2

011年3月27-29日、東京農工大学府中キャンパス

2. 藤澤真理子、藤江 誠、山田 隆、他2名、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、2011年3月27-29日、東京農工大学府中キャンパス

3. 磯崎里奈、藤江 誠、山田 隆、他2名、タバコ培養細胞 BY-2 を利用した青枯病感染モデル系の開発、平成22年度植物病理学会大会、2011年3月27-29日、東京農工大学府中キャンパス

4. 田坂友一、藤江 誠、山田 隆、他1名、青枯病菌の病原性を賦活化するファージ RSS1 の遺伝子解析、平成22年度植物病理学会大会、2011年3月27-29日、東京農工大学府中キャンパス

5. 小寺 星、藤江 誠、山田 隆、他2名、青枯病菌に感染する新奇バクテリオファージの探索と解析、日本生物工学会（第62回大会）、2010年10月29日、ワールドコンベンションセンターサミット宮崎

6. 清島恵介、藤江 誠、山田 隆、他3名、蛍光標識ファージを用いた青枯病菌検出キットの開発、日本生物工学会（第62回大会）、2010年10月29日、ワールドコンベンションセンターサミット宮崎

7. 藤原亜希子、藤江 誠、山田 隆、他2名、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* に感染する巨大バクテリオファージ RSL1 にバイオコントロールツールとしての有効性、日本生物工学会（第62回大会）、2010年10月29日、ワールドコンベンションセンターサミット宮崎

8. Kawasaki, T., Kiyoshima, K., Shiraishi, H., and Yamada, T., Detection of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* using bacteriophages, *Virus of Microbes*, 2010. 6. 24, Institut Pasteur, Paris, France

9. Fujiwara, A., Kotera S., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T., Comprehensive analysis of phage-tolerance mechanisms in *Ralstonia solanacearum*, *Virus of Microbes*, 2010. 6. 24, Institut Pasteur, Paris, France

10. Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T., Dynamic integration and excision of filamentous phage RSM in the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*, *Virus of Microbes*, 2010. 6. 22, Institut Pasteur, Paris, France

11. 藤原亜希子、藤江 誠、山田 隆、他1名、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* に感染するバクテリオファージの解析とバイオコントロールへの利用、日本生物工学会（第61回大会）、2009年9月24日、名古屋大学東

山キャンパス

12. 石川大生、藤江 誠、山田 隆、他2名、青枯病菌に感染する新奇バクテリオファージの探索と解析、日本生物工学会（第61回大会）、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス

13. 白石 悠、藤江 誠、山田 隆、他2名、繊維状ファージを利用した青枯病菌高感度検出キットの開発、日本生物工学会（第61回大会）、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス

14. 高本裕史、藤江 誠、山田 隆、他1名、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の植物体内における増殖ダイナミクスの蛍光モニタリング、日本生物工学会（第61回大会）、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス

〔図書〕（計1件）

1. Yamada Takashi, Bacteriophage Biocontrol: The *Ralstonia solanacearum* case. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, Trends in Bacteriophage Research (Adams H. T. ed.) 2009, 375-390.

〔その他〕

ホームページ等

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

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：