

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850027

研究課題名(和文)多犯性細菌防除のための宿主域可変型ファージセラピーの開発

研究課題名(英文) Isolation and characterization of novel phages infectious to *Pectobacterium* for phage therapy against wasabi soft-rot

研究代表者

平田 久笑(Hirata, Hisae)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：00432196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：清流を利用する沢ワサビの栽培においては農薬使用が難しく、細菌病の対策において溶菌性バクテリオファージによる生物防除法の開発が期待されている。ワサビ罹病組織およびワサビ田の水から複数のワサビ軟腐病菌と溶菌性ファージを分離し、生物防除への利用の可能性を検討した。分離できたファージはゲノム解読により多くはPodovirus科の新種であること、それらの宿主域は軟腐病菌のゲノム配列に基づくゲルピンと相関が認められ、細菌の迅速検出やファージタイピングに利用可能であることを示し、さらにファージ感受性が変化した宿主菌の変異株の作出によりファージ感染の宿主因子を同定し、ファージセラピー開発の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：Soft rot of Japanese horseradish (wasabi) is a seasonally serious disease caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* or some other soft rot bacteria. For preventing bacterial disease, phage therapy could be useful, especially in a wasabi field where agricultural chemicals cannot be applied. In this study, lytic phages infectious to some Pcc isolated from soft-rotted wasabi were found in a plaque assay. Sequencing of the phage genomic DNA suggested that each phage is new species of the family Podoviridae and some have similarities to other *Pectobacterium* phages reported in other countries. Mutational analysis against host bacteria was performed and host factors involved in lytic reaction were identified. It is also notable finding that their host range corresponds to the bacterial groups based on genetic differences, so that the phages are also useful for detection and classification of Pcc isolated from wasabi.

研究分野：植物病理学

キーワード：ワサビ軟腐病 バクテリオファージ

1. 研究開始当初の背景

溶菌性のバクテリオファージ(細菌ウイルスの総称、ファージ)は、動物では抗生物質に代わる細菌治療薬として、また植物では環境保全型の細菌病防除に利用され、これらはファージセラピーと呼ばれる。近年、気象や環境の変化、また栽培品種の多様化等によりワサビ軟腐病の発生事例は増加傾向にあるが、清流を利用する沢ワサビの栽培においては病害防除に農薬を使用できず、有効な防除方法が確立されていない。そこでワサビ軟腐病に対するファージセラピーの開発が期待されているが、病原細菌の発生生態やファージについての知見は乏しい。本研究では、「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業『環境に配慮したワサビにおける総合的作物管理システムの確立』(平成18~20年度)」の共同研究において、ワサビの軟腐病菌の病害調査と、病原菌およびその溶菌性ファージの分離に取り組んだ経緯から、それらのユニークな特性に着目し、ワサビ軟腐病のファージセラピー開発に向けた基盤構築を開始した。

2. 研究の目的

ワサビ軟腐病の罹病組織からは *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) の複数の系統が分離され、単一系統ではなく混在型の発病が確認された。ゲノム配列に基づく系統解析により Pcc ワサビ分離株は特徴的な細菌集団であることが示され、またゲノムDNAを用いた rep-PCR により Pcc ワサビ分離株は5グループに大別された。分離された細菌を指示菌としてファージ探索を行った結果、最初に単離されたファージ(F100、その後 PPWS1 と改名)は、グループ3に含まれる細菌の2分離株(No.127 および No.144)にのみ溶菌活性を示し、同種近縁系統である他の4グループの細菌には感染しない。このような高い宿主特異性が見出されたことから、特徴的な宿主決定のパターンとメカニズムを有していることが予想された。

本研究では、まず Pcc ワサビ分離株のファージ探索を行い、それらの宿主範囲を検証すること、そして分離されたファージおよび細菌系統間における比較解析により、ファージの性状や溶菌能を調べることで、また宿主細菌へのトランスポゾン挿入によりランダム変異株を作出し、ファージ感染と宿主決定に関わる因子を同定することを試みた。また細菌の獲得免疫と考えられる CRISPR/Cas システムがファージ耐性をもたらすことが報告されていることから、Pcc ワサビ分離株のファージ感受性との関連についても考察した。さらに同定された宿主因子と相互作用するファージ側因子を探索することにより、Pcc ワサビ分離株のグループを超えて溶菌性を示す宿主域可変型ファージの作出を目指し、基

盤的知見の蓄積に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) バクテリオファージの分離と同定

ワサビ罹病組織およびワサビ田の水から、ワサビ軟腐病の病原細菌(主として、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pcc) を分離するとともに、それらを指示菌として、同サンプル(ワサビ罹病組織の粗抽出液およびフィルター濃縮したワサビ田の水)のクロロホルム処理液をブランクアッセイに供試し、溶菌性バクテリオファージを探索した。指示菌としては、先行研究から保存されていた Pcc ワサビ分離株も含め、多様な Pcc 系統を用いてブランクアッセイを行い、宿主範囲が異なる複数のファージを分離した。

(2) バクテリオファージの性状解析

単離精製したファージを、ある一定の温度もしくは pH の条件下においた後に、ブランクアッセイを行うことによりファージの生存率を調べ、温度や pH に対する耐性を調べた。また、ファージおよび宿主細菌の組み合わせを変えてファージの感染サイクルや、経過時間ごとの増殖程度を比較し、溶菌に至る最適条件を調べた。

(3) Pcc ワサビ分離株の溶菌変異株の作出

Pcc ワサビ分離株へのトランスポゾン(EZ-Tn5 <KAN-2>)挿入によりファージ感受性が変化した変異株を、溶菌活性に基づき選抜した。

(4) ゲノム解読

ワサビ軟腐病菌および分離できた溶菌性ファージの一部について、ゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解読を行った。さらにファージのゲノム情報をもとに系統学的な解析を行い、種や属の同定と、分類学的な位置づけを考察した。また宿主細菌の野生株、および変異株についてもゲノム比較を行い、ファージ感受性に関わる遺伝子領域を特定した。

4. 研究成果

(1) 静岡県内で採集されたワサビ軟腐病の罹病組織より複数種の Pcc を、またワサビ田の水からも、それら Pcc の溶菌性ファージを分離できた。Pcc ワサビ分離株は、先行研究にて rep-PCR により凡そ5グループに大別できることが示されている。本研究にて、分離された複数のファージの宿主範囲を調べたところ、それぞれ rep-PCR のグルーピングとの相関が認められた。すなわち、分離できたファージそれぞれが rep-PCR の特定グループの細菌のみを溶菌することが示され、最初に分離できたファージと同様に、高い宿主特異

性があることを検証できた。また、プラークアッセイにより rep-PCR に相当する Pcc ワサビ分離株の分類と同定が可能であることが示唆され、ファージタイピングにも有用であることが示された。

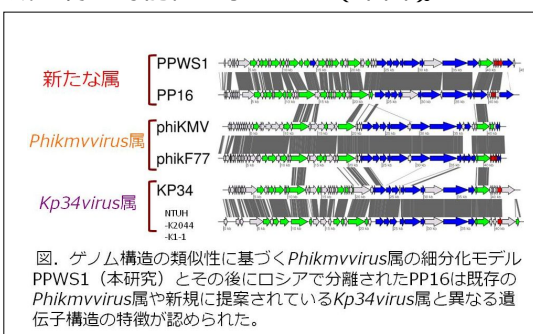
(2) Pcc ワサビ分離株の溶菌性ファージの特性を調べた結果、他の植物病原細菌のファージと同様な pH 耐性域を有する一方、温度に関しては高温域での耐性が低いことがわかり、冷涼なワサビ田の環境に由来する性質を有することが推測された。ファージの特性を知ることは、ファージセラピー開発のための基盤的知見にもなると考えられ、温度耐性の機構についてもさらなる解析が必要であると考えている。またファージの増殖レベルを宿主細菌間で比較すると、rep-PCR の同一グループ内の細菌間にも差が認められ、ファージの感染サイクルにおいて宿主細菌に吸着した後も、その後の感受性や溶菌の程度を調節する因子の相互作用があることが示唆された。

(3) Pcc ワサビ分離株のトランスポゾン変異株を作出し、ファージ感受性の程度によりスクリーニングした。これら変異株の溶菌反応が低下、あるいは消失した原因としては、宿主細菌への吸着ができない、宿主細菌に吸着した後にファージの遺伝子発現に至らない、溶菌酵素の生産レベルもしくは活性が低下している等の可能性が考えられた。吸着試験、およびファージ感染後の発現遺伝子の解析、さらにゲノム解読により、溶菌に関わる宿主因子を同定した。

(4) ゲノム解読と系統解析
本研究にて分離されたファージのうち、PPWS1 と PPWS4 については全ゲノム (アクセッション番号: LC063634、LC216347) を解読した。ORF 検出と機能予測を行い、複製酵素関連遺伝子 (RNA polymerase) や構造タンパク質 (capsid protein) などの遺伝子配列をもとに系統解析を行った結果、PPWS1 と PPWS4 はいずれも *Podovirus* 科のそれぞれ *Phikmvvirus* 属と *T7virus* 属に分類される可能性が示された。その後、国外で分離された *Pectobacterium* 属細菌のファージのゲノム登録数が増えたことから、改めて系統学的な解析と配列類似性を調べた結果、PPWS1 はロシアで分離されたファージの PP16 と、また PPWS4 は PP81 と近縁であることが確認された。PPWS1 や PPWS4 は、それぞれ Pcc ワサビ分離株の異なるグループの細菌を溶菌する。そのような宿主特異性が高いファージと近縁なファージが国外でも分離されたことは、同様に宿主細菌も近縁である可能性が推測され、つまり Pcc ワサビ分離株と同様な病原細菌がロシアでも発生している可能性が示唆された。これらは病原細菌およびファージの発生生態と進化を考察する上でも重要な知見で

あると考えられる。

また、PPWS1 を含むと想定される *Phikmvvirus* 属の一部は *Kp34virus* 属として細分化されることが近年提案されている (Eriksson et al., 2015)。ゲノム配列の類似性の他、溶菌関連遺伝子の種類や並び順等に基づく新たな基準を指標に解析されており、この点でも PPWS1 と近縁種 PP16 における類似性が確認された。さらに *Phikmvvirus* 属の他種ファージと比較すると、*Pectobacterium* 属細菌である PPWS1 と PP16 にも特徴的なゲノム構造が見出され、*Phikmvvirus* 属から細分化され新たな属を構成し得る可能性が示された (下図)。



(5) 分離されたファージを用いて、軟腐病の防除効果を検証した結果、溶菌ファージのいずれも感染組織内で Pcc の菌密度を低下させることを確認した。

本研究では、Pcc ワサビ分離株のファージを同定し、それぞれが Pcc ワサビ分離株の特定のグループ細菌を宿主とする溶菌性ファージであることを示した。また宿主決定や溶菌の程度に関わる因子を同定し、ファージ感染のメカニズムについて知見を蓄積することができた。分離できた溶菌性ファージは、それぞれが Pcc ワサビ分離株の主要な系統を溶菌することから、ファージカクテルとしてもファージセラピーへの利用の可能性が考えられる。同定された宿主因子の改変も含めて今後さらに効率的なワサビ軟腐病のファージセラピーを検証する計画である。

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 3 件)

Haque M M, Oliver M M H, Nahar K, Alam M Z, Hirata H, Tsuyumu S. CytR homolog of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* controls air-liquid biofilm formation by regulating multiple genes involved in cellulose production, c-di-GMP signaling, motility, and type III secretion system in response to nutritional and environmental signals.

Front. Microbiol. 2017 (in press) 査読有
https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00972

Hirata H, Kashihara M, Horiiike T, Suzuki T, Dohra H, Netsu O, Tsuyumu S. Genome sequence of *Pectobacterium carotovorum* phage PPWS1, isolated from Japanese horseradish [*Eutrema japonicum* (Miq.) Koidz] showing soft-rot symptoms. Genome Announc. 2016, 4(2); e01625-15 査読有
doi: 10.1128/genomeA.01625-15
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4841149/

Haque M M, Hirata H, Tsuyumu S. SlyA regulates *motA* and *motB*, virulence and stress-related genes under conditions induced by the PhoP-PhoQ system in *Dickeya dadantii* 3937. Res Microbiol. 2015, 166(6): 467-75. 査読有
doi: 10.1016/j.resmic.2015.05.004.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26027774

〔学会発表〕(計 4 件)

柏原美紗子・大津菜文・青木雄太・平田久笑、静岡県内で分離されたワサビ軟腐病菌の溶菌性バクテリオファージについて、平成 29 年度日本植物病理学会大会 (2017 年 4 月 26 日~28 日、岩手県盛岡市、アイーナ・いわて県民情報交流センター)

柏原美紗子・大津菜文・西島卓也・堀池徳祐・平田久笑、ワサビ軟腐病菌の溶菌性ファージの分離と同定、平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会 (2016 年 9 月 29 日~30 日、静岡県静岡市、静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ)

柏原美紗子・道羅英夫・堀池徳祐・鈴木智大・平田久笑、ワサビ軟腐病菌を宿主とするバクテリオファージ F100 の全ゲノム解析、平成 27 年度日本植物病理学会大会 (2015 年 3 月 28 日~31 日、東京都千代田区、明治大学)

柏原美紗子・藤代京・露無慎二・平田久笑、ワサビ軟腐病菌を宿主とするバクテリオファージ F100 の性状解析、平成 26 年度日本植物病理学会大会 (2014 年 6 月 2 日~4 日、北海道札幌市、札幌コンベンションセンター)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 久笑 (HIRATA, Hisae)
静岡大学・農学部・准教授
研究者番号 : 00432196

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

道羅 秀夫 (DORA, Hideo)
堀池 徳祐 (HORIIEKE, Tokumasa)
西島 卓也 (NISHIJIMA, Takuya)