

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870399

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) A filamentous phage affects host pathogenicity according to phage infection stage.

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) 3,100,000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。この病原菌は灌漑用水等によって容易に拡散してしまう上、土の中で長期にわたって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。繊維状ファージRSS1の感染によって青枯病菌の病原性が增强されることを以前報告した。そこでこのファージについて、感染/溶原化状態における宿主への影響を調べた。

また、このファージが溶原化/誘発する条件について調べ、誘発は凍結融解ストレスやRSL1ファージ感染で引き起こされることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Ralstonia solanacearum is a causative agent of lethal bacterial wilt more than 200 species in 50 botanical families, including economically important crops. R. solanacearum is easily spread via contaminated irrigation water and can survive for many years in the soil.

Recently, there are some reports of host behavioral change caused by lysogenic phage infection. In the case of R. solanacearum, we reported a filamentous phage RSS1 infection increase the host pathogenicity. So we tried to research host pathogenicity change according to phage infection stage, lysogenic cycle and active propagate stage.

And we also tried to find the integration/induction conditions of RSS1 phage. We succeeded to detect induced RSS1 phage under freeze-thaw condition and RSL1 infected condition.

研究分野：農学

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

溶原性ファージは、溶菌サイクルと溶原化サイクルの両方を行う。溶原化の際には宿主のゲノムに潜伏するが、一方的に寄生するだけでなく、宿主の生存、伝播に有利な形質を付与する例も報告されている。

M13 ファージ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 年前後から様々な病原菌において溶原化の報告がなされるようになってきた。これら繊維状のファージによる病原性の変化に関する研究は動物の病原菌においても始まったばかりであり植物病原菌についての研究は我々のグループによるものが初めての報告である。

感染した青枯病菌の病原性を増強させる RSS1 ファージのゲノムをプローブとして 15 株の青枯病菌ゲノムに対するサザン解析を行ったところ 14 株からシグナルが得られ、自然界において、このファージと宿主は非常に密接な関係を持つ物と予想された。

また、RSS1 が溶原化している青枯病菌 C319 株にストレスを与えファージの誘発を試みたところ、非常に低頻度であるが誘発に成功した。ところが得られたのは RSS1(6662 nt)だけではなく RSS0(7288 nt)も得られた。このことからこのファージのゲノムからの切り出され方は 2 タイプあることが判明した。この RSS0 ファージは RSS1 とは異なり、感染した宿主の病原性を減少させることが判明し、延長された 626 nt の領域に何らかの原因があることが予想された。

2. 研究の目的

感染した宿主の病原性を増強させる RSS1 ファージ(6662 nt)と、減少させる RSS0 ファージ(7288 nt)についてその原因を探索する。延長された 626 nt の領域には DNA-binding transcription regulator

protein と相同性を示す ORF13 がコードされていた。この遺伝子をファージあるいはプラスミドに導入し、宿主に形質転換し、宿主の生理活性変化(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、病原性等)を解析し、これにより ORF13 およびファージ感染、溶原化による宿主への影響を解析する。

また、自然界において宿主との密接な関係が予想される RSS タイプのファージについて、その溶原化と誘発の条件についても検討する。

3. 研究の方法

RSS0 ファージにコードされる ORF13 (156 aa) の内部には dif site に類似する配列(1 bp 異なり T A)が存在しておりこの site を用い、宿主の Xer C/D 系によりファージは溶原化する。さらに、dif site とは 1 bp 異なることで溶原化後、132 番目のアミノ酸が Lys (AAA) Stop (TAA) と変化し、ORF13 は短く(131 aa)なる(以下短縮型 ORF13)。そこで、この ORF13 のアミノ酸配列を変えず、別コドンを使用した改変 ORF (ORF13') を作製した。方法は、改変配列プライマーを用い PCR により RSS0 ファージを鋳型として行った。ライゲーション後、エレクトロポレーション法により宿主菌株に導入し、ブラクアッセイ法によるブランクの確認、及び改変ファージの単離を行った。改変ファージ取得後、DNA を抽出し、シーケンス解析による確認を行った。同様にプラスミドも作製した。これらを宿主に感染/導入し、生理活性の変化を確認した。また溶原化株や感染株に対して、凍結融解ストレスや乾燥ストレスなどを与え、ファージの誘発/溶原化条件について検討した。

4. 研究成果

「コドン変化させた完全長の ORF13' を保持する RSS0 (ORF13') ファージの作製」
「コドン変化させた短縮型の ORF13' を保

持する RSS0 (ORF13') ファージの作製」を行った。改変プライマーを用いインバース PCR により改変ファージ全長を取得した。ライゲーション後、エレクトロポレーション法により宿主菌株に導入し、ブランクアッセイ法によるブランクの確認及び改変ファージの単離を行った。改変ファージゲノム DNA を取得し、シーケンス解析による確認を行ったところ多くの株はポイントミューテーションにより意図しない変異型になっていたが、望む配列の株も取得できた。ただし、意図しない変異型が多数現れる場合は、何らかの不都合な現象が起きている場合が多く懸念された。実際に未感染の宿主、野生型ファージ感染青枯病菌、ORF13 改変ファージ感染青枯病菌について比較を行ったところ、野生型ファージ、ORF13 改変ファージの何れも、運動性の低下や細胞の凝集性、バイオフィーム形成能の向上がみられ、ORF13 とこれらの現象との関連性は低いことが予想された。一方で病原性については安定せず ORF13 との関連性を断定できなかった。ORF13 の発現コントロールが必要と予想された。

Lac プロモーターによる発現制御を行える ORF13 発現プラスミドの構築も行ったが、漏出が大きく安定しないことが判明した。コールドショックプロモーター等、より厳密に制御されるプロモーターを利用する必要がある。

RSS タイプファージの溶原化/誘発については、その条件は知られていなかったが、今回の研究でいくつかの条件を発見した。

誘発については、凍結融解の繰り返しや、RSL1 ファージ感染により引き起こされる場合があった。ストックセンターから分与される青枯病菌からは溶原化した RSS タイプファージのみが検出され、プラスミド状態で複製される活性化ファージは確認されていない。このことから、溶原化について

L-乾燥法を疑った。実際に L-乾燥法を行ったところ、プラスミド状態で活動するファージを擁する宿主は生存率が低いことが判明した。

これらについてまとめた。この研究期間に論文 6 報を発表した。

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 6 件)
全て査読あり

1. Kawasaki, T., E. Narulita, M. Matsunami, H. Ishikawa, M. Shimizu, M. Fujie, A. Bhunchoth, N. Phironrit, O. Chatchawankanphanich and T Yamada. 2016

Genomic diversity of large-plaque-forming podoviruses infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*.

Virology. 492:73-81

10.1016/j.virol.2016.02.011

2. Narulita, E., H. S. Addy, T. Kawasaki, M. Fujie and T. Yamada. 2016

The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in phage infection in *Ralstonia solanacearum*

Biochem. Biophys. Res. Comm. 469:868-872.

10.1016/j.bbrc.2015.12.071

3. Hida, A., S. Oku, T. Kawasaki, Y. Nakashimada, T. Tajima, and J. Kato. 2015

Identification of the *mcpA* and *mcpM* Genes Encoding Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins (MCPs) for Amino Acids and L-Malate and Involvement of *McpM*-mediated Chemotaxis in Plant

Infection by *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum*).

Appl. Environ. Microbiol. 81(21):7420-7430
doi: 10.1128/AEM.01870-15. Epub 2015 Aug 14.

4. Bhunchoth, A., N. Phironrit, C. Leksomboon, O. Chatchawankanphanich, S. Kotera, E. Narulita, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2015

Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents

J. Appl. Microbiol. 118: 1023-1033
doi: 10.1111/jam.12763.

5. Ahmad, A., A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2014

The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the causative agent of citrus canker disease.

Front Microbiol. Jul 1;5:321.
doi: 10.3389/fmicb.2014.00321

6. Askora, A., T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2014.

Insights into the diversity of ϕ RSM phages infecting strains of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* complex: regulation and evolution

Mol. Genet. Genom. 2014 Aug, 289(4):589-598 (Mar 12)

doi: 10.1007/s00438-014-0835-3

〔学会発表〕(計 7件)

1. 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26-28 日城山観光ホテル(鹿児島市)

Importance of PilQ in *Ralstonia solanacearum* on the infection by several types of bacteriophage

Erlia Narulita, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada

2. 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26-28 日城山観光ホテル(鹿児島市)
宿主病原性に影響を与える溶原性繊維状ファージ RSS の溶原/誘発機構の解析
川崎 健, 藤江 誠, 山田 隆

3. 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26-28 日城山観光ホテル(鹿児島市)
青枯病菌に感染するジャンボファージの解析と青枯病防除への利用
松井 健, 山田 隆, 川崎 健, 藤江 誠

4. 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26-28 日城山観光ホテル(鹿児島市)
ファージを利用した青枯病防除技術の開発:ジャンボファージ及び T7 型ファージの有効性
安田 太輝, 山田 隆, 藤江 誠, 川崎 健

5. 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26-28 日城山観光ホテル(鹿児島市)
カンキツかいよう病菌に感染する大型ファージ XacN1 の特徴づけとバイオコントロールへの利用
河部 誠, Ahmed Askora, 山田 隆, 川崎 健, 藤江 誠

6. 第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 9-11 日札幌コンベンションセンター(札幌市)
青枯病菌とファージのダイナミックな相互作用の解析

園元 貴也, 川崎 健, 藤江 誠, 緒方 博之, 山田 隆

7. 第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 9-11 日札幌コンベンションセンター(札幌市)

幌市)

Isolation and genomic characterization
of new T7-like phages infecting
Ralstonia solanacearum from Thailand
Erlia Narulita, Takaya Sonomoto, Takeru
Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada

〔その他〕

ホームページ等

<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・大学院先端物質科学研究科・

助教

研究者番号：00510299