

氏名	とうるん てい びっち う` あん TRUONG THI BICH VAN
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第735号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Studies on <i>Ralstonia solanacearum</i> Bacteriophages (青枯病菌バクテリオファージに関する研究)
審査委員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 功刀 滋 教授 村上 章

### 論文内容の要旨

申請論文は「序論」、第1章「病原性青枯病細菌に感染する3種類のバクアテリオファージ  $\phi$ RS138、 $\phi$ RS6111 および  $\phi$ RS603 の単離と特性解析」、第2章「繊維状青枯病細菌ファージ  $\phi$ RS6111 および  $\phi$ RS603 のゲノム解析」、第3章「*Siphoviridae* 科に属する青枯病細菌ファージ  $\phi$ RS138 のゲノム解析」、第4章「 $\phi$ RS603 ゲノムの青枯病細菌ゲノムへのインテグレーション部位の分析」、第5章「 $\phi$ RS138 感染における青枯病細菌のタンパク質変化の解析」および「結論」から構成されている。

序論では、本論文の背景と目的を述べている。バクテリオファージ(以下ファージ)は細菌に感染するウイルスである。まず、ファージのライフサイクル、分類およびその利用等を概説するとともに、ナス科植物に青枯病を引き起こす青枯病細菌を解説している。さらに、ファージを生物農薬として利用することによる青枯病制圧の可能性に言及するとともに、本研究の目的を述べている。

第1章では、青枯病細菌に感染するファージの取得を目指している。ファージ単離の初期段階で、青枯病が発生したトマト畑の土壌に3系統の青枯病細菌混合物を添加し、培養することによってファージを増殖させるという工夫を行った。得られた粗精製ファージ画分から、単一系統の青枯病細菌を用いたプラーク法による精製を繰り返し、3種類の青枯病細菌ファージ  $\phi$ RS138、 $\phi$ RS6111 および  $\phi$ RS603 の単離に成功した。9系統の青枯病細菌を用いた解析の結果、 $\phi$ RS138 は他の2種とは異なる宿主特異性を示した。また、 $\phi$ RS603 と  $\phi$ RS6111 は似通った宿主特異性を示したが、 $\phi$ RS603 の宿主特異性は  $\phi$ RS6111 よりも広いことを明らかにした。STEM による形態観察の結果、 $\phi$ 138 は正20面体の頭部とフレキシブルな尾部を持つ *Siphoviridae* 科に属し、 $\phi$ RS6111 と  $\phi$ RS603 は *Inoviridae* 科に属する繊維状ファージであることを明らかにした。

第2章では、繊維状ファージ  $\phi$ RS6111 と  $\phi$ RS603 のゲノムを解析した。両ファージのゲノムを単離し、各種酵素を用いた分析の結果、両ファージゲノムは環状一本鎖DNAであることを確かめた。全ゲノム配列を解析した結果、 $\phi$ RS6111 のゲノム配列は他グループが報告している青枯病細菌ファージ  $\phi$ RSS0 や  $\phi$ RSS1 のゲノムと非常に高い相同性を持つものの、約900塩基が欠失した変異体であった。一方、 $\phi$ RS603 のゲノム配列は他グループが報告している青枯病細菌ファージ

$\phi$ RSM1 や  $\phi$ RSM3 のゲノムと高い相同性を示した。しかし、 $\phi$ RSM1 および  $\phi$ RSM3 において ORF14 にコードされているインテグラーゼおよびインテグレーション部位 *attP* を欠失していることが明らかとなった。また、 $\phi$ RS603 の ORF11 は  $\phi$ RSS1 の ORF10 と相同性を示し、 $\phi$ RS603 は  $\phi$ RSS 系統と  $\phi$ RSM 系統のファージ間の進化的中間体であることが明らかになった。

第3章では、*Shiphoviridae* 科に属する  $\phi$ RS138 の全ゲノム配列を決定した。 $\phi$ RS138 ゲノムは約 42 kbp からなる 2 本鎖 DNA であり、56 個の推定 ORF を有していた。ゲノムはその相同性から 3 つの領域に分けられ、5' 末端側は青枯病細菌 K60-1 の染色体 DNA、中央部は *Pseudomonas* ファージのゲノム DNA、3' 末端側は他の青枯病細菌系統 CMR15 の染色体 DNA との相同性を持つことを明らかにした。これは、ファージの分子進化の過程を示す興味深い結果である。また、本成果は、*Shiphoviridae* 科に属する青枯病細菌ファージの最初の全ゲノム配列の決定である。

第4章では、 $\phi$ RS603 ゲノムのインテグレーション部位 *attP* の解析を行った。第2章で明らかにしたように、 $\phi$ RS603 ゲノムはインテグレーションおよび *attP* を欠失している。近年、青枯病細菌 IPO1609 のゲノム配列が報告されたことから、 $\phi$ RS603 ゲノム配列と詳細に比較した結果、 $\phi$ RS603 の ORF11 をコードする遺伝子領域と青枯病細菌 IPO1609 ゲノム中のプロファージ遺伝子の間で相同性が認められ、約 46% の一致を示すことを見出した。そこで、 $\phi$ RS603 の ORF11 遺伝子に *attP* が含まれているという仮説を立て、*attP* の解析を進めた。 $\phi$ RS603 の宿主である青枯病細菌 MAFF 106603 のゲノム配列が明らかにならなかったため、まず青枯病細菌 IPO1609 のプロファージ遺伝子をもとにプライマーを設計し、青枯病細菌 MAFF 106603 ゲノムの配列を解析した。その結果、青枯病細菌 MAFF 106603 も  $\phi$ RS603 の ORF11 遺伝子と相同なプロファージ遺伝子を持つことを見出した。さらに、青枯病細菌 MAFF 106603 のプロファージ遺伝子と  $\phi$ RS603 の ORF11 遺伝子の間に完全に一致する配列が存在し、その配列は *dif* 配列と相同性を持つことを見出した。*dif* 配列は他の菌のファージ感染におけるインテグレーション部位として知られており、宿主のチロシンリコンビナーゼ XerC/D の結合部位であることが知られている。したがって、 $\phi$ RS603 のインテグレーションは、 $\phi$ RS603 の ORF11 遺伝子に存在する *dif* 配列と青枯病細菌 MAFF 106603 ゲノムのプロファージ遺伝子に存在する *dif* 配列の間で起こり、宿主青枯病細菌の XerC/D チロシンリコンビナーゼによって触媒されるものである可能性を明らかにした。

第5章では、 $\phi$ RS138 の感染によって青枯病細菌内で起こるタンパク質の変化を SDS-PAGE によって解析し、感染に伴って消失するタンパク質を見出した。アミノ酸配列分析により、消失タンパク質は sulfate-binding signal peptide protein であることを明らかにした。

結論では、第1章から第5章で得られた結果を要約した。

## 論文審査の結果の要旨

バクテリオファージ（以下ファージ）はバクテリアに感染するウイルスであり、バクテリア感染症の治療等への応用が期待されている。一方、青枯病細菌はナス科植物に青枯病を引き起こす原因細菌であり、経済的に重要な農作物が被害にあうためにその防除法の開発が希求されている。本研究は、青枯病の防除に応用可能なファージを単離し、その特性解析、ゲノム解析などを行ったものである。

ファージを単離する手順に工夫を加え、青枯病が発生したトマト畑の土壌から  $\phi$ RS138、 $\phi$ RS6111 および  $\phi$ RS603 の単離に成功した。形態観察の結果、 $\phi$ 138 は正 20 面体の頭部とフレキシブルな尾

部を持つ *Siphoviridae* 科に属し、 $\phi$ RS6111 と  $\phi$ RS603 は *Inoviridae* 科に属する繊維状ファージであることを明らかにした。

得られたファージ3種の全ゲノム配列を決定した結果、 $\phi$ RS6111 と  $\phi$ RS603 はいずれも環状一本鎖を持ち、他グループが報告しているファージのゲノムとの高い相同性が認められた。しかし、 $\phi$ RS603 ゲノムはインテグラーゼ遺伝子およびインテグレーション部位 *attP* を欠失しており、ゲノム配列の高い相同性にも関わらず、報告されているファージとは異なるインテグレーション機構を有することを明らかにした。 $\phi$ RS603 ゲノムと青枯病細菌ゲノムとの相同性を解析した結果、両ゲノム中に *dif* 配列と相同な領域を発見した。*dif* 配列は他の菌のファージ感染の際のインテグレーション部位として知られており、宿主のチロシンリコンビナーゼである XerC/D によってファージゲノムは宿主ゲノムに挿入されることが知られている。これらより、 $\phi$ RS603 のインテグレーションは、 $\phi$ RS603 の ORF11 遺伝子に存在する *dif* 配列と青枯病細菌 MAFF 106603 ゲノムのプロファージ遺伝子に存在する *dif* 配列の間で起こり、宿主青枯病細菌の XerC/D チロシンリコンビナーゼによって触媒される可能性を明らかにした。

また、 $\phi$ RS138 のゲノムは約 42 kbp からなる 2 本鎖 DNA であった。その配列の相同性から 3 つの領域に分けられ、5'末端側は青枯病細菌 K60-1 の染色体 DNA、中央部は *Pseudomonas* ファージのゲノム DNA、3'末端側は他の青枯病細菌系統 CMR15 の染色体 DNA との相同性を持つことを明らかにした。これは、ファージの分子進化の過程を示す興味深い結果である。また、本成果は、*Siphoviridae* 科に属する青枯病菌ファージの最初の全ゲノム配列の決定である。

これらの知見は、ファージを活用した青枯病細菌防除法の開発のための基盤となるとともに、ファージの分子進化に関する重要な情報を与えるものとして、その意義は高く評価できる。

本論文の内容は、査読制のある国際的学会誌にすでに発表済みの下記の 2 編の論文を基礎としている。なお、いずれも申請者が筆頭著者である。

- 1) **Van, T.T.,** Yoshida, S., Miki, K., Kondo, A., and Kamei, K. Genomic characterization of  $\phi$ RS603, a filamentous bacteriophage that is infectious to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiol. Immunol.*, 58 (12), pp. 697-700 (2014)
- 2) **Van, T.T.,** Yoshida, S., Miki, K., Kondo, A., and Kamei, K. Complete genome sequence of a filamentous bacteriophage, RS611, that infects the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Arch. Virol.*, 160 (3), pp. 865-867 (2015)