

青枯病菌のファージによるバイオコントロール： 巨大ファージ RSL1 の有効性

藤原 亜希子・藤澤 真理子、川崎 健、藤江 誠、山田 隆
 広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻 生命分子情報学 G
 〒4739-8530 東広島市鏡山 1-3-1 電話: 082-424-7752
 Fax: 082-424-7752 E-mail: tayamad@hiroshima-u.ac.jp

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激に再燃している。すでにファージによる多剤耐性菌感染治療の成功例が蓄積し、本年 6 月のパスツール研究所（フランス）における微生物ウイルス国際学会の主要トピックスとなり、大きな潮流が起ころうとしている。本研究では、農業分野で大きな問題となっている青枯病のコントロールをめざして、ファージを利用した「診断・予防・防除」システムの開発を目指している。特に巨大ファージ RSL1 を用いた持続的な病原菌制圧と植物予防効果において良い結果が得られた。

1. はじめに

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の研究・技術開発が欧米を中心に急激に再燃している [1, 2]。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 33 科 200 種以上の植物に感染し、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。まず、(1) 自然界からの多種のファージの分離、(2) ゲノム解読によるファージの高度な特徴付け、(3) ゲノム情報をもとにした感染特性・宿主との相互作用の分子基盤の理解のもと

に、ファージの特性を生かした青枯病菌バイオコントロール技術「診断・予防・防除」の開発を行った [3, 4]。

2. 材料及び方法

(1) バクテリオファージ

「診断・予防・防除」を効率的に行うために多様なファージを自然界から分離し、ファージ特性、宿主域、ゲノム解読、安定性等について基礎情報を得た。これまでに計 12 種のファージのゲノム解読を終了している。RSL1 は巨大 Myovirus であり、広い宿主域を示す [5]。

(2) ゲノム解析、マイクロアレイ解析

ファージ RSL1 について、そのゲノム 231,255 bp を決定し 343 個の ORF を検出した (AB366653)。DNA マイクロアレイ (40 x 55) を作製し、感染後 0, 10, 30, 90, 1,800 min p.i. の遺伝子発現パターンを取得している (GSM567022-GSM567026)。

(3) トマト感染実験と植物内細菌モニタリング

トマト (大型福寿) 種子を寒天培養プレート内で発芽させ、実生 (7 日齢) の主根先端切れ目より各種青枯病菌株を接種した。ファージは接種 12-24 h 前に植物に投与した。GFP 標識細菌の経時追跡は独自開発の方法に従った [6, 7, 8]。生存株は土壌に移しポット栽培した。

3. 結果と考察

(1) RSL1 感染による持続的細菌増殖抑制

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、早期に溶菌した場合、約 30 時間後に耐性菌の出現が顕著となる。しかしながら RSL1 を用いた場合、適当な条件でのファージ投与により、増殖抑制は実験室条件下 2 週間以上も継続した (図 1)。すなわち、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 感染下では細菌の増殖とファージによる溶菌が平衡状態にあると解釈される。

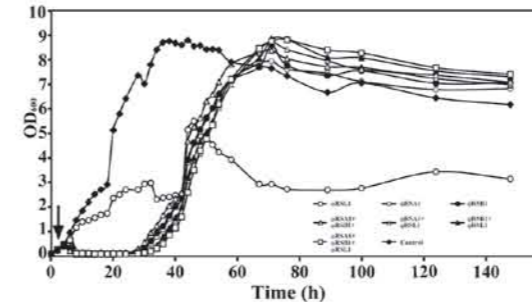


図 1 青枯病菌の増殖に及ぼすファージの影響。対数増殖初期 ($OD_{600}=0.3$ 、矢印) に単独、もしくは混合剤 (cocktail) としてファージを添加した。

(2) DNA マイクロアレイ解析

RSL1 感染による持続的細菌増殖抑制を理解するために、RSL1 の 343 個の遺伝子について感染時発現パターンの比較を行った。基本的にこれら遺伝子は感染早期発現型と後期発現型に分かれるが、感染後 30 時間以降で特に発現が促進される遺伝子 12 個を特定した。これら遺伝子は、他のファージには見られない独自のものが多く、宿主の増殖制御と同時にファージ自体の増殖制御に関与する可能性があり極めて興味深い。

(3) 感染モニタリングとファージ効果

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検証した。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 時間で菌体の主根から漏出し、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。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。

(4) ファージ安定性

ファージを現場で使用する場合、自然環境下における安定性のデータが必要となる。上記、トマト 2 被験体から 4 ヶ月後、ファージの検出を行った。2 被験体とも根部、根圏土壌から一定量の RSL1 ファージが安定的に検出できた。また土壌存在下でのファージの安定性に及ぼす温度の影響を調べた。上記 3 種のファージを比較したが、28°C 間では大差なく 37°C で RSA1 はかなり不安定となり、50°C で明らかに RSL1 が高い温度耐性を示した (図 2)。このように RSL1 は環境下における持続性も保持している。

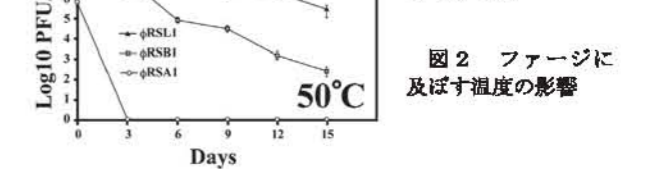


図 2 ファージに及ぼす温度の影響

4. 今後の展望

従来多くの議論があるように、ファージと宿主菌の間には arms race の関係があり、相互に耐性と新たな感染性を生む仕組みを有する。宿主とファージ双方のゲノム情報が利用できる現在、この仕組みが繰り返されるパターンを理解し、パターンに応じたファージセットを整備することが持続的バイオコントロールには必要である。本研究で示した RSL1 のような特長あるファージを選抜することも大切で、単に溶菌ファージの cocktail を用いた短期処理は必ずしも良い結果をもたらさない。青枯病対策にはファージを圃場に散布する必要は無く、ポット苗を処置するのみで十分と思える。

参考文献

- [1] Merril, C R, *et al.*: Nature Rev. Drug Disc. 2, 489-497 (2003)
- [2] Hausler T: Viruses vs Superbugs: a solution to the antibiotic crisis? Palgrave Macmillan (2006).
- [3] Yamada T, *et al.*: Microbiology 153, 2630-2639 (2007)
- [4] Yamada T: Contemporary Trends in Bacteriophage Research (Adams, T. A. ed.), Nova Science Publishers, Inc. pp.375-390 (2009)
- [5] Yamada T, *et al.*: Virology 398, 135-147 (2010)
- [6] Kawasaki T, *et al.*: J. Biosci. Bioeng., 104, 451-456 (2007)
- [7] Fujie M, *et al.*: J. Biosci. Bioeng. 190, 153-158 (2010)
- [8] <http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/ichikou/itikouindex.html>