

青枯病防除に使用するバクテリオファージの形態観察

瀧川 義浩¹、浅尾 教史²

要 旨

本研究は青枯病防除の生物防除資材であるバクテリオファージ（ファージ）の形態を透過型電子顕微鏡により観察を行った。これらのファージは、その形態的特徴から *Myoviridae* と *Podoviridae* に属するファージと類似していた。一方で、繊維状の構造をしている *Inoviridae* と類似するファージは観察されなかった。

1. 緒 論

近年、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*¹⁾ に感染するファージの報告が増えているとともに、形態的特徴に関する情報も蓄積されつつある^{2-15, 20)}。青枯病菌は、主にナス科などの作物に感染する土壌伝染性の病原細菌であり、宿主範囲や病原性ならびに生理・生化学的性質等の異なる系統の存在が多く知られている^{4, 16)}。本細菌に汚染された土壌から青枯病菌を除去することは困難であることから、ファージを用いた防除手法の確立が急務とされている。筆者らもファージを用いた青枯病菌の防除を主眼において、これまで作物栽培土壌から多数のファージを分離してきた⁴⁾。

青枯病菌に感染するファージの形態は M13 様ファージ^{9, 14)}、P2 様ファージ^{10, 13, 14)}、T7 様ファージ^{7, 12)} ならびに λ 様ファージ²⁾ が報告されている。本誌で報告したファージ群⁴⁾ においても既報^{2, 3, 5, 7-15, 20)} のいずれかのタイプのファージに属するものが含まれていると推測される。現在のところ、分離した多数のファージの様々な系統の青枯病菌に対する感染性試験は進行中であるが、形態的特徴に関する解析や分類は全く実施していない。そこで今回は、その分離したファージ群⁴⁾ の形態を知ることを目的として、透過型電子顕微鏡によるファージの観察を行ったので報告する。

2. 材料および方法

ファージ粒子の調整と電子顕微鏡による形態観察

大阪府ならびに和歌山県他の各作物栽培土壌（地域非公開）を用い、前報⁴⁾ において分離したファージ群から無作為にファージ試料を選んだ。ファージの調製では CPG 培地¹⁷⁾ を用いた重層寒天法でプラークを形成させた後、SM バッファー（0.1M NaCl, 7mM MgSO₄, 0.01% Gelatin, 50mM Tris-HCl pH 7.5）を加えた。その後、バッファー中に拡散したファージを回収し、ネガティブ染色¹⁸⁾ を行った後に電子顕微鏡観察を行った。

原稿受付 2016年2月19日

1. 近畿大学先端技術総合研究所 植物センター, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

2. 近畿大学生物理工学部 生物工学科 生物生産工学研究室, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 結果および考察

透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ、頭部の下に長い尾部を持った形状をしているもの（図 1 A）、頭部の下に尾鞘を持っているもの（図 1 B）、および頭部の下に非常に短い尾部を持っているもの（図 1 C）、などを観察することができた。図 1 にそれら特徴のある代表的なファージの形態を示した。これらはその形態構造と既報^{7, 14, 19)}の情報から、収縮性の尾部をもつ *Myoviridae*（図 1 A と B）と短い尾部をもつ *Podoviridae*（図 1 C）に属するファージと類似していた。図 1 B に示すファージは尾部が収縮した状態であると判断している。このような状態のファージの電顕写真は Ackermann らが報告している *Enterobacter* 属細菌に感染するファージにも示されている¹⁹⁾。また、Ackermann らは *Myoviridae* に属するファージが様々な形態の尾部繊維構造を持つことを示している¹⁹⁾。今回の観察では Ackermann らが示すような尾部繊維の明確な構造は確認できなかった。一方で、線維状のファージである *Inoviridae* のファージは、既報^{9, 10, 14)}においていくつか知られているが、今回の試料では確認されなかった。また、観察した試料のいくつかには、*Myoviridae* と *Podoviridae* のファージと類似した科の異なるファージが混在しているものもあったことから、単一分離が完全に行われていないものと判断できる。これらについては分離作業を再度実施する必要がある。

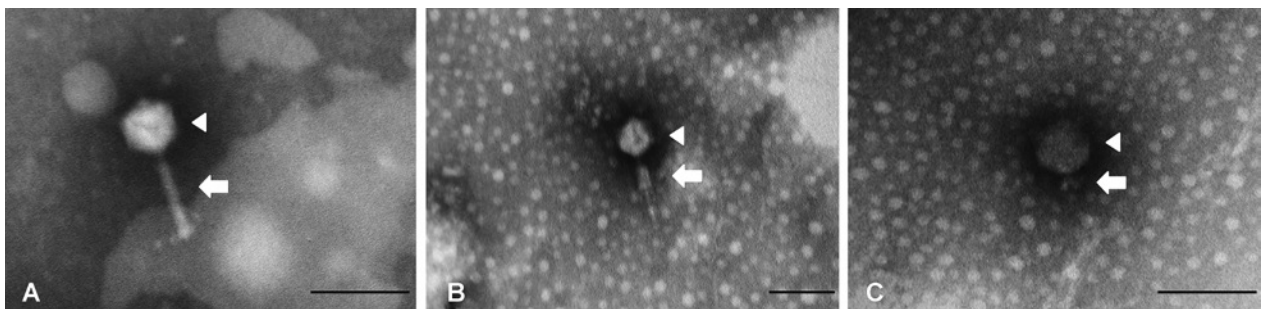


図 1. 透過型電子顕微鏡観察によるバクテリオファージの形態

それぞれのバクテリオファージ粒子は頭部（△）と長い尾部（A, 白矢印）と尾鞘（B, 白矢印）および短い尾部（C, 白矢印）を保持していた。スケールバーは 100 nm を示す。

図 1 C に示すような *Podoviridae* に属する T7 型の青枯病菌感染性のファージにはその宿主範囲が広いものもあり、ファージを利用した生物防除のための資材としての利用が期待されている²⁰⁾。筆者らの研究室では前報⁴⁾で分離したファージ群を用いて青枯病菌への感染性試験を実施しており、数種の青枯病菌に感染するファージの存在を確認している（データ示さず）ことから、それらはこの科に属するファージであると推測している。筆者らの研究グループでは、継続して青枯病防除のためのファージの分離作業を行っている。その過程で分離された全ての試料のファージの形態観察はまだ十分に行われていないが、今後も引き続き実施することになっている。

4. 結 論

青枯病防除のために分離したファージには、*Myoviridae* と *Podoviridae* に属するファージと類似の構造をしたファージが含まれていることが明らかとなった。

5. 文 献

- 1 . Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y. (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology* 39, 897–904.
- 2 . Van Truong Thi B., Pham Khanh NH., Namikawa, R., Miki, K., Kondo, A., Dang Thi PT., Kamei, K. (2016) Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phages ϕ RS138 of the family *Siphoviridae*. *Archives of Virology* 161, 483–486.
- 3 . Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. (2014) Insights into the diversity of ϕ RSM phages infecting strains of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* complex: regulation and evolution. *Molecular Genetics and Genomics* 289, 589–598.
- 4 . 瀧川義浩 (2014) 青枯病防除のための土壌からのバクテリオファージの分離
近畿大学 先端技術総合研究所紀要 19, 63–68.
- 5 . Van Truong Thi B., Yoshida, S., Miki, K., Kondo, A., Kamei, K. (2014) Genomic characterization of ϕ RS603, a filamentous bacteriophage that is infectious to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology and Immunology* 58, 697–700.
- 6 . Effantin, G., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Bacia, M., Moriscot, C., Weissenhom, W., Yamada, T., Schoehn, G. (2013) Cryo-electron microscopy three-dimensional structure of the jumbo phage ϕ RSL1 infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Structure* 21, 298–305.
- 7 . Bae, J. Y., Jing, W., Hyoung, J. L., Eun, J. J., Murugaiyan, S., Chung, E., Lee, S. W. (2012) Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 1613–1620.
- 8 . Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. (2011) The filamentous Phage ϕ RSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on tomato. *Phytopathology* 102, 244–251.
- 9 . Murugaiyan, S., Bae, J. Y., Wu, J., Lee, S. D., Um, H. Y., Choi, H. K., Chung, E., Lee, J. H., Lee, S. W. (2010) Characterization of filamentous bacteriophage PE226 infecting *Ralstonia solanacearum* strains. *Journal of Applied Microbiology* 110, 296–303.
- 10 . Yamada, T., Satoh, S., Ishikawa, H., Fujiwara, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Ogata, H. (2010) A jumbo phage infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* defines a new lineage of the Myoviridae family. *Virology* 398, 145–147.
- 11 . Askora, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M., Yamada, T. (2009) Host recognition and integration of filamentous phage ϕ RSM in the phytopathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Virology* 384, 69–76.
- 12 . Kawasaki, T., Shimizu, M., Satsuma, H., Fujiwara, A., Fujie, M., Usami, S., Yamada, T. (2009) Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* Phage ϕ RSB1, a T7-like wide-host-range phage. *Journal of bacteriology* 191, 422–427.
- 13 . Fujiwara, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M., Yamada, T. (2008) Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage ϕ RSA1 and its related prophage (ϕ RSX) in strain GMI1000. *Journal of bacteriology* 190, 143–156.

14. Yamada, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S., Fujie, M. (2007) New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology* 153, 2630–2639.
15. Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Satsuma, H., Fujie, M., Usami, S., Yamada, T. (2007) Genomic characterization of the filamentous integrative bacteriophages ϕ RSS1 and ϕ RSM1, which infect *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 189, 5792–5802.
16. 堀田光生、土屋健一 (2009) 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の分類の現状と課題 日本植物病理学会報 75, 297–306.
17. Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693–695.
18. Brenner, S., Horne, R. W. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochemica et Biophysica Acta* 34, 103–110.
19. Ackerman H. W., DuBow M, S., Gershman, M., Karska-Wysocki, B., Kasatiya, S. S., Loessner, M. J., Mamet-Bratley, M. D., Regue, M. (1997) Taxonomic changes in tailed phages of enterobacteria. *Archives of virology* 142, 1381–1390.
20. 山田隆 (2014) ファージを利用した青枯病防除技術の開発 巨大ファージ RSL1 と繊維状ファージ RSMs の有効性 化学と生物 52 (6), 371–379.

英文抄録

Electron microscopic observations of isolated bacteriophages
for use in biological control against bacterial wilt diseaseYoshihiro Takikawa¹, Norifumi Asao²

We observed morphology of bacteriophages (phages) for use in the biological control of the bacterial wilt disease using transmission electron microscope. These morphological characteristics of the phages were similar to those of P2 or T7 belonging to the families *Myoviridae* and *Podoviridae*. The filamentous phages belonging to the family *Inoviridae* were not observed in this study.

Key words: bacteriophages, *Ralstonia solanacearum*, *Myoviridae*, *Podoviridae*

1. Plant Center, Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama, Japan.

2. Department of Biotechnological Sciences, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama, Japan.