

Isolation and characterization of phage infects to novel soft rot *Enterobacter* species

グエン, コン, タイン

<https://hdl.handle.net/2324/4110568>

出版情報 : 九州大学, 2020, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : NGUYEN CONG THANH (グエン コン タイン)

論文題名 : Isolation and characterization of phage infects to novel soft rot *Enterobacter* species
(*Enterobacter* 属細菌による軟腐病制御のためのファージ単離と特性解析)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

軟腐病(soft rot)は野菜、果物、草花などの葉、茎、根、球根などに発生し、農業生産に深刻な被害を及ぼす世界共通の疾病である。本病の原因菌は soft rot Pectobacteriaceae (SRP)と称され、*Pectobacterium* 属と *Dickeya* 属細菌に大別されていた。近年、蒟蒻、唐辛子、ドラゴンフルーツの軟腐病から *Enterobacter* 属細菌が単離された。*Enterobacter* 属細菌はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で、*Enterobacter*-*Escherichia* クレードに属し、SRP とされる *Pectobacterium*-*Dickeya* クレードとは異なる *Enterobacteriales* 目のグループに属するため、同属菌が SRP であるか否かの議論が生じている。

一方、軟腐病をはじめとする植物病原菌制御のため、東南アジア諸国では農薬や化学薬品の多施用が問題となっている。これを解決する一方策として細菌ウイルスであるバクテリオファージ(ファージ)を用いた生物防除(ファージセラピー)が提唱されている。ファージは細菌の寄生因子で、特異的な細菌を宿主として感染し、最終的には宿主を溶菌して娘ファージ粒子を放出する。このため、ファージセラピーは特異的な宿主菌のみを破壊し、環境負荷を最小化できる方策と考えられる。

そこで本論文では、ベトナムの軟腐病発生地域より単離した細菌の分子系統解析を行い、その多様性を明らかにし、当該菌に感染するファージを単離してその性状、ゲノム・タンパク質構造を明らかにすることで、軟腐病制御を目的としたファージセラピーの基盤を構築する事を目的とした。

まず、ベトナム各地の軟腐病発生域の野菜、果物より 7 株の細菌を単離した。単離株については、16S rDNA 塩基配列から、*Acinetobacter baumannii*、*Pantoea dispersa*、および *Enterobacter* 属に分類した。しかし、*Enterobacter* 属に分類した 5 株については、生理・生化学試験や分子系統解析によっても *Enterobacter* 属基準株と明確な一致が認められなかった。そこで、*Enterobacter* M4-VN 株について Miseq を用いた全ゲノム解読を行なった。その結果、本株ゲノム(accession No. BLVN01000000)は 4,754,309 bp (G+C 含量 55.1%)から成り、65 個の tRNA、7 個の rRNA、1 個の CRISPR の他、4,424 個の ORF が推定された。これらの ORF のうち、病原性に関与する遺伝子として TonB タンパク質、M16 プロテアーゼをコードする遺伝子が検索できた。一方、M4-VN 株ゲノムと *Enterobacter* 属基準株との *in silico* DNA-DNA ハイブリダイゼーション値は 42.5%であったことから、本株は *Enterobacter* 属の新種であると推測した。

次に、分離株および既存の植物病原菌に感染するファージの取得を試み、ベトナムバクニン省の土壌からプラークアッセイでファージ EspM4VN を単離した。本ファージは、正二十面体(直径 100 nm)の頭部、収縮性の尾部(長さ 100 nm、幅 18 nm)から成り、尾部には特徴的なアンブレラ構造を有していた。これらの形態的特徴は、Ackermannviridae 科の *Shigella* ファージ Ag3 や *Dickeya* ファージ JA15、XF4 と類似していた。また、本ファージは分離株、既存株 20 株のうち、M4-VN 株のみにクリアプラークを形成する狭い宿主域を示す溶菌性ファージであった。さらに、EspM4VN は 10~50°C、pH4~10 で安定で、1.5%(v/v)までのエタノール、Tween 20 にも耐性を示した。一段増殖曲線から、EspM4VN の潜伏期は 20 分、上昇期は 10 分、プラト一期 40 分で平均放出数は 122 であった。

本ファージ EspM4VN のゲノムは 160,766 bp で 219 個の ORF が推定され、これらの遺伝子配座は Ag3 ファージの他、*Salmonella* ファージ SKML-39、*Dickeya* ファージ Coodle、PP35、JA15、Limestone と類似していた。上記の結果に加えて、ESI-MS/MS 分析により本ファージ構造タンパク質の解析を行い、4 種の特異的 tail spike タンパク質を同定し、また、構造タンパク質や DNA polymerase、DNA ligase などの分子系統解析を行った。これらの結果から、新規の *Enterobacter* 属 M4-VN 株に感染するファージ EspM4VN を Ackermannviridae 科、Aglimvirinae 亜科、*Agtrevirus* 属に分類した。