

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	グエン コン タイン			
論文名	Isolation and characterization of phage infects to novel soft rot <i>Enterobacter</i> species (<i>Enterobacter</i> 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)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	土居克実
	副査	九州大学	教授	宮本敬久
	副査	九州大学	教授	古屋成人
	副査	九州大学	教授	深見克哉

論文審査の結果の要旨

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が、近年、東南アジアの軟腐病植物から *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、*Enterobacter* 属細菌が軟腐病に関与している可能性が議論されている。

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。これを解決する方策として、バクテリオファージ（ファージ）を用いた防除（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から、その多様性を明らかにした。さらに、当該菌に感染するファージを単離し、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に資する事を目的としている。

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、16S rDNA 塩基配列から、*Acinetobacter baumannii*、*Pantoea dispersa*、および *Enterobacter* sp.に同定した。しかし、*Enterobacter* 属とした 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ため、これらのうち、M4-VN 株について全ゲノム塩基配列の解読を行なった。その結果、4,754,309 bp (G+C 含量 55.1%)の塩基配列を決定し、65 個の tRNA、7 個の rRNA、1 個の CRISPR の他、4,424 個の ORF を同定した。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を検出すると共に、*Enterobacter* 属基準株との *in silico* DNA-DNA ハイブリダイゼーション結果から、M4-VN 株を *Enterobacter kobei* と同定した。

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ファージ EspM4VN を単離した。本ファージは電子顕微鏡観察の結果から、正二十面体の頭部、収縮性の尾部から成り、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が、Ackermannviridae 科の *Shigella* ファージ Ag3 や *Dickeya* ファージ JA15、XF4 と類似していること、また、本ファージは分離株、既存株 20 株のうち、M4-VN 株のみに感染する狭い宿主域を示

す溶菌性ファージであることを明らかにした。

また、EspM4VN は 10～50℃、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、本ファージの潜伏期は 20 分、上昇期は 10 分、プラトー期は 40 分で、娘ファージ の平均放出数は 122 であることを示した。

さらに、ゲノム塩基配列解読の結果から、EspM4VN ゲノムは 160,766 bp で、219 個の ORF が座乗し、これらの遺伝子配座は Ag3 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た。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、*E. kobei* 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。

以上要するに、本研究は、東南アジアの軟腐病発生域から単離した *E. kobei* M4-VN が軟腐病の新規の病因となる可能性を初めて示すと共に、本株に感染する溶菌性ファージの特性を解明し、軟腐病ファージセラピーの基盤を提示したものであり、微生物遺伝子資源学の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。