

発光ファージ法による植物病原細菌の 迅速同定システムの開発

(研究課題番号 15380034)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))

研究成果報告書



平成17年3月

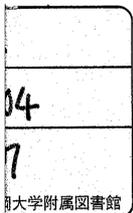
静岡大学附属図書館



000652286 6

研究代表者 露 無 慎 二

(静岡大学農学部教授)



奇賸 露燕俱二(晨字

0006522866

発光ファージ法による植物病原細菌 の迅速同定システムの開発

(研究課題番号 15380034)

平成15年度～平成16年度科学研究費補
助金（基盤研究（B）（2））



研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 露無慎二

(静岡大学農学部教授)

はしがき

この研究課題又はこれに密接関連した研究課題として、「レポーターファージを用いた植物検疫システムの開発」(基盤研究(B)(2)、平成11～12年度、研究経費13,400千円)の援助を受けた。この研究では、発光ファージを分離するための、Tn3及びTn5の逆向き繰り返し配列をベースにした遺伝子融合用トランスポゾンを作成し、これらがプラスミド上の既知遺伝子に融合され、無事発光する事を確認した。さらに、大腸菌を中心に発光ファージを構築し、これら尾を餅田検出システムが、各種植物病原細菌の植物検疫システムに応用できる事を示した。本研究では、上記融合用トランスポゾンを用いて、各種植物病原細菌検出用発光ファージを分離し、単一の病原細菌だけではなく、複数の病原細菌を同時に検出する事によって、簡易同手も可能なシステムを構築する事を目的とした。本研究では、さらに当初予定した上記レポーターファージの利用の他、ファージ粒子をビオチンや臭化エチジウムであらかじめ標識しておき、これを多重吸着させて、特定の植物病原細菌を迅速、且つ正確に検出できるかについても検討を行った。いずれの検出法においても、ナス科植物青枯れ病菌、カンキツかいよう病菌を10の2～3乗個まで、3時間以内に検出できる事が分かった。本研究報告書は、これらの研究成果をまとめたものである。

平成15～16年度科学研究費（基盤研究B（2））
研究成果報告書

1. 課題番号 15380034

2. 研究課題 発光ファージ法による植物病原細菌の迅速同定
システムの開発

3. 研究組織

研究代表者 : 露無慎二（静岡大学農学部教授）

研究分担者 : なし

4. 研究経費

平成15年度 10,600 千円

平成16年度 5,400 千円

計 16,000 千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) P. Jitareerat, H. Matsumoto, M. Umehara and S. Tsuyumu, (2003) D-alanine-D-alanine ligase gene (ddl) of *Erwinia chrysanthemi* strain EC16. II. Analysis of regulation of pectate lyase using *ddl*-mutant. *J. Gen. Plant Pathol.* 69(1): 49-54
- 2) P. Jitareerat^{1,2}, H. Matsumoto^{1,2}, M. Umehara² and S. Tsuyumu. D-alanine-D-alanine ligase gene (ddl) of *Erwinia chrysanthemi* strain EC16. I. Isolation and Gene dosage effect on pectate lyase synthesis. *J. Gen. Plant Pathol.* 68 (4): 342-349 (2003)
- 3) S. Kusumoto, T.N. Aveny, S. Mujimn, C. Ginting, T. Tsuge, S. Tsuyumu, and Y. Takikawa, (2004)

Occurrence of blood disease of banana in Sumatra, Indonesia. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 45–49

- 4) G. Ponciano, H. Ishihara, S. Tsuyumu and J.E. Leach, (2003) Bacterial effectors in plant disease and defense: Keys to durable resistance? *Plant Disease* 87: 1272–1282
- 5) S. Yoshida, S. Tsuyumu, and T. Tsukiboshi. (2003) Macerating enzymes produced by *Rhizopus oryzae* in infected mulberry roots. *J. Phytopathol.* 151: 436–441
- 6) H. Matsumoto, M. Umerhara, H. Muroi, Y. Yoshitake, and S. Tsuyumu. (2003) Homolog of FlhDC, a master regulator for flagellum synthesis: required for pathogenicity in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 189–193 (2003)
- 7) H. Matsumoto, H. Muroi, M. Umehara, Y. Yoshitake, and S. Tsuyumu (2003) Peh production, flagellum synthesis, and virulence reduced in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by mutation in a homologue of *cytR*. *Mole. Plant–Microbe Interact.* 16 (5): 289–397
- 8) H. Matsumoto, H., P. Jitareerat, Y. Baba, and S. Tsuyumu, (2003) Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 16 (3): 226–237
- 9) H. Ishihara, G. Ponciano, J. E. Leach, and S. Tsuyumu, (2004) Functional analysis of the 3' end of *avrBs3/pthA* genes from two *Xanthomonas* species. *Physiol. Mole. Plant Pathol.* 63: 329–338
- 10) H. Ishihara, S. Uchida, Y. Masuda, K. Tamura, S. Tsuyumu, (2004) Increase in telomerase activity in

- citrus inoculated with *xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 218-220
- 11) S. Kusumoto, T.N. Aveny, S. Mujimn, C. Ginting, T. Tsuge, S. Tsuyumu, and Y. Takikawa, (2004)
- 12) Haque, M.M., and S. Tsuyumu (2005) Virulence, resistance to magainin II, and expression of pectate lyase are controlled by the PhoP-PhoQ two-component regulatory system responding to pH and magnesium in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:47-53.
- 13) Haque, M. M., A. Yamazaki, and S. Tsuyumu (2005) Virulence, accumulation of acetyl-coenzyme A and pectate lyase synthesis are controlled by PhoP-PhoQ two-component regulatory system responding to organic acids in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:133-138

口頭発表

- 1) Haque, M.M. and Tsuyumu, S., A Homologue of *pehRS*, A Two Component Regulatory System, Controls Exo-polygalacturonase Production and Virulence in *Erwinia chrysanthemi*3937, 日本植物病理学会報 69 (3):305 (2003)
- 2) 須山弘明・松本裕之・露無慎二, 軟腐性 *Erwinia* 属細菌における *rpoH* 遺伝子の機能解析, 日本植物病理学会報 69 (3): 305 (2003)
- 3) 松岡圭介・I K Toth・L J Hyman・露無慎二, 軟腐性 *Erwinia* 属細菌の 3 大グループ間の SSH (Suppression on Subtractive Hybridization) 法による *E. chrysanthemi* 特異的配列の解析, 日本植物病理学会報 69 (3): 306 (2003)
- 4) 石原博通・Ponciano, G.・Leach, J.E.・露無慎二
Xanthomonas 属細菌の *avr/pth* 遺伝子ファミリー間のキメ

- ラがカンキツ植物に呈する反応, 日本植物病理学会報 69 (3):313(2003)
- 5) Takashi Fujikawa, Hiromichi Ishihara, and Shinji Tsuyumu, Suppression of active defense resistance in non-host plants by *avr/pth* gene in xanthomonads. 8th International congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand (2003)
 - 6) 柴田敏史、相沢慎一、露無慎二、植物病原性細菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* EC1 の運動性の病原性への関与。日植病報 70 (3) : 291 (2004)
 - 7) Haque, M.M., and S. Tsuyumu, Involvement of PehR-PehS Two-component system in virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 日本植物病理学会報 70(3):292 (2004)
 - 8) Joko, T., H. Etoh and S. Tsuyumu, Effects of sugars on the expression of *pelE* in *Erwinia chrysanthemi* EC16. 日本植物病理学会報 70(3):292 (2004)
 - 9) 藤川貴史、駒井慶子、露無慎二、*Xanthomonas* 属細菌由来 *avr/pth* 遺伝子産物と結合する植物細胞壁タンパク質の研究、日植病報 70 (3) : 293 (2004)
 - 10) 駒井慶子、木村幸、小松節子、露無慎二、カンキツかいよう病菌の病原性遺伝子 *apl1* 産物 (Apl1) と相互作用するカンキツタンパクの解析、日植病報 70 (3) : 293 (2004)
 - 11) 山崎明広、Ulla Bonas, 露無慎二、*hrpG**_{XCV} を導入したカンキツかいよう病菌の分泌するタンパク質の探索、日植病関西西部会講演要旨集、46 (2004)
 - 12) Hossain, M.M. and S. Tsuyumu, Role of motility in pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. 日植病関西西部会講演要旨集、46 (2004)
 - 13) 木村幸、駒井慶子、露無慎二、カンキツかいよう形成エフェクターApl1 と結合するカンキツペクチンメチルエステラーゼの解析、日植病関西西部会講演要旨集、47 (2004)

- 14) 藤川貴史、吉村淳、露無慎二、異なる遺伝背景の植物における *avr/pth* 遺伝子産物のサプレッサー活性の比較解析、日植病関西部会講演要旨集、46 (2004)
- 15) 佐々木則英、藤沢郁弥、露無慎二、軟腐性 *Erwinia* 属細菌と植物との相互作用に果たすフラジェリンの役割、H17年日本植物病理学会大会、p.172、(2005)
- 16) Hossain, M.M. and Tsuyumu, S. Involvement of motility in biofilm formation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* H17年日本植物病理学会大会、p.172、(2005)
- 17) Joko, T., and Tsuyumu, S. Environmental factors involved in the *pelE* hyperinduction in *Erwinia chrysanthemi* EC16. H17年日本植物病理学会大会、p.173、(2005)
- 18) 関谷敏芳、石原博通、増田有美、露無慎二、カンキツかいよう病菌におけるテロメラーゼの役割と TERT(Telomerase reverse-transcriptase)遺伝子の解析、H17年日本植物病理学会大会、p.175、(2005)
- 19) 塩谷浩、藤川貴史、石原博通、露無慎二、カンキツかいよう病菌に対するブンタン類の抵抗反応、H17年日本植物病理学会大会、p.175
- 20) 藍原誠、高塚勇規、上田一郎、露無慎二、カンキツのかいよう形成特異的に発現する遺伝子の研究、H17年日本植物病理学会大会、p.175
- 21) 菅沼龍、露無慎二、バクテリオファージを用いたナス科植物青枯れ病菌の高速検出に関する研究、H17年日本植物病理学会大会、p.180

目次

第1章 基盤となるレポーターファージ法の開発

第2章 ナス科植物青枯病菌の検出法の開発

第3章 カンキツかいよう病菌の検出法の開発

第4章 おわりに

第一章 基盤となるレポーターファージ法の開発

1) 発光ファージ法の原理

ファージとは？

ファージとは、細菌に感染するウイルスの事を言う。ファージは、加来さんとそれを保護するタンパク質とから構成されている。ファージは、限られた範囲の細菌（宿主）にしか感染しないが、その感染様式は、1) ファージの宿主細菌への吸着、2) 核酸を宿主細胞内に注入、3) 注入された核酸の複製（数百倍）、4) 宿主細胞内におけるファージタンパク質の生合成、5) これらのタンパク質と核酸の自動集合によるすう約のファージ粒子の形成、6) 宿主細菌の内部からの溶菌、これに続く子ファージの放出というようになっている。この感染から溶菌までの1サイクルは、1時間程度で終わる程驚異的な早さで完了する。宿主細菌が存在しないとき（他の細菌が混在していても）、ファージはただの物質の集合体に過ぎず、上記の様な溶菌サイクルを全うする事が出来ない。従って、ファージの感染活動を見る事により、その宿主細菌の存在を知る事が出来る。

発光遺伝子

自然かには、蛍、ホタルイカのように、ルシフェラーゼという酵素反応によって光エネルギーを放出して発光に導くシステムを持った生物が多数存在する。各種ファージの遺伝子に発光遺伝子をつなげておくと、宿主細胞にのみ特異的に感染し、ファージゲノムの複製とともに、短時間のうちに発光遺伝子のコピー数も複製される。その結果、大量の酵素が生産され、大量のフォトンを生産するようになる。これを高感度の検出器（フォトンカウンター）を用いる事によって、細菌の存在を迅速、且つ鋭敏に検出する事が出来るようになる。

一般の大腸菌の検出のため、我々は、海洋細菌 *Vibrio fischerii* の *lux* 遺伝子群（図1）をレポーター遺伝子とした発光ファージ（図2）を作出した。その結果、1個の大腸菌の存在を90%以上の精度で、3時間以内に検出できる事を示す事が出来た。本法を用いて大腸菌

O157 株をも数個のオーダーで検出する事ができた。(図3)

図1 *Vibrio fishcrii* の lux カセット

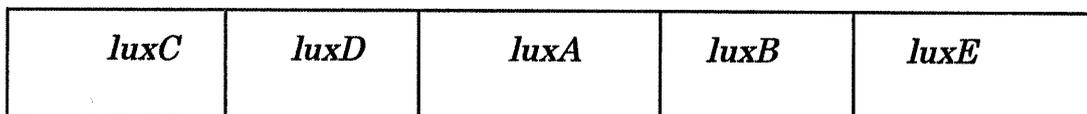
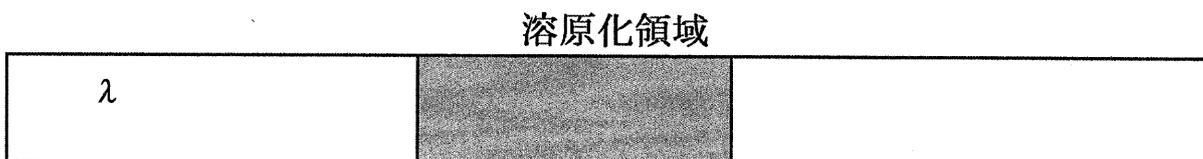
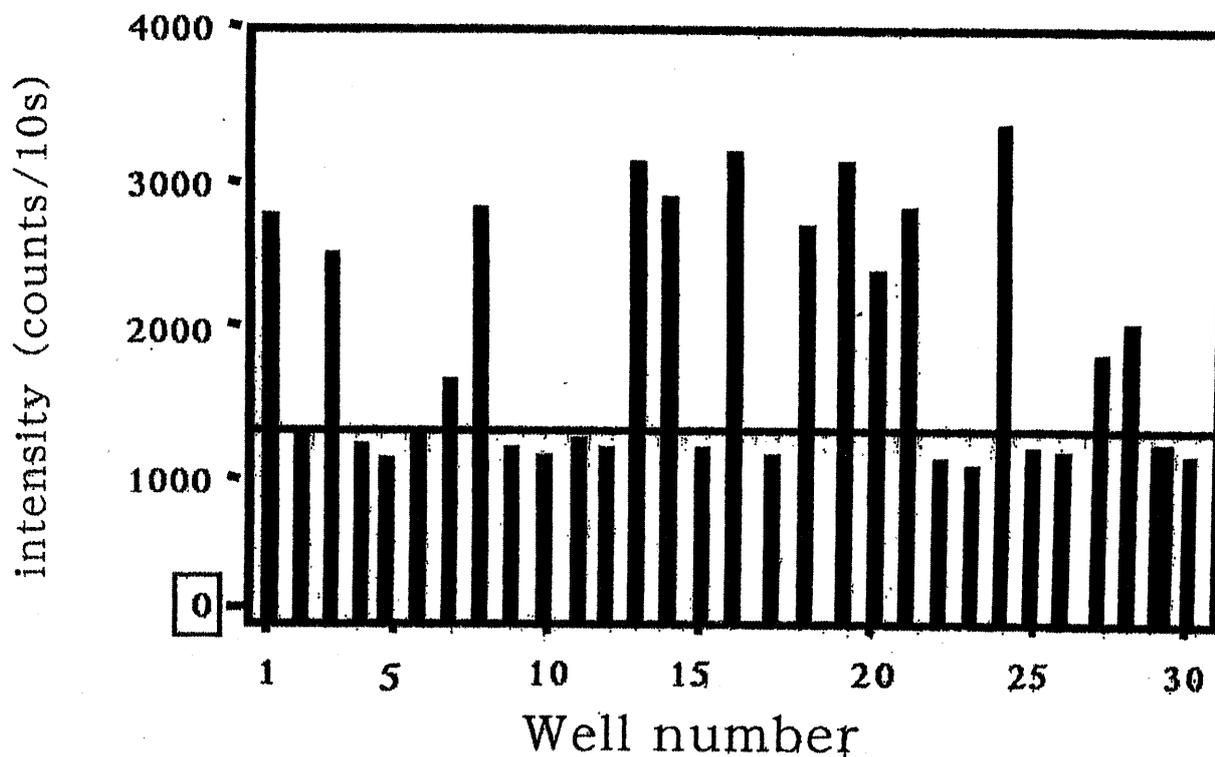


図2 EMBL3 を用いた発光λファージ



lux カセット

図3 大腸菌 O157:H7 株の検出限界



第2章 ナス科植物青枯れ病菌検出法の開発

A. レポーターファージ法による検出

pBS-E18 は、ファージ PRS1 のゲノムクローンであり、M13 プライマーにより両端の DNA シークエンスがすでに調べられていた。この配列を、DDBJ FASTA (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/fasta-j.html>) に送信し、相同性検索を行なった結果、既報の *Ralstonia solanacearum* ファージ P4282 のリゾチウム遺伝子と高い相同性を持つことが分かった。しかしながら、この DNA 配列は、500bp 程度のパーシャルなものであった。

そこで、pBS-E18 にライゲーションされた PRS1 の P4282 リゾチウムホモログ遺伝子、及びその周辺の DNA シークエンスを調べた。

1. EZ::Tn pMOD::Km^r を利用したカナマイシン耐性遺伝子の pBS-E18 への導入

In vitro トランスポゾンインサクションによる、pBS-E18 へのカナマイシン耐性遺伝子の挿入を行ない、反応液をエレクトロポレーションにより DH5 α へ導入、形質転換体の作成を試みた結果、52 個のシングルコロニーを回収することができた。これらのうち 3 つはベクター pBluescriptSK- 上のアンピシリン耐性遺伝子にトランスポゾンが導入されており、アンピシリン感受性となっていた。

2. ザンハイブリダイゼーションによる pBS-E18k へのカナマイシン耐性遺伝子のランダム一カ所挿入の確認

回収された Amp^r、Km^r の pBS-E18k のシングルコロニー 49 個からミニプレップによりプラスミドを回収し、制限酵素 *Sac*1、*Kpn*1 で切断した。制限酵素切断サンプルを電気泳動しバンドパターンを確認した後、pUC4k 由来のカナマイシン耐性遺伝子をプローブとしたザンハイブリダイゼーションを行なった。

この結果、49 個のうち、2 サンプルはカナマイシン耐性遺伝子のシグナルが 2 つ確認されており、残りの 47 個は、シグナルが 1 つであ

り、カナマイシン耐性遺伝子挿入数は1つであるということが示唆された(図4)。

3. P4282 リゾチウムホモログ遺伝子周辺のDNAシーケンス及びその解析

シグナルが1つである事が確認されたサンプルをDNAシーケエンサーにかけ、pMODのMosaic endの両端に設計されたプライマーpMOD-F、pMOD-Rを用いてpBS-E18にクローニングされたPRS1ゲノム断片のDNA配列を調べた。

また、このP4282リゾチウムホモログ遺伝子は、pBS-E18の末端にあり、その下流のDNA配列は、このクローニングサンプルでは40bp程度しか調べる事ができなかった。そのため、プライマーLysDS walkingを作成し、プライマーウォーキングをおこない、下流のDNA配列を調べた。下流の配列を調べる際にはPRS1ゲノムを鋳型とした。DNAシーケンスは1サンプルにつき4回行ない、その結果をアライメントして正確な配列になるように補正していった。

この結果、P4282リゾチウムホモログORFを含む6.2kbのpBS-E18のクローニングされたDNA配列および、その下流の配列を決定する事ができた。

この配列を遺伝子解析ソフトウェアGENETYXおよびORF Finder (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)で調べた結果、pBS-E18にクローニングされた配列の中にP4282リゾチウムホモログORFを含む推定上のORFが4つ、その下流に1つのORFが存在するということが示唆された(図5)。P4282リゾチウムホモログORFの上流に存在する推定上ORFを上流よりORF1、ORF2、ORF3とし、下流にある推定上ORFをORF5とした。

P4282リゾチウムホモログ遺伝子全体でP4282と相同性検索をかけると塩基配列で83.0%、アミノ酸配列で82.6%と、非常に高い相同性を持っているということが分かった(図6)。また、C-ターミナル側は、非常に高い相同性を持ち、ほぼ100%の相同性で保存されていた。逆にN-ターミナル側は相同性が低く、バリエーションがあ

った。

その他の ORF についても推定上のアミノ酸配列で相同性検索を行なった結果、ORF1 では特に高い相同性を持つアミノ酸配列は無く、ORF2 は、ファージ、ウィルスのコートタンパクとパーシャルな領域ではあるが、30%程度の相同性を持っていた (Data not shown)。ORF3,5 については、E-Value が高く、相同性を持つ可能性のあるタンパクは得られなかった。

4. プロモーター活性の確認

ORF1 と ORF2 の間の領域にプロモーターが存在する可能性が推定されたため、2つのプライマー E18 promoter sense Hind3 と E18 promoter antisense BamH1 を用いて PCR を行い増幅し、これを pGEM-T EASY にサブクローニングした。さらに pUC118 につなぎ直し、その下流に同様にプライマー luxA sense BamH1、luxB antisense EcoR1 を用いて PCR 増幅した *luxAB* をつないだ。このサンプルに対し、E18 promoter sense Hind3 と、luxB antisense EcoR1 を用いて PCR 増幅し、これをブロードレンジベクター pLAFR3 につないだ。インサートの向きは *lac* プロモーターと逆向きに繋がったものをスクリーニングした。

これを *Ralstonia solanacearum* EPPS1、*Escherichia coli* DH10B にエレクトロポレーションにより導入し、それぞれの菌株について形質転換体を作成した。この際、*lac* プロモーターと同じ向きに繋がったものについてもコントロールとして同様に形質転換体を作成した。

これらの形質転換体について微弱発光計数装置 (浜松ホトニクス) で、発光を調べた結果、*lac* プロモーターと同じ向きのものについては、どちらの形質転換体についても発光が見られた。しかしながら、逆向きのものについては、*Escherichia coli* DH10B では発光は確認されず、*Ralstonia solanacearum* EPPS1 でのみ発光が見られた (図 7)。ここでは、バクテリオファージ PRS1 を感染させたもの、感染させないものについて発光検出をおこなったが、ファージの有無によらず強い発光が検出された。

次にこのプロモーターの特異性を調べるため *Xanthomonas*

axonopodis pv. *citri* L-9 に、同様のコンストラクトを導入し、発光測定をおこなった。

この結果、*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* L-9 においても *Ralstonia solanacearum* EPPS1 と同様に、強い発光が確認された (図 8)。

これらの結果を元にしてマーカーエクステンジコンストラクトの作成を行った。マーカーエクステンジは、P4282 リゾチウムホモログ ORF と *luxAB* を置き換えるリプレイスメントになるように設計した。

5. マーカーエクステンジコンストラクトの作成

以下のマーカーエクステンジコンストラクトの作成スキームを図 9、図 10 および図 11 に示した。

P4282 リゾチウムホモログ ORF の上流 550bp (以後 *lysUS*) をプライマー-*lysUS* sense *Sal*I、*lysDS* antisense *Bgl*II で、*luxAB* をプライマー-*luxA* sense *Bgl*II、*luxB* antisense *Afl*II で、P4282 リゾチウムホモログ ORF の下流 500bp (以後 *lysDS*) をプライマー-*lysDS* sense *Afl*II、*lysDS* antisense *Bam*HI でそれぞれ PCR をし、それぞれを pGEM-T Easy にライゲーションした。

次に *lysUS* を *lac* に同じ向きになるように *Eco*R I でベクター pUC118 に、*luxAB* を *Eco*R I でベクター pBluescript SK- にライゲーションした (それぞれ pUC-US、pBS-BA)。

そして、pBS-BA 由来の *luxAB* を pUC-US に *Sac*I、*Kpn*I でライゲーションした (pUC-USBA)。これを *Bgl*II で切断し、セルフライゲーションをし、不要な配列を除いた (pUC-USBA self)。pUC-USBA および、pUC-USBA self において、テトラデカナルを加え、発光測定を行なったところ、強い発光が確認された (図 12)。

さらに *Afl*II、*Bam*HI で切断した *lysDS* をライゲーションしようと試みたが、ベクターの一部、或いはインサートの一部が消失してしまい、コンストラクトの作成ができなかった。

そこで、pUC-USBA self の *lysUS*~*luxAB* を *Eco*R I、*Sal*I で切断し、*lac* プロモーターと逆向きになるように pBluescript SK- に

ライゲーションした (pBS-USBA anti)。ここに *Afl*II、*Bam*H I で切断した lysDS をライゲーションした (pBS-ME)。PBS-ME より、lysUS~luxAB~lysDS を *Sal*I、*Bam*H I で切断し pUFR047 にライゲーションし、マーカーエクステンジコンストラクトとした (pUFR-ME)。

このコンストラクトに対し、プライマー lysUS sense *Sal*I、lysDS antisense *Bam*H I を用いて PCR を行なったところ、推定した位置にバンドを確認できた (Fig.10)。また、制限酵素 *Sal*I、*Bam*H I による切断でも、同様にインサートが確認された (図 1 4)。

6. コンプリメンテーションコンストラクトの作成

P4282 リゾチウムホモログ遺伝子を pET21(+)ベクターに、SD 配列を含むようにプライマーを設計し増幅した断片をライゲーションし、大腸菌 BL21(DE3)を用いた pE T システムにより大量発現した。SDS-PAGE で解析した結果、推定通りのサイズ (71kDa) にでバンドを確認できた (図 1 5)。 *Ralstonia solanacearum* EPPS1 を含む上昇寒天にスポットをしたが活性を確認できなかった (図 1 6)。発現タンパクを混合し、静置したものを平板希釈法により、プレートにスプレッドするという方法でも同様に、活性が観察されなかった (Data not shown)。そのため、発現したタンパクがリゾチウムではなく、また相同性が非常に高いことから、ハウスキーピングな遺伝子である可能性を考慮し、マーカーエクステンジファージをリカバリーするためのコンプリメンテーションコンストラクトの作成を行なうことにした。コンプリメンテーションコンストラクトはプロモーター活性を持つ領域 (以後 E18-200p) を上流に、その下流に SD 配列を含むように、P4282 リゾチウムホモログ遺伝子をライゲーションしようと試みた。スキームを図 1 7 に示した。

E18-200p をプライマー E18 promoter sense *Hind* III、E18 promoter antisense *Bam*H I で増幅し、*Hind* III、*Bam*H I でベクター pUC118 にライゲーションした (pUC-200p)。

次に P4282 リゾチウムホモログ遺伝子をプライマー lys sense *Bam*H I、lys antisense *Eco*R I で増幅し、pUC200p にライゲーションした (pUC-200plys)。

PUC-200plys より *Hind*III、*Eco*R I で E18-200p~lys を切断し、pLAFR3 にライゲーションし、コンプリメンテーションコンストラクトとした (pLAFR-200pLys)。

B. ビオチン標識ファージによる検出

レポーターファージ法のほか、ファージの細菌への吸着を検出基準とするビオチン標識ファージを用いた検出法についても検討を行った。

1. バクテリオファージ PRS1 のタンパク質としての濃度測定およびビオチン標識

バクテリオファージ PRS1 が 10^{10} pfu/ml でどの程度のタンパク濃度であるかを調べた結果、およそ 0.33mg/ml であることが分かった。そこで、タンパク濃度で 0.5mg のファージをとり、ビオチン標識を行なった。ビオチン標識後、タイター測定を行なったところ、ビオチン標識による吸着への大きな阻害は見られず、吸着効率に劇的な変化はなかった (図 18)。

次に、ビオチン標識がされているかを確認するため、PVDF メンブレンにサンプルをスポットし、ビオチン-アビジン AP アッセイをし、NBT、BCIP で発色させた。

その結果、すべてのフラクションで発色反応が見られた。また、すべてのフラクションにおいて発色反応のシグナルに差は見られなかった。ラベルされていないファージ、ビオチンのみでは発色反応が見られなかったため、PRS1 がビオチンで標識されているといえた (図 19)。

2. ビオチン標識ファージの検出限界濃度の検討

ビオチン標識ファージ PRS1 の検出限界濃度を調べるため、濃度調整を行ない、 10^6 から 10^2 個のファージをメンブレンにスポットしていった。そして、基質として NBT・BCIP および、CDP-Star を用いてそれぞれ発色反応、発光反応を調べた (図 20)。この結

果、発色反応、発光反応において優位な差が見られるのは 10^4 個程度までであり、 10^3 個では、差が見られるものの、誤差範囲になり得てしまう程度であった (図 2 1)。

3. 宿主バクテリアの検出限界菌数の検討

ビオチン標識ファージが 10^4 個以上必要であるということが分かったため、次に宿主バクテリアの検出限界菌数について調べた。

検出に用いる標識ファージを 10^7 個で固定し、*Ralstonia solanacearum* EPPS1 の菌数を 10^6 から 10CFU まで減らしていき、これに標識ファージを、 10^7 個混ぜた場合、どのように検出されるかを調べた (図 2 2)。この結果、 10^2 CFU 以上の宿主バクテリアの存在していれば、優位な差として検出されるということが分かった。また、 10^6 から 10^3 CFU については、発光による検出の数値に大きな差は見られなかった (図 2 3)。

第3章 カンキツかいよう病菌の検出法の開発

1. バクテリオファージ CP I の遺伝子の解析

CP I ゲノムの制限酵素処理による泳動パターンの解析

得られたファージゲノムを制限酵素 *Hind*III、*Pst* I 及び *Kpn* I で切断した後の泳動パターンより、CP I のゲノムサイズは約 40Kbp であることが判明した。(図 2 6) ファージゲノムの複製は直鎖状で細菌に導入された後に、ゲノムの末端にある相補的な一本鎖末端 (cos 領域) が塩基対を形成し環状化され、ローリングサークル方式により環状ゲノムから長い一本鎖 DNA を形成していく。一本鎖 DNA の cos 領域をターミナーゼが切断し、その断片から二本鎖へと合成することによってゲノムを増幅する。これらがファージ頭部へと収納されるが、このとき収納される DNA の量はファージ染色体の長さそのもので決定される。ファージゲノムにレポーター遺伝子を導入する際に重要なことは、遺伝子導入したファージのゲノムが頭部に収まりきるかになる。入ファージでは DNA の約 106% 以内に収めれば、導入が可能となる。CP I ゲノムは 40Kbp であるので、2.4Kbp までのレポーター遺伝子を導入できる。

CP I ゲノムのクローニング

制限酵素処理 (*Hind*III と *Pst* I) したファージゲノムよりファージライブラリを作成した。(図 2 7) それらを CP I ゲノムをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、ファージゲノムであることを確認した。(図 2 8) 一部の切断断片はクローニングすることができなかった。これは、切断末端の一方が cos 領域でベクターとの切断部位が異なったために、ライゲーションによる接合ができなかったと考えられる。また、リゾチウムなどの溶菌酵素をコードしている遺伝子が菌内で発現し、大腸菌

が溶菌してしまいクローニングができなかった可能性が考えられる。今後、別の制限酵素 (*Sau3A I* など) を用いることによりファージゲノムを細かく (約 500bp) して、より広くクローニングを行っていく必要がある。また、CPI と近縁であると考えられる *Xanthomonas oryzae* bacteriophage Xp10 のヘッドプロテインをコードする遺伝子上でプライマーを作成し PCR を行ったところ、目的の位置に増幅断片 (図 29) が得られ、その断片をクローニングすることができた。このことから、ファージ CPI と XP10 のコートプロテインは似た配列をもっており、分類学的に近いことが示唆された。

DNA シーケンスの解析

得られたライブラリと PCR 断片のクローンを DNA シーケンシングした結果、インサートの配列を得ることができた。それらを DDBJ の Fasta による相同性検索をかけ遺伝子の予測を行った。その結果、ファージ遺伝子の翻訳の過程で使われるエクソヌクレアーゼや RNA ポリメラーゼ、ターミナーゼ、エンドヌクレアーゼ、また、ファージのコートプロテインや尾部を形成するタンパクをコードする遺伝子、そのほかにタンパク分解酵素をコードする遺伝子と高い相同性が得られた。(Table1.2.3.) ファージのコートプロテインは転写量が多く、ファージの外皮を形成する。この領域にレポーター遺伝子を導入し、コートプロテインとレポーター遺伝子産物の複合体として発現させファージを形成させればその発光量を測定でき、レポーターファージとして病原菌の検出ができる。

2. ビオチン標識ファージを用いたレポーターファージ法の検証

ファージへのビオチン標識

ビオチン (図 30) をファージに結合させたビオチン標識ファージ (10^{10} pfu) をメンブレンに固定化し、アルカリホスファタ

ーゼラベルされたストレプトアビジンをビオチンに結合させ NBT・BCIP による発色によりファージへビオチンが結合したことを確認した。また、コントロールで標識していないファージを同様に発色させたところ、弱いながらも発色が見られた。これはファージを精製していく過程で宿主の残渣が残ってしまったことが原因であると考えられる。したがって、ファージの精製を塩化セシウム密度勾配法を用いて、精製度をより上げていく必要性がある。

ビオチン標識ファージの検出限界

ビオチン標識ファージを 10 乗ずつ段階的に希釈してメンブレンにスポットして、NBT・BCIP での発色による検出限界を調べた。(図 3 1) その結果、 10^6 pfu のビオチン標識ファージを検出することができた。これより、病原菌の検出には 10^6 pfu 以上のビオチン標識ファージを検出に用いる必要があると示唆された。よって、病原菌検出の以下の実験において、ビオチン標識ファージを 10^{10} pfu 用いて検出することにした。

NBT・BCIP での発色による病原菌の検出限界

基質に NBT・BCIP を用いての病原菌(L9)の検出では、 10^4 cfu の病原菌を検出することができた。(図 3 3) 10^4 cfu の菌を感染発色させたときの度合いは、 10^6 pfu のビオチン標識ファージを発色させたときくらいの度合いであり、このことから菌 1 つに対して約 100~1000 のファージが吸着していると考えられる。NBT・BCIP での発色による検出限界は 10^4 cfu で低いこと、発色の識別があいまいになってしまうことから基質に NBT・BCIP を用いる手法では有用性がないことが示唆される。また、菌液のみをメンブレンに固定化し発色を行ったところ、発色が起こってしまった。これは、抗体であるストレプトアビジンが菌の細胞膜もしくは、細胞外多糖質へと結合してしまったためであろうと考えられる。これを解決するためには、未吸着のビオチン標識ファージを除く過程でのバッファのナトリウム濃

度を上げて多糖質を取り除く、ブロッキングの時間を長くしてストレプトアビジンの結合をより特異的にするなど条件を変えて実験を行っていく必要がある。

CDPStar での発色による病原菌の検出限界

基質に CDPStar を用いての病原菌 (L9) の検出では、 10^3 cfu の病原菌を検出することができた。(図 3 4) 10^2 cfu に感染させたファージもコントロールに比べて差はあったが、標準偏差から考えて優位な差とはいえなかった。今回の実験においては、病原菌にビオチン標識ファージを感染させる時間を 30 分で行ったが、その時間をさらに長く (60 分~) すればファージの菌への吸着数がより多く発光量が増し検出感度が高まると考えられる。CDPStar を用いた発光測定では、計数装置を用いてその発光量を数値化できるため NBT・BCIP を用いた発色検定よりも識別が正確になる。よって、この手法を確立すれば病原菌の早期検出への有効な方法となる。

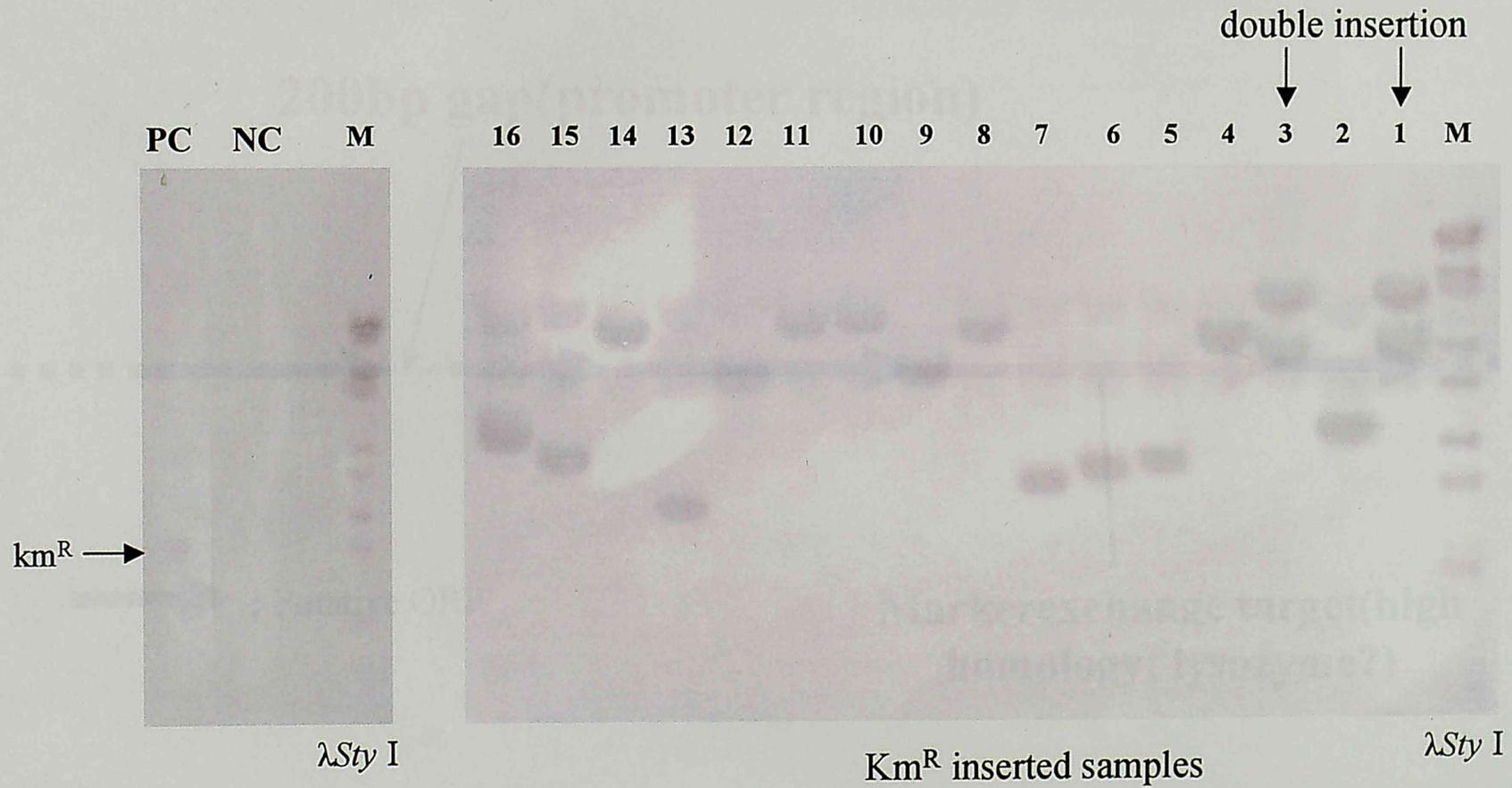
おわりに

本研究によって、植物病原細菌ナス科植物青枯れ病菌 *Ralstonia solanacearum* に感染するファージを単離し、ファージゲノムのシーケンス解析を行い、この内、リゾチーム生産構造遺伝子相同領域領域のクローンを利用し、この領域に海洋細菌 *Vibrio fischeri* のルシフェラーゼ遺伝子 *luxA*, *B* 遺伝子を融合させたマーカージェネティック用プラスミドを構築した。なお、この時点で既に、基質テトラデカナルを添加後発光する事を確認できたが、さらに、これをファージに相同組み換えで組換えファージを構築した。また、ファージ粒子をビオチンで標識し、これを青枯れ病菌に吸着させた後に、酵素標識ストレプトアビジンと作用させる事によって、 10^2 の青枯れ病菌を検出する事が出来た。カンキツかいよう病菌

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* では、これに感染する CP1 ファージについて、コートタンパク質遺伝子相同領域に上記 *luxA*, *B* を挿入したレポーターファージを用いる事により、また、直接臭化エチジウムで標識したファージ粒子を高い moi で吸着させる事により、カンキツかいよう病菌を 10^2 まで検出できた。以上のように、植物病原細菌の検出さらには簡易同定に、発光ファージ法が有用である事、さらに遺伝子操作を必要としない標識ファージが同程度の検出が可能である事を示す事が出来、今後本同定システムが植物検疫の現場で広く利用されるものと期待している。

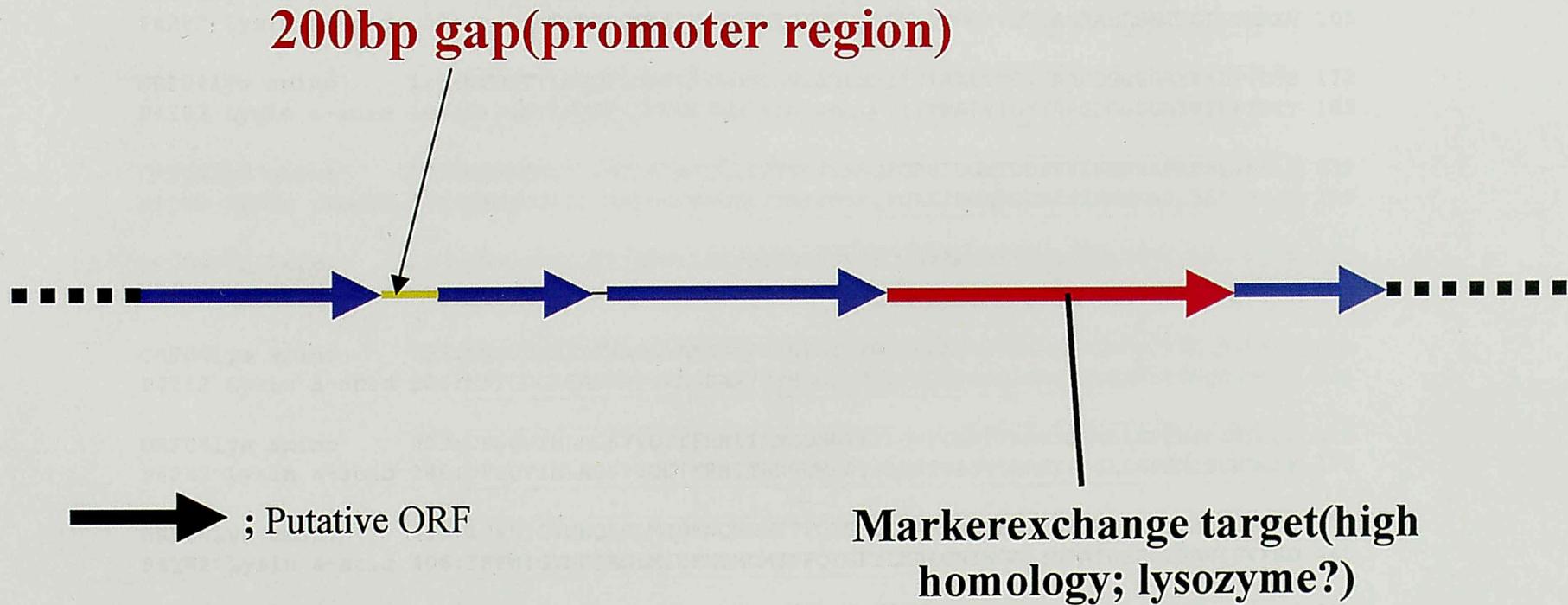
最後に、本研究は科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））の援助なしには、到底上記の様な成果を上げる事が出来なかった。本研究報告書を纏めるにあたって、この援助に対して衷心よりお礼申し上げたい。

☒ 4 Km^r single insertion confirmation



*Kanamycin cassette from pUC4k was used as the probe.

☒5 Predicted genetic map around PRS1 putative lysozyme gene

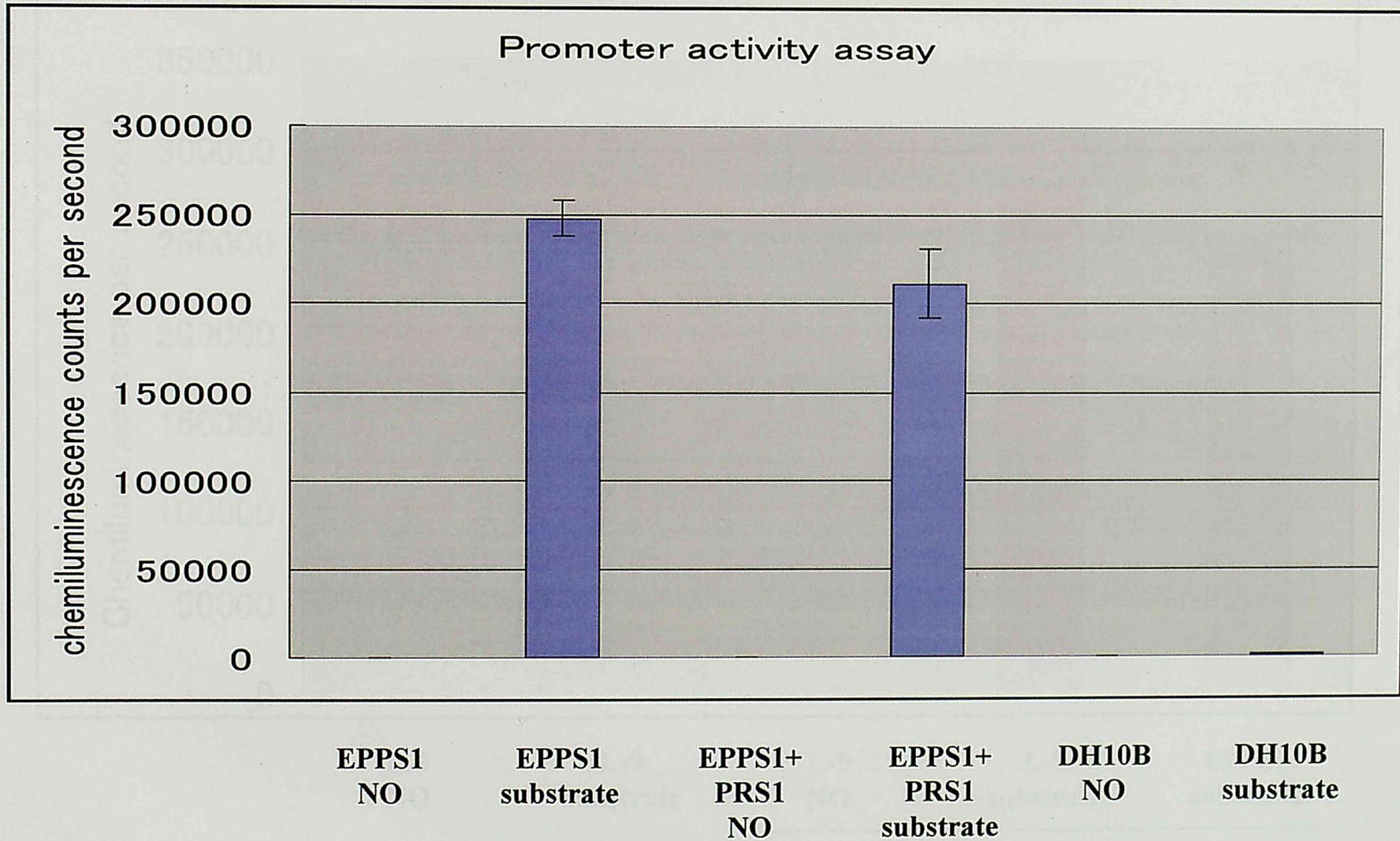


*ORF Finder(NCBI) was used to make the map.

図6 P4282 lysozyme vs PRS1 putative lysozyme alignmetn

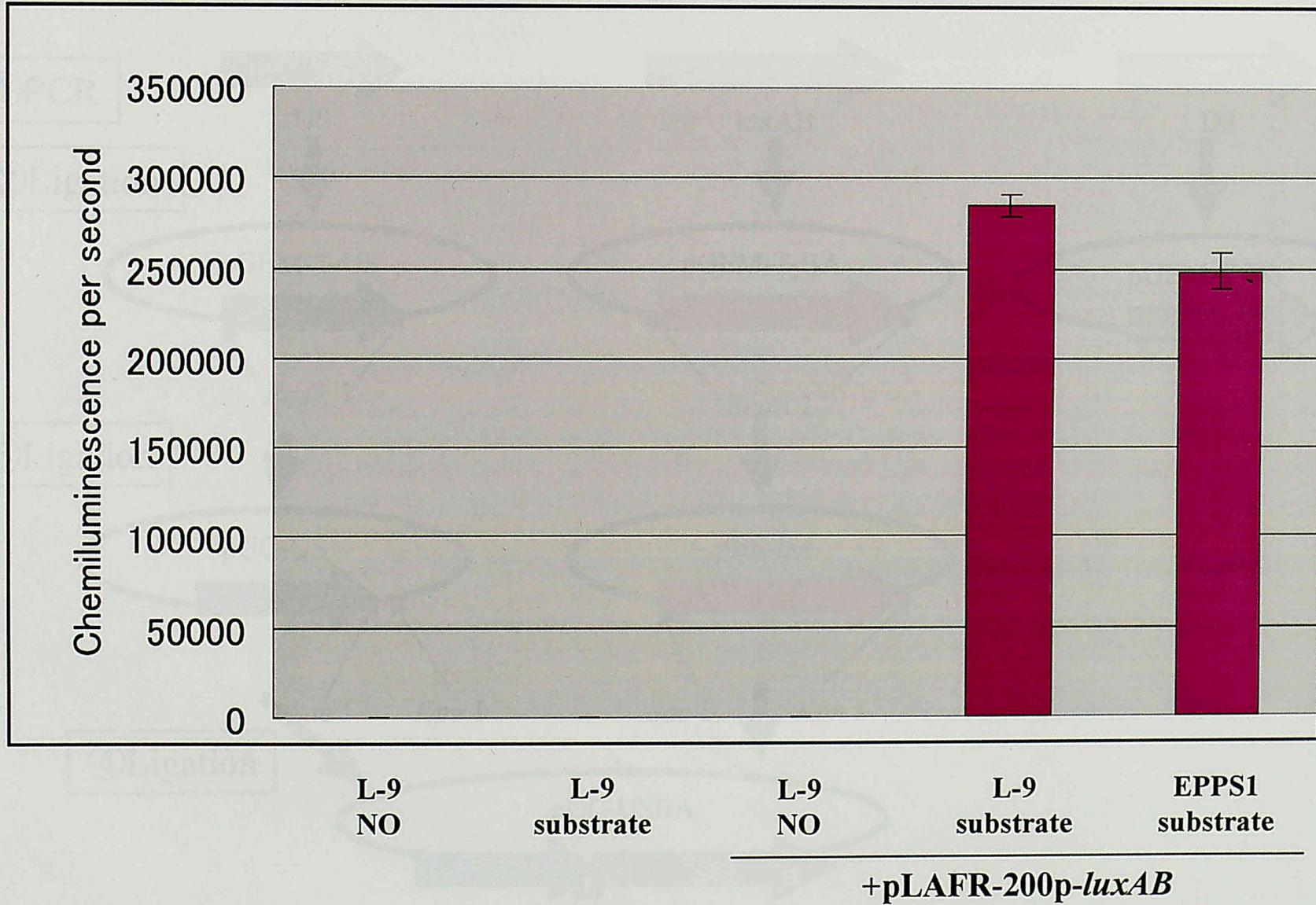
ORF04lys amino	1:MGNMVLN--PI-AFFTDLTGKPLQWRHV-YIGVANANPVTNQLTVYQDAAMTIPMSQPLS	56
P4282 Lysin a-acid	1:---MOLLQNAKTOFI-DSGGLPLANGTVGFYAVGTLNPLP----TYQDQAGTIQNTNPI-	51
ORF04lys amino	57:TSNGYVTLNGTPQPVFVNAASYSLAVNDSAG----NLTLSLPNYTNPLLNQGTGAGGASQI	112
P4282 Lysin a-acid	52:-----TLDSRGOAIWGTGTYRQIVKIDASGVTIWDQIVDTPAGAASLSNITGPGGAALV	105
ORF04lys amino	113:GFDGTTLDQQLFLSRVGRVVDLSIAVLRALSKTYYTRAFVVTGYAAGDGGGGAYWYDPTDTS	172
P4282 Lysin a-acid	106:GFDGGTLSQFFLSKNNRVIDSIAGLRALLKTTYTRAFVVTGYAAGDGGGGAYWYDPTDIT	165
ORF04lys amino	173:SDNNGGTIIIVATDGGRWKLIITTSFVSAKQFGAKIDGVTDDSTVINNAKAPLDALGKRLY	232
P4282 Lysin a-acid	166:STDNNGGTIIIVATDGGRWKLVITTNFVSAKQFGAKIDGATDDSTVINNAKAPLDALGKRLY	225
ORF04lys amino	233:FPAGICKIGTAIMPPLAGVFGDSPQSSVILCNGVSAFNFPSTFGLGRPACVIEKLGIKSY	292
P4282 Lysin a-acid	226:LPAGVCKIGTAITPPLAGVFGDSPQSSVILCNGVSAFNFPSTFGLGRPACVIEKLGIKSY	285
ORF04lys amino	293:NNTCDGLFAFNAPGVASGAAVVYNSGLTVRDVEIGTGGRFGGAFSLKDFFRVNIENVGCT	352
P4282 Lysin a-acid	286:NNTCDGLFAFNAPGVASGAAVVYNSGLTVRDVEIGTGGRFGGAFSLKDFFRVNIENVGCT	345
ORF04lys amino	353:DVSQVINLAGSVVQCTFRNITANGDNAPTILQRTGLSTTAATYSSGLLGPEHISCWDCSF	412
P4282 Lysin a-acid	346:DVSQVINLAGSVVQCTFRNITANGDNAPTILQRTGLSTTAATYSSGLLGPENISCWDCSF	405
ORF04lys amino	413:IRFNIQVNHQAGLMIDFNQMDMETFQYGFYLKAACNINGGIINPAPNSAGTAAWIGVFKD	472
P4282 Lysin a-acid	406:IRFNIQVNHQAGLMIDFNQMDMETFQYGFYLKAACNINGGIINPAPNSAGTAAWIGVFKD	465
ORF04lys amino	473:VPDFETTNGAIIIDGLDVNALNVPPTPGSSYGMVIGNGVKNKCVGTTIKNCRFRGAASSFLS	532
P4282 Lysin a-acid	466:VADFETTNGAIIIDGLDVNALNVPPTPGSSYGMVIGNGVKNKCVGTTIKNCRFRGAASSFLS	525
ORF04lys amino	533:AISAPLMGGEIILENNQVSGTVATGTTFSVTGASYARVVGNRNRCATGGTVNGSMSVTDNGT	592
P4282 Lysin a-acid	526:AISAPLMGGEIILENNQVSGTVATGTTFSVTGASYARVVGNRNRCATGGTVNGSMSITDSTGA	585
ORF04lys amino	593:GSIQIVLGNFATITNTVNSYSGAWNPGTIANSTPASTTVAVPGAIVAGDRVLAGLSSLIG	652
P4282 Lysin a-acid	586:GTVGTVLGNFATITNTVNAISGAWNPGTIANLVAASTTVAVPGAIVAGDRVVVLSSLIG	645
ORF04lys amino	653:SANCMITGYVSSSNVTVIILYVNSGGSQTIIPSGTLNVAVLKP	694
P4282 Lysin a-acid	646:SANCIISGYVSSSGNVTVMILYVNSGGSQTIIPSGTLNVAVLKP	687

☒7 Promoter activity check in EPPS1



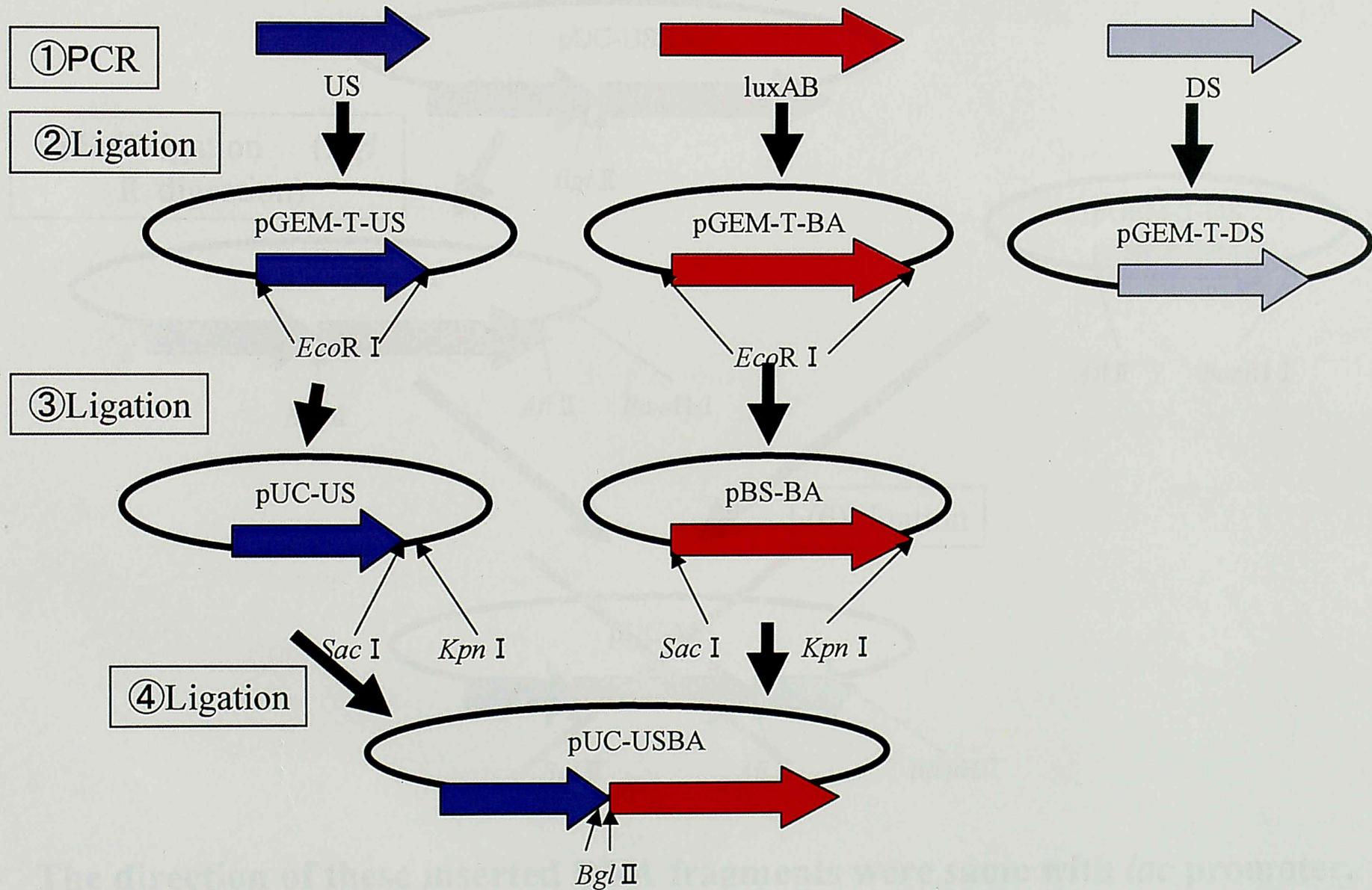
Substrate; tetradecanal

☒ 8 Promoter activity check in L-9

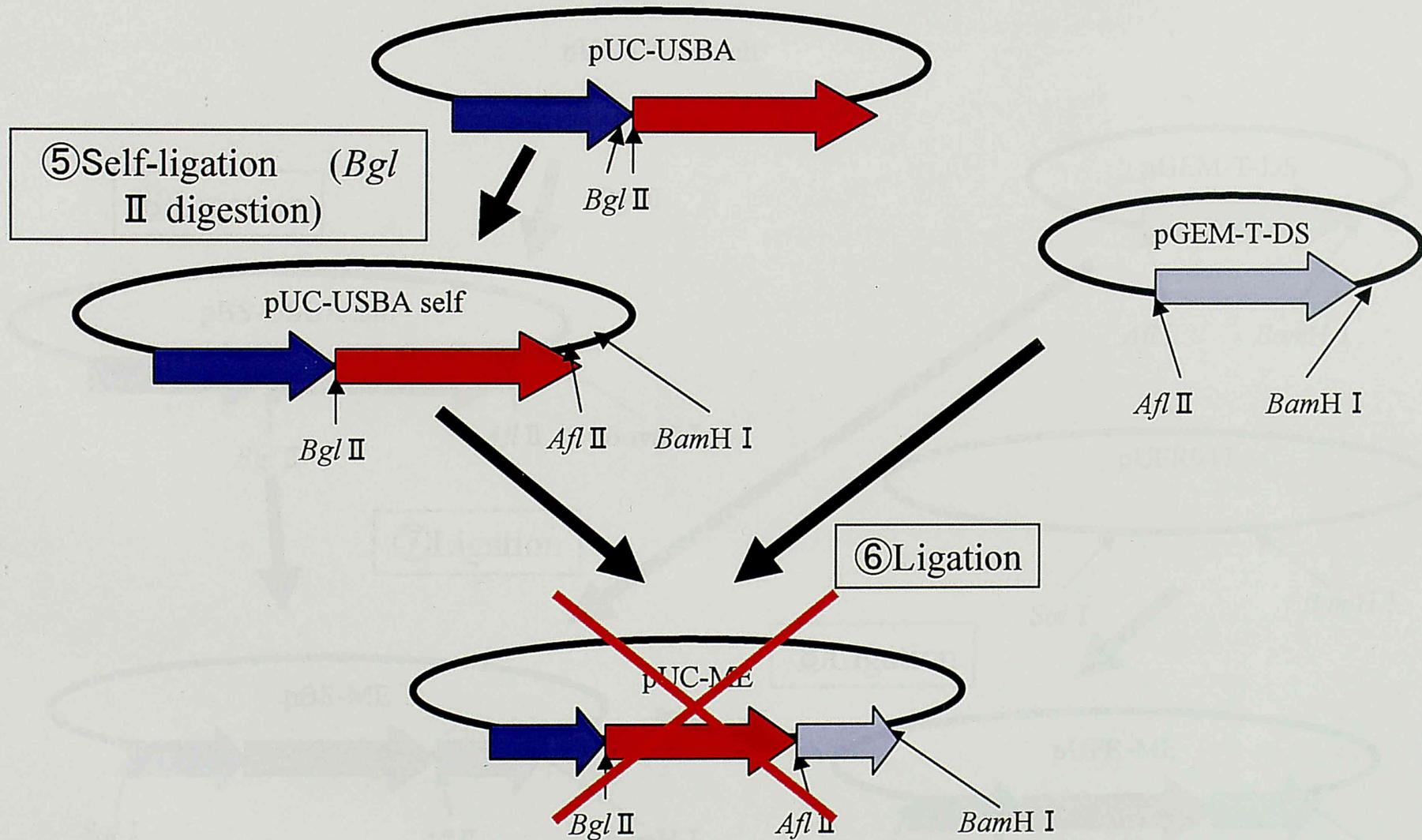


Substrate; tetradecanal

☒9 Marker exchange construct scheme 1

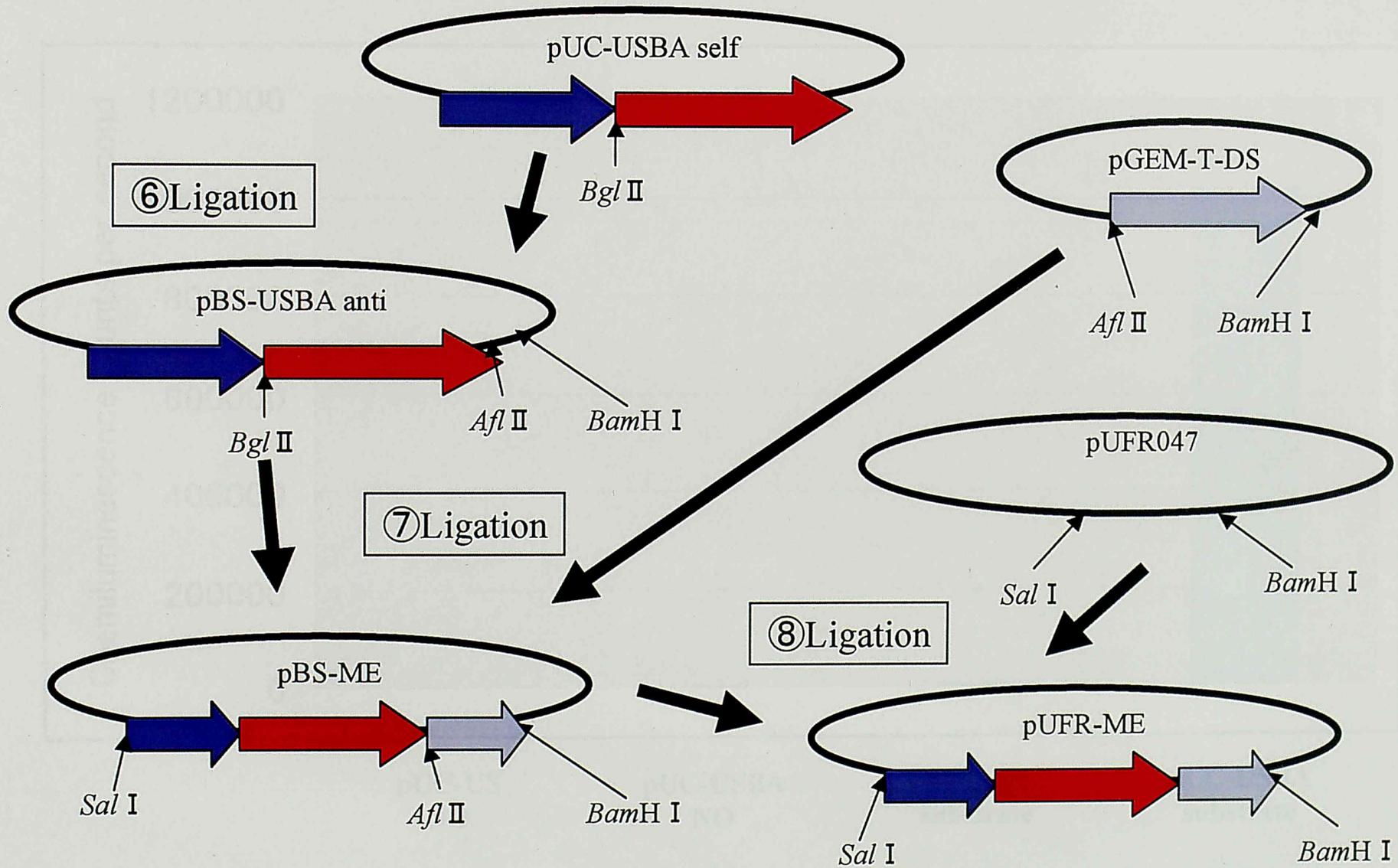


☒ 10 Marker exchange construct scheme 2



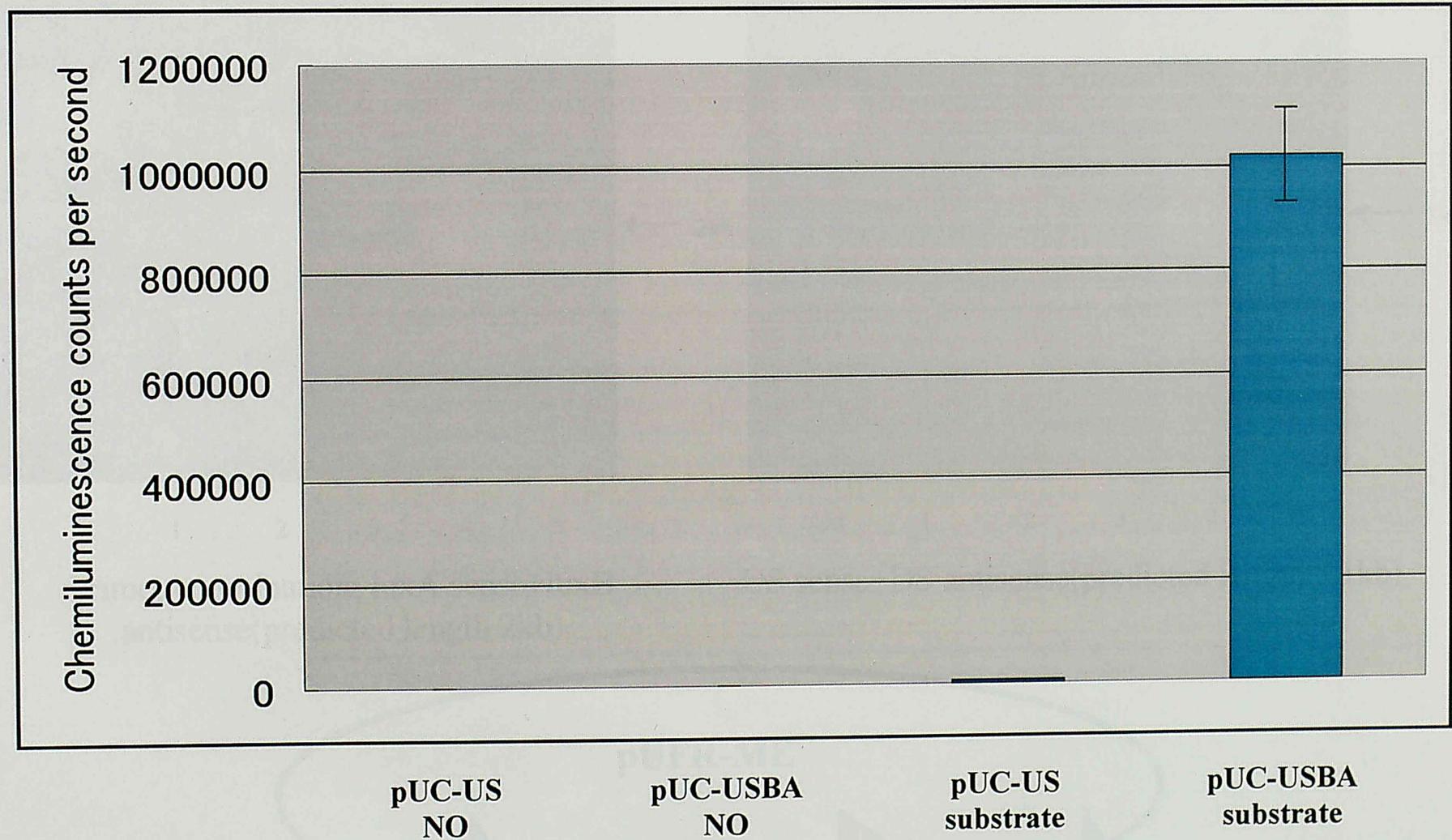
The direction of these inserted DNA fragments were same with *lac* promoter.

☒ 1 1 Marker exchange construct scheme 3



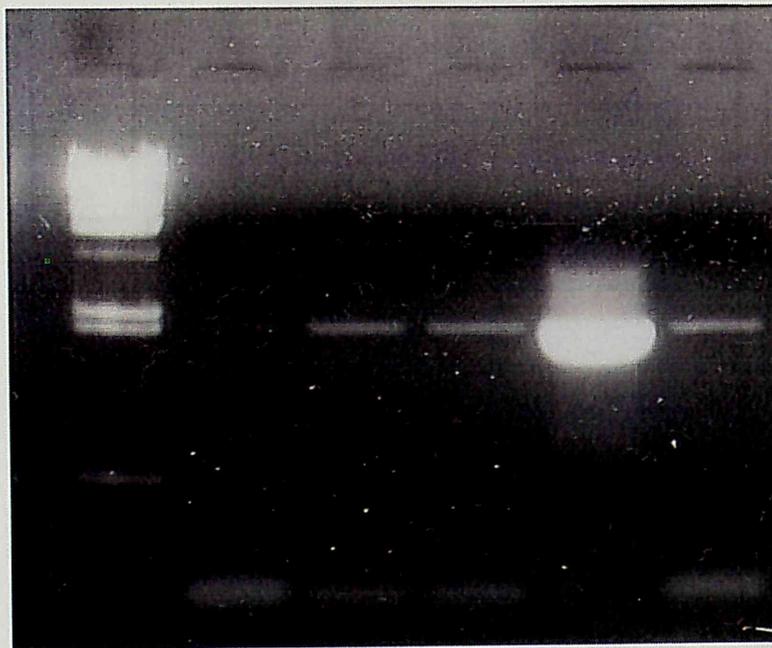
The direction of the inserted DNA fragments were opposite with *lac* promoter.

Figure 12 pUC-USBA self *luxAB* activity confirmation by chemiluminescence assay

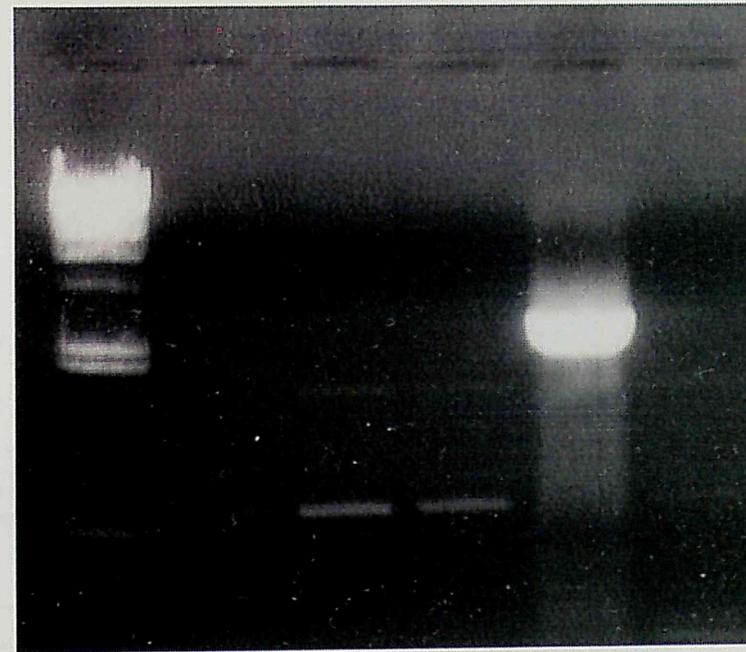


Substrate; tetradecanal

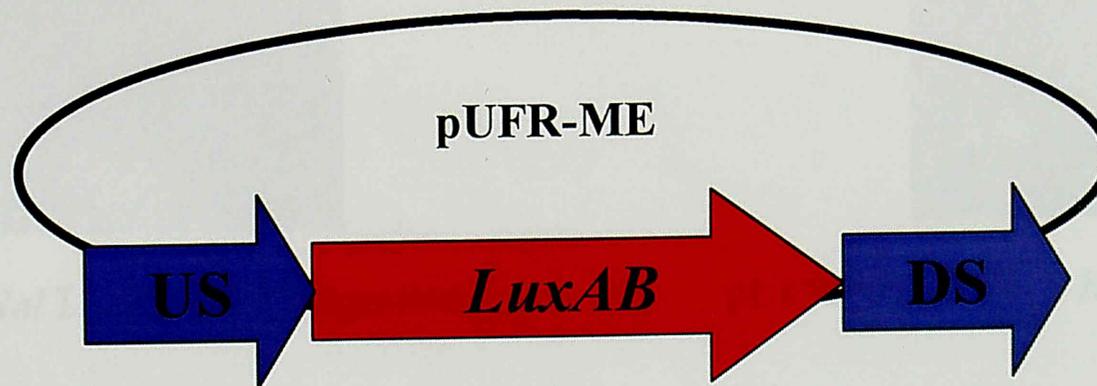
☒ 13 pUFR-ME PCR confirmation



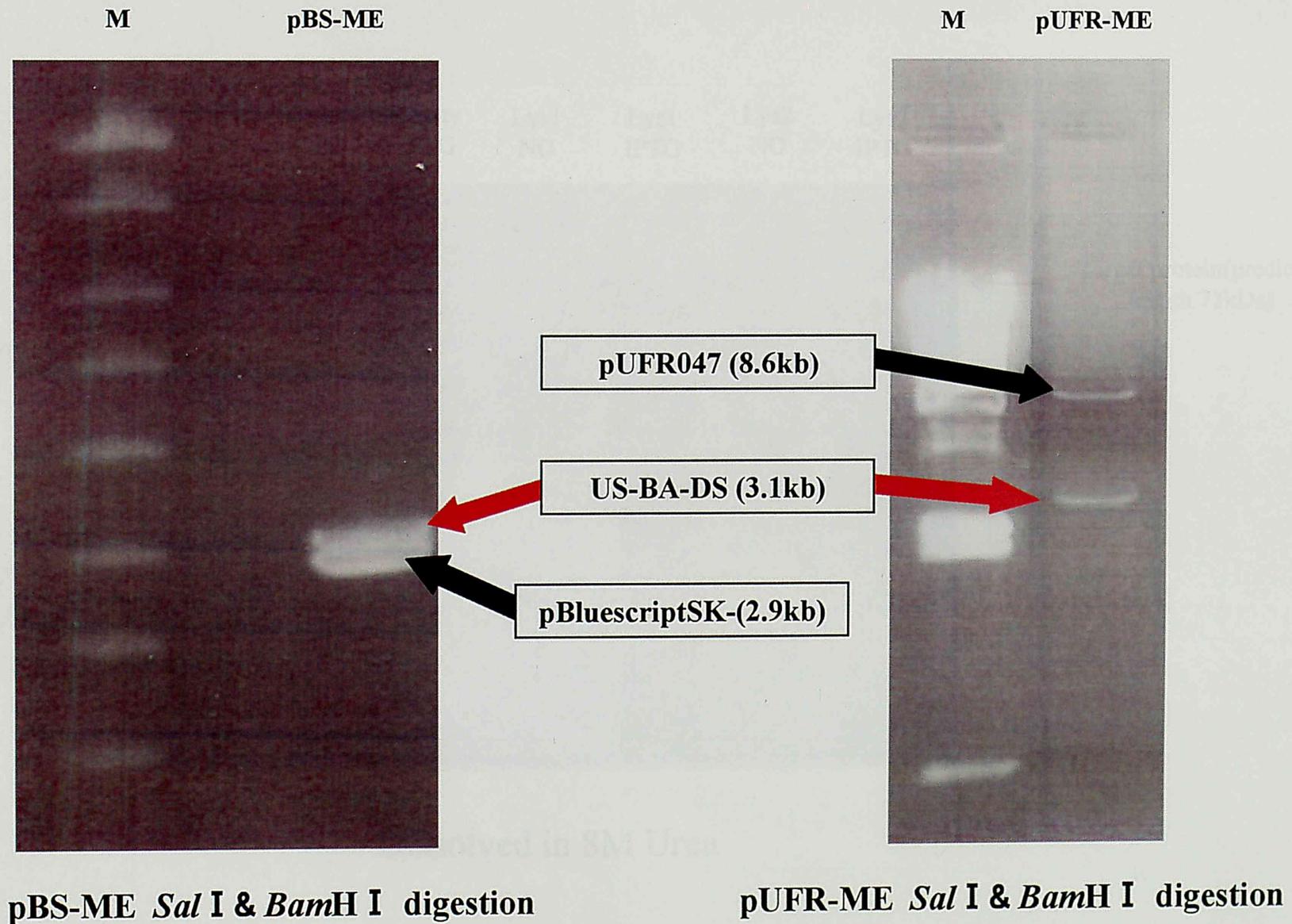
M 1 2 3 4 5
Primer combination; luxA sense+luxB
antisense(predicted length 2kb)



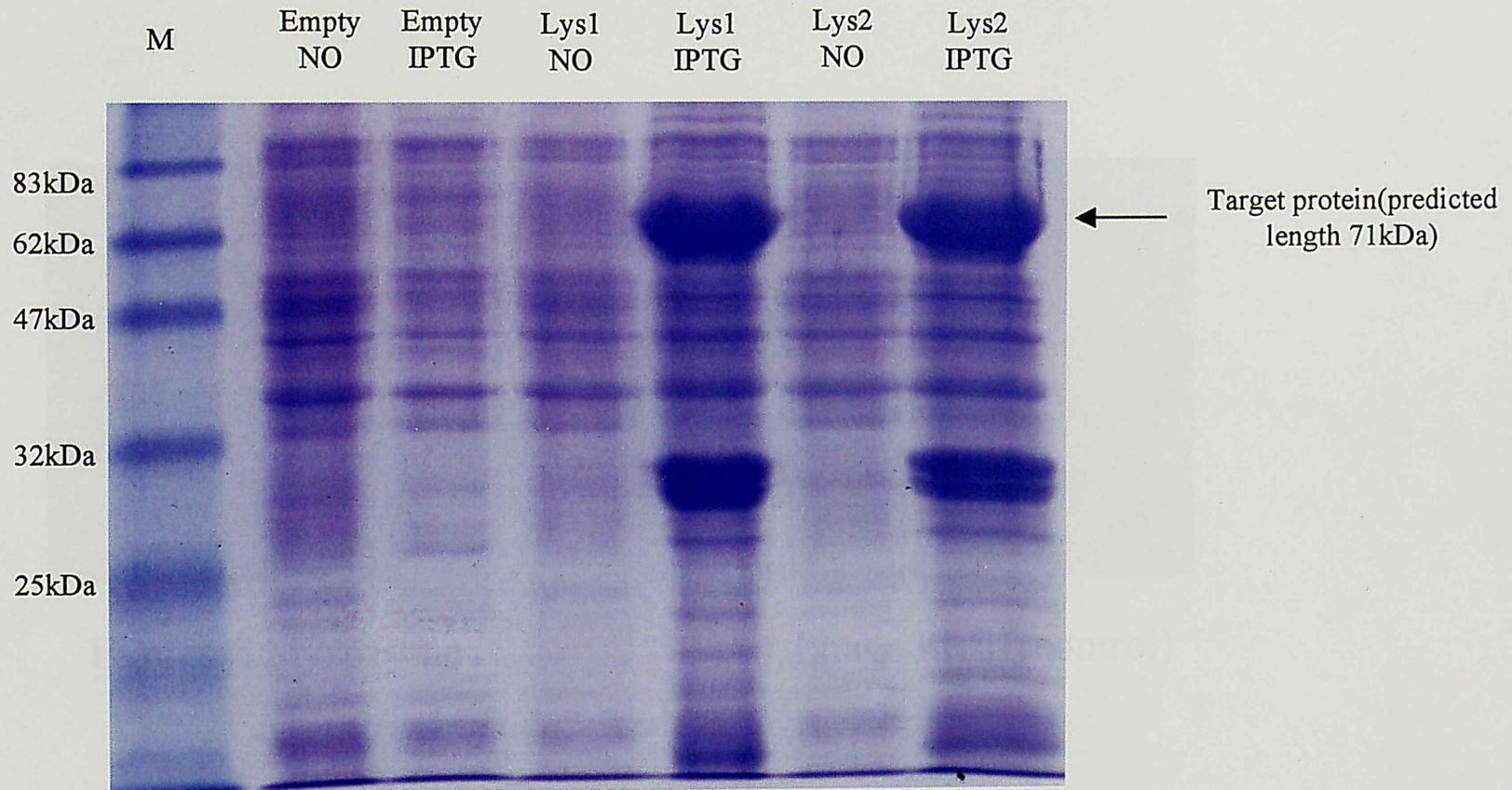
M 1 2 3 4 5
US sense+DS antisense(predicted length 3.1kb)



☒ 14 pUFR-ME confirmation by restriction enzyme digestion

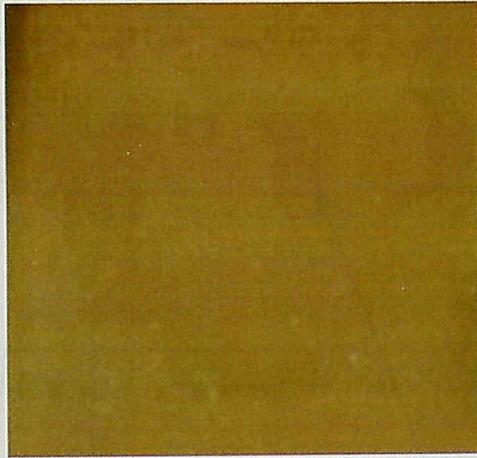


☒ 15 Putative lysozyme protein over expression



Dissolved in 8M Urea

☒ 16 Expressed protein spot assay

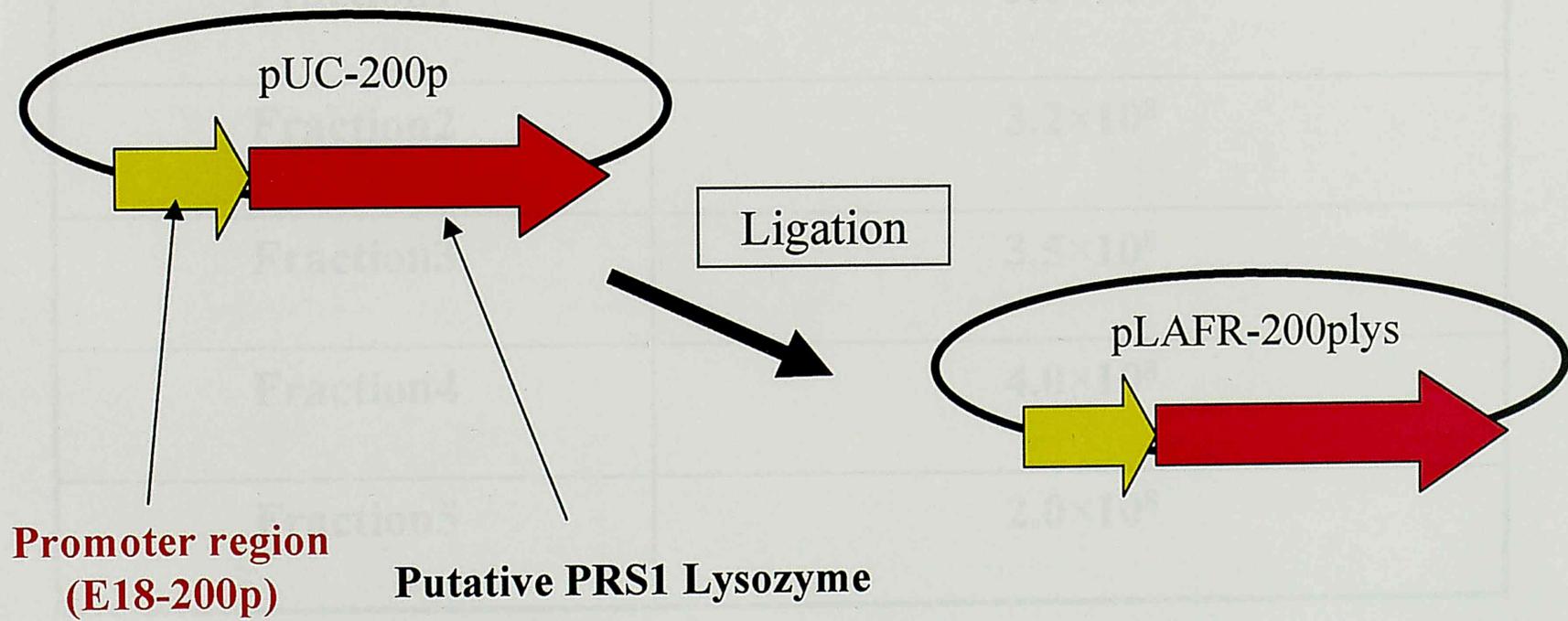


Expressed lysozyme



Phage PRS1(control)

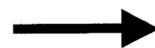
☒ 17 Complementation construct scheme



☒ 18 Biotinylated-bacteriophage adsorption efficiency check

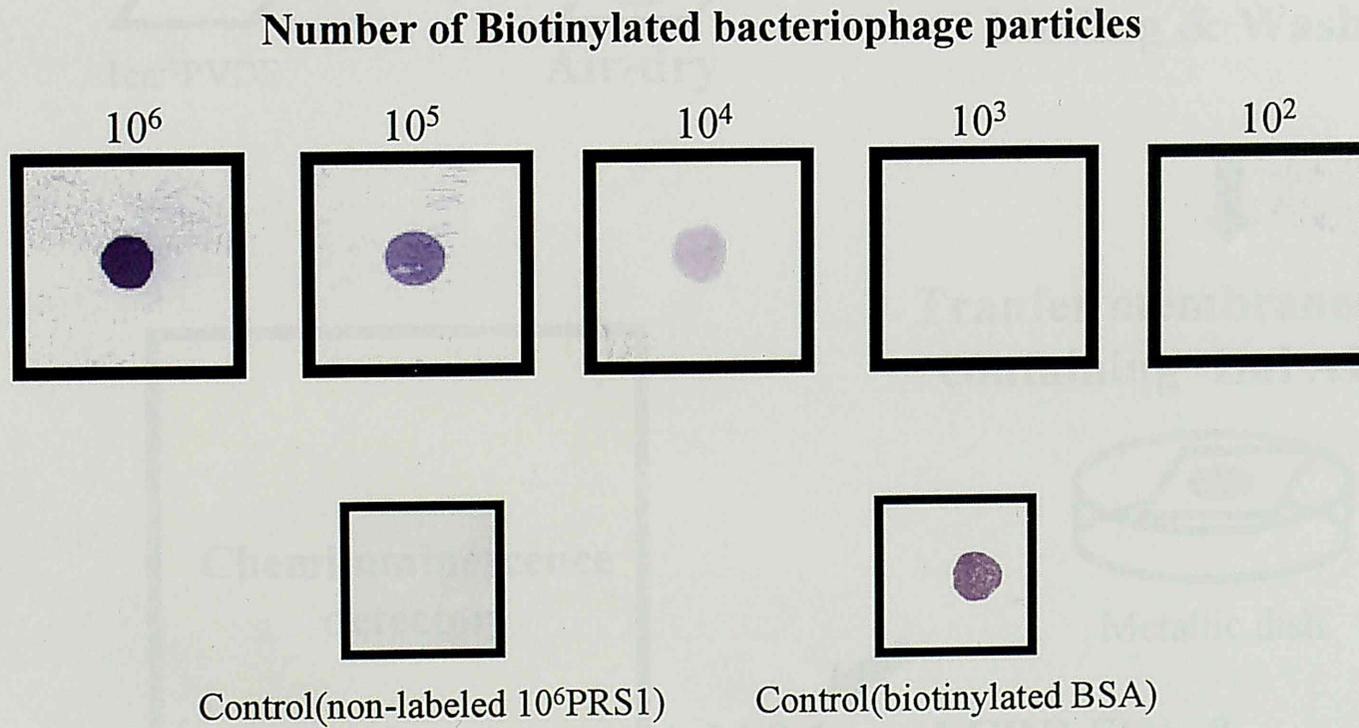
Fraction number	Titer(pfu/ml)
Fraction1	3.0×10^8
Fraction2	3.2×10^8
Fraction3	3.5×10^8
Fraction4	4.0×10^8
Fraction5	2.0×10^8

Original titer; 1.0×10^{10} PFU



Titer after labeling; 5.6×10^9 PUF

图 19 Biotinylated phage adsorption detection



Substrate; NBT & BCIP

☒ 20 Chemiluminescence detection assay overview

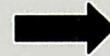
Biotinylated bacteriophage



1cm²PVDF



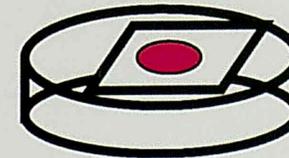
Air-dry



Blocking, Avidin binding & Washing



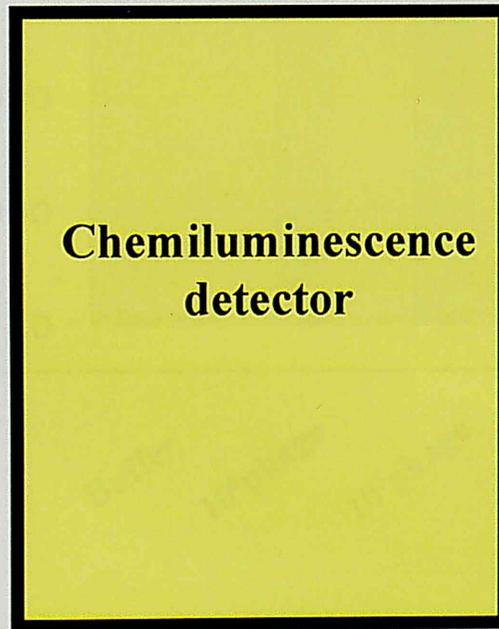
Transfer membrane to a dish containing 1ml AP buffer



Metallic dish

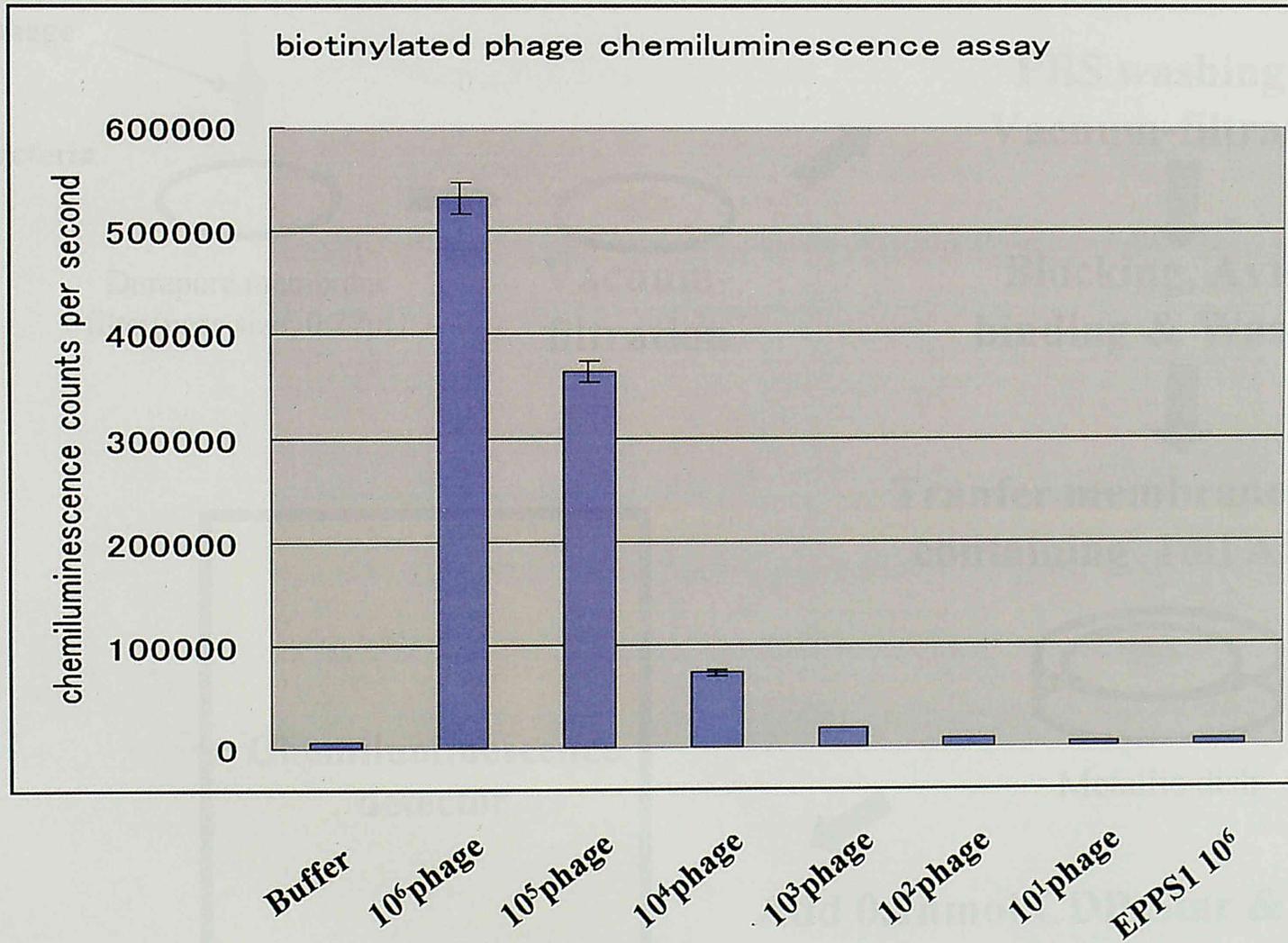


Add 0.1nmol CDP-Star & detection



Chemiluminescence detector

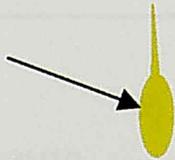
图21 Chemiluminescence assay result (after 45min)



Substrate; CDP-Star

☒23 Chemiluminescence adsorption assay overview

**Biotinylated
bacteriophage**
+



Target bacteria



Durapore membrane
filter(pore size; 0.22 μ l)



**Vacuum-
filtration**



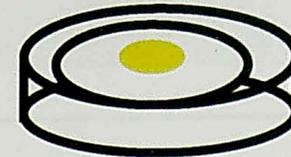
**PBS washing &
Vacuum-filtration**



**Blocking, Avidin
binding & Washing**



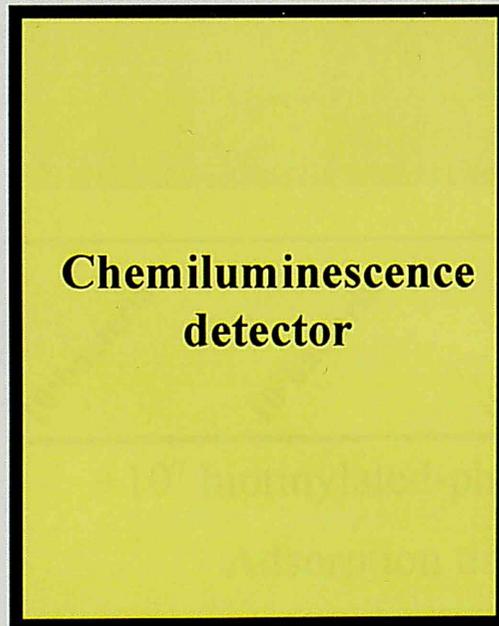
**Transfer membrane to a dish
containing 1ml AP buffer**



Metallic dish

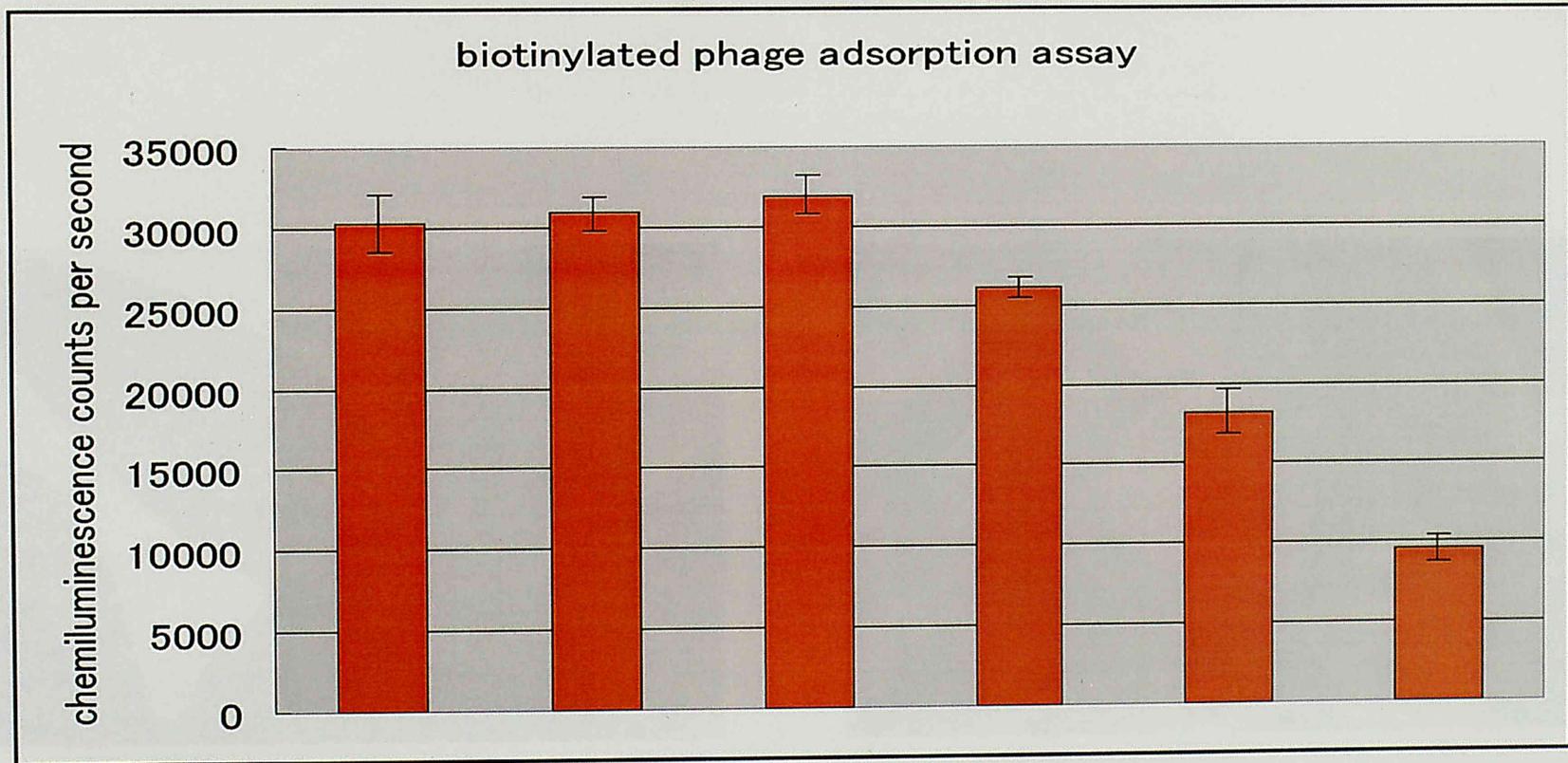


**Add 0.1nmol CDP-Star &
detection**



**Chemiluminescence
detector**

図24 Chemiluminescence adsorption assay result



10^4 bacteria

10^3 bacteria

10^2 bacteria

10^1 bacteria

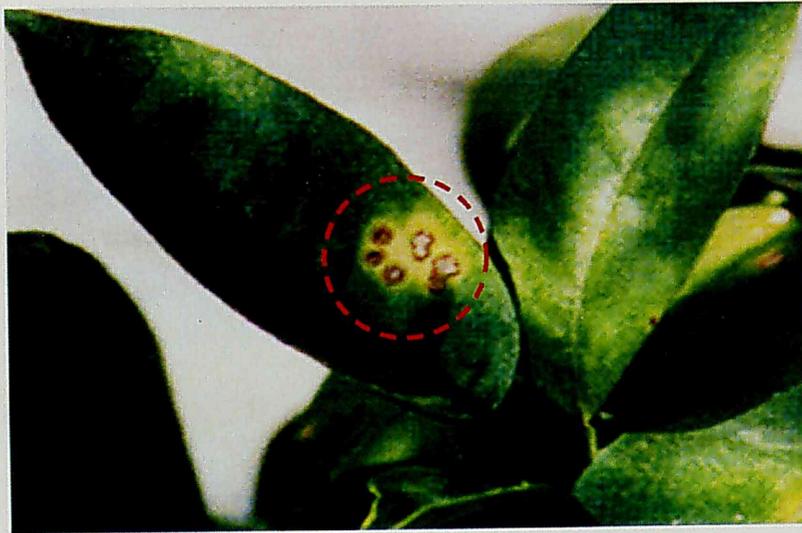
10^7 biotinylated
bacteriophage

10^6 bacteria

+ 10^7 biotinylated-phage particles

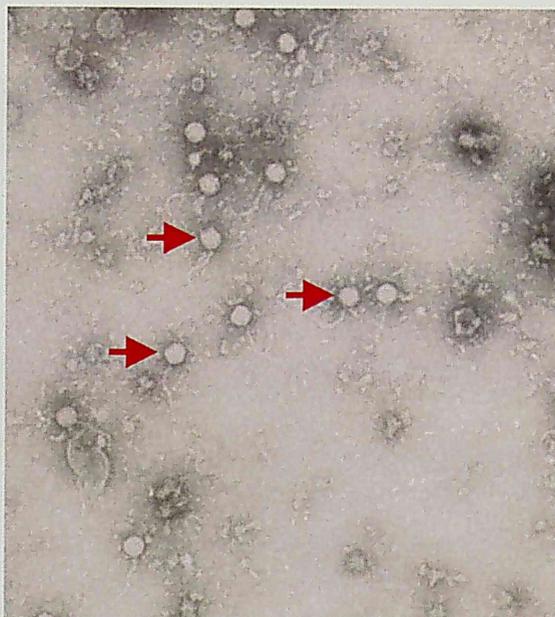
Adsorption time; 20min

Substrate; CDP-Star



カンキツかいよう病菌によるかいよう症状
尾崎 克巳

図24.カンキツかいよう病菌によるかいよう症状



バクテリオファージCP I の電子顕微鏡写真
安藤・室井

図25.バクテリオファージCP I の電子顕微鏡写真

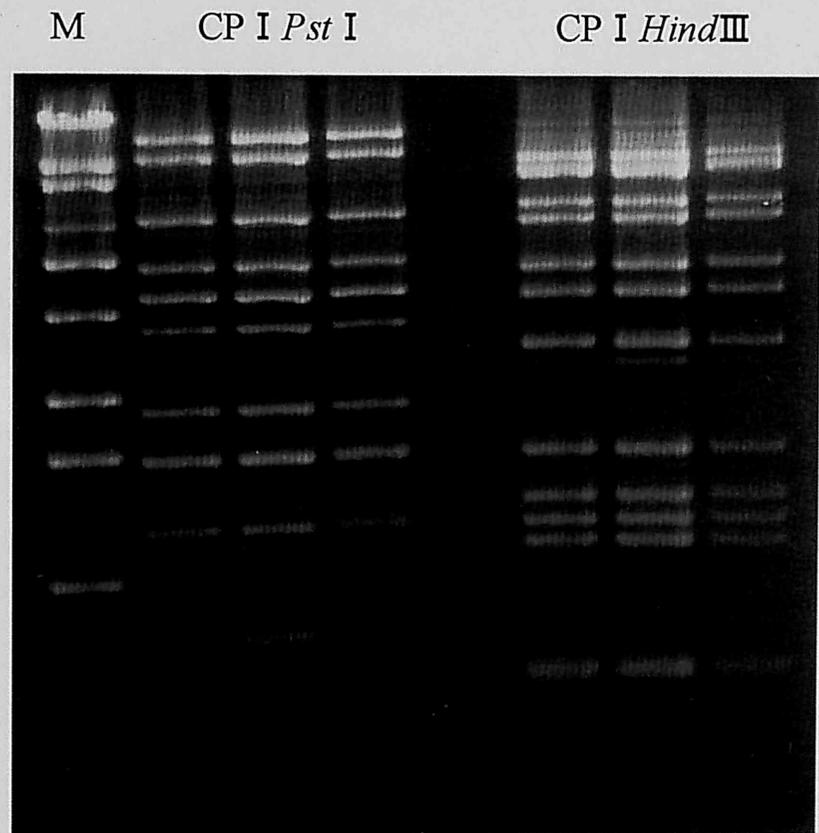


図26.CP I ゲノムの制限酵素処理断片の泳動パターン

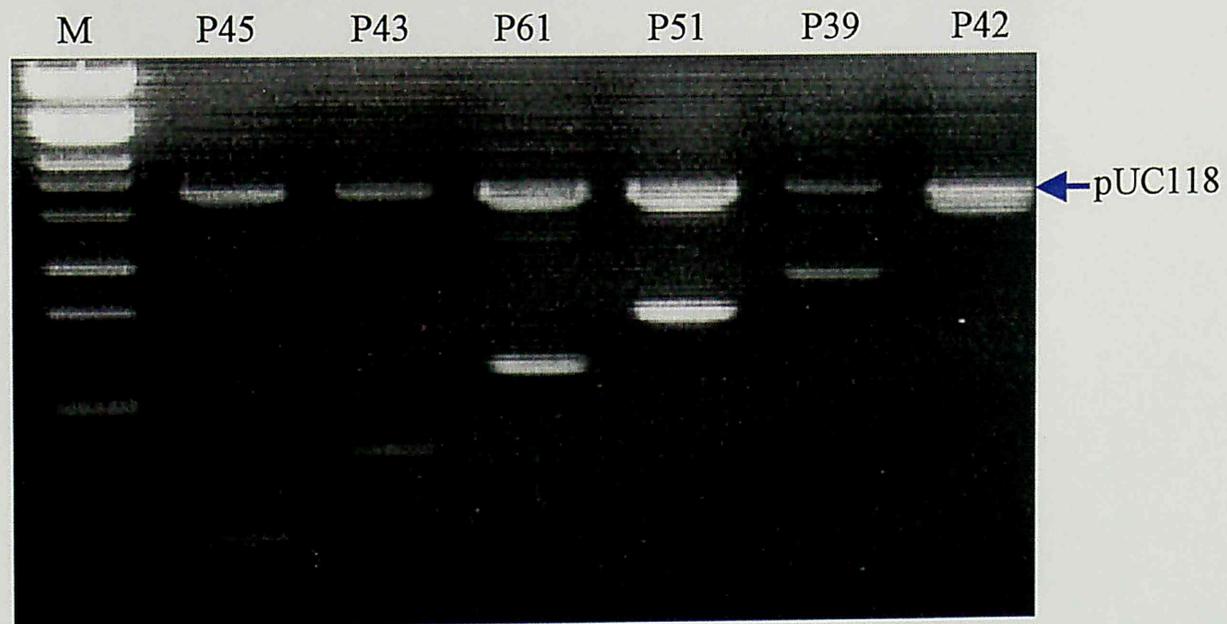
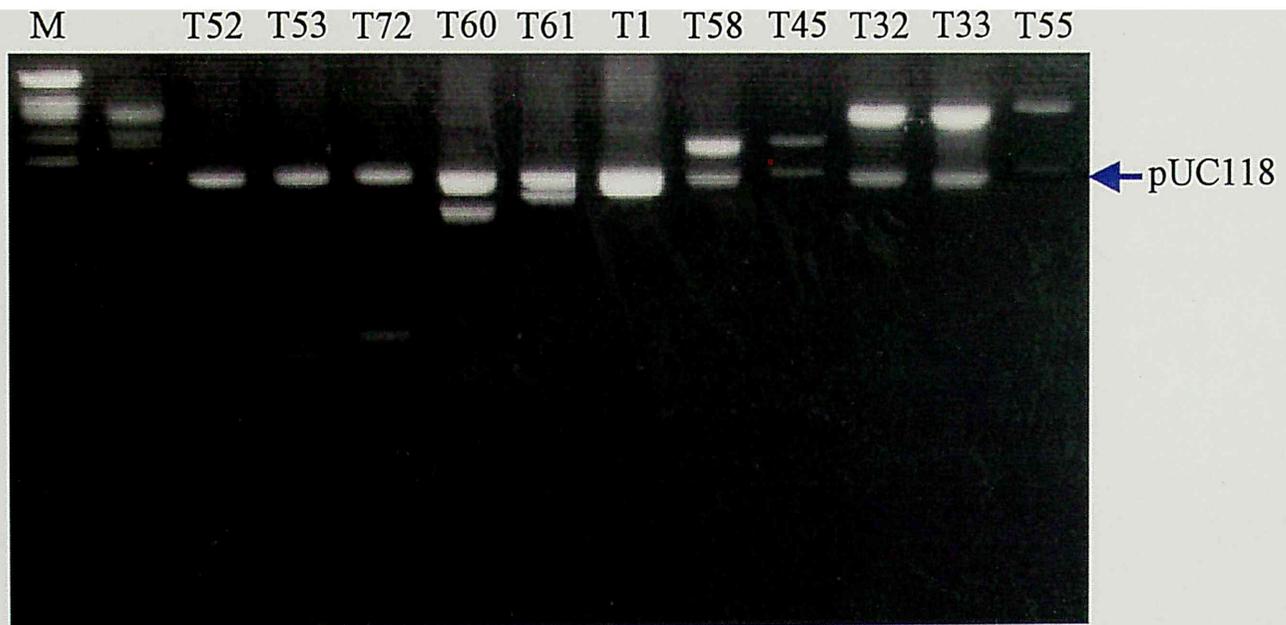


図27.CP I 制限酵素処理断片のクローン

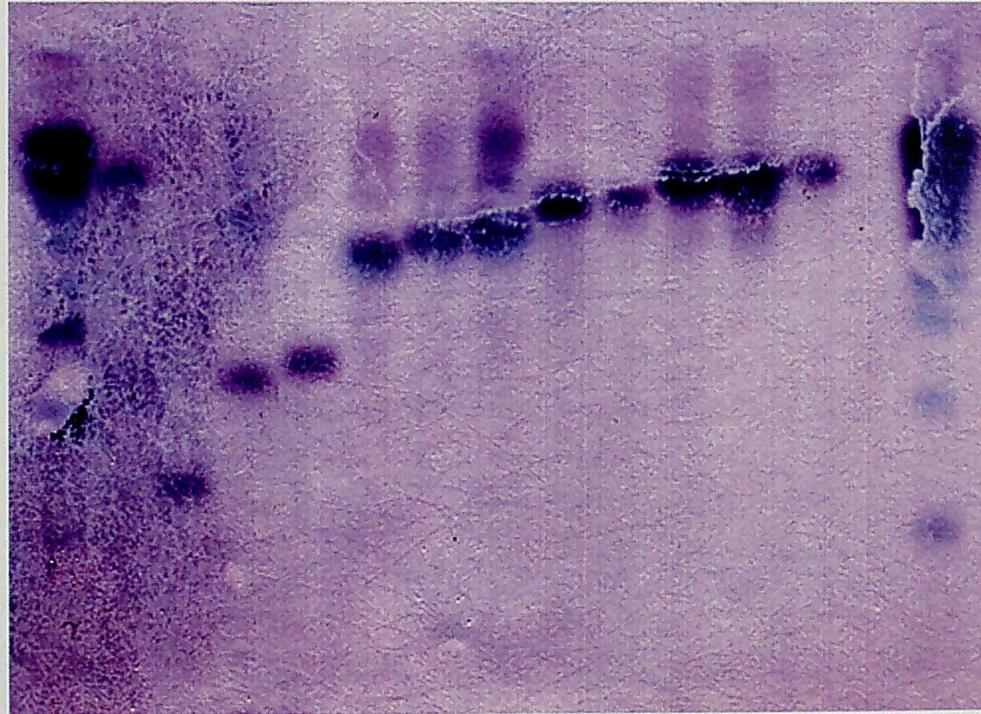


図28.ハイブリダイゼーションによるインサートの確認

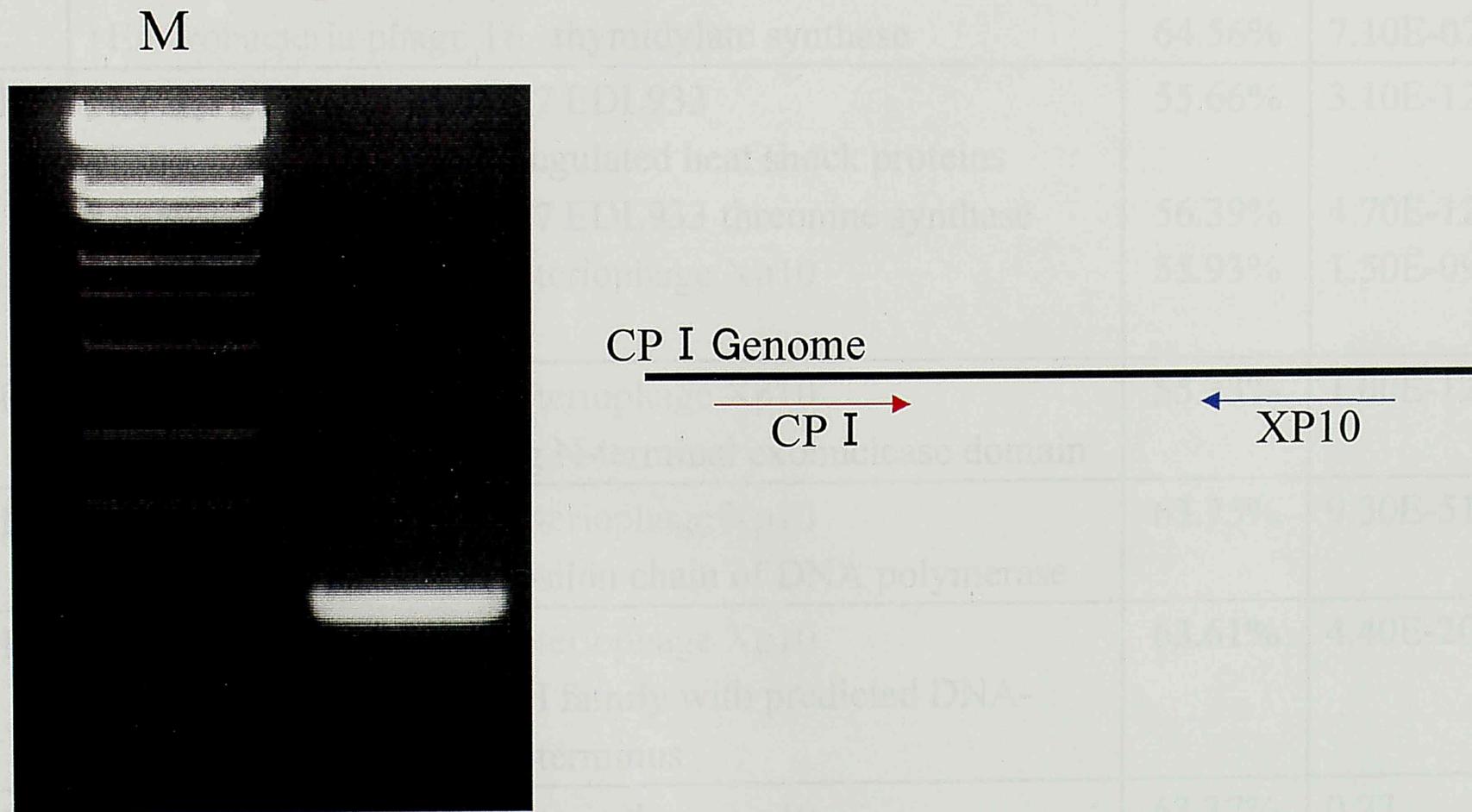


図29.PCRによるヘッドプロテインの増幅

クローン	相同遺伝子	相同性	期待値
P39R	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Bacteriophage U5</i> thymidylate synthase ▪ <i>Bacteriophage Tula</i> thymidylate synthase ▪ <i>Enterobacteria phage T6</i> thymidylate synthase 	64.92%	3.20E-05
T61F	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933 DNA biosynthesis; autoregulated heat shock proteins ▪ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933 threonine synthase ▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 terminase large subunit 	55.66%	3.10E-12
P39F	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 DNA polymerase lacking N-terminal exonuclease domain 	55.33%	1.00E-12
T58F	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 exonuclease related to epsilon chain of DNA polymerase 	63.75%	9.30E-51
T60F	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 endonuclease of the HNH family with predicted DNA-binding module in the C-terminus 	63.61%	4.40E-20
T61R	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 endonuclease of the HNH family 	63.37%	0.23

Table1. 相同性検索結果1

クローン	相同遺伝子	相同性	期待値
T58R	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 DNA-dependent RNA polymerase	60.24%	1.30E-36
	▪ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 DNA-directed RNA polymerase	70.64%	3.00E-07
P51R	▪ <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 ABC transporter, periplasmic solute-binding protein	54.41%	0.11
P42F	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 tail length tape measure protein	67.21%	1.20E-18
	▪ <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 prophage LambdaSo, tail length tape measure protein	64.41%	5.20E-13
P40	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 protease of the ClpP family	67.99%	9.80E-26
	▪ <i>Pseudomonas</i> phage D3 similar to <i>Streptomyces coelicolor</i> ClpP protease	63.11%	9.80E-14
P45	▪ <i>Bordetella bronchiseptica</i> Clp protease	59.70%	0.023

Table2. 相同性検索結果2

クローン	相同遺伝子	相同性	期待値
P42R	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 conserved phage protein	66.83%	1.10E-12
T1F	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 conserved phage protein; central region	65.53%	3.20E-72
T1R	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 conserved phage protein; central region	65.10%	1.90E-52
T55R	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 conserved phage protein; central region	59.97%	1.60E-48
P43	▪ <i>Xanthomonas oryzae</i> bacteriophage Xp10 <u>head portal protein</u>	66.02%	9.70E-54
	▪ Bacteriophage phi1026b <u>putative portal protein</u>	57.23%	2.10E-26

Table3. 相同性検索結果3

Sulfo-NHS-LC-Biotin(PIERCE)

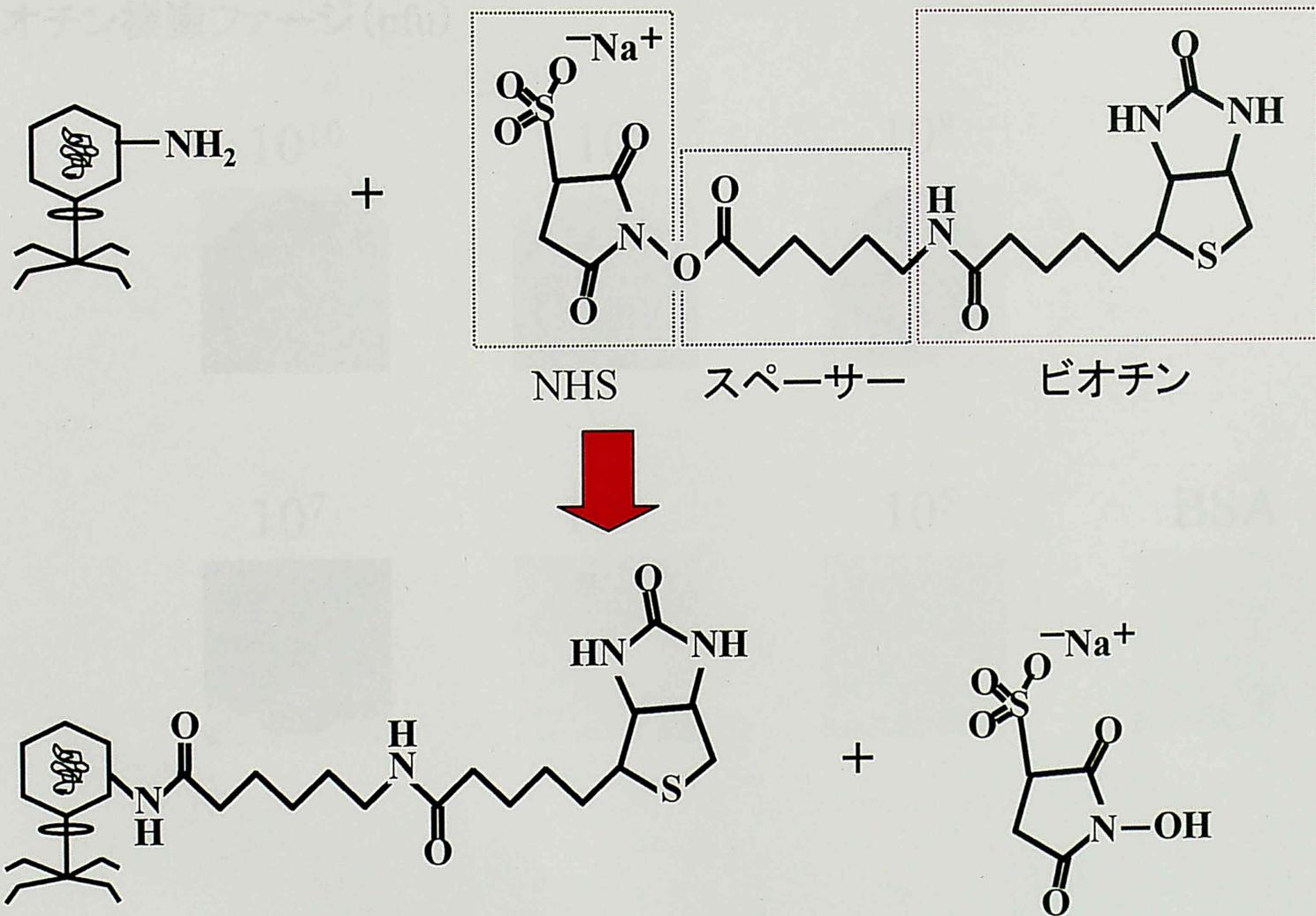


図30.ファージへのビオチン標識

ビオチン標識ファージ (pfu)

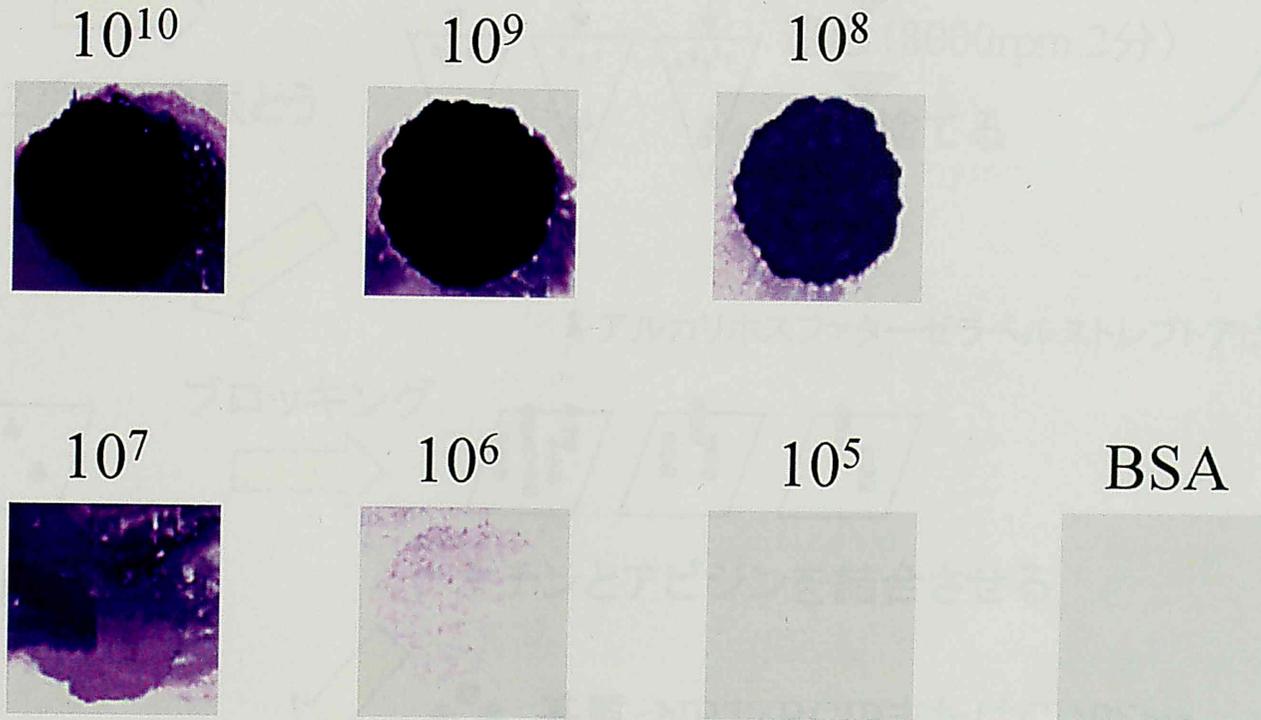
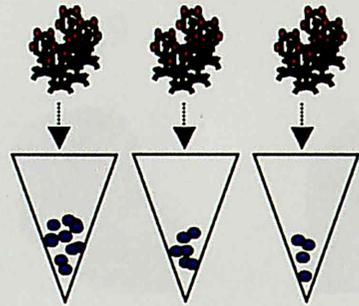


図31. ビオチン標識ファージの検出限界

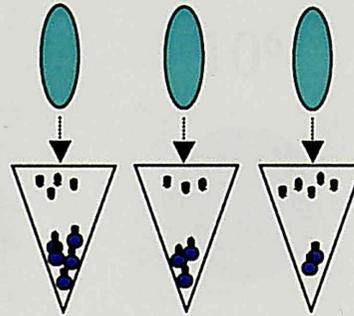
ビオチン標識ファージ



菌 ($10^6, 10^5 \dots$)

27°C 30分 振とう
吸着

バッファー



バッファーを加える

攪拌 (5秒)

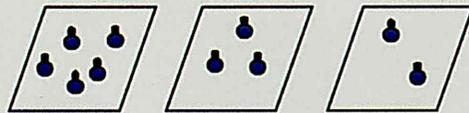
遠心 (8000rpm, 2分)

上清捨てる

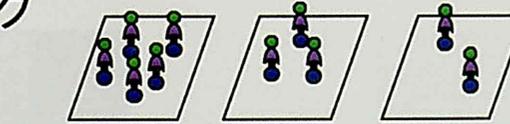
×3

▲ アルカリホスファターゼラベルストレプトアビジン

ブロッキング



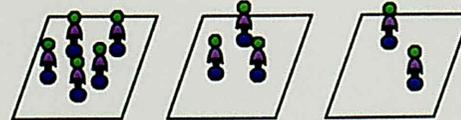
メンブレン (PVDF) に固定化



ビオチンとアビジンを結合させる



基質: NBT・BCIP または CDPStar



発色・発光

図32. ビオチン標識ファージを用いた病原菌の検出方法

菌数 (cfu)

10^9

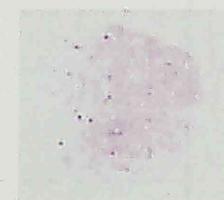
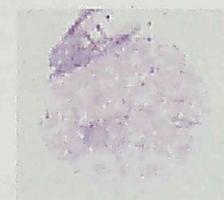
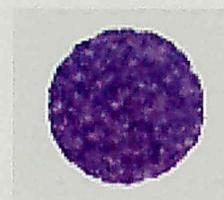
10^8

10^7

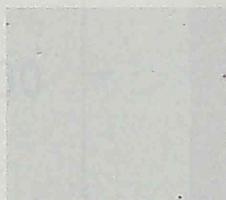
10^6

10^5

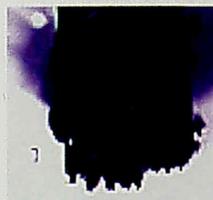
10^4



BSA



Biotinylated CP I 10^5 (菌のみ)



基質: NBT・BCIP

図33. ビオチン標識ファージを用いた病原菌(L9)の検出1

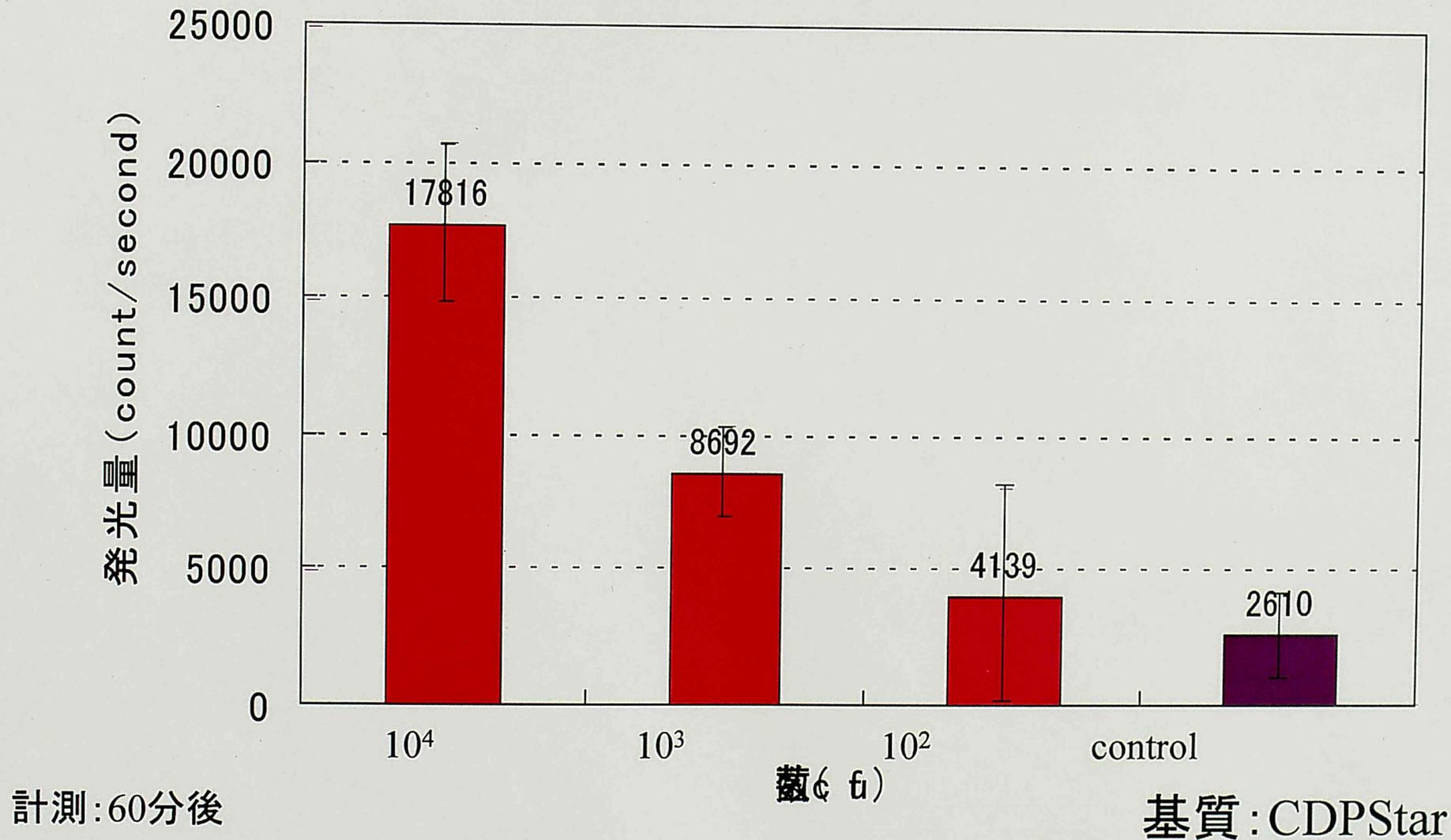


図34.ビオチン標識ファージを用いた病原菌(L9)の検出2