

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-252351

(P2007-252351A)

(43) 公開日 平成19年10月4日(2007.10.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 7/00 (2006.01)</b>	C12N 7/00	2B314
<b>AO1N 63/00 (2006.01)</b>	AO1N 63/00 F	4B065
<b>AO1P 3/00 (2006.01)</b>	AO1P 3/00	4H011
<b>CO9K 17/32 (2006.01)</b>	CO9K 17/32 H	4H026
<b>AO1G 7/00 (2006.01)</b>	AO1G 7/00 6O5Z	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-110115 (P2006-110115)	(71) 出願人	504136568
(22) 出願日	平成18年4月12日 (2006.4.12)		国立大学法人広島大学
(31) 優先権主張番号	特願2006-47865 (P2006-47865)		広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
(32) 優先日	平成18年2月24日 (2006.2.24)	(74) 代理人	110000084
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		特許業務法人アルガ特許事務所
特許法第30条第1項適用申請有り 平成17年9月25日 社団法人生物工学会発行の「日本生物工学会大会講演要旨集」に発表		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 青枯れ病菌感染性バクテリオファージ

(57) 【要約】

【課題】 青枯れ病菌を効果的に防除する手段の提供。

【解決手段】 ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) より単離され、ラルストニア ソラナセラムのC-319株、M4S株、Ps29株、Ps65株、Ps72株、Ps74株、MAFF106603株、MAFF106611株、MAFF211270株、MAFF211271株、MAFF211272株、MAFF301556株、MAFF301558株、MAFF730138株及びMAFF730139株のすべてに溶菌性を示すバクテリオファージ。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) より単離され、ラルストニア ソラナセラムの C-319株、M4S株、Ps29株、Ps65株、Ps72株、Ps74株、MAFF106603株、MAFF106611株、MAFF211270株、MAFF211271株、MAFF211272株、MAFF301556株、MAFF301558株、MAFF730138株及びMAFF730139株のすべてに溶菌性を示すバクテリオファージ。

## 【請求項 2】

ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) MAFF211272株より単離され、RSA1と命名された請求項 1 記載のバクテリオファージ。

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載のバクテリオファージを有効成分として含有する青枯れ病の防除剤。

10

## 【請求項 4】

請求項 1 又は 2 記載のバクテリオファージを有効成分として含有する土壌改良剤。

## 【請求項 5】

請求項 1 又は 2 記載のバクテリオファージを植物又は土壌に散布することを特徴とする青枯れ病の防除方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 又は 2 記載のバクテリオファージを水耕栽培又は溶液栽培の培養液に添加することを特徴とする青枯れ病の防除方法。

20

## 【請求項 7】

請求項 1 又は 2 記載のバクテリオファージを土壌に添加することを特徴とする土壌の改良方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、青枯れ病菌（ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*)）に対して溶菌性を示すバクテリオファージ（以下、単に「ファージ」とも言う）、及びその利用に関する。

## 【背景技術】

30

## 【0002】

青枯れ病菌は、トマト、ナス、タバコなどに青枯れ病（立ち枯れ病）を引き起こす土壌細菌である。比較的温暖な地域を中心に世界中に分布し、ナス科やマメ科の他、経済的に重要な農作物多種を含む 33 科 200 種以上の植物に感染し、甚大な被害をもたらす。一度汚染された土壌から病原菌を除去することはきわめて困難である。本病に対する防除法としては、これまでに間作、輪作、土壌改良、土壌消毒法などが考案されているが、その発生を安定的に抑えることはほとんどできていない。

## 【0003】

また、植物細菌病に関しては、病原細菌を溶菌するバクテリオファージを利用した防除方法が、病原細菌を選択的に溶菌して防除できる手段として古くから期待され、青枯れ病についても、P4282ファージ、PK101ファージ等の青枯れ病菌感染性バクテリオファージが報告されている（非特許文献 1、非特許文献 2）。また、最近、本発明者らは、青枯れ病菌に対して溶菌性を示し、その宿主特異性から 3 種類に大別される十数種のバクテリオファージを自然界より単離することに成功し、先に特許出願している（特許文献 1）。

40

しかしながら、これまで報告されているバクテリオファージは、溶菌スペクトルが狭く、宿主範囲、地理的分布、病原性、疫学的特徴から多くの系統が存在する青枯れ病菌を有効に防除するには十分なものではない。

## 【特許文献 1】特開 2005 - 278513 号公報

【非特許文献 1】田中 博、根岸秀明、前田初枝：非病原性タバコ立枯病菌 *Pseudomonas solanacearum* M4S とバクテリオファージによるタバコ立枯病の生物防除、日本植物病理学

50

会報 56巻 2号 pp243-246 (1990年)

【非特許文献2】Toyoda H, Kakutani K, Ikeda S, Goto H, Tanaka H and Ouchi S. Characterization of deoxyribonucleic acid of virulent bacteriophage and its infectivity to host bacteria, *Pseudomonas solanacearum*. J. Phytopathology. (1991), 131:11-21

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、新規な青枯れ病菌感染性バクテリオファージを用いて、青枯れ病を効果的に防除する手段を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、斯かる実情に鑑み鋭意検討を重ねた結果、ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) より、青枯れ病菌に感染性の広い溶菌スペクトルを示すバクテリオファージを単離することに成功し、これを用いることにより青枯れ病を効果的に防除できることを見出した。

【0006】

すなわち、本発明は以下の(1)~(6)に係るものである。

(1)ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) より単離され、ラルストニア ソラナセラムのC-319株、M4S株、Ps29株、Ps65株、Ps72株、Ps74株、MAFF106603株、MAFF106611株、MAFF211270株、MAFF211271株、MAFF211272株、MAFF301556株、MAFF301558株、MAFF730138株及びMAFF730139株のすべてに溶菌性を示すバクテリオファージ。

20

(2)上記バクテリオファージを有効成分として含有する青枯れ病の防除剤。

(3)上記バクテリオファージを有効成分として含有する土壌改良剤。

(4)上記バクテリオファージを植物又は土壌に散布することを特徴とする青枯れ病の防除方法。

(5)上記バクテリオファージを水耕栽培又は溶液栽培の培養液に添加することを特徴とする青枯れ病の防除方法。

(6)上記バクテリオファージを土壌に添加することを特徴とする土壌の改良方法。

【発明の効果】

30

【0007】

本発明のバクテリオファージは、公知の青枯れ病菌感染性バクテリオファージに比べて、広い作用スペクトルを示す。従って、これを用いることにより、多くの青枯れ病に有効な防除剤を提供することができ、また青枯れ病菌で汚染された土壌の改良に有効な土壌改良剤を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明のバクテリオファージは、ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) から単離されるものである。

ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) は、トマト、ナス、タバコなど200種以上の農作物に対して、青枯れ病(立ち枯れ病)を引き起こす多犯性の土壌伝染細菌である。本明細書においては、「青枯れ病菌」とも云う。

40

【0009】

本発明のバクテリオファージは、少なくともラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) のC-319株、M4S株、Ps29株、Ps65株、Ps72株、Ps74株、MAFF106603株、MAFF106611株、MAFF211270株、MAFF211271株、MAFF211272株、MAFF301556株、MAFF301558株、MAFF730138株及びMAFF730139株のすべてに溶菌性を示すという、宿主特異性を有する。

斯かる宿主特異性は、後記実施例3に示すように、特開2005-278513号公報(特許文献1)に記載のタイプ1、タイプ2及びタイプ3に属するバクテリオファージと

50

は、異なるものである。

【0010】

ここで、M4S株は、タバコより分離されたレース1の菌株であり、前記非特許文献1に記載の菌株である。

Ps29株は、タバコより分離されたレース1の菌株であり、Ozawa H, Tanaka H, Ichinose T, Shiraishi T, and Yamada T. Bacteriophage P4282, a parasite of *Ralstonia solanacearum*, encodes a bacteriolytic protein, important for lytic infection of its host. *Molecular Genetics and Genomics* (2001) 265:95-101に記載の菌株である。

C-319株、Ps65株、Ps72株及びPs74株は、タバコより分離されたレース1の菌株である。

10

C-319株、M4S株、Ps29株、Ps65株、Ps72株及びPs74株は、山陰建設工業（島根県出雲市）より分譲された菌株である。

MAFF106603株は、レース1、biovar 3の菌株であり、MAFF106611株は、レース1、biovar 4の菌株であり、MAFF211270株は、レース1、biovar N2の菌株であり、MAFF211271株は、レース3、biovar N2の菌株であり、MAFF211272株は、レース4、biovar 4の菌株であり、MAFF301556株はレース1、biovar 4の菌株であり、MAFF301558株は、レース3、biovar N2の菌株であり、MAFF730138株は、レース1、biovar 3の菌株であり、MAFF730139株は、レース1、biovar 4の菌株である。MAFF106603株、MAFF106611株、MAFF211270株、MAFF211271株、MAFF211272株、MAFF301556株、MAFF301558株、MAFF730138株及びMAFF730139株は、農林水産省生物資源研究所発行の微生物遺伝資源利用マニュアル（12）、堀田光生・土屋健一、平成14年3月に記載の菌株で、農林水産省生物資源研究所農業生物資源ジーンバンクより分譲が可能である。

20

【0011】

上記の宿主特異性（溶菌スペクトル）を有するバクテリオファージは本発明のバクテリオファージに包含されるが、このうち、ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) MAFF211272株より単離されるものが好ましい。MAFF211272株は、上記のとおりレース4、biovar 4の菌株であり、農林水産省生物資源研究所農業生物資源ジーンバンクより分譲が可能である。

そして、このうち、「RSA1」と命名されたバクテリオファージが特に好ましい。

RSA1は、本出願人において分譲可能な状態で保管されている。尚、当該RSA1は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託を申請（NITE AP-210（平成18年2月22日））したが、拒否された。

30

【0012】

以下、バクテリオファージRSA1が有するこの他の特徴について説明する。

1. 形態

図1に示すとおり、バクテリオファージRSA1は、正二十面体型の頭部と線上の尾部とから構成されるものである。これは、前記非特許文献1に記載のP4282ファージとは、P4282ファージは頭部の直径が約70nm、尾部が約20nmであるのに対して、RSA1は頭部の直径が約40nm、尾部が約100nmである点で異なる。

【0013】

40

2. ゲノム解析

バクテリオファージRSA1のゲノムは、2本鎖DNAよりなり、制限酵素（*Sma*I）処理による断片のパターンは、図2に示すとおりであり、特許文献1に記載のタイプ1～3のバクテリオファージとは異なる（実施例5）。

電気泳動により決定したRSA1のゲノムサイズは、約39Kbpであり（図2）、非特許文献2のPK101ファージ（約35Kbp）、とは異なる。

また、RSA1の塩基配列を決定したところ、サイズは38,820bpであり、全ゲノムが決定されているラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) GMI1000株のゲノム中に、RSA1の配列と非常に高い相同性を示す領域が存在しており（図3）、RSA1はラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) のゲノム中に溶原化され保持される可能

50

性を示している。

以上より、バクテリオファージRSA1は、文献未記載の新規な青枯れ病菌感染性バクテリオファージであると云える。

【0014】

本発明のバクテリオファージは、ブランクアッセイ・分離方法を用いることにより、青枯れ病菌より分離することができる。すなわち、例えば、ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) MAFF211272株をCPG(実施例1)培地で旋回培養し、この培養液をtop agarに混合して、CPG寒天培地上に広げる。25~30℃で12時間~48時間培養し、検出された単一ブランクの中央部分を滅菌爪楊枝等でつつき、例えばラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) M4S株等の培養液に添加してバクテリオファージを増幅させる。増幅後、遠心上清を0.2μm孔のフィルター等で濾過滅菌することにより、バクテリオファージRSA1を分離することができる。

10

【0015】

本発明のバクテリオファージは、一般的なバクテリオファージと同様の方法で増殖させることができる。例えば、ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) を培養し、十分に増殖させた後、本発明のバクテリオファージを接種し、培養を継続することにより、大量のファージ溶液を得ることができる。ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) の培養は、定法に従って行うことができ、例えば、CPG液体培地などを用い、温度27~37℃で旋回又は振とう培養すればよい。バクテリオファージを接種する時期は、ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) が十分増殖している時期であれば特に限定されないが、菌体濃度が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  cfu/ml程度まで増殖した時期に接種するのが望ましい。ファージ接種から6~12時間の培養で、ほぼすべての菌が溶菌し、ファージ溶液を得ることができる。

20

【0016】

本発明のバクテリオファージは、上述したように、公知の青枯れ病菌感染性バクテリオファージに比べて、広い作用スペクトルを有し(実施例3)、圃場や水耕栽培等に適用した場合に、優れた青枯れ病防除効果を発揮する(実施例8)。従って、このバクテリオファージは、青枯れ病の防除、青枯れ病菌で汚染された土壌の改良及び水耕栽培や溶液栽培の培養液の当該細菌の駆除等に利用できる。なお、ここでいう「防除」とは、感染した青枯れ病菌の「駆除」と感染の「予防」の双方を含む意味である。

30

【0017】

本発明のバクテリオファージを青枯れ病の防除剤又は土壌改良剤として利用する場合、上述した増殖方法によって得られるファージ溶液、あるいはファージ溶液を遠心分離等によって培養残渣と分離したものを使用してもよいが、展着剤を配合した溶液として使用しても、植物体への付着をよくすることができ好ましい。また、微生物製剤において一般的に使用される固体担体又は液体担体を配合して、水和剤、粉剤、カプセル剤等の製剤形態に調製したものを使用してもよい。

【0018】

当該バクテリオファージを含有する防除剤又は土壌改良剤においては、溶液中のファージ濃度は、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{11}$  pfu/mlとするのが好ましく、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu/mlとするのが更に好ましい。

40

【0019】

防除の対象となる植物としては、ジャガイモ、ナス、トマト、トウガラシ、ピーマン、タバコ、シソ、ダイコン、イチゴ、バナナ、マーガレット、キク、ヒマワリ等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、防除対象とする病害は、ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) によって引き起こされる病害であれば限定されず、例えば、ナス科植物の青枯れ病、タバコ立枯れ病などを挙げることができる。

【0020】

本発明の防除剤を圃場に散布する場合、その散布量は青枯れ病菌を防除できる範囲内で

50

あれば特に限定されないが、通常、圃場1平方メートル当たり $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$  pfuのファージを散布するのが好適である。水耕栽培又は溶液栽培での防除に用いる場合は、ファージを $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu/mlになるように培養液に添加するのが好ましい。

#### 【0021】

また、本発明の土壌改良剤を土壌に添加する場合、その添加量は特に限定されないが、通常、土壌1kg当たり $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$  pfuのファージを添加するのが好適である。

#### 【実施例】

#### 【0022】

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明する。尚、特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いる。

#### 【0023】

#### 実施例1 青枯れ病菌の培養

ポリペプトン10.0g、カザミノ酸1.0g、及びグルコース5.0gを、蒸留水1,000mlに加えて、CPG液体培地を調製した。このCPG液体培地を用いて、青枯れ病菌の各菌株を28℃で巡回培養(200rpm)又は振とう培養(300rpm)した。

#### 【0024】

#### 実施例2 バクテリオファージRSA1の分離

ブランクアッセイ・分離方法により青枯れ病菌MAFF211272株よりバクテリオファージRSA1を分離した。

ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) MAFF211272株をCPG培地で巡回培養し、この培養液250 $\mu$ Lを4mlのtop agarに混合して、CPG寒天培地(上記CPG液体培地に17.0gの寒天を添加した培地)上に広げた。28℃で12時間~48時間培養後、ブランクを検出した。単一ブランクの中央部分を滅菌爪楊枝でつつき、青枯れ病菌(M4S株)の培養液(OD600=0.1~0.5)に添加してバクテリオファージを増幅した。増幅後、遠心上清を0.2 $\mu$ m孔のフィルターで濾過滅菌し、バクテリオファージRSA1を分離した。

このファージRSA1は青枯れ病菌 MAFF211272株に溶原化していた可能性がある。

尚、RSA1は、平成18年2月15日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託申請したが(受領番号NITE AP-210(平成18年2月22日))、平成18年3月28日に受託の拒否がなされた。

#### 【0025】

#### 実施例3 バクテリオファージRSA1の宿主特異性

バクテリオファージRSA1の青枯れ病菌の各菌株に対する宿主特異性をブランクアッセイ法によって調べた。実施例2で分離したバクテリオファージRSA1を、実施例1で得た青枯れ病菌の各菌株の培養液(OD600=0.1~0.5)に混合し、28℃で1時間だけ保温後、4mlのtop agarに混合してCPG寒天培地上に広げ、ブランクアッセイを行った。青枯れ病菌の検定菌として、病原性、疫学的特徴、生理・生化学的性質が異なるラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) C319株、M4S株、Ps29株、Ps65株、Ps72株、Ps74株、MAFF106603株、MAFF106611株、MAFF211270株、MAFF211271株、MAFF211272株、MAFF301556株、MAFF301558株、MAFF730138株、MAFF730139株を用いた。

本発明者が青枯れ病菌からすでに単離している3種類のバクテリオファージ(特許文献1)との相同性を比較・検討するために、L-type(タイプ1ファージ)、M-type(タイプ3ファージ)、S-type(タイプ2ファージ)のバクテリオファージについても、同様の実験を行った。結果を表1に示す。

#### 【0026】

【表 1】

	A-type (RSA1)	L-type	M-type	S-type
C319	○	○	×	○
M4S	○	○	○	×
Ps29	○	○	○	×
Ps65	○	○	○	×
Ps72	○	○	×	×
Ps74	○	○	○	×
MAFF106603	○	○	×	○
MAFF106611	○	○	×	○
MAFF211270	○	×	○	×
MAFF211271	○	×	×	×
MAFF211272	○	×	×	×
MAFF301556	○	×	×	×
MAFF301558	○	○	×	×
MAFF730138	○	○	○	×
MAFF730139	○	×	×	○

○：宿主とする      ×：宿主としない

10

20

## 【0027】

表 1 に示すように、バクテリオファージ RSA1 は検定に用いた全ての菌株を宿主とし、すでに単離している 3 種類のバクテリオファージ（特許文献 1）とは宿主特異性が異なっていた。

## 【0028】

## 実施例 4 バクテリオファージ RSA1 の形態観察

バクテリオファージ RSA1 の形態を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。実施例 2 で示すバクテリオファージ RSA1 の濾過滅菌液 10ml を、40,000g で 1 時間、遠心分離し、バクテリオファージ RSA1 を沈殿として得た。この沈殿を 0.01mol/l の MgSO<sub>4</sub> を含む 100 μl の PBS に懸濁した。バクテリオファージの懸濁液をホルムパールの膜を張ったグリッドに滴下し、リンタングステン酸を用いてネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。この結果を図 1 に示す。

30

## 【0029】

図 1 に示すように、バクテリオファージ RSA1 は正二十面体型の頭部と線状の尾部から構成されていた。尾部の末端は太くなっていた。この形態は、非特許文献 1 で報告されているものとは異なっていた。ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) に感染する類似ファージの報告は文献等では見あたらない。

40

## 【0030】

## 実施例 5 バクテリオファージ RSA1 のゲノムの解析

バクテリオファージ RSA1 より核酸を単離し解析した。RSA1 のゲノムは 2 本鎖 DNA よりなり、電気泳動でファージ RSA1 のゲノムサイズを決定したところ、図 2 に示すように約 39kbp であった。RSA1 より精製した未処理の DNA（図 2A）、SmaI 消化処理後の DNA（図 2B）の電気泳動パターンより、RSA1 のゲノムを解析したところ（図 2A においては、低濃度アガロースゲルを用いて電気泳動を行うことで、20Kbp 以上の DNA を分離）、断片のパターンは、特許文献 1 及び非特許文献 2 のファージとは異なっていた（図 2）。

## 【0031】

## 実施例 6 バクテリオファージ RSA1 のゲノム配列の決定

50

RSA1の塩基配列を決定したところ、サイズは38,820bpであった。図3に示すようにラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) GMI1000株 (全ゲノムが決定されている) のゲノム中に、ファージRSA1の配列と非常に高い相同性を示す領域が存在することが判明した。

ラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) GMI1000株のゲノム中にファージRSA1のゲノムの配列と相同性が高い領域が存在する事は、RSA1はラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) のゲノム中に溶原化され保持される可能性を示している。

#### 【0032】

#### 実施例7 バクテリオファージRSA1の大量生産

CPG寒天培地上で培養したラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) M4S株のシングルコロニーをCPG液体培地50mlに植菌し、28℃にて24~48時間巡回培養した。この培養液10mlをCPG液体培地2,000mlに添加し、OD600=0.1 (約 $5 \times 10^7$  cfu/ml) 程度まで28℃にて4~6時間巡回培養(120rpm)した。この培養液に、m.o.i. (The multiplicity of infectionの略、細胞一個あたりに対するファージの数) =0.0001~0.1になるようあらかじめ希釈しておいたファージ液を10~100ml添加した。ファージの希釈には、実施例1に示すCPG液体培地に、MgSO<sub>4</sub>が終濃度0.01mol/lになるように加えた溶液を用いた。28℃にて1時間静置後、28℃にて10時間以上巡回培養し(120rpm)、溶菌させることで大量のバクテリオファージ液を調製した。溶菌液は $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^9$  pfu/mlのファージRSA1を含んでいた。

10

20

#### 【0033】

#### 実施例8 バクテリオファージRSA1による青枯れ病菌の増殖阻害効果

CPG寒天培地上で培養したラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) M4S株のシングルコロニーをCPG液体培地50mlに植菌し、28℃にて24時間巡回培養した。この培養液0.5mlをCPG液体培地100mlに添加し、OD600=0.1 (約 $5 \times 10^7$  cfu/ml) 程度まで28℃にて4~6時間巡回培養(200rpm)した。この培養液に、あらかじめCPG液体培地にMgSO<sub>4</sub>が終濃度0.01mol/lになるように加えた溶液で希釈した、ファージRSA1の溶液を20μl加え、m.o.i. (The multiplicity of infectionの略、細胞一個あたりに対するファージの数) が0.01、0.001、0.0001になるよう感染させた。コントロールの試料にはファージを感染させなかった。28℃にて30分間静置後、28℃にて16時間、巡回培養し(200rpm)、2時間ごと

30

#### 【0034】

ファージRSA1の添加により青枯れ病菌の増殖が有意に阻害された。増殖阻害の程度は、ファージ感染時のm.o.i.に依存し、m.o.i.が大きいほうが増殖阻害効果は強かった。

#### 【0035】

##### 〔態様の形式1〕圃場における青枯れ病の防除

圃場に散布する場合は圃場1平方メートル当り $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$  pfuのファージを散布する。土壤に混合して使用する場合は土壤1Kgあたり $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$  pfuのファージを土壤に混合し使用する。

#### 【0036】

##### 〔態様の形式2〕水耕栽培や溶液栽培における青枯れ病菌の防除

ファージRSA1を用いて、水耕栽培又は溶液栽培での青枯れ病菌の防除を行う。水耕栽培又は溶液栽培で用いる培養液に、ファージRSA1を $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu/mlになるように添加し栽培する。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0037】

【図1】RSA1のネガティブ染色法による電子顕微鏡観察写真である。スケールバーは100nmを示す。

【図2】RSA1(A)より精製したDNAの電気泳動パターンを示す写真である。図2A: RSA1より精製した未処理のDNA、図2B: *Sma*I消化処理後のDNA。 、 /*Sty*I、 /*Sty*I+ /*Bgl*I

50



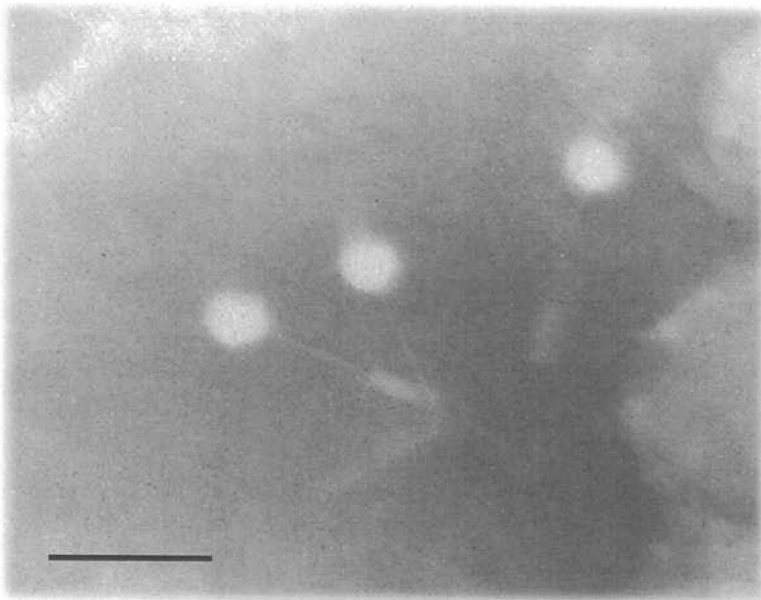
II、 /HindIII+ X174/HaeIIIで示す各レーンはサイズマーカー。

【図3】バクテリオファージRSA1のゲノム配列とラルストニア ソラナセラム GMI1000株のゲノム配列の相同性を示す図。図3A：ファージRSA1(全長38.8kbp)のゲノムの塩基配列から得た物理地図。末端の と は、ファージゲノムDNAの両末端を表す。図3B：ファージRSA1のゲノム配列とラルストニア ソラナセラム GMI1000株のゲノムで相同性があり、対応する部分を示す。図3B上段：RSA1のゲノムが、青枯れ病菌中では両末端が結合し環状構造をとることを仮定したゲノムの構造を示す。図3B下段：ラルストニア ソラナセラム GMI1000株のゲノムの物理地図を示す。上段の数字：ファージRSA1の末端( )からの距離をKbpで示したもの。下段の数字：GMI1000株のゲノムの末端( )からの距離を示したもの。

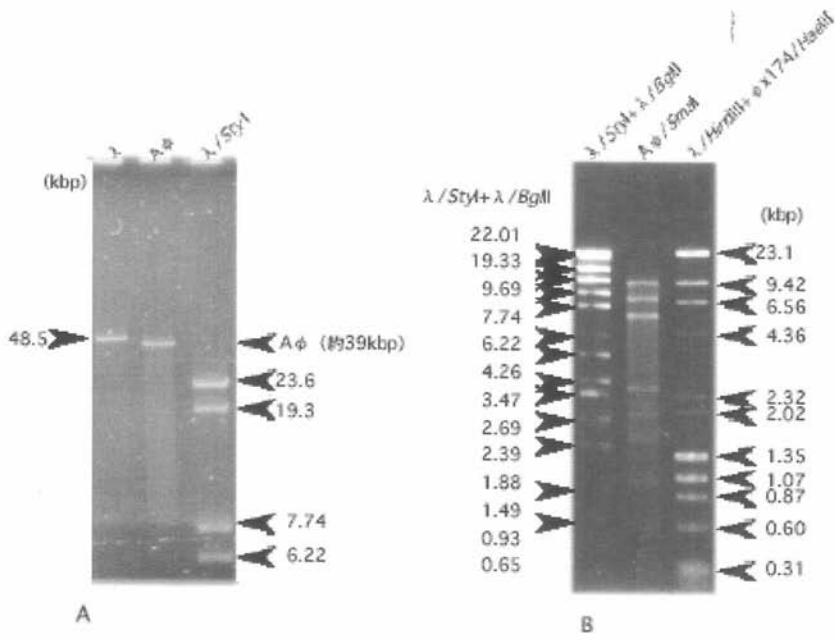
10

【図4】バクテリオファージRSA1による青枯れ病菌の増殖阻害効果を示す図である。

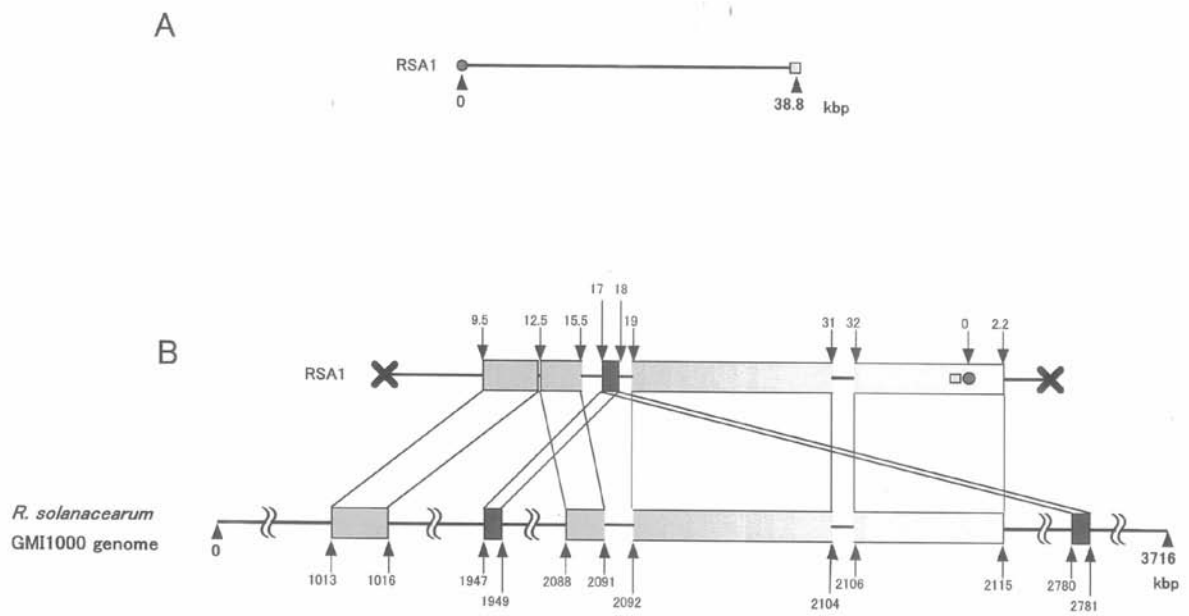
【図1】



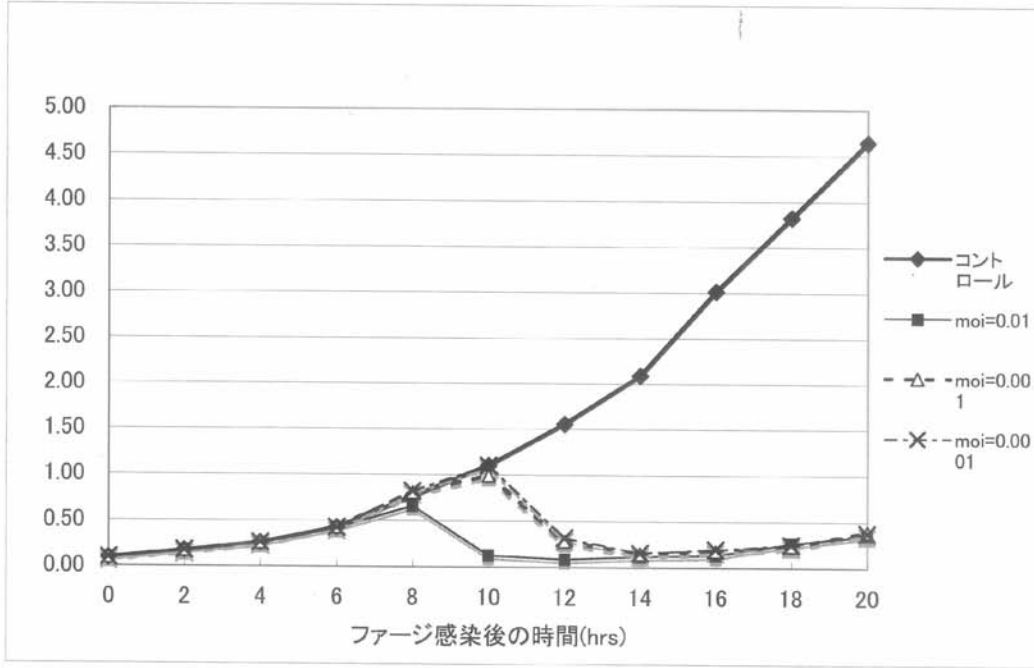
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 0 1 G 31/00 (2006.01)</b>	A 0 1 G 31/00	6 0 1 A
C 0 9 K 101/00 (2006.01)	C 0 9 K 101:00	
(74)代理人 100101317 弁理士 的場 ひろみ		
(74)代理人 100121153 弁理士 守屋 嘉高		
(74)代理人 100134935 弁理士 大野 詩木		
(74)代理人 100130683 弁理士 松田 政広		
(74)代理人 100140497 弁理士 野中 信宏		
(72)発明者 藤江 誠 広島県東広島市鏡山 1 丁目 3 番 1 号 国立大学法人広島大学先端物質科学研究科内		
(72)発明者 山田 隆 広島県東広島市鏡山 1 丁目 3 番 1 号 国立大学法人広島大学先端物質科学研究科内		
(72)発明者 川崎 健 広島県東広島市鏡山 1 丁目 3 番 1 号 国立大学法人広島大学先端物質科学研究科内		
F ターム(参考) 2B314 MA15 MA30 MA45 MA46 4B065 AA98X AC20 BA22 CA47 4H011 AA01 BA01 BB21 BC18 DA15 DC05 DD03 DD04 4H026 AA08 AB04		