

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18895

研究課題名（和文）塩素低減型の次世代水道における病原細菌の制御に資するバクテリオファージの探索

研究課題名（英文）Exploring bacteriophages that contribute to controlling pathogenic bacteria in next-generation water supply system with decreased chlorine

研究代表者

北島 正章（Kitajima, Masaaki）

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：30777967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：水系感染性細菌の中でも特に世界中で甚大な健康被害を出している赤痢菌（Shigella）に着目し、赤痢菌に感染する溶菌性バクテリオファージ（以下ファージ）の探索と特性解析を行った。都市下水中から単離したファージ株について、全ゲノム情報解析に基づく特性解析を実施した。ゲノム解析の結果、このファージは全長168kbの直鎖状二本鎖DNAをゲノムとして有することが分かった。データベース上のファージ遺伝子情報と照合したところ、このファージはMyoviridae科に属する新規ファージであることが明らかとなった。赤痢菌に感染するファージに関する新たな知見を得ることができたと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、水系感染性細菌の制御に資するバクテリオファージを環境中から探索するための方法論を確立した。赤痢菌に感染するバクテリオファージを都市下水中から単離し、単離したファージの全ゲノム配列を解読することで特性を解析した。この方法論は、赤痢菌のみならずあらゆる水系感染性細菌のバクテリオファージ探索に応用することができ、塩素低減型の次世代水道において問題となりうる病原細菌の再増殖をバクテリオファージを利用して制御する際に有用な知見となるものである。

研究成果の概要（英文）：This study focused on Shigella, which is one of the most significant cause of health hazards in the world among waterborne pathogenic bacteria, and explored virulent bacteriophages (phages) infecting Shigella followed by characterization of the isolated phage strains. Genomic characterization based on full-genome sequence information was performed for a phage strain isolated from municipal wastewater. The result of genomic analysis showed that the isolated phage possessed 168-kb double-stranded linear DNA as a genome. The full-genome sequence was compared with phage genome information deposited in the database, which revealed that the isolated phage is a previously unknown phage belonging to the family Myoviridae. This study provides novel information on bacteriophages infecting Shigella.

研究分野：環境工学

キーワード：バクテリオファージ 水系感染性細菌 水道 遺伝子解析 単離 下水

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 水道における塩素消毒の代替として残留性のある病原細菌抑制法の必要性

水道の塩素消毒は、我が国を含む先進国においてかつて猛威を振るっていたコレラや赤痢などの水系感染症を激減させることに大きく貢献し、現在も水道水の微生物学的安全性を確保する上で最も重要な処理と位置付けられている。ところが近年、水道水中のトリハロメタン等の消毒副生成物や異臭味の低減を目的として海外だけではなく国内(例: 東京都水道局「安全でおいしい水プロジェクト」)でも残留塩素をできる限り低減し、代替消毒(オゾン・紫外線)と生物活性炭による高度浄水処理を用いた「次世代水道」への切り替えの動きが進んでいる。世界に先駆けて塩素消毒を使用しない水道システムを導入しているオランダにおいて実施された調査では、配水管路内に日和見感染症を引き起こす病原細菌が存在することが報告されており(van der Wielen and van der Kooij, 2013)、塩素消毒の代替として残留性のある病原細菌抑制法を模索する必要が出てきている。

(2) バクテリオ(ファージ)を利用した水道における病原細菌の制御

そこで本研究では、細菌ウイルスであるファージを利用して病原細菌を制御するという全く新しい発想のもと、病原細菌に感染するファージを見出し、塩素低減型の水道における病原細菌制御に資する生物ツールとしての有効性を実証することを目指す。

2. 研究の目的

(1) 塩素低減型の水道における病原細菌制御に資する生物ツールとしてのファージの有効性の実証

本研究では、ファージを利用して病原細菌を制御するという全く新しい発想のもと、病原細菌に感染するファージを見出し、塩素低減型の水道における病原細菌制御に資する生物ツールとしての有効性を実証することを目指す。

最も重要な水系感染性病原細菌として挙げられる *Legionella* および *Shigella* 属細菌を最初の標的(宿主)病原細菌とし、以下の条件を兼ね備えた *Legionella* および *Shigella* ファージを自然界から見出すことを目指す:

- 1) 複数種の病原性 *Legionella* および *Shigella* を溶菌する能力を有すること(宿主域の広さ)。
- 2) 幅広い温度範囲で病原性 *Legionella* および *Shigella* を溶菌すること(溶菌温度域の広さ)。
- 3) 細胞外多糖類(EPS)を分解する酵素により、バイオフィルムの破壊能力を有すること。

(2) 水道水の微生物学的安全性確保に関する今後の学術・実務の方向性を大きく変革・転換させることに繋がる研究成果

水道水の水質衛生管理にあたっては、これまでは塩素消毒処理を施すことにより微生物学的安全性を確保してきた。しかし、消毒副生成物の発がん性の問題など塩素消毒の弊害が明らかになった現在、塩素に依存しない水道システムの構築が求められている。本研究は、これまで考えられてこなかったバクテリオファージを用いた水道水中の病原細菌の制御法を提案するものであり、水道水の微生物学的安全性確保に関する今後の学術・実務の方向性を大きく変革・転換させることに繋がる研究成果を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Shigella* ファージの単離と特性解析

下水・環境水試料を濃縮し宿主細菌として *Shigella* を用いてファージを集積した後スポットテストに供した。スポットが形成された場合プラーク単離を3回繰り返すことでファージ単離株を得た。各ファージ単離株について、透過型顕微鏡(TEM)観察により形態学的に分類した。

(2) ファージ感染による *Shigella* 菌体数低減試験

初期 OD₆₀₀ を 0.01 に調整した *S. sonnei* 培養液にファージ単離株を感染多重度(MOI)が 0.01 となるように混合し *S. sonnei* の生菌体数(cfu/ml)およびファージ粒子数(pfu/ml)の経時変化を測定した。

(3) ファージコンピネーションの有効性評価

複数のファージ単離株を用いた場合の宿主細菌増殖抑制効果を評価するため、初期 OD₆₀₀ 0.01 の *S. sonnei* 培養液に1種類または2種類のファージを MOI 0.01 となるように混合し OD₆₀₀ を指標として菌体量の経時変化を測定した。

(4) *Shigella* ファージ SfΦ01 の全ゲノム解析

Shigella ファージ SfΦ01 のゲノム DNA を抽出し、Illumina MiSeq を用いた次世代シーケンズ解析により SfΦ01 の全長ゲノム配列を解読した。解読結果から全ゲノム情報を構築し、分子系統学的分類およびゲノムの特徴を解析した。

4. 研究成果

(1) 水系感染性細菌に感染するファージの単離と特性解析

環境試料(下水、河川水、水道水、池底泥)を採取し、水系感染性病原細菌(*Legionella*, 病原性 *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*)に対する溶菌性ファージを探索した。ファージ探索には宿主細菌を用いたファージの集積培養とスポットテストを用い、プラーク単離を3回繰り返すことでファージを単離した。その結果、下水から病原性 *E. coli* O1, *Shigella flexneri/sonnei*, *Salmonella enterica* に感染する溶菌性ファージを単離することに成功した。*Legionella* ファージについては、池底泥試料からスポットテストでスポットが確認されファージの存在が示唆された。

流入下水試料から *S. sonnei* に感染する溶菌性ファージの単離に成功し、単離株について、特性解析を実施した。電子顕微鏡により単離ファージ株のうち 2 株 (SfΦ01 および SsΦ02) の形態を観察したところ、図 1 に示すような電子顕微鏡像が得られ、その形態学的特徴から単離されたファージは 2 種類の科 (*Myoviridae* 科、*Siphoviridae* 科) に分類されると考えられた。これらの単離ファージの宿主域を調べた結果、属レベルで異なる複数種の宿主細菌 (*E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*) に広く感染するファージが存在した。これは水中病原細菌の網羅的な駆逐に応用する上で有利な特性であると言える。

(2) ファージ感染による *Shigella* の増殖抑制

本研究では、*Shigella* に感染するファージを環境水から複数株単離することに成功した。単離したファージ株の溶菌特性を把握するため、宿主細菌 (*Shigella sonnei*) を被感染細菌として用いた、ファージによる細菌増殖抑制能試験を実施した (図 2)。ファージ SsΦ02 株感染による *S. sonnei* 菌体数の経時変化を図 2 に示す。ファージ非感染の宿主細菌は培養開始約 3~6 時間後に対数増殖期を迎えた。これに対しファージを感染させた場合は 6 時間後に 3 log₁₀ 以上の菌体数低下が観察されたがその後増殖し 18 時間後にはファージ非感染の場合と同程度の生菌体数に達した。これはファージ添加後に感染・溶菌を免れた細菌細胞が増殖し優占した結果であると考えられる。

1 種類または 2 種類 (SfΦ01, SsΦ02 株) のファージ感染による *S. sonnei* 菌体量の経時変化を図 3 に示す。いずれのファージ株についても、細菌増殖期には顕著な増殖抑制効果が認められたが、ファージ株によっては感染後一定の時間経過後に細菌の増殖が見られる場合もあった。1 種類のファージを感染させた場合、14 時間以内に宿主菌の増殖が見られたが、2 種類のファージを感染させた場合、宿主菌の増殖は認められず、長時間にわたり宿主菌増殖抑制効果が継続した。これは 2 種類のファージの共存により溶菌を免れる細菌細胞数が大幅に減少したためであると考えられる。

単一ファージ株のみの感染では宿主細菌の増殖が起こるが 2 種類のファージ株を感染させることにより増殖抑制効果が大幅に高まること明らかとなった。この結果は、ファージ株により細菌増殖抑制効果が異なるため応用にあたっては目的に合致する適切なファージ株を選定する必要があること、そして必要に応じてファージのコンビネーションが必要であることを示すものである。このように、本研究では病原細菌の制御に貢献する新たなアプローチとして期待されるファージバイオコントロールの水道配水過程における実用化に向けた有用な知見を得ることに成功した。本研究の成果は、ファージを水中病原細菌制御に利用する上での課題を明らかにするとともに、ファージコンビネーションの有効性を示すものである。

(3) *Shigella* ファージ SfΦ01 の全ゲノム解析

Shigella ファージ SfΦ01 の全ゲノムを解析したところ、このファージは 168,000 bp の二本鎖直鎖状 DNA をゲノムとして有し、GC 含量は 35.29% であること、そして 288 のタンパクコード領域が存在することが明らかとなった。ファージ SfΦ01 の全ゲノム配列を遺伝子データベースと照合したところ、既知の *Shigella* ファージ Sf21 (GenBank アクセッションナンバー MF327007) と 95.58% 一致することから、*Myoviridae* 科に属することが明らかになった。本研究では、*Shigella* 属細菌に感染する新規バクテリオファージ SfΦ01 の全ゲノム情報を明らかにすることに成功した。

参考文献

Paul W. J. J. van der Wielen, Dick van der Kooij. (2013) Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(3):825-834.

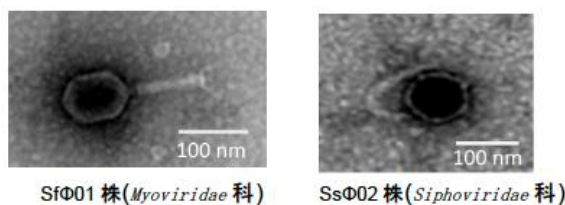


図 1. TEM 観察によるファージの形態学的分類

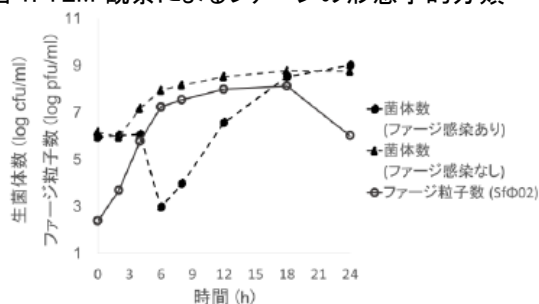


図 2. ファージ感染による *Shigella* 菌体数の変化

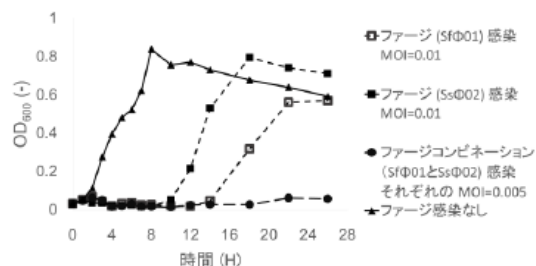


図 3. ファージコンビネーションによる *Shigella* 増殖抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitajima Masaaki, Ishizaki So, Jang Jeonghwan, Ishii Satoshi, Okabe Satoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Strain S05, a Fouling-Causing Bacterium Isolated from a Membrane Bioreactor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00471-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/genomeA.00471-18	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 北島正章	4. 巻 95
2. 論文標題 ファージを利用した環境中の病原細菌制御	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaaki Kitajima, Satoshi Ishii, Tatsuma Takagi, Satoshi Okabe	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Novel Myoviridae Phage, Sf 01, Infecting <i>Shigella</i> spp.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcement	6. 最初と最後の頁 e00349-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00349-19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部慶彦, 大坪千穂, 石崎創, 石井聡, 岡部聡, 北島正章
2. 発表標題 膜ファウリング進行細菌に感染するバクテリオファージの単離と応用
3. 学会等名 第4回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木達馬、佐野大輔、岡部 聡、北島正章
2. 発表標題 環境水から単離した溶菌性バクテリオファージによる水中病原細菌の低減効果
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木達馬、佐野大輔、岡部 聡、北島正章
2. 発表標題 水系感染性病原細菌に対するバクテリオファージの単離および溶菌特性解析
3. 学会等名 第54回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木達馬、佐野大輔、岡部 聡、北島正章
2. 発表標題 水中病原細菌の制御に有効なバクテリオファージの単離及び特性解
3. 学会等名 第25回衛生工学シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------