

令和 6 年 10 月 1 日現在

機関番号：12701

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2023

課題番号：17KK0010

研究課題名（和文）ファージを用いたコウレオスリックス属糸状性細菌の選択的制御

研究課題名（英文）Specific control of filamentous bacteria Kouleothrix using bacteriophage

研究代表者

新田見 匡（Nittami, Tadashi）

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：20377089

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,700,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：活性汚泥の固液分離障害を誘引する糸状性細菌、および人体の常在菌である歯周病原性細菌や大腸菌を対象に、それら細菌に感染して溶菌性を示すウイルス（バクテリオファージ）の探索を行った。下水処理施設より採取した活性汚泥試料よりバクテリオファージの探索を行った結果、Escherichia coli K12株を溶菌するクラウウイルス属に近縁なC3形態を示す新たなバクテリオファージを分離することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境や医療の分野において、複合微生物系制御の重要性は共通の認識となっている。既往の多くの研究により、様々な複合微生物系でトラブルを引き起こす細菌の特定は進んできた。しかしその選択的な制御方法については開発が途上である。本研究ではバクテリオファージ（ファージ）に着目し、各種細菌を選択的に溶菌するファージの分離を試みた。その結果Escherichia coli K12株を特異的に溶菌する新たなファージを分離するに至った。

研究成果の概要（英文）：A study was conducted with the objective of identifying bacteriophages that exhibit bacteriolysis when infected with bacteria. The study focused on filamentous bacteria, which are responsible for solid-liquid separation failures in activated sludge, as well as oral periodontopathogenic bacteria and Escherichia coli, which are endemic bacteria in the human body. A search for bacteriophages in activated sludge samples collected from wastewater treatment plants led to the isolation of a new bacteriophage against E. coli K12 with a C3 morphology, which is closely related to the genus Kuravirus.

研究分野：環境生物化学工学

キーワード：水質汚濁・土壌汚染防止・浄化 バイオテクノロジー 医療・福祉 ウイルス 細菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥は直径数百 μm 程度の複合微生物凝集塊（フロック）と水からなる懸濁液である。糸状性細菌の増殖によりフロック密度の低下やフロック間の凝集阻害が生じると、活性汚泥の固液分離障害が誘引される。廃水処理に汎用される活性汚泥法において、活性汚泥の固液分離障害は、今なお最大の運転障害の一つとなっている。活性汚泥の固液分離障害は、放流水質の悪化、腐敗臭の発生などの維持管理上の問題、また病原性微生物の飛散・蔓延等の公衆衛生上の問題をもたらす。さらには反応槽内の活性汚泥濃度の低下とそれに伴う廃水処理性能の悪化、汚泥循環量の増大を招いている。

糸状性細菌の増殖を抑制するため、これまで活性汚泥反応槽をブラックボックスとして扱う経験的な制御が行われてきた。しかし鍵となる糸状性細菌を把握せず、細菌群集全体を制御する非特異的な方法では、得られる効果に限界があった。そのため廃水処理施設の固液分離障害を解決するには、障害を誘引する細菌種の把握とその特異的な制御方法の確立が必要である。

2. 研究の目的

活性汚泥の固液分離障害を誘引する主要な細菌の一つとして、代表者らはコウレオスリックス属の糸状性細菌に着目してきた。これまでに同属の細菌の増殖を抑制する生物反応槽の構成や環境因子について一部明らかにした。しかし複合微生物系を利用する活性汚泥法では、プロセスの構成や環境因子の操作により、系内の複数の微生物群が影響を受けることも分かった。そのため活性汚泥法のような生物プロセスのトラブルを副作用なしに解決するためには、複合微生物系で特定の細菌を選択的に制御する方法の確立が不可欠であるとの考えに至った。本研究課題では活性汚泥中のコウレオスリックス属などの糸状性細菌を対象に、ファージを用いた選択的制御方法の開発を目的とした。

複合微生物系の制御の必要性は、下水処理などの環境分野のほか医療分野においても認識されてきた。例えば歯周病やう蝕（虫歯）などの疾患を引き起こす口腔内細菌叢、生体恒常性の破綻を引き起こす腸内細菌叢の制御などである。既往の多くの研究において、それら疾患の原因となる細菌種は特定されてきた。しかしその選択的な制御方法については、未だ方法論が確立されてはいない。そこで医療分野において問題となる各種細菌についても、ファージを用いた選択的制御を検討した。

3. 研究の方法

(1) ファージ混合液・培養液の調製

都市下水処理施設の生物反応槽より活性汚泥試料を採取した。同試料を遠心分離、および膜ろ過に供し、懸濁物質を取り除いてファージ混合液を調製した。これを研究室で分離培養した細菌株、およびカルチャーコレクションより提供を受けた各種細菌株と共に液体培養した。一晚培養した試料について再度遠心分離と膜ろ過で懸濁物質を取り除き、得られた試料をファージ培養液とした。

(2) ファージの分離

ブランクの確認と回収

制御対象とする各細菌株を全面に播種した寒天培地に、(1)で調製したファージ培養液を滴下し、細菌増殖後のブランク形成の有無を確認した（図 1（黒矢印））。ファージが細菌を溶菌してブランクが形成された場合は、ブランク部分の寒天を回収して（図 1（白矢印））緩衝液に浸漬させ、寒天より緩衝液にファージを浸出させた。

ファージの精製・分離

ファージが浸出した緩衝液を添加した液体培地で同一の細菌株を培養し、(1)と同様の方法でファージ培養液を調製した。細菌株を全面に播種した寒天培地にファージ培養液を滴下し、再度ブランクの形成を確認した。ブランクの回収からファージ培養液の調製までの作業を繰り返すことで、ブランクを形成するファージの精製・分離を行った。

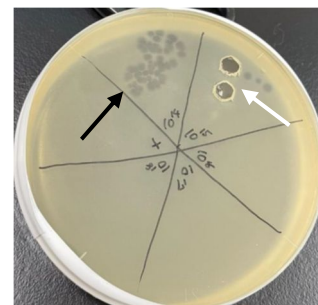


図 1 寒天培地におけるブランク形成の様子（黒矢印）とブランク回収の様子（白矢印）。

(3) ファージの解析

特性の解析

分離したファージを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し、その形態を確認した。また分離したファージについて温度や pH に対する安定性を調べた。

ゲノム解析

分離したファージよりゲノム DNA を抽出し、その塩基配列を解読した。得られた配列情報より分離したファージの系統や保有する遺伝子について調べた。

4. 研究成果

(1) コウレオスリックスおよびその他糸状性細菌のファージ

カルチャーコレクションより提供を受けたコウレオスリックス属の細菌 5 株についてファージ

ジの分離を試みた。しかしいずれの株についても感染するファージを分離することはできなかった。上記3.(2)に記したファージの分離方法では、寒天培地上に均一に細菌を増殖させることが必要となる。しかしコウレオスリックス属の細菌株はそれが困難であった。このことがファージを分離できなかった要因の一つだと考える。

活性汚泥より分離されたその他の糸状性細菌 20 株についてもファージの分離を試みた。そのうちモラクセラ属、ハリスコメノバクター属、およびゴールドニア属の細菌 3 株については、3.(2)に記した方法でプラークの形成を確認することができた(図 2a)。しかしモラクセラ属とハリスコメノバクター属の細菌株のファージについては、その後の精製やゲノム塩基配列の解読ができなかったため、ファージの特性や遺伝子情報を得ることはできなかった。ゴールドニア属の細菌株に感染するファージについては、現在精製・分離を進めているところである。

(2) 歯周病原性細菌(フソバクテリウム、他)のファージ

カルチャーコレクションより提供を受けたフソバクテリウム属の細菌 2 株についてファージの分離を試みた。しかしいずれの株についても感染するファージを分離することはできなかった(図 2b)。また口腔より分離されたその他の細菌 6 株についてもファージの分離を試みた。しかしそれらの株についても感染するファージを分離することはできなかった。

フソバクテリウム属の細菌はコウレオスリックス属の細菌と同様に、寒天培地上に均一に細菌を増殖させることが難しかった。フソバクテリウムについては、これがファージを分離できなかった要因の一つだと考える。また3.(1)で採取した活性汚泥試料について 16S rRNA 遺伝子解析を行ったところ、歯周病原性細菌由来の遺伝子はその存在割合が非常に小さいか検出されない結果であった。そのため同試料中には歯周病原性細菌に感染するファージが少なかったため、分離が困難であったことも考えられた。

(3) 大腸菌ファージ YF01

カルチャーコレクションより提供を受けた大腸菌 1 株(*Escherichia coli* K-12 株(JCM20135))についてファージの分離を試みた。その結果ファージ YF01 を分離することができた。

特性解析の結果

YF01 は *E. coli* K-12 株を培養した寒天培地において、直径約 1 mm の小さな円形のプラークを形成した。YF01 を TEM で観察したところ、楕円形の細長いカプシドと短い尾部を持つ形態を有していることが分かった(図 2c)。この形態は典型的な C3 形態であったことから、YF01 が Podiviridae 科のファージであることが示唆された。

YF01 のプラーク形成は pH3 ~ 11 の範囲では比較的安定であり、広範囲の pH でその活性を示すことが分かった。また 4 ~ 50 °C の温度範囲においても活性は比較的安定であった。しかし 60 °C において活性は低下し、70 °C 以上では活性を確認できなかった。

ゲノム解析の結果

YF01 のゲノムは塩基配列長が 78,626 bp であり(図 3)、GC 含有率は 42.1%であった。遺伝子共有ネットワーク法による解析の結果、YF01 は 34 株の *Escherichia* ファージ、および 1 株の *Shigella* ファージとウイルスクラスターを形成することが分かった。YF01 を含めた同クラスターのファージについて核酸の類似度を Average Nucleotide Identity(ANI)解析で調べたところ、YF01 は他の 35 株いずれとも 95%未満の類似度を示した。国際ウイルス分類委員会(ICTV)の基準では、95%の類似度が種の閾値であることから、この結果は YF01 が新種であることを示唆するものであった。YF01 はそのゲノムに宿主溶菌にかかわるタンパク質であるホリンとエンドライシンをコードする遺伝子を保有していた(図 3)。また C3 形態であることを裏付けるタンパク質をコードする遺伝子を YF01 が保有することも確認できた(図 3)。

(4) その他の大腸菌ファージ

YF01 のほか *E. coli* K-12 株に感染するファージ 3 株を分離した。これらについても現在ゲノム塩基配列の解析などを進めているところである。本研究で分離した 4 株の大腸菌ファージについては、今後その宿主となる細菌の範囲を確認する予定である。

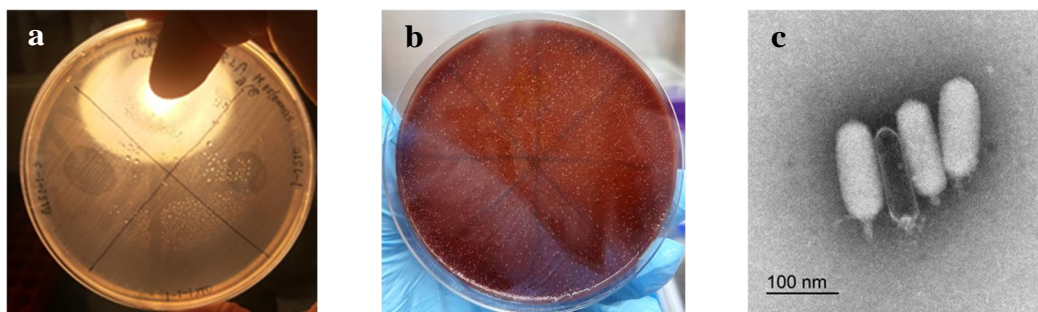


図 2 プラーク観察に使用した寒天培地の写真と分離したファージの電子顕微鏡画像。a) モラクセラ属のファージのプラーク、b) 寒天培地で培養したフソバクテリウム属の細菌株の写真、c) *E. coli* ファージ YF01 の電子顕微鏡 (TEM) 画像。



図3 YF01 のゲノム (出典 : Batinovic *et al.*, 2023 (5 . 主な発表論文等に雑誌情報を記載))

本研究の開始当初、代表者はオーストラリアの海外共同研究者の研究室に半年間滞在し、実験や解析の手法を学んだ。社会情勢等によりその後の渡航はかなわなかったものの、代表者の研究室において研究を継続した。上記の通りファージを分離できるか否かは、細菌種により結果が異なった。一連の実験で明らかになったことは、寒天培地上でコロニーを形成しない、あるいは形成までに時間のかかる細菌については、現状ではファージの分離が困難だということであった。開始当初に目的としたファージによる細菌の選択的制御方法の開発には至らなかったものの、本研究ではその基礎となる成果や知見が得られた。今後もこのファージの研究を継続し、細菌の選択的制御の有用な手段となるよう発展させる計画である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Batinovic Steven, Fujii Yugo, Nittami Tadashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Expansion of Kuravirus-like Phage Sequences within the Past Decade, including Escherichia Phage YF01 from Japan, Prompt the Creation of Three New Genera	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 506(18頁)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v15020506	査読の有無 有
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 Petrovski Steve, Rice Daniel T. F., Batinovic Steven, Nittami Tadashi, Seviour Robert J.	4. 巻 104
2. 論文標題 The community compositions of three nitrogen removal wastewater treatment plants of different configurations in Victoria, Australia, over a 12-month operational period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 9839 ~ 9852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-020-10901-8	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Batinovic, Wassef, Knowler, Rice, Stanton, Rose, Tucci, Nittami, Vinh, Drummond, Sobey, Chan, Seviour, Petrovski, Franks	4. 巻 8
2. 論文標題 Bacteriophages in Natural and Artificial Environments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 100 ~ 100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens8030100	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井祐悟, Steven Batinovic, 本山夏帆, 文怡琳, 新田見匡
2. 発表標題 国内都市下水処理場からのKuravirus様ファージの分離とその系統解析
3. 学会等名 日本微生物生体学会 第35回大会
4. 発表年 2023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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ペトロヴスキ スティーヴ (Petrovski Steve)	ラトロブ大学・Physiology, Anatomy, and Microbiology・Associate Professor	

	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
その他の研究協力者	スティーヴン バティノヴィック (Steven Batinovic)	ラトロブ大学・Physiology, Anatomy, and Microbiology・Postdoctoral Research Officer	

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			
オーストラリア	La Trobe University			