

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790479

研究課題名（和文）ボツリヌス毒素伝達機構の解明に向けたファージゲノムの解析

研究課題名（英文）Genome analysis of bacteriophage toward botulinum neurotoxin-transfer mechanism

研究代表者

阪口 義彦（SAKAGUCHI YOSHIHIKO）

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号：70403491

研究成果の概要（和文）：

c-st ファージは、典型的な C 型ボツリヌス毒素変換ファージである。以前に、c-st ファージのゲノム解析を行ったが、その大部分の遺伝情報は不明であった。本ファージの毒素遺伝子の水平伝播を明らかにするため、c-st ファージのコアゲノム領域を調べた。まず最初に、c-st ファージの構造タンパク質をコードする遺伝子が 98.5-157.5 kbp の領域に存在すると考えられた。次に、同種ファージである c-468 ファージとの比較ゲノム解析を行うと、43-57 kbp と 116.5-123 kbp の領域が欠損していた。さらに、c-st ファージゲノムの 175.5-178.5 kbp の領域の遺伝子産物が、プラスミド分配に関与していることが明らかとなった。これらの結果から、c-st ファージゲノムの 1-43 kbp と 57-116.5 kbp、123-186 kbp の領域がファージ生命維持に必要なコアゲノムであることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Phage c-st is typical *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage. Although the phage c-st genome has been sequenced, no much information is available in its biology and genome. To extend our understanding of horizontal gene transfer by this phage, we investigated in the core genome of phage c-st. First, analyzing the phage structural proteins, the genome module for the structural proteins was 98.5-157.5 kbp of phage c-st genome. Second, comparing the genome of phage c-st with that of a related phage c-468, the 43-57 kbp and 116.5-123 kbp of phage c-st genome were very similar to phage 468 genome. Third, the essential genes for phage genome partitioning were revealed to be located 175.5-178.5 kbp of phage c-st genome. According to these results, I speculated that the core genome was the 1-43 kbp, 57-116.5 kbp, and 123-186 kbp regions of phage c-st genome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：ボツリヌス菌、ボツリヌス毒素遺伝子、バクテリオファージ、プラスミド、ファージ変換、接合伝達、チューブリン、分配

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌は、世界で最も強力な神経毒素（ボツリヌス毒素）を産生する。本菌は産生するボツリヌス毒素の抗原性の違いにより、A-G型の7型に分類されている。A、B、E、F型菌は主としてヒトに、CとD型菌は家畜（トリ、ウマなど）に強力な致死作用を引き起こす。特に、C型とD型菌によるボツリヌス中毒は、畜産・食品産業に甚大な被害をもたらしている。従って、本菌の感染制御の確立は極めて重要である。

ボツリヌス毒素遺伝子は、染色体、バクテリオファージ（ファージ）、プラスミドの様々な様式で菌体内に存在している。C型とD型菌は、ファージにより毒素産生性が支配されている（ファージ変換）。これまでに、ボツリヌス毒素はボツリヌス菌固有の毒素と考えられていた。しかしながら、ボツリヌス菌以外に *C. butyricum* は E 型毒素、*C. baratii* は F 型毒素、*C. argentinense* は G 型毒素を産生することが判明した。この中で、*C. butyricum* と *C. baratii* による畜産被害や食中毒事例が世界中で報告され、問題とされている。このことは、ボツリヌス菌と他のクロストリジウム属菌の間で普遍的にファージやプラスミドを介したボツリヌス毒素遺伝子の水平伝播が起きた可能性が考えられる。

ボツリヌス毒素変換ファージの研究は世界的にも極めて少なく、これまで申請者は一貫して C 型毒素変換ファージの研究を行い、独自に、C 型毒素変換ファージ（c-st ファージ）の全ゲノム解析を行い、遺伝学的な情報を明らかにした。また、c-st ファージ DNA が、

細菌内でエピソーム様（宿主染色体に挿入されず、環状 DNA として存在する状態）「偽溶原化」で存在し、C 型ボツリヌス毒素を産生していることを明らかにした。

2. 研究の目的

ボツリヌス毒素産生菌の蔓延防止には、ファージによる毒素遺伝子伝播の抑制・阻止が有効であると考えた。従って、ファージ遺伝情報の解明が重要である。ボツリヌス毒素遺伝子を伝搬するファージに関する情報は、申請者が報告した c-st ファージの 1 種類のみであり、その大部分の遺伝子情報は不明であった。その全容を明らかにするには、まずファージのコアゲノム領域を特定することが重要である。本研究では、ファージ本体を構成する構造タンパク質をコードする遺伝子群の特定、ファージ DNA のプラスミド分配に係るタンパク質及び同種ファージとの比較ゲノムの解析によりコアゲノムの推定を行った。

3. 研究の方法

(1) ファージの構造タンパク質の同定

c-st ファージを C 型ボツリヌス無毒株（(C)-A02 株）に感染させ、ファージ溶菌液を調製した。塩化セシウム密度勾配遠心法により、精製したファージ粒子のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、N 末端アミノ酸配列および質量分析を用いてタンパク質を解析した。質量分析で使用したデータベースは、独自に構築した。

(2) C 型毒素変換ファージのプラスミド分配

に関する解析

①組換えタンパク質の作製

c-st ファージゲノム上の *tubZ*、*tubR*、*tubY*の遺伝子を個別にpETベクターに構築し、大腸菌によりそれぞれの組換えタンパク質、TubZ、TubR、TubYを発現させた。組換え TubZ はアフィニティークロマトグラフィー、組換え TubR はイオン交換クロマトグラフィー、組換え TubY は陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

②チューブリン重合反応とタンパク質間相互作用の解析

組換え TubZ の重合反応をネガティブ染色法により電子顕微鏡で観察した。また、TubZ と TubR、TubY、*tubS*とのそれぞれの相互作用を光散乱法により測定した。

(3) C型毒素変換ファージ (c-468 ファージ) の全塩基配列の決定

①ファージ DNA の調製

C型毒素変換ファージ (c-468 ファージ) を無毒株 ((C)-468U28NT) に感染させ、増殖させた。得られたファージをパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 用プラグに包埋し、塩化リゾチウムとプロテアーゼ処理した。作製したプラグ (DNA) の PFGE を行い、ゲルから DNA を精製した。

②全ゲノム塩基配列の決定

全ゲノム塩基配列の決定は、基本的にはランダムショットガンシーケンシング法により行った。精製したファージ DNA を超音波により、1~2 kb の DNA 断片に破碎した。得られた DNA 断片をサブローニングした後、DNA シークエンサー (Applied Biosystem) によりシーケンス解析を行った。得られた配列情報を SEQENCHER DNA sequencing software (Gene Codes) により編集し、多数の配列断片をアセンブラーで結合編集させた。

③ファージゲノム上の配列の相同性検索

ゲノム DNA 上のそれぞれの Open Reading Frame (ORF) を確定した。得られた ORF と種々の生物における既知の遺伝子との核酸・アミノ酸配列の相同性を調べた。具体的には、分子生物学・配列解析ソフトウェア (インシリコモレキュラークロニング) を用いて、塩基配列および予測アミノ酸配列を種々のプログラム (BLASTN, BLASTP など) により、公共のデータベース (DDBJ) に対して配列の相同検索およびモチーフ検索を行った。

4. 研究成果

本研究では、以下の 1) ~3) の解析を行い、C型ボツリヌス毒素変換ファージの生命維持に必要なコアゲノムの推定を行った。

1) c-stファージの構造タンパク質をコードする遺伝子群の特定

CsCl密度勾配遠心法によりc-stファージ粒子のタンパク質を精製し、N末端アミノ酸分析と質量分析を用いて解析したところ、計10個のOpen Reading Frame (ORF)が同定された。これらのORFは全てc-stファージゲノム上の98.5-157.5 kbp領域に存在することが示唆された。

2) c-stファージDNAのプラスミド分配に関する解析

c-stファージのゲノム情報をもとに、偽溶原化機構の解析を行った。c-stファージDNAの複製開始付近には、セグロソームをコードする遺伝子群 (*tubZ*、*tubR*、*tubS* (セントロメア領域)、*tubY*) が予想された。これらのタンパク質の機能を解析したところ、TubZは重合反応により微小管を形成し、これにTubR、TubY、*tubS*が作用することで、エピソーム様に存在するファージDNAの分配を調節していることが明らかになった。

3) C型毒素変換ファージ (c-468ファージ) とc-stファージとの比較ゲノム解析

c-st ファージと他のC型とD型毒素変換ファージのゲノム構造を比較するため、ファージゲノム全体のPCR スキャニング解析を行ったところ、全体的には非常にバリエーションに富んだ配列であったことから、それぞれのファージ間でゲノム構造が異なっていることが推察された。そこで、c-st ファージと同種ファージ (c-468 ファージ) の全ゲノム塩基配列の決定を行った。しかしながら、c-468 には異なるサイズのゲノム分子が存在したため、新たにゲノム配列を決定する必要があると考えられた。従って、全ゲノム配列の決定は完全ではない。現在、C型有毒株 C468 の純培養を行い、得られた菌 DNA を使用して宿主菌体内に存在するファージのゲノム配列決定を次世代シーケンサーにより行っている。現在の c-468 ファージゲノム情報と c-st ファージゲノムを比較したところ、c-468 ファージでは 43-57 kb と 116.5-123 kb の領域が欠損していることが分かった。

これらの研究成果から、c-st ファージゲノムの 1-43 kbp と 57-116.5 kbp、123-186 kbp の領域がファージの生命維持に必要なコアゲノムであることが明らかになった。今後、さらなる解析を進めファージのコアゲノムを特定し、毒素遺伝子の伝播機構 (ファージ変換) の解明を行いたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., Andreu, J. M., Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 109(20), 7711-7716, 2012, 査読有, <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1121546109>.

②Fatmawati, N. N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Oda, M., Shimizu, K., Yamamoto, Y., Sakurai, J.,

Matsushita, O., Oguma, K., Phospholipase C produced by *Clostridium botulinum* types C and D: comparison of gene, enzymatic, and biological activities with those of *Clostridium perfringens* alpha-toxin, Acta Med. Okayama, 67(1), 9-18, 2013, 査読有, http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/67_1_9.pdf.

③Sakaguchi, M., Murata, H., Yamamoto, K., Ono, T., Sakaguchi, Y., Motoyama, A., Hibino, T., Kataoka, K., Huh, N. H., TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding, PLoS One, 6(8), e23132, 2011, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0023132.

[学会発表] (計 7 件)

①阪口義彦、内山淳平、小椋義俊、山本由弥子、鈴木智典、阪口政清、織田華絵、津田千秋、松崎茂展、林 哲也、小熊恵二、C型ボツリヌス毒素変換ファージの構造タンパク質の解析、第4回ファージ研究会、前橋市、平成24年9月19日～9月20日。

② Uchiyama, J., Sakaguchi, Y., Takemura-Uchiyama, I., Kato, S., Satoh, M., Ujihara, T., Daibata, M., Matsuzaki, S., Improved adsorption of *Enterococcus faecalis* bacteriophage ΦEF24C caused by a point mutation in a tail fiber gene, 第4回ファージ研究会、前橋市、平成24年9月19日～9月20日。

③内山淳平、竹内 啓晃、加藤伸一郎、阪口義彦、蒲生啓司、氏原隆子、内山伊代、大畑雅典、松崎茂展、ピロリ菌バクテリオファージの分離・解析、第4回ファージ研究会、前橋市、平成24年9月19日～9月20日。

④Sakaguchi, Y., Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Andreu, J. M., Sakaguchi, M., Uchiyama, J., Ogura, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, T., Orita, K., Tsuda, C., Matsuzaki, S., Hayashi, T., Oguma, K., Analysis of pseudolysogenic lifecycle of

Clostridium botulinum phage c-st, based on comparative genomics of wild-type and long-term-incubated mutants phages, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, 2012.12.11 -2012.12.14.

⑤ Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Ogura, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, T., Orita, K., Tsuda, C., Matsuzaki, S., Hayashi, T., Oguma, K., The search for core-genome of *Clostridium botulinum* bacteriophage converting type C neurotoxin, The 86th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Chiba, 2013. 3.18.-2013. 3.20.

⑥ Hosomi, K., Sakaguchi, Y., Goto, K., Nakamura, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Iida, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Kozaki, S., The complete sequence of plasmid encoding neurotoxin gene in *Clostridium botulinum* type B strain, The 86th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Chiba, 2013. 3.18.-2013. 3.20.

⑦ Uchiyama, J., Takeuchi, H., Sakaguchi, Y., Ujihara, T., Uchiyama, I., Daibata, M., Matsuzaki, S., Morphological and genomic analysis of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30, The 86th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Chiba, 2013. 3.18.-2013. 3.20.

〔図書〕 (計 1 件)

小熊恵二、阪口義彦、西河 淳、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、医薬ジャーナル社「病原菌の今日的意味 改訂 4 版」、259-288、2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

宮崎大学型若手研究リーダー育成モデル
<http://www.miyazaki-u.ac.jp/ir/?p=92>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 義彦 (SAKAGUCHI YOSHIHIKO)

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号 : 70403491