

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16250

研究課題名(和文) バクテリオファージ溶菌酵素を用いたディフィシル菌細胞壁の構造解析とその応用

研究課題名(英文) Structural analysis of the cell wall of *Clostridioides difficile* using lytic enzyme of bacteriophage

研究代表者

武 晃 (Take, Akira)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30818399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： クロストリディオイデス・ディフィシル感染症は、ディフィシル菌が引き起こす難治性下痢症・腸炎で、その制御には殺菌法の確立が喫緊である。本殺菌法の確立へ展開していく中で、まずはディフィシル菌の細胞壁構造を十分に理解することが重要となる。本研究課題では、バクテリオファージの特性に着目し、その溶菌活性を利用することで、ディフィシル菌の細胞壁構造を解析した。ディフィシル菌を種々の物理・化学的に処理することで、細胞壁を精製した。それに推定溶菌酵素を作用させたところ、解析に十分な分解性を示した。現在、LC/MSを用いてその分解産物の解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロストリディオイデス・ディフィシル感染症(CDI)は、世界的に罹患率の高い疾患であり、経済面においても深刻な課題となっている。米国疾病管理予防センター(CDC)では、ディフィシル菌を「urgent threat」に分類しており、緊急に解決すべき課題である。ディフィシル菌の細胞壁構造を理解することで、溶菌酵素の殺菌メカニズムを解明することが可能となる。本研究を発展させることで、ディフィシル菌の殺菌効果を示す消毒薬の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)： *Clostridioides difficile* bacterial infection produces severe diarrhea and enteritis. Therefore, it is essential to establish an effective disinfection method to control the infection. To accomplish this objective, it is important to study the structure of the cell wall of *C. difficile*. This study was focused on the analysis of the cell wall structure of *C. difficile* using a bacteriophage lytic enzyme activity. The cell wall was purified using various physical and chemical treatments. Following the application of two types of lytic enzymes to the cell wall, the cell wall decomposition products were analyzed using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) methods.

研究分野：細菌学

キーワード： *C. difficile*感染症 *C. difficile* 細胞壁 ペプチドグリカン バクテリオファージ 溶菌酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ディフィシル菌は、クロストリディオイデス・ディフィシル感染症 (CDI) を引き起こす。CDI は、難治性下痢症・腸炎であり、再発を繰り返すことから治療が難渋し、病院や介護施設などにおける感染拡大が多大な被害をもたらしている。欧米では罹患率・死亡率の高い疾患であり、経済的な面でも深刻な問題となっている。また、国内でも欧米と同等またはそれ以上に多いと推察されている。CDI 治療に対する抗菌薬に耐性を示すディフィシル菌も出現していることから、米国疾病管理予防センター (CDC) では、ディフィシル菌を「urgent threat」に分類しており、緊急に解決すべき課題である。また、イギリス政府機関によると、これまでの抗菌薬治療では、2050 年までには薬剤耐性菌による感染症が原因で、世界で年間 1,000 万人 (3 秒に 1 人) 以上が死亡することになるとの報告がある。これらのことは驚愕な事実である。従って、CDI 感染症の発生を未然に防止すること、発生した感染症を拡大しないように制圧することなどの感染症制御が最も重要であり、環境中でのディフィシル菌の伝播を阻止するために、CDI の原因となるディフィシル菌の殺菌法の確立が喫緊である。

2. 研究の目的

本研究課題では、ディフィシル菌の特異的殺菌法の確立へ展開する中で、本菌の細胞壁構造を明らかにする。ディフィシル菌は、グラム陽性細菌でその細胞壁構造の殆どがペプチドグリカン (PG) により構成されている。PG 構造を明らかにすることで、ディフィシル菌に対する特異的殺菌法の開発に寄与することができ、ディフィシル菌に汚染された病院、介護施設などの環境の消毒法として発展させられる。一般的に、細菌細胞壁の構造解析には、細胞壁を分解し得られた産物を質量分析する必要がある。ディフィシル菌の場合、リゾチーム (加水分解酵素) では細胞壁の分解が困難である。

ファージは、宿主である細菌にのみ特異的に感染し細胞壁を破壊する。その破壊には、ファージの溶菌酵素が関わっている。本課題では、ディフィシル菌から分離したバクテリオファージ (ファージ) の溶菌酵素を用いることにより、ディフィシル菌の細胞壁の解析を行った。

3. 研究の方法

1. 組換えファージ由来溶菌酵素の発現・精製

ファージゲノム上の溶菌酵素をコードする 2 つの遺伝子 (*orfA*, *orfB*) を推定した。これらの遺伝子の大腸菌発現系を構築し、His 融合タンパク質 (His-OrfA, -OrfB) を作製した。

2. ディフィシル菌の培養

ディフィシル菌をグルコース添加変法岐阜嫌気性培地 (Glc-mGAM)、変法 GAM

培地、ブルセラ HK 培地およびブレインハートインフュージョン(BHI)培地にて 37°C、一晩から 7 日間、嫌気チャンバーを用いて嫌気培養した。培養液を集菌し実験に使用した。

3. ディフィシル菌 PG の精製

培養したディフィシル菌体を超音波処理後、SDS を添加し 100°C で、40 分間処理した。本処理液をプロナーゼによりタンパク質を分解し、トリクロロ酢酸を添加、100°C、20 分間処理することで多糖を脱離した。さらに、エタノールおよびジエチルエーテル処理により脂質を除去し PG を調製した。

4. ELISA 法

ディフィシル菌を 96 穴マイクロプレートに固定した。これに His 融合タンパク質 (His-OrfB) を 37°C で 1 時間、一次抗体 (マウス抗 His-Tag モノクローナル抗体) を室温で 1 時間、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG) を室温で 1 時間反応させた。反応液を 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) で発色させ、吸光度測定器で吸光度 (OD₄₅₀) を測定した。

5. ウエスタンブロット法

ディフィシル菌または精製 PG と His 融合タンパク質 (His-OrfB) を 37°C で 30 分間反応させた。反応液を遠心により上清と沈渣に分け、それぞれ SDS-PAGE を行い、ウエスタンブロットにより His-OrfB のディフィシル菌または精製 PG に対する結合を評価した。ウエスタンブロットでは、一次抗体 (マウス抗 His-Tag モノクローナル抗体) HRP 標識二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG) を用い、ECL Western blotting detection reagents により発色させた。

6. ディフィシル菌の溶菌活性

液体培養したディフィシル菌を緩衝液に懸濁し、OD₆₀₀ = 1.0 に調整した。本懸濁液に His-OrfB を添加し、37°C で 4 時間、嫌気的条件下で反応させた。それぞれの反応液を吸光度測定器で濁度 (OD₆₀₀) を測定した。

7. 精製 PG に対する分解活性

精製 PG を緩衝液で懸濁し、His-OrfB を 37°C で反応させ、PG の分解性について OD₆₀₀ を経時的に測定した。

8. PG の構成成分解析

精製したペプチドグリカン (PG) を 6 M 塩酸に懸濁し、100°C、16 時間の反応でアミノ酸とアミノ糖まで分解する。分解物は薄層クロマトグラフィー (TLC) にて展開し、

ニンヒドリンと反応させることで、PG 中のアミノ酸とアミノ糖の種類を同定した。

4 . 研究成果

ディフィシル菌のバクテリオファージ(ファージ)の推定溶菌酵素タンパク質(OrfA, OrfB)を His 融合タンパク質として、大腸菌で発現した(His-OrfA, -OrfB)。His-OrfB は、可溶性タンパク質として高発現することができたが、His-OrfA の殆どは不溶性タンパク質になっていた。これらのタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにより、単一のバンドとして精製することができた。しかしながら、His-OrfA は、結合性や分解活性試験に使用する濃度ではなかったことから、発現条件などを検討している。

ディフィシル菌は、栄養条件が悪くなると芽胞を形成する特徴を有する。そこで、まずは、芽胞にならない培養条件を検討した。ディフィシル菌を GAM 培地、変法 GAM 培地、ブルセラ HK 培地および BHI 培地を液体または寒天で培養したところ、BHI 液体培地にて嫌氣的に 35℃、一晚培養することで芽胞を形成していない条件を得ることができた。ディフィシル菌の細胞壁のペプチドグリカン(PG)の構造を解析するため、本条件を用いて菌体の大量培養を行い、細胞壁の精製の検討を行った。培養したディフィシル菌を集菌し、10 分間、20 分間、30 分間および 60 分間と経時的に超音波処理を行い、菌体をグラム染色により染色し光学顕微鏡により確認したところ、菌体の十分な破碎には、30 分間の処理が必要であった。本破碎物を SDS、pronase E、トリクロロ酢酸および有機溶媒処理により細胞壁 PG を精製した。そこで、His-OrfB のディフィシル菌および精製 PG に対する結合性を ELISA およびウエスタンブロットにより調べたところ、His-OrfB は両手法において結合が認められた。また、His-OrfB のディフィシル菌に対する溶菌活性および精製 PG に対する分解活性を調べたところ、His-OrfB は濃度依存的、時間依存的に活性を示した。

ディフィシル菌 PG の構成成分を調べるために、薄層クロマトグラフィー(TLC)を行ったところ、PG には *N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルムラミン酸、アラニン、グルタミン酸および *meso*-ジアミノピメリン酸が含まれていることが明らかとなった。現在、液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS)を用いて His-OrfB の分解産物の解析を行っている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Gotoh Kazuyoshi, Sakaguchi Yoshihiko, Kato Haru, Osaki Hayato, Jodai Yasutaka, Wakuda Mitsutaka, Take Akira, Hayashi Shunji, Morita Eri, Sugie Takehiko, Ito Yoichiro, Ohmiya Naoki	4. 巻 73
2. 論文標題 Fecal microbiota transplantation as therapy for recurrent <i>Clostridioides difficile</i> infection is associated with amelioration of delirium and accompanied by changes in fecal microbiota and the metabolome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102502 ~ 102502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anaerobe.2021.102502	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 -

1. 著者名 Sakaguchi Yoshihiko, Uchiyama Jumpei, Take Akira, Gotoh Kazuyoshi, Sakaguchi Masakiyo, Suzuki Tomonori, Yamamoto Yumiko, Hosomi Koji, Kohda Tomoko, Mukamoto Masafumi, Kozaki Shunji, Hayashi Shunji, Oguma Keiji	4. 巻 66
2. 論文標題 Analysis of a plasmid encoding botulinum neurotoxin type G gene in <i>Clostridium argentinense</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102281 ~ 102281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anaerobe.2020.102281	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武 晃, 阪口義彦, 稲橋佑起, 後藤和義, 林 俊治, 加藤はる, 大宮直木
2. 発表標題 食物およびヒト糞便から分離した放線菌の人工消化液での生残性
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪口 義彦, 武 晃, 後藤 和義, 山本 由弥子, 幸田 知子, 向本 雅郁, 小崎 俊司, 林 俊治, 林 哲也, 小熊 惠二
2. 発表標題 C型とD型ボツリヌス毒素を支配するバクテリオファージの溶原化機構の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武 晃, 阪口 義彦, 稲橋 佑起, 後藤 和義, 林 俊治, 加藤 はる, 大宮 直木
2. 発表標題 根野菜からの放線菌の分離とその腸内環境生存能の評価
3. 学会等名 第35回(2021年度) 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武 晃, 阪口 義彦, 稲橋 佑起, 後藤 和義, 林 俊治, 大宮 直木, 加藤 はる
2. 発表標題 食物から分離した放線菌の腸内環境生存能の評価
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪口 義彦, 後藤 和義, 武 晃, 尾崎 隼人, 城代 康貴, 和久田 光毅, 林 俊治, 大宮 直木, 加藤 はる
2. 発表標題 Clostridioides difficile 感染症に対する糞便微生物移植の影響～ヒト腸内微生物叢及びメタボロームの解析～
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
研究協力者	阪口 義彦 (Sakaguchi Yoshihiko)		
研究協力者	後藤 和義 (Gotoh Kazuyoshi)		
研究協力者	加藤 はる (Kato Haru)		
研究協力者	大宮 直木 (Ohmiya Naoki)		

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
---------	---------