

令和元年6月4日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08785

研究課題名(和文) C型とD型ボツリヌス毒素遺伝子を伝達するファージの宿主認識機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Study of the molecular machinery of host recognition by the Clostridium botulinum type C and D neurotoxin-converting phages

研究代表者

阪口 義彦 (Sakaguchi, Yoshihiko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70403491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：C型とD型菌による感染症(ボツリヌス症)が発生すると、生産者への経済的な損失や消費者への食の安全に対する不安感を助長させる。その原因となるC型とD型ボツリヌス毒素をコードする遺伝子は、バクテリオファージ(ファージ)により伝播されている。本研究では、C型菌とD型菌ファージの宿主菌への感染に重要である吸着に関して遺伝学的に研究を行った。C型菌とD型菌ファージのゲノム解析を基に、ファージの構造タンパク質を特定し、数種のファージ尾部吸着分子の候補遺伝子を推定した。現在、当該遺伝子産物の機能を調べているところである。吸着阻害によりファージ伝播を阻止することでボツリヌス症の制御が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファージリガンド分子とボツリヌス菌レセプター分子との相互作用に関する研究は、未だ明らかとなっていない。研究代表者は、これまでボツリヌス毒素遺伝子の伝達が、ファージを介して近縁菌間で起きている可能性を独自に着想した。本研究により、C型またはD型毒素遺伝子を伝播するファージビリオンタンパク質を特定し、数種のファージ尾部吸着分子と予想される遺伝子を推定することができた。今後、本吸着分子を明らかにすることにより、クロストリジウム属菌間でのボツリヌス毒素遺伝子の伝達メカニズムの解明が可能となる。また、C型菌とD型菌ファージの詳細な情報は、ボツリヌス症の感染を制御する有用なデータとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our ongoing study revealed that botulinum neurotoxin genes are present in the bacteriophage (phage) genomes and that, consequently, phages participate in neurotoxin-gene transfer to Clostridium botulinum types C and D. If so, a strategy mediated by phages to inhibit neurotoxin-gene transfer to the hosts would be of great help to block botulism outbreaks. In this study, we aimed to identify the infectious mechanism of C. botulinum type C and D phages. We performed genomics analyses of type C and D phages, which was useful to specify the phage adsorption rate that is required for adherence to the host surface. We found that phages carry several interesting genes adapted to our purpose, which are likely to encode the proteins that compose the phage tail. These novel findings will be very useful to identify the machinery of the phage host interaction in the process of infection-mediated neurotoxin-gene transfer.

研究分野：病原細菌学

キーワード：ボツリヌス菌 人畜共通感染症 ボツリヌス症 ボツリヌス毒素遺伝子 バクテリオファージ 水平伝播 ビリオンタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌は、グラム陽性で酸素の存在下では増殖できない偏性嫌気性菌である。本菌は、芽胞を形成し土壌や河川などの自然界に広く分布している。ボツリヌス菌は、強力な神経毒素(ボツリヌス毒素)を産生し、ヒトや家畜(ウシ、トリなど)に重篤な感染症(ボツリヌス症)を引き起こす。生産現場である農場で、ボツリヌス症のアウトブレイクが発生すると、生産者への経済的な損失や消費者への食の安全に対する不安感を助長させる。従って、農場におけるボツリヌス菌の感染制御は緊急な課題である。ボツリヌス菌は、産生するボツリヌス毒素によりA型~G型菌に分類されている。その中で、C型菌はトリに、D型菌はウシにボツリヌス症を引き起こす。

2. 研究の目的

原因となるC型とD型ボツリヌス毒素の遺伝子は、バクテリオファージ(ファージ)により伝播されている。その伝播を阻害することにより、畜産・食品への被害の抑制に有効であると考えた。しかしながら、ファージのボツリヌス菌(宿主菌)への吸着メカニズムは未だ明らかでない。従って、本ファージの宿主菌への吸着メカニズムを解明し、その本体を十分に理解することが重要である。本研究では、まず、C型菌とD型菌ファージの宿主認識分子の解析を行った。

3. 研究の方法

C型菌とD型菌ファージの全塩基配列決定とゲノム構造の比較解析

(1) C型菌とD型菌ファージの精製およびDNA調製

C型菌ファージはc-stファージ(C型有毒株C-Stockholm株由来)およびc-468ファージ(C型有毒株C-468株由来)、D型菌ファージはd-1873ファージ(D型有毒株D-1873株由来)を用いた。C型菌またはD型菌ファージを宿主菌(ファージ非保有株)に感染させ、ファージの大量培養を行った。大量培養したC型菌またはD型菌ファージをポリエチレングリコールで濃縮し、CsCl密度勾配超遠心法によりファージ粒子を精製した。精製したファージ粒子から、DNA精製キットを用いてファージDNAを調整した。

(2) C型菌とD型菌ファージゲノム構造の比較

(1)で精製したDNAを次世代シーケンサー(PacBio)により、C型菌とD型菌ファージゲノムの全塩基配列の決定を行った。ゲノム上のそれぞれの遺伝子(*orf*)を推定し、各遺伝子産物のアノテーション(遺伝子産物の機能予測や遺伝子カテゴリー分類など)を行った。また、近縁ファージゲノム情報は、公共のデータベース(Genbank)を利用し、ファージ間でのゲノム構造の比較解析を行った。

C型菌とD型菌ファージのビリオンタンパク質の解析

(1) ウエスタンブロット解析

精製したc-468ファージをウサギに免疫し、抗c-468ファージ抗体(ポリクロナール抗体)を作製した。作製した一次抗体(抗c-468ファージ抗体)を用いて、c-stファージ、c-468ファージまたはd-1873ファージのウエスタンブロット解析を行った。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識した抗ウサギ抗体を用いた。

(2) N 末端アミノ酸分析と質量分析

−(1)で精製したファージタンパク質を SDS-PAGE により分離し、N 末端アミノ酸分析器および質量分析器を用いて、ファージピリオンタンパク質を解析した。質量分析で使用するタンパク質データベースは、独自に構築した。得られたアミノ酸配列から、ファージゲノム上のピリオンタンパク質をコードする遺伝子群を特定した。

(3) 組換えファージ尾部吸着タンパク質の作製

候補となるファージ側の宿主認識タンパク質をコードする遺伝子について、大腸菌発現系を構築し組換えファージ尾部吸着タンパク質を発現した。

4 . 研究成果

本研究では、C 型菌と D 型菌ファージの感染に第一義的に重要であるファージの宿主菌への吸着に関する遺伝学的研究を行った。はじめに、他の C 型菌ファージ、c-468 ファージおよび D 型菌ファージ、d-1873 ファージの比較ゲノム解析を行い、次に C 型菌および D 型菌ファージを構成するピリオンタンパク質、特に尾部吸着分子をコードする遺伝子群の特定を試みた。

c-468 ファージのゲノム解析

既に、c-st ファージのゲノム情報を得ていたので、まずは他の C 型菌ファージ、c-468 ファージのゲノム解析を行うことにした。C-468 株から c-468 ファージを分離・培養し、本ファージの全ゲノム塩基配列を決定した。c-468 ファージのゲノムサイズは 165 kbp で、184 個の遺伝子 (*orf*) を確定できた。既知の c-st ファージと c-468 ファージの比較ゲノム構造解析を行ったところ、c-st ファージゲノムの 43~57 kbp と 116~123 kbp の領域が欠損したゲノム構造を有していた。本解析から、c-468 ファージはある頻度でゲノムが縮小していることが明らかとなった。

c-468 ファージタンパク質の網羅的解析

精製した c-468 ファージタンパク質の解析を行ったところ、c-468 ファージゲノム上の遺伝子から推定されるアミノ酸残基から、総計 10 個の *orf* が同定された。これらの *orf* は全て 99~157 kbp 領域に存在することが示唆された。

d-1873 ファージのゲノム解析

D-1873 株から d-1873 ファージを分離・培養し、本ファージのゲノム解析を行った。d-1873 ファージゲノムサイズは 186 kbp で、151 個の *orf* が確定できた。既に報告した c-st ファージと d-1873 ファージのゲノム構造を比較すると、D 型ボツリヌス毒素遺伝子 (*boNT/D*) および DNA 複製に関係する遺伝子を含む領域 (45~100 kbp) がよく保存されていた。しかしながら、*boNT/D* の上流領域 (1~45 kbp) および下流領域 (100~115 kbp) は、c-st ファージおよび c-468 ファージのゲノム構造とは著しく異なっていた。特に、*boNT/D* の下流領域は、ファージの構造タンパク質をコードする遺伝子群であることが推察され、本構造タンパク質配列は、c-st ファージおよび c-468 ファージのものとは大きく異なっていた。

C 型菌および D 型菌ファージのピリオンタンパク質の解析

作製した抗 c-468 ファージ抗体を用いて、精製した c-st ファージ、c-468 ファージまたは d-1873 ファージのウエスタンブロット解析を行った。その結果、c-st ファージおよび c-468 ファージは、同じシグナルパターンが得られたが、d-1873 ファージでは異なるシグナルパターンであった。このことから、c-st ファージおよび c-468 ファージのピリオンタンパク質

は類似の抗原性を示すが、d-1873 ファージのピリオンタンパク質は C 型菌ファージとは異なる抗原性を示すことが明らかとなった。

C 型菌および D 型菌ファージのピリオンタンパク質の発現・精製

得られたゲノム情報を基に、C 型菌および D 型菌ファージを構成するピリオンタンパク質を特定し、その中で遺伝子間での相同性解析を行い、数種のファージ尾部吸着分子の候補遺伝子を推定した。当該遺伝子産物の発現・精製を行なうため、複数の発現系について条件検討を行ったが、2 つの遺伝子については、大腸菌を用いた発現系では宿主である大腸菌の培養が困難であった。また、他の推定した種々の遺伝子については、現在、遺伝子産物の発現・精製を行っており、得られた組換えタンパク質のボツリヌス菌に対する特異的吸着性を調べるため、環境を整えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Takehara, M., Takagishi, T., Seike, S., Oda, M., Sakaguchi, Y., Hisatsune, J., Ochi, S., Kobayashi, K., Nagahama, M., Cellular entry of *Clostridium perfringens* iota-toxin and *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Toxins*, 9(8), 247, 2017. 査読有 doi: 10.3390/toxins9080247
2. Uchiyama, J., Taniguchi, M., Kurokawa, K., Takemura-Uchiyama, I., Ujihara, T., Shimakura, H., Sakaguchi, Y., Murakami, H., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., Adsorption of *Staphylococcus* viruses S13' and S24-1 on *Staphylococcus aureus* strains with different glycosidic linkage patterns of wall teichoic acids. *J. Gen. Virol.*, 98(8), 2171–2180, 2017. 査読有 doi: 10.1099/jgv.0.000865
3. Putranto, E. W., Kinoshita, R., Watanabe, M., Sadahira, T., Murata, H., Yamamoto, K., Futami, J., Kataoka, K., Inoue, Y., Ruma, I. M. W., Sumardika, I. W., Youyi, C., Kubo, M., Sakaguchi, Y., Saito, K., Nasu, Y., Kumon, H., Huh, N. H., Sakaguchi, M., Expression of tumor suppressor REIC/Dkk-3 by a newly improved adenovirus vector with insertion of an hTERT promoter at the 3'-side of the transgene. *Oncol. Lett.*, 14, 1041–1048, 2017. 査読有 doi: 10.3892/ol.2017.6201
4. Saho, S., Satoh, H., Kondo, E., Inoue, Y., Yamauchi, A., Murata, H., Kinoshita, R., Yamamoto, K., Futami, J., Putranto, E. W., Ruma, I. M., Sumardika, I. W., Youyi, C., Suzawa, K., Yamamoto, H., Soh, J., Tomida, S., Sakaguchi, Y., Saito, K., Iioka, H., Huh, N. H., Toyooka, S., Sakaguchi, M., Active secretion of dimerized S100A11 induced by the peroxisome in mesothelioma cells. *Cancer Microenviron.*, 9, 93–105, 2016. 査読有 doi: 10.1007/s12307-016-0185-2
5. Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I., Kato, S., Takeuchi, H., Sakaguchi, Y., Ujihara, T., Daibata, M., Shimakura, H., Okamoto, N., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., Screening of KHP30-like prophages among Japanese *Helicobacter pylori* strains, and genetic analysis of a defective KHP30-like prophage sequence integrated in the genome of the *Helicobacter pylori* strain NY40. *FEMS Microbiol. Lett.*, 363(16), 1–9, 2016. 査読有 doi: 10.1093/femsle/fnw157
6. Uchiyama, J., Suzuki, M., Nishifuji, K., Kato, S., Miyata, R., Nasukawa, T., Yamaguchi, K., Takemura-Uchiyama, I., Ujihara, T., Shimakura, H., Murakami, H., Okamoto, N., Sakaguchi, Y., Shibayama, K., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., Analyses of short-term antagonistic evolution of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and phage KPP22 (*Myoviridae* family, PB1-like virus genus). *App. Environ. Microbiol.*, 82(15), 4482–4491, 2016. 査読有 doi: 10.1128/AEM.00090-16

7. Shigehisa, R., Uchiyama, J., Kato, S., Takemura-Uchiyama, I., Yamaguchi, K., Miyata, R., Ujihara, T., Sakaguchi, Y., Okamoto, N., Shimakura, H., Daibata, M., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family *Podoviridae* genus N4-like viruses isolated in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 60(1), 64–67, 2016. 査読有 doi: 10.1111/1348-0421.12347

〔学会発表〕(計 19 件)

阪口義彦、後藤和義、妹尾充敏、内山淳平、尾崎隼人、城代康貴、林 俊治、大宮直木、加藤はる、Analysis of gut microbiota and metabolite in Fecal transplantation for *Clostridioides difficile* infection. 第 92 回日本細菌学会総会、札幌、2019 年 4 月 23 日–25 日。

Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Ogura, Y., Gotoh, K., Yamamoto, Y., Matsuzaki, S., Yamaguchi, A., Hayashi, T., Oguma, K., Hayashi, S., Analysis of botulinum neurotoxin-converting phages in *Clostridium botulinum* types C and D, The 91st Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Fukuoka, March 27–29, 2018.

Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Hosomi, K., Kohda, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Hayashi, S., Kozaki, S., Mukamoto, M., Analysis of botulinum neurotoxin type B6 gene-encoding plasmid in *Clostridium botulinum* type B. 第 90 回日本細菌学会総会、仙台、2017 年 3 月 19 日–21 日。

他学会発表 15 件

〔図書〕(計 2 件)

阪口義彦、シリーズ！！ポツリヌス菌による疾患(ポツリヌス症) ポツリヌス症の臨床症状、サラヤ情報誌「衛生の友」, 58、p8、2016。

阪口義彦、シリーズ！！ポツリヌス菌による疾患(ポツリヌス症) ポツリヌス症の治療と予防、サラヤ情報誌「衛生の友」, 59、p8、2016。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：林 俊治

ローマ字氏名：Hayashi Shunji

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40260765

(2) 研究分担者

研究分担者氏名: 加藤 はる

ローマ字氏名: Kato Haru

所属研究機関名: 国立感染症研究所

部局名: 細菌第二部

職名: 室長

研究者番号(8桁): 00273136

(3) 研究分担者

研究分担者氏名: 大宮 直木

ローマ字氏名: Ohmiya Naoki

所属研究機関名: 藤田医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00335035

(4) 研究分担者

研究分担者氏名: 内山 淳平

ローマ字氏名: Uchiyama Jumpei

所属研究機関名: 麻布大学

部局名: 獣医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 20574619

(5) 研究分担者

研究分担者氏名: 妹尾 充敏

ローマ字氏名: Senoh Mitsutoshi

所属研究機関名: 国立感染症研究所

部局名: 細菌第二部

職名: 主任研究官

研究者番号(8桁): 20646624

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、研究者個人に帰属されます。