

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06015・19K21155

研究課題名(和文)腸管出血性大腸菌に感染する広宿主域ファージの感染機構の解明と食品への応用

研究課題名(英文) Broad-host-range bacteriophage EscHU1 infecting Enterohemorrhagic Escherichia coli: characterization, infection mechanism, and application for food safety

研究代表者

山木 将悟 (Yamaki, Shogo)

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：20824337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌(*Escherichia coli*)やサルモネラ(*Salmonella enterica*)などの複数種の細菌に感染する広宿主域バクテリオファージEscHU1の性状と食品への応用の可能性について検討した。EscHU1は頭部と尾部から構成され、柔軟な長い尾部を持つSiphoviridae科に属することが明らかとなった。牛肉および牛乳を用いた試験では、EscHU1は*E. coli*の生菌数を減少させたが、*S. Typhimurium*の生菌数は減少しなかった。したがって、EscHU1は食品中の*E. coli*制御するために有効なファージであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品の安全・安心は人々の健康を根底から支え、食品に求められる重要な要素のひとつである。特に、腸管出血性大腸菌やサルモネラによる食中毒は世界で問題となり、効果的な対策が常に求められてきた。本研究で用いたバクテリオファージ(ファージ)は細菌に特異的に感染するウイルスであり、既に欧米の一部では食品にファージを利用することが認可されている。研究に使用したファージEscHU1は腸管出血性大腸菌とサルモネラの両方に感染し、特に食品を利用した試験では腸管出血性大腸菌の生菌数を効果的に減少させた。今後、両細菌を食品より殺菌するためにEscHU1の利用が有効な手法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, broad-host-range bacteriophage EscHU1 was characterized and investigated as an antimicrobial agent for the control of foodborne pathogens such as *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. EscHU1 has head and tail structures, and this phage belongs to family Siphoviridae that has a long and flexible tail. In challenge tests using beef and milk, EscHU1 reduced viable cell counts of *E. coli*, but did not reduce that of *S. Typhimurium*. The results from this study suggest that EscHU1 has potential as the antimicrobial agent for the control of *E. coli* in contaminated food.

研究分野：食品微生物

キーワード：バクテリオファージ 食品衛生 食品微生物 微生物制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、食品の低温流通技術と調理加工技術の発達により、食品の安全性は飛躍的に上昇している。一方で、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) やサルモネラ (*Salmonella enterica*) による食中毒の発生が後を絶たないのも現状である。これらの食中毒細菌は加熱により容易に死滅するが、加熱を必要としない食品では制御が比較的困難となる。そこで、非加熱かつ食品の品質劣化を伴わない食品保蔵技術の開発が求められている。

本研究では、バクテリオファージ (ファージ) の利用に着目した。ファージは細菌に感染するウイルスであり、1915年と1917年に Frederick W. Twort と Félix d'Herelle によりそれぞれ独立に発見された。ファージは宿主となる細菌に感染後、細菌細胞内で自己を複製し、最終的に宿主細胞を溶菌することにより殺菌する。ファージの宿主への感染は極めて厳密な宿主認識により行われ、細菌細胞表面上のレセプターをファージのレセプター結合タンパク質が認識することにより感染が開始する。そのため、抗生物質と異なり、ファージによる微生物制御は、対象とする細菌以外に影響を及ぼさない。また、食品の味や香りに影響を及ぼさないことも利点のひとつである。欧米では、食中毒細菌の殺菌を目的に、大腸菌やサルモネラ、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) に感染するファージ製剤の食品への利用が認められている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が分離したファージ EscoHU1 の性状について調べ、食品での微生物制御能を評価することを目的に研究を行った。本研究で対象とした EscoHU1 は、河川水より分離したファージであり、大腸菌とサルモネラの両方に感染する広宿主域ファージである。通常、ファージの宿主域は極めて狭く、複数の属の細菌に感染するファージは稀である。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

ファージ EscoHU1 の一般性状分析には *E. coli* RIMD 0509939 (血清型 O157:H7) および *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 を使用した。また、宿主域測定には様々な種および属に該当する複数のグラム陰性細菌株を使用した。各菌株は Tryptic soy broth (BD) で培養し、以後の実験に供した。

(2) ファージ EscoHU1 の一般性状分析

ファージ EscoHU1 の増幅・精製

実験に使用するファージは、*E. coli* RIMD 0509939 培養液中で増殖させた後、ポリエチレングリコール沈殿法により濃縮した。その後、塩化セシウム密度勾配遠心法および SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, and 0.01% gelatin, pH 7.5) による透析を行い、精製ファージとして以後の実験に供した。

ファージ EscoHU1 の形態学的観察

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、ファージ EscoHU1 の形態を観察し、形態学的に同定を行なった。被膜グリッド (日新 EM) に EscoHU1 を吸着させ、2.5% 酢酸サマリウムでネガティブ染色を行なった。その後、TEM (JEM-1011, 日本電子) により EscoHU1 の形態を観察し、同定を行なった。

ファージ EscoHU1 の宿主域測定

E. coli O157:H7, *S. enterica* を含むグラム陰性菌 37 株に対して、EscoHU1 のブランク形成能と Efficiency of plating (EOP) 測定により宿主域を評価した。

ファージ EscoHU1 の一段増殖実験

Tryptic soy broth に *E. coli* RIMD 0509939 または *S. Typhimurium* ATCC13311 を接種し 37°C で培養後、OD₆₀₀ が 1.0 となった培養液に EscoHU1 を接種した。37°C で 5 分間培養後、遠心分離し菌体を新鮮な TSB に懸濁した。37°C で培養し、経時的にブランク形成数を測定した。また、培養液をクロロホルム処理し同様にブランク形成数を測定した。

ファージ EscoHU1 のゲノム解析

ファージ EscoHU1 のゲノムに含まれる ORF のアノテーションを行なった。また、EscoHU1 のレセプター結合タンパク質に相当する遺伝子のアミノ酸配列を近縁のファージと比較した。

(3) 微生物制御剤としてのファージ EscoHU1 の評価

濁度法を用いた液体培地中での殺菌能の評価

濁度の変化から、EscoHU1 の殺菌能を評価した。Tryptic soy broth に 10⁵ CFU/mL となるように *E. coli* RIMD 0509939 または *S. Typhimurium* ATCC 13311 を接種後、10⁸ PFU/mL となるようにファージ EscoHU1 を接種した。30°C 30 rpm で振盪培養し、バイオフォトレコーダー (TVS062CA, ADVANTEC) にて継時的に OD₆₀₀ を測定した。

EscoHU1 の殺菌能に及ぼす培地 pH の影響

培地 pH を 4.5, 5.0, 6.0, 7.0 と調整した Tryptic soy broth に 10^5 CFU/mL となるように *E. coli* RIMD 0509939 を接種後, 10^8 PFU/mL となるようにファージ EscoHU1 を接種した。30°C, 30 rpm で振盪培養し, バイオフォトレコーダー (TVS062CA, ADVANTEC) にて継時的に OD₆₆₀ を測定した。

食品における EscoHU1 の殺菌力評価

牛肉および牛乳を用いて, ファージ EscoHU1 のチャレンジテストを行なった。牛肉は約 2 cm × 2 cm × 0.5 cm の小片にカットし, *E. coli* RIMD 0509939 または *S. Typhimurium* ATCC 13311 を約 2×10^5 CFU/cm² となるように接種した。安全キャビネット内で乾燥後, EscoHU1 を約 2×10^9 PFU/cm² となるように接種した。牛乳を用いた試験では, *E. coli* RIMD 0509939 または *S. Typhimurium* ATCC 13311 を約 2×10^5 CFU/mL となるように接種後, EscoHU1 を約 2×10^9 PFU/mL となるように接種した。サンプルは 4°C で 3 日間保存し, 接種した *E. coli* または *S. Typhimurium* の生菌数を測定した。

生菌数測定の際には, Chibeu *et al.* (2013) および de Siqueira *et al.* (2006) を一部改変し調製した TeaF 溶液により, 試料中に含まれる EscoHU1 を不活化し, *E. coli* および *S. Typhimurium* の測定に供した。*E. coli* RIMD 0509939 は CHROMagar O157TAM (CHROMagar) を用いた表面塗抹法により測定した。*S. Typhimurium* ATCC 13311 は, Hong *et al.* (2019) の方法に従い Tryptic soy agar に表面塗抹後, 37°C で 2 時間回復培養し XLD agar (Oxoid) 7 mL を重層する agar overlay 法により測定した。

ファージ処理後の食品に生残した *E. coli* および *S. Typhimurium* の EscoHU1 感受性を調べた。前述の実験において, ファージ処理区サンプルの生菌数測定後の平板から *E. coli* および *S. Typhimurium* を分離し, Tryptic soy broth で培養した。培養した菌体を用いてスポットテスト法により EscoHU1 感受性を調べた。

4. 研究成果

(1) ファージ EscoHU1 の性状

E. coli RIMD 0509939 を用いてファージ EscoHU1 を増殖させ, ポリエチレングリコール沈殿法および塩化セシウム密度勾配超遠心法により濃縮と精製を行なった結果 約 10^{11-12} PFU/mL の EscoHU1 懸濁液を調製することができた。TEM 観察の結果, EscoHU1 は頭部と尾部より構成され, その尾部は長く柔軟性があった。これより, EscoHU1 は *Siphoviridae* 科に属するファージであることが明らかとなった。宿主域測定では, EscoHU1 は *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. bongori* などにプラークを形成し, 通常のファージと比較して宿主域が広い広宿主域ファージであることを確認した。特に, 実験に供した *E. coli* O157:H7 では全ての株でプラークを形成し, EscoHU1 が *E. coli* O157:H7 を制御するファージとして優れた宿主域を示すことが明らかとなった。

一段増殖実験により, *E. coli* および *S. Typhimurium* に対する EscoHU1 の潜伏期, 暗黒期, バーストサイズを算出したが, *E. coli* と *S. Typhimurium* の宿主の違いによる明確な差は認められなかった。また, ゲノム解析により, EscoHU1 ゲノム (約 123 kbp) の両末端約 10 kbp に direct terminal repeat 構造が含まれることが明らかとなった。これにより, ファージ EscoHU1 は T5 phage が属する *Tequintavirus* 属に属することが明らかとなった。また, 近縁のファージとの比較により, ファージの感染と宿主域の決定に重要となる Receptor-binding protein をコードする ORF を特定することができ, 同様に広宿主域ファージである SPC35 の Receptor-binding protein のアミノ酸配列と高い identity を示した。これにより, 宿主細胞表面上のファージ EscoHU1 のレセプターは既知のファージと同様である可能性が示唆された。

(2) 微生物制御剤としてのファージ EscoHU1 の評価

液体培地中の *E. coli* および *S. Typhimurium* の増殖に及ぼすファージ EscoHU1 の影響

はじめに, 液体培地におけるファージ EscoHU1 の殺菌力を評価した。*E. coli* RIMD 0509939 では, ファージ処理区のサンプルでは 30°C, 24 時間で濁度上昇は認められなかったが, ファージ未処理区のサンプルでは培養 6 時間程度で濁度上昇が認められた。また, *S. Typhimurium* ATCC 13311 でもファージ処理による培養液の濁度上昇の遅延が観察された。これより, 液体培地の系で EscoHU1 は効果的に *E. coli* O157:H7 および *S. Typhimurium* の増殖を抑制することが明らかとなった。

EscoHU1 の殺菌能に及ぼす pH の影響を調べた結果, pH 6.0 および 7.0 では濁度上昇の顕著な遅延が認められた。pH5.0 では, pH6.0 および 7.0 と比べて濁度上昇の遅延具合に低下が認められ, pH4.5 ではファージ処理の有無による *E. coli* RIMD 0509939 の濁度上昇に違いは認められなかった (図 1)。したがって, ファージ EscoHU1 の殺

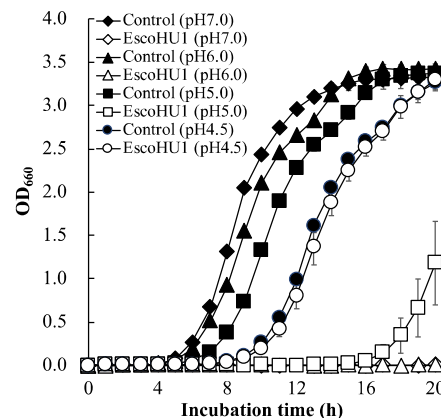


図1 ファージEscoHU1の溶菌性に及ぼす培地pHの影響

菌能は pH による影響を受け、EscoHU1 は pH が中性域の食品に用いることが望ましいと明らかになった。

食品中の *E. coli* および *S. Typhimurium* の生残性に及ぼすファージ EscoHU1 の影響

牛肉および牛乳に *E. coli* および *S. Typhimurium* を接種し、ファージ EscoHU1 処理により生菌数が減少するか検証した。牛肉に EscoHU1 処理を行なった結果、*E. coli* RIMD 0509939 の生菌数は処理後 6 時間で約 1 log CFU/cm² 減少した。一方、牛肉に接種した *S. Typhimurium* ATCC 13311 の生菌数はファージ未処理区と比較して減少しなかった。牛乳を用いた試験では、ファージ未処理区のサンプルと比較して *E. coli* RIMD 0509939 の生菌数は約 1 log CFU/mL 減少したが、*S. Typhimurium* ATCC 13311 の生菌数は減少しなかった。したがって、*S. Typhimurium* よりも *E. coli* の方が EscoHU1 に感染し易く、EscoHU1 は特に *E. coli* O157:H7 の制御に適したファージであることが示唆された。また、4°C で 3 日間保存後の食品から *E. coli* および *S. Typhimurium* を分離し、EscoHU1 耐性菌が存在するか確認したが、分離株は全て EscoHU1 に感受性であった。これより、低温下で使用した際には EscoHU1 耐性株が出現しなかったことが推察された。

以上より、本研究で使用したファージ EscoHU1 は *E. coli* や *S. enterica* に感染する広宿主域ファージであり、食品を汚染する *E. coli* O157:H7 を制御するために有効なファージであることが示唆された。

<参考文献>

- Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Sabour, P.M., Kropinski, A.M., and Balamurugan, S., 2013. Efficacy of bacteriophage LISTEXTMP100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int. J. Food Microbiol.*, **167**, 208–214.
- de Siqueira, R.S., Dodd, C.E.R., and Rees, C.E.D., 2006. Evaluation of the natural virucidal activity of teas for use in the phage amplification assay. *Int. J. Food Microbiol.*, **111**, 259–262.
- Hong, E.-J., Park, S.-H., and Kang, D.-H., 2019. Sequential treatment of hydrogen peroxide, vacuum packaging and dry heat for inactivating *Salmonella* Typhimurium on alfalfa seeds without detrimental effect on seeds viability. *Food Microbiol.*, **77**, 130–136.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山木将悟, 川合祐史, 山崎浩司
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌0157:H7およびサルモネラに感染するバクテリオファージの分離
3. 学会等名 日本食品科学工学会 2018年北海道支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shogo Yamaki, Yuji Kawai, Koji Yamazaki
2. 発表標題 Characterization of a novel bacteriophage EscoHU1 infecting both Escherichia coli 0157:H7 and Salmonella
3. 学会等名 2019 IAAP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----