

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月17日現在

機関番号：16401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890129

研究課題名（和文） バクテリオファージ尾部リガンド分子を利用した
新規迅速細菌同定法の開発研究課題名（英文） Development of a new rapid bacterial identification using
bacteriophage tail ligand molecule

研究代表者

内山 淳平 (UCHIYAMA JUMPEI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20574619

研究成果の概要（和文）：感染拡大防止には、感染管理が極めて有効である。感染管理における迅速な細菌種同定は、患者早期治療、医療費削減、感染拡大防止 等に大きく貢献する。それゆえ、より迅速な細菌同定法の開発は急務である。研究代表者は、バクテリオファージ（ファージ；細菌ウイルス）の構造タンパク質が細菌種特異的吸着能に関与していることに着目し、細菌検出法への応用性を検討した。その結果、ファージ尾部分子は迅速細菌検出法に使用できる可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Infection control is extremely important to prevent infection spread. Rapid bacterial examination in infection control enables early treatment of patients, reduction of medical costs and prevention of infection spread. Thus, the development of more rapid bacterial detection systems is urgently required. The principal Investigator focused on the specific bacteriophage (phage; bacterial virus) structural proteins contributed to the bacteria-species-specific binding ability, and examined the applicability of the phage molecule to bacterial detection system. As a result, the phage tail molecule was revealed to be potentially used for the rapid bacteria detection system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,320,000	696,000	3,016,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：感染症内科学

キーワード：バクテリオファージ、ファージ、細菌検出法、ファージリガンド

1. 研究開始当初の背景

(1) 感染制御と細菌検査

抗生物質の不適切な過剰使用や医療従

事者の院内感染制御に対する不十分な意識により、病原細菌の抗生物質耐性が進行した。それゆえ、高度な感染管理は極めて重要である。特に、感染管理における迅速な細菌種同定は、患者の早期治療や救命を可能にするばかりでなく、医療費の削減、感染拡大の防止にも大きく貢献する。しかしながら、日常細菌検査が自動化された今でも、細菌同定には数日間は要する。近年、高感度で迅速な PCR を用いた遺伝子検出法や質量分析器による微生物同定方法も開発されたが、ランニングコストの問題、手間、高額な機械を使用するなどの一般検査では不向きである。

一方、迅速簡便な細菌検査方法も存在する。ラテックス凝集反応やイムノクロマトグラフィー法などを代表とする免疫学的検出方法である。これらの手法は、簡便さ、迅速さを有し非常に優れた検出方法である。ところが、この手法は抗体の優劣に依存するところが大きく、標的細菌側因子による抗原抗体反応の回避、菌株間による表現型の相違による抗原の欠如、また、抗体の非特異的反応 等により偽陰性あるいは偽陽性の結果を得ることも少なくない。また、その開発も容易でない。細菌標的抗原の選択が困難である問題、抗体作製における動物愛護の問題、優秀な抗体作製までに長い時間を要する問題 等がある。それゆえ、細菌検査に利用可能な抗体の新規代替分子の探索は極めて意義があると考えられる。

(2) バクテリオファージリガンド分子を抗体の代替分子として利用

バクテリオファージ (ファージ) とは、細菌特異的に感染するウイルスの総称である。自然界に存在し、地球上で最も個体数が多く多様性に富んでいる。分離されるファージの 96 % は尾部保有ファージである。その大きな特徴は、細菌の種や株レベルに特異的に感染することである。この宿主特異性は、第一義的に尾部先端に存在するリガンド分子と菌表層のレセプター分子との強力な特異的結合反応に起因していると考えられている。それゆえ、ファージ粒子から分離されたリガンド分子自体も菌種特異的に吸着できると考えられている。

ファージリガンド分子の特色は、細菌との長年の共進化で成熟した巧妙な分子デザ

インにある。特に、① 高い宿主特異性、② 数分子でその巨大なファージ構造体を細菌表層に接着させ感染を維持できる極めて強い吸着能は、人為的、人工的にも作製することは難しいと考えられる。また、③ リガンド分子は抗体と異なり、大腸菌タンパク質合成系により分離可能であるため、安価、迅速、安定した供給が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」より、ファージリガンド分子を抗体の代替として細菌検出法に応用する技術開発を行った。

本研究では、ファージリガンド分子を開発性、利便性に優れているビーズ凝集法に適用し、新規細菌同定法の開発を目的とした。薬剤耐性菌起因菌モデルとして黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、及び、腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) に対して技術開発を実施した。

3. 研究の方法

(1) リガンド遺伝子の推定

GenomeMatcher (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html>) によるゲノム全体の DNA 配列および ORF の比較を行った。

(2) リガンドタンパク質の大量調製

大腸菌を使用し、N 末端に 6 × His tag が付加した組み換えタンパク質の大量作製を行った。Co²⁺ アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。

(3) リガンドタンパク質の性状解析

構造タンパク質を SDS-PAGE で分離し、染色後 (銀染色あるいは CBB)、タンパク質バンドを切り出し、トリプシン処理後、質量分析器により分析を行った。質量分析器用データベースは、local computer に構築した。

組み換えタンパク質をウサギに免疫を行い、ウサギ抗血清を取得した。ウサギ抗血清を使用し、ファージ構造タンパク質に対してウエスタンブロット、精製ファージに対して免疫電子顕微鏡法を行った。

様々な濃度に希釈した抗血清をファージと混和し、活性ファージの定量を行った。

組み換えタンパク質を Blue-native PAGE で解析した。

(4) リガンド分子の吸着能有無の測定

菌体とリガンド分子を加え、液体中で一定時間反応後、遠心法により菌体と液体に分画した。菌体と液体をそれぞれ SDS-PAGE 後、ウエスタンブロットによりリガンド分子の検出を行った。

(5) リガンドタンパク質のビーズへの固定化 タンパク質 N 末端をビーズヘカップリング

した。

(6) リガンドタンパク質結合ビーズを利用した細菌検出系の構築

培養した細菌、作製したビーズを96ウェルマイクロタイタープレート内で混和し、凝集反応が見られる条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌ファージ S24-1 リガンド分子を利用した細菌検出法の開発

① ファージ S24-1 のリガンド分子推定とその性状解析

高知市内の下水処理場より分離した類縁ファージ S13' と S24-1 の比較ゲノム解析により *orf16* がリガンド遺伝子と予想された。ファージ S24-1 構造タンパク質、大腸菌発現系により調製した ORF16、精製したファージ S24-1 を使用し、ORF16 の性状解析を行った。

はじめに、ファージ S24-1 構造タンパク質に対してウエスタンブロットを行った結果、2本バンドが検出された (70, 210 kDa) (Fig. 1A)。また、検出バンドを SDS-PAGE で対応させ、トリプシンで消化したタンパク質を質量分析器で分析した結果、両タンパク質とも、検出ペプチドの分布や分子量は一致していた。これらのデータをデータベースに照合して解析した結果、両タンパク質とも ORF16 のみであることが示唆された。これより、ORF16 は三量体で一つのユニットを形成している可能性が示唆された。さらに、組み換え ORF16 を Blue-native PAGE で解析したところ、ORF16 は、複数のユニット (三量体) が集合し存在する可能性が示唆された (Fig. 1B)。

Fig. 1A ファージ S24-1 構造タンパク質の SDS-PAGE とウエスタンブロット (WB)

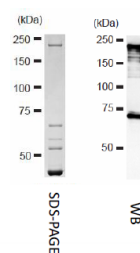
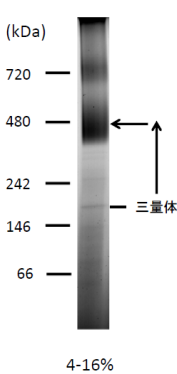


Fig. 1B ORF16 の Blue-Native PAGE



ファージ粒子の免疫電子顕微鏡では、ORF16 は尾部に存在することが示唆された (Fig. 1C)。また、抗 ORF16 血清を利用した中和試験では、抗血清濃度依存的なファージ活性の抑制が観察された。 (Fig. 1D)。それゆえ、ORF16 は、尾部に存在し、感染に重要な分子であることが示唆された。

さらに、黄色ブドウ球菌・腸球菌を使用し、ORF16 の吸着能を調べた結果、ORF16 は黄色

ブドウ球菌のみに吸着能を示した。

以上の結果より、ファージ S24-1 の ORF16 は、高次な構造を有するリガンド分子であることが証明された。

Fig. 1C ファージ S24-1 ORF16 の免疫電子顕微鏡

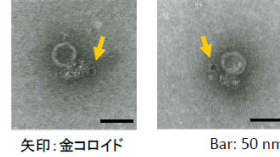
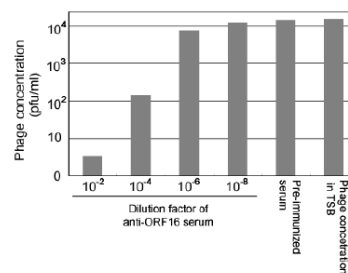
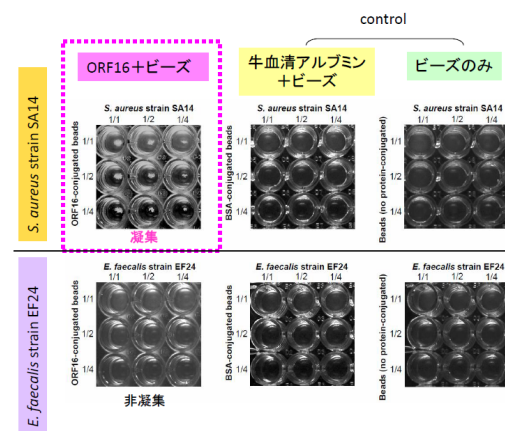


Fig. 1D 抗 ORF16 血清によるファージ S24-1 の中和試験



② リガンド分子結合ビーズによる細菌検出法の開発

Fig. 2A ORF16 付加ビーズによる細菌検出系の構築



黄色ブドウ球菌ファージ S24-1 リガンド分子 ORF16 を使用し、ビーズ凝集法による黄色ブドウ球菌検出法の研究開発を行った。

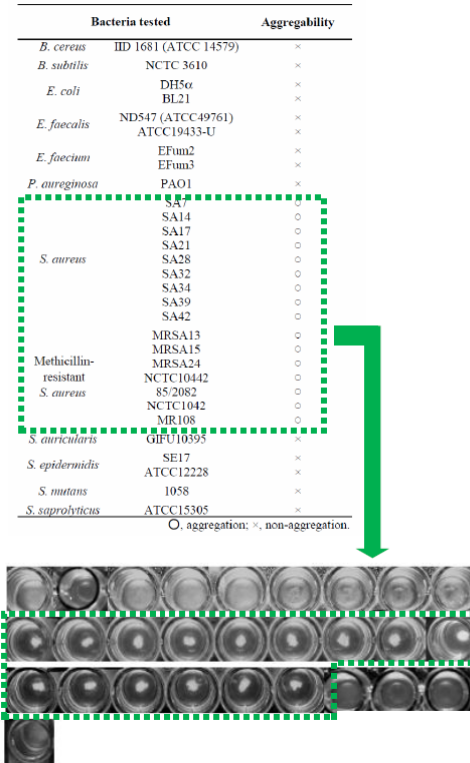
はじめに、ORF16 結合ビーズを利用した黄色ブドウ球菌検出系の構築を行った。ORF16 結合ビーズ、ビーズ自体、牛血清アルブミン結合ビーズを調製した。これらのビーズを黄色ブドウ球菌、腸球菌へ混和した。その結果、1 分以内に ORF16 結合ビーズのみが黄色ブドウ球菌特異的に凝集反応を示した。これより、ORF16 結合ビーズによる黄色ブドウ球菌検出系が構築できたと考えられた。

加えて、ORF16 結合ビーズを様々な菌種菌

株へ凝集試験を行った結果、1分以内に ORF16 結合ビーズは MRSA を含む黄色ブドウ球菌特異的に凝集反応を示した (Fig. 2B)。それゆえ、ORF16 結合ビーズは、黄色ブドウ球菌検出に使用できる可能性が示唆された。

以上より、ファージリガンド分子を利用した迅速細菌検出法の可能性が証明された。上記のデータをもとに当技術の特許出願を行っている。

Fig. 2A ORF16付加ビーズの様々な菌種菌株に対する凝集性



(2) 腸球菌ファージ ϕ EF24C リガンド分子の解析

溶菌活性が上昇した変異株 ϕ EF24C-P2 の分離を行い、溶菌活性上昇の原因がファージ吸着にあることを特定した。変異ファージ ϕ EF24C-P2 と野生株ファージ ϕ EF24C との全ゲノム比較を行った結果、巨大 *orf31* に点変異があることが明らかになった。この点変異によりアミノ酸置換が行われている可能性が示唆された (Fig. 3A)。

次に、ファージ構造タンパク質のウエスタンブロットを行った結果、180kDa 付近にバンドが検出された (Fig. 3B)。対応するバンドを質量分析器で解析した結果、ORF31 であることが示唆された。また、免疫電子顕微鏡法を行った結果、ファージ ϕ EF24C には尾繊維が存在し、ORF31 は尾繊維のコンポーネントであることが示唆された (Fig. 3C)。

以上の研究成果は、「5. 主な発表論文等」雑誌論文③Uchiyama J, et al. PLoS ONE, 6(10): e26648, 2011. に報告した。

次に、ORF31 自体の菌特異的吸着能の有無を調べた。ORF31 は、巨大なタンパク質であったため、各種様々な部分タンパク質の作製を行い、そのタンパク質の特異的吸着能測定を行った。しかしながら、ORF31 自体が菌体に吸着するというデータは得られなかった。現在、吸着能を有する部分 ORF31 作製の検討を行っている。

Fig. 3A ファージ ϕ EF24Cとその変異体とのゲノム比較

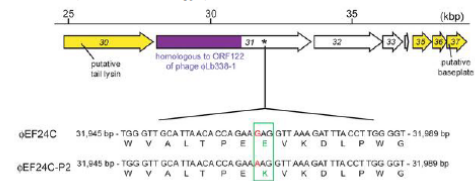


Fig. 3B ファージS24-1 構造タンパク質の SDS-PAGEとウエスタンブロット(WB)

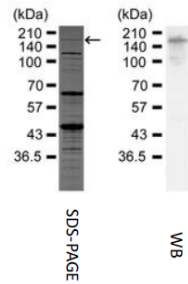


Fig. 3C ファージ ϕ EF24C の免疫電子顕微鏡



(3) まとめ

以上の結果より、ファージリガンド分子が細菌検出法に適応できる可能性が示唆された。また、ファージの種類により細菌検出法に対して適性を有するリガンド分子がある可能性が示唆された。

今後、様々な菌種ファージでリガンド分子ライブラリーの構築を行うこと、ファージリガンド分子を利用した高感度検出法の検討などを行っていく予定である。

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 8 件)

- ① Uchiyama J, Maeda Y, Takemura I, Gamoh K, Matsuzaki S, Daibata M. Analysis of deoxynucleosides in bacteriophages ϕ EF24C and K and the frequency of a specific restriction site in the

- genomes of bacteriophage subfamily *Spounavirinae*. *Archive of Virology*, 2012, Accepted. 査読あり
- ② **Uchiyama J**, Rashel M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Matsuzaki S, Daibata M. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. *Archive of Virology*, 157(4):733-738, 2012. 査読あり
 - ③ **Uchiyama J**, Takemura I, Satoh M, Kato S, Ujihara T, Akechi K, Matsuzaki S, Daibata M. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C with a spontaneous point mutation. *PLoS ONE*, 6(10): e26648, 2011. Available at <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0026648>. 査読あり
 - ④ Moro C, **Uchiyama J**, Chess-Williams R. Urothelial/lamina propria spontaneous activity and the role of M3 muscarinic receptors in mediating rate responses to stretch and carbachol. *Urology*, 78(6):1442. e9-15, 2011. 査読あり
 - ⑤ 松崎茂展、**内山淳平**、竹村伊代、大畑雅典. バクテリオファージ療法研究の現状と展望. 日本医事新報, 4551, 48-49, 2011. 査読なし
 - ⑥ **Uchiyama J**, Takemura I, Hayashi I, Matsuzaki S, Satoh M, Ujihara T, Murakami M, Imajoh M, Sugai M, Daibata M. Characterization of lytic enzyme open reading frame 9 (ORF9) derived from *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2):580-585, 2011. 査読あり
 - ⑦ Murakami M, Imajoh M, Ikawa T, Nakajima H, Kamioka M, Nemoto Y, Ujihara T, **Uchiyama J**, Matsuzaki S, Sano S, Daibata M. Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Virology*, 50(1):37-41, 2011. 査読あり
 - ⑧ Hoshiba H, **Uchiyama J**, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Daibata M, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage, ϕ MR25, and its therapeutic potential. *Archives of virology*, 155(4): 545-52, 2010. 査読あり
 - ① **Jumpei Uchiyama**, Iyo Takemura, Takako Ujihara, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C with a point mutation. 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 2012/03/27.
 - ② 松崎茂展、**内山淳平**、内山(竹村)伊代、大畑雅典. バクテリオファージの尾部リガンド分子を利用する細菌同定法, 国際医薬品原料・中間体展 2012 (CPhIJAPAN2012), 東京, 2012/03/21.
 - ③ 福田 憲, **内山淳平**, 森田珠恵, 石田わか, 角 環, 松崎茂展, 大畑雅典, 福島敦樹. 緑膿菌臨床分離株に対するバクテリオファージ KPP12 の溶菌効果の検討. 角膜カンファレンス 2012. ホテルニューオータニ (東京都千代田区). 2012/02/24.
 - ④ 内山伊代, **内山淳平**, 松崎茂展, 杉浦哲朗, 大畑雅典. 黄色ブドウ球菌ファージの尾部リガンドタンパク質を利用した細菌検出法の開発. 第 8 回合同地方会(第 57 回日本臨床検査医学会中国・四国支部総会, 第 152 回日本臨床化学会中国支部例会・総会, 第 22 回日本臨床化学会四国支部例会・総会), 岡山, 2012/02/05.
 - ⑤ 福田憲, 石田わか, 角環, 森田珠恵, **内山淳平**, 松崎茂展, 大畑雅典, 福島敦樹. バクテリオファージによるマウス緑膿菌角膜炎の抑制効果. 第 48 回日本眼感染症学会, 国立京都国際会館 (京都市) 2011/07/08.
 - ⑥ **内山淳平**, 竹村伊代, 氏原隆子, 邑岡麻子, 松崎茂展, 大畑雅典. 緑膿菌ファージ KPP10 のゲノム DNA 解析. 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総, 岡山, 2011/10/22.
 - ⑦ **内山淳平**, 竹村伊代, 佐藤美帆, 加藤伸一郎, 氏原隆子, 松崎茂展, 大畑雅典. 黄色ブドウ球菌ファージ S13' および S24-1 ゲノム比較による尾部吸着タンパク質の同定と解析. 第 56 回日本ブドウ球菌研究会, 高知, 2011/09/24.
 - ⑧ **Uchiyama J**, Takemura I, Satoh M, Kato S, Ujihara T, Akechi K, Matsuzaki S, Daibata M. Improved adsorption of *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C caused by a point mutation in a tail fiber gene. Symposium, International Congress of Virology, 札幌, 2011/09/16.
 - ⑨ Takemura I, **Uchiyama J**, Satoh M, Kato S, Ujihara T, Akechi K, Matsuzaki S, Daibata M. Identification of a tail adsorption protein by comparative genomic analysis of *Staphylococcus*

aureus bacteriophages S13' and S24-1. Symposium, International Congress of Virology, 札幌, 2011/09/16.

- ⑩ **内山淳平**, 竹村伊代, 佐藤美帆, 加藤伸一郎, 氏原隆子, 明智和愛, 松崎茂展, 大畑雅典. 感染効率が改善された腸球菌バクテリオファージφEF24C変異体の解析. 第5回細菌学・若手コロッセウム, 高知, 2011/08/09.
- ⑪ **内山淳平**, 竹村伊代, 氏原隆子, 佐藤美帆, 松崎茂展, 今城雅之, 村上雅尚, 大畑雅典. 黄色ブドウ球菌バクテリオファージ (ファージ) S13' 及びS24-1の比較ゲノム解析による尾部吸着タンパク質の同定. 学部長裁量経費採択演題, 第10回 Kochi Medical School (KMS) Research Meeting, 高知, 2011/02/02.
- ⑫ **内山淳平**, 竹村伊代, 氏原隆子, 松崎茂展, 村上雅尚, 大畑雅典: 巨大黄色ブドウ球菌バクテリオファージの解析, 第63回日本細菌学会中国・四国支部総会, 愛媛・松山, 2010/10/16.
- ⑬ 竹村伊代, **内山淳平**, 氏原隆子, 松崎茂展, 村上雅尚, 大畑雅典 [非会員共同研究者: 今城雅之, 佐藤美帆]: 黄色ブドウ球菌バクテリオファージ (ファージ) S13' 及び S24-1 の比較ゲノム解析による尾部吸着タンパク質の同定, 第63回日本細菌学会中国・四国支部総会, 愛媛・松山, 2010/10/16.
- ⑭ **内山淳平**, 松崎茂展, 大畑雅典: ファージ療法およびファージを利用する新しい細菌検出法の開発: 高知大学の取り組み, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「バクテリオファージ研究の可能性と課題」, 大阪, 2010/09/09.
- ⑮ 竹村伊代, **内山淳平**, 氏原隆子, 松崎茂展, 村上雅尚, 今城雅之, 大畑雅典: 黄色ブドウ球菌バクテリオファージ S13' 及び S24-1 の比較ゲノム解析と尾部吸着タンパク質の特徴付け, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「バクテリオファージ研究の可能性と課題」, 大阪, 2010/09/09.
- ⑯ **内山淳平**, 竹村伊代, 氏原隆子, 松崎茂展, 村上雅尚, 今城雅之, 大畑雅典: 新規黄色ブドウ球菌バクテリオファージ S6 の解析, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「バクテリオファージ研究の可能性と課題」, 大阪, 2010/09/09.
- ⑰ **内山淳平**, 林幾江, 竹村伊代, 氏原隆子, 竹内啓晃, 杉浦哲朗, 菅井基之, 大畑雅典, 松崎茂展: 腸球菌ファージφEF24C由来溶菌酵素ORF9の解析, 第83回日本細菌学会総会, 横浜, 2010/03/29.
- ⑱ 松下憲司, **内山淳平**, 氏原隆子, 杉原重喜, 邑岡麻子, 大畑雅典, 松崎茂展: 新規 *Serratia marcescens* バクテリオフ

ァージKSP20, KSP90, および KSP100の性状解析, 第83回日本細菌学会総会, 横浜, 2010/03/29.

- ⑲ **内山淳平**, 竹村伊代, 氏原隆子, 根本由以子, 今城雅之, 村上政尚, 大畑雅典, 松崎茂展. 腸球菌ファージφEF24C由来溶菌酵素ORF9の解析. 第10回 Kochi Medical School (KMS) Research Meeting, 高知, 2010/02/03.

[図書] (計1件)

Matsuzaki S, Uchiyama J, Daibata M. Phage therapy: experiments using animal infection models. In: Jan Borysowski J, Międzybrodzki R, Górski A (edn) Phage Therapy: Current Research and Applications. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2012 (tentative).

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 黄色ブドウ球菌に結合するタンパク質及びそのタンパク質を利用した黄色ブドウ球菌の測定方法

発明者: 内山淳平、竹村伊代、松崎茂展、大畑雅典

権利者: 国立大学法人高知大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-192996

出願年月日: 平成 23 年 9 月 5 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 淳平 (UCHIYAMA JUMPEI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 20574619

(2) 研究協力者

大畑雅典 (DAIBATA MASANORI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

松崎 茂展 (MATSUZAKI SHIGENOBU)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

内山 伊代 (UCHIYAMA IYO)

高知大学医学部附属病院・検査部・技師