

## 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6月28日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657025

研究課題名（和文）バクテリオファージの宿主域は正しく評価できているのか？：新規宿主域評価法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for evaluating the host range of bacteriophages

## 研究代表者

井町 寛之（IMACHI HIROYUKI）

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：20361933

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、以下の4つのステップから構成される新規なファージの宿主域同定技術を開発した。(i) EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) で標識したファージを微生物叢に感染させ、宿主微生物を光らせる。(ii) 宿主微生物細胞をFACSで回収する。(iii) 回収した微生物細胞の16S rRNA遺伝子を決定し、宿主微生物の同定をおこなう。(iv) その確認として、宿主微生物の16S rRNAに特異的なDNAプローブを用いたFISH法とEdUによるファージ標識による2重染色を行う。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel phage-host range evaluation method using EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) labeled phages, which consists of the following four steps. (i) Fluorescently labeled phages are added to a microbial consortium, and host cells are infected and fluorescently labeled. (ii) Fluorescent cells are sorted by FACS. (iii) 16S rRNA gene sequences retrieved from sorted cells are analyzed, and specific oligonucleotide probes for FISH are designed. (iv) Cells labeled with both fluorescently labeled phage and FISH probe are identified as host cells.

## 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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：ファージ、宿主域、16S rRNA 遺伝子、FISH 法

## 1. 研究開始当初の背景

ファージは原核生物（細菌と古細菌）に感染するウイルスの総称である。研究代表者は、環境中の原核生物の生態研究をこれまでずっと行ってきたが、原核生物の生態研究をさらに深く理解していくためには、ファージの生態の研究も必要であると考えようになった。そしてファージ研究を開始しようと文献を読むうちに、大きな疑問が浮かんだ。「あるファージが感染可能な宿主微生物というのはある特定の種に限定されていて、常識ではファージの宿主域というのは非常に狭いと考えられているがこれは正しいのである

うか？そうだとすると、現在の膨大な微生物の遺伝的多様性が生み出されることはなかったのではなかろうか？遺伝的多様性が生み出されるためには宿主域が広いファージがいるのでは？」という疑問である。

このような疑問を抱いた理由は、従来のファージ宿主域評価法がこの疑問に答えを与えてくれるものではないと研究代表者は考えたからである。プラークテスト法に代表されるその従来法とは、純粋分離された微生物に対してファージを添加し、溶菌のチェックを行う方法である。現在の微生物学において、環境中に生息する微生物の99%は人為的に

分離されることがない未知の微生物であることが常識となっていることを考えると、従来法では全くファージの宿主域をカバーできていないと言える。加えて、報告例は極めて少ないが、特定の種だけでなく属を超えて感染する広宿主域ファージも報告されていることから、環境中にはこのようなファージが多く存在するであろうし、すでに分離されているファージも広い宿主域を持っている可能性もある。

そこで本研究課題では、従来法とは全く異なる培養に依存しない新規なファージ宿主域評価法の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

研究代表者が考案した以下に示す4つのステップからなる新規なファージ宿主域評価法を開発することを目的とした (i) 核酸染色剤で染めたファージを微生物叢に感染させ微生物を光らせる。(ii) FACS (fluorescence activated cell sorting) 技術により、ファージに感染した'光った'微生物細胞を特異的に回収する。(iii) 回収された微生物細胞からDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子を決定することで、どのような種類の微生物がファージの感染を受けたのかを決定する。(iv) そのクロスチェックとして、回収されてきた微生物細胞の16S rRNAに特異的なDNAプローブをデザインし、先の(i)の核酸染色剤によるファージ標識技術と微生物の16S rRNAを標的としたFISH法による2重染色により確認を行う。

## 3. 研究の方法

提案する新規なファージ宿主域評価法の開発には、ファージの中でも最も研究が進んでいるT4ファージと大腸菌をモデルとして用いることで研究開発を進めた。核酸染色剤には、SYBR Gold、DPI および YOYO-1 を用いた。EdU 標識には Invitrogen 社の Click-it EdU Assay Kit を用いた。FACS は Becton Dickinson 社製の FACS Aria を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 核酸染色剤で蛍光標識したファージの利用検討

ステップ(i)に必要な核酸染色したT4ファージによる大腸菌の検出条件の検討を行った。核酸染色剤にはSYBR Goldを用いた。SYBR Goldを選択した理由はどの核酸種(2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNAおよび1本鎖RNA)でも染色できるため、あらゆるタイプのファージに利用可能だからである。 $10^7$  cells/mLの大腸菌培養液中にSYBR Goldで核酸染色したT4ファージを $5 \times 10^{10}$  PFU/mLとなるように投入し、 $37^\circ\text{C}$ で10~20分程度感染させると、ほぼ全ての大腸菌細胞からT4

ファージ感染由来の蛍光が感度良く検出できることが明らかとなった。しかしながら、T4ファージが感染しない*Bacillus subtilis*の細胞からも核酸染色剤由来の蛍光が観察されるという問題が発生した(図1)。これは核酸染色剤がT4ファージから漏れ出し、宿主ではない*B. subtilis*細胞へ入ってしまったことを意味している。核酸染色剤が漏れ出す原因はおそらく核酸染色剤は核酸と水素結合による可逆的な結合であるので培地中のNaCl等が影響していると推定した。SYBR Gold以外の核酸染色剤であるDAPIやYOYO-1でも同じ現象が観察された。この核酸染色剤が宿主細胞から漏れ出す原因を調査したところ培地に含まれるNaClが主な原因であることが明らかになった。この問題の改善をいろいろと試みたが、うまく進めることができなかった。そこで、核酸染色剤によるファージの蛍光標識をあきらめ、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)を用いたファージの標識を検討することとした。

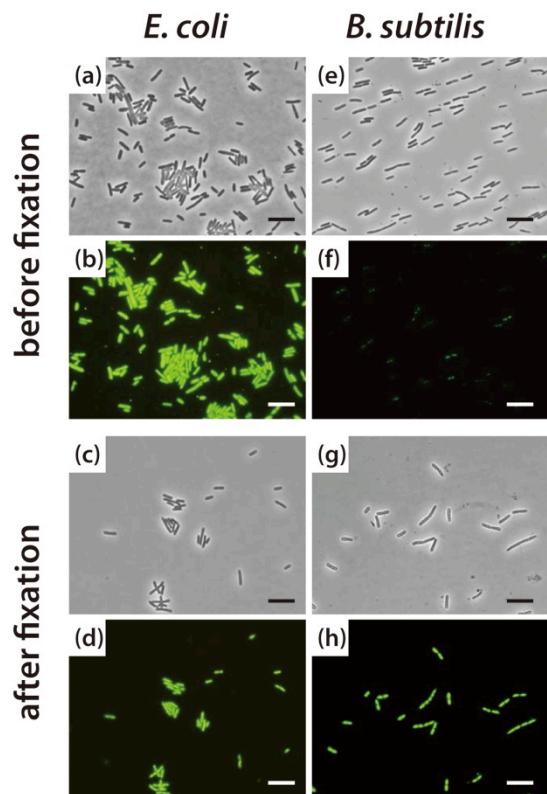


図1. SYBR Goldで標識したT4ファージに感染した大腸菌細胞。左側の写真(a-d)が大腸菌細胞、右側の写真(e-h)がT4ファージの非宿主である*B. subtilis*細胞。固定操作後に、非宿主である*B. subtilis*細胞からも蛍光が見られる。

### (2) EdUを利用したファージの蛍光標識

EdUとはチミジンの構造アナログである。DNA合成時にEdUを添加することで、チミジンの代わりにEdUがDNAに取り込まれ、DNA

が EdU に標識されるという原理である。この EdU で標識された DNA 自体は蛍光を発しないが、蛍光標識アジドおよび銅イオンを加えると EdU 中のアルキンとアジドがクリック反応を起こし、結合することで蛍光を発する。これまで EdU を用いてファージを含むウイルスの DNA を標識した例はこれまで報告はなかった。

ファージは自己複製能を持たないので EdU を添加しただけでは標識ができない。そこで、対数増殖期の *E. coli* を含む培地に 100  $\mu$ M の濃度の EdU と T4 ファージを添加することで EdU により DNA が標識された T4 ファージを得た (以下 T4-EdU ファージと記載)。続いて、direct count により T4-EdU ファージの濃度を測定し、MOI (multiplicity of infection) =100 でファージを *E. coli* に感染させた。感染 10 分後に *E. coli* 細胞をパラホルムアルデヒドにより固定し、蛍光分子 Alexa488 付きのアジドを加えクリック反応を行った。その結果、全ての *E. coli* 細胞から蛍光が確認された (図 2)。また、T4 ファージの宿主ではない *B. subtilis* を *E. coli* と混合培養し、T4-EdU ファージを感染させたが、宿主である *E. coli* のみを特異的に検出できた。次に、T4-EdU ファージに感染した *E. coli* 細胞に FISH 法を適用したところ、ファージ感染由来の蛍光を褪色させることなく FISH 法が適用可能であることが分かった。これらの結果は、本提案手法のステップ (i) と (iv) を行うことができることを示していた。次に、ステップ (ii) の FACS によるファージに感染した細胞の分取を検討するために、T4-EdU ファージに感染した *E. coli* 細胞と非感染細胞をフローサイトメーターで解析した。その結果、両者の間に明確な蛍光強度の差があることが確認できた。このことは FACS を用いて宿主細胞のみを特異的に分取できる可能性が高いことを示唆していた。

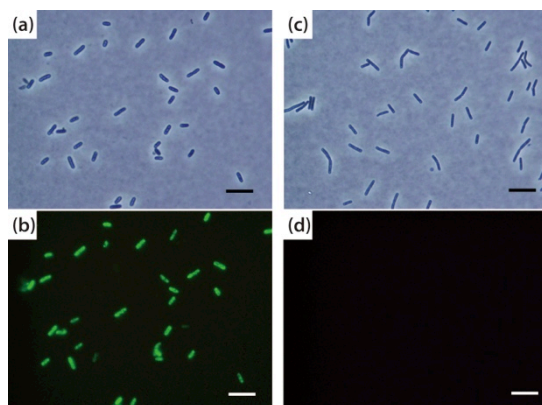


図 2. EdU で標識された T4 ファージに感染した *E. coli* 細胞。位相差顕微鏡画像 (上) と蛍光顕微鏡画像 (下)。a と b が *E. coli* 細胞。c と d が T4 ファージの宿主ではない *B. subtilis* の細胞。

### (3) 複合微生物系に対しての本手法の適用

モデル微生物系を用いた実験結果から、ステップ (i) と (iv) の完成、そしてステップ (ii) が遂行可能だと考え、T4-EdU ファージを複合微生物系に適用することで、本提案手法の完成を目指した。複合微生物系として下水を準備した。下水を 37°C に加温後、T4-EdU ファージを投入した。しかしながら、T4-EdU ファージ感染由来の微生物細胞は観察されなかった。そこで、大腸菌群を選択的に培養が可能なデスオキシコレート培地で下水を前培養し、T4-EdU ファージを投入した。その結果、その培養液中に、T4-EdU ファージに感染した微生物細胞が全細胞中の 5% 程度の割合で検出された (図 3)。続いて、光った微生物細胞の蛍光の分布の確認とその分取を FACS にて行った。分取した細胞から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。その結果、T4 ファージの既知の宿主微生物である *Escherichia* 属のクローンが多数得られた。最後に、本提案手法の最終ステップ (iv) を確認するために、下水をデスオキシコレート培地で培養した微生物群に FISH 法との二重染色を適用した結果、T4-EdU ファージに感染した細胞を *Escherichia* 属細菌に特異的な ES445 プロブにより二重染色できた。以上の結果から、EdU 標識をしたファージを用いる我々が開発したファージ宿主域評価法は新規な手法になり得る可能性が高いと判断した。

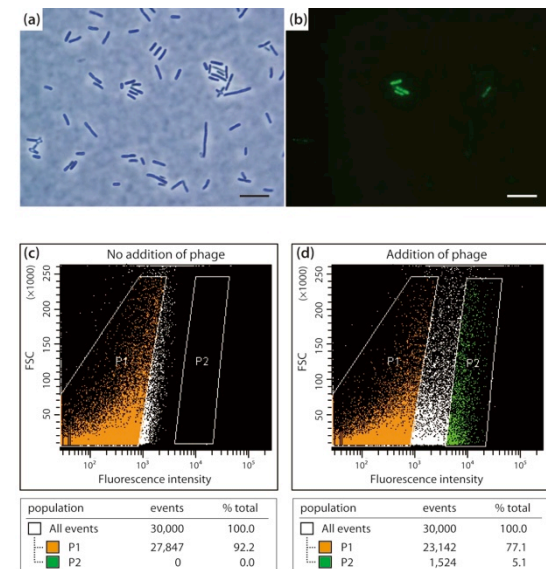


図 3. 下水由来の複合微生物群集に EdU 標識 T4 ファージを適用し、検出された微生物細胞。a と b が顕微鏡画像で、a が位相差顕微鏡画像、b が蛍光顕微鏡画像。c と d がフローサイトメーターの解析結果。c が EdU 標識 T4 ファージを添加していない複合微生物群集、d が EdU 標識 T4 ファージを添加していない複合微生物群集。

## 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 2 件)

- (1) Ohno, S., H. Okano, Y. Tanji, A. Ohashi, K. Watanabe, K. Takai and H. Imachi. 2012. A method for evaluating the host range of bacteriophages using phages fluorescently labeled with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). Applied Microbiology and Biotechnology. 95: 777-788. 査読有り
- (2) 井町寛之. 2011. 過小評価されているファージの宿主域、生物工学会誌バイオメディア、第 89 巻 4 号、pp. 204. 査読無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井町 寛之 (IMACHI HIROYUKI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員  
研究者番号：20361933

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

久保田 健吾 (KUBOTA KENGO)

東北大学・工学研究科・助教  
研究者番号：80455807