

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659524

研究課題名(和文)ファージ溶菌酵素を利用するセラチア菌感染症に対する新制御法の開発

研究課題名(英文)Development of new control methods for Serratia infections using the lytic enzyme of bacteriophage

研究代表者

松下 憲司(MATSUSHITA, KENSHI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：20332835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：セラチア菌(*Serratia marscecens*)は多剤耐性化の進行により、感染症の治療が困難になりつつある。我々は、本菌感染症に対するバクテリオファージ(ファージ)が保有する溶菌酵素を利用するファージ療法の可能性を検討した。まず、我々が分離した2種のセラチア菌ファージKSP90、KSP100の全ゲノム塩基配列を解読したが、相同性検索では溶菌酵素ドメインをもつ遺伝子は特定できなかった。そこで、データベースに登録されているセラチアファージETAの推定溶菌酵素をBacillus属ファージの溶菌酵素の推定外膜透過ドメインと融合させた融合タンパク質の遺伝子を合成し、溶菌活性の検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Development of multidrug-resistance makes medical treatment to *Serratia marscecens* infections by antibiotics difficult. We examined a possible control method to *S. marscecens* infections using the lytic enzyme of bacteriophage (phage). The complete genome sequences of two *Serratia* phages KSP90 and KSP100, isolated by us, were analyzed. The genes with lytic enzyme domains, however, were not specified. Alternatively, the lytic enzyme of phage ETA was fused with the possible outer membrane penetration domain of the Bacillus phage lytic enzyme. Examination of bacteriolytic activity of the fused protein to *S. marscecens* is advanced.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：バクテリオファージ 溶菌酵素 ファージ療法 セラチア菌 グラム陰性菌 外膜

1. 研究開始当初の背景

セラチア菌 (*Serratia marcescens*) 感染症は、易感染性宿主である新生児 (特に低出生体重児) において注意を必要とする疾患である。本菌は、中枢神経に親和性を持ち、新生児の髄膜脳炎や脳膿瘍などの病原菌となり、重篤な予後をもたらすことが知られている。現在セラチア菌は、薬剤耐性化が進行しており、新生児等の易感染性宿主に多剤耐性セラチア菌が全身感染を起こすと、抗菌薬投与による治療が困難になり、致死的となることがある。今後、他の細菌種の場合と同様に、セラチア菌も多剤耐性化が増々進行すると予想され、抗菌薬に依存しない本菌感染症の制御法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、セラチア菌感染症に対するファージ療法、特にファージ溶菌酵素を利用するファージ療法の確立をめざした。ファージは宿主に感染し、菌体内で子ファージを産生し、最後の段階で、ファージが産生する溶菌酵素 (ライシン) により細胞壁を破壊し、子ファージを菌体外に放出する。この溶菌酵素は、グラム陽性菌ではペプチドグリカン層が露出しているため、外部から作用させても溶菌する。しかし、セラチア菌はグラム陰性菌であり、ペプチドグリカン層の外側に外膜を有するため、そのままのファージ溶菌酵素を外部より作用させても溶菌することができない。それで、溶菌酵素に外膜透過タンパク質を融合させることで、溶菌酵素の外膜透過活性を持たせることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我々が分離したセラチア菌ファージ KSP90, KSP100 の全ゲノム DNA を、次世代シーケンサー GS Junior を使用して解読した。続いて ORF アノテーションを行なうことにより、溶菌酵素遺伝子を特定した。

(2) 上記とは独立して、ゲノム DNA 塩基配列バンクに登録されているセラチア菌ファージゲノムより、溶菌酵素遺伝子を探索した。

(3) 上記溶菌酵素に外膜透過に関係すると予想される *Bacillus amyloliquefaciens* Morita ファージ由来の外膜透過ペプチド領域 (C100) を融合させ、その融合溶菌酵素の溶菌活性を検討する。

4. 研究成果

(1) 我々が新規に分離した 2 種のファージ KSP90 と KSP100 (Matsushita et al. FEMS Microbiol. Lett. 291(2):201-8. 2009) の溶菌酵素遺伝子を特定するため、これらのファージの DNA を抽出しゲノム全塩基配列を次世代シーケンサー (454 GS Junior) を用いて解読し、その解析を行なった。

KSP90 のゲノム塩基配列は 159,300 bp で、173 個の ORF (open reading frame) の存在が予測された。ファージ KSP90 は主要頭部タン

パク質の推定アミノ酸配列から T4-like 属ファージであると予想された。

データベースを利用した推定アミノ酸配列の相同性解析により、ファージ粒子の構造タンパク質の遺伝子群やファージの DNA 合成遺伝子群等を推定することができ、さらに尾部先端溶菌酵素遺伝子 (531 aa) を推定することができた。

しかし、尾部先端に存在すると予想される溶菌酵素以外に、溶菌酵素ドメイン (アミダーゼ、リゾチーム、ムーラミニダーゼ、エンドペプチダーゼ) を保有する ORF は見つからなかった。

一方、KSP100 ゲノムの全塩基配列は、約 70 kbp で 88 個の ORF の存在が予想された。本ファージは新規性がかなり高く、強い相同性を有するファージは存在しなかった。しかし、大腸菌ファージ phiEco32 やサルモネラファージ 7-11 と進化的に関係していると予想され、遺伝子順序および推定アミノ酸配列の弱い類似性から、ファージ構造タンパク質や DNA 合成関連遺伝子を推定できた。

しかし、KSP100 の溶菌酵素遺伝子を、他ファージの溶菌酵素のアミノ酸配列との類似性により検出することは困難であった。更に、ファージ phiEco32、7-11 ゲノムにおける遺伝子の順序との類似性により、推定尾繊維タンパク質遺伝子の下流に溶菌酵素の遺伝子が存在すると予想されたが、その推定タンパク質には溶菌酵素に存在するアミダーゼ、リゾチーム、ムーラミニダーゼ、エンドペプチダーゼなどの活性ドメインを保有するものはなかった。

以上から、KSP90、KSP100 は、これまで報告されている孔形成タンパク質 (ホリン) と溶菌酵素 (ライシン) からなる既知のシステムとは異なる、新たな溶菌システムを持っていると予想された。

(2) 次に、ゲノムバンクに登録されているセラチア菌ファージのゲノムの中に、溶菌酵素遺伝子が存在するか否かを検討した。その結果、最近登録されたセラチア菌ファージ ETA の DNA 塩基配列の中にリゾチームドメインを有する ORF が存在することを確認した。この ORF (Eta_0047) は、150 アミノ酸残基からなり lysozyme-like superfamily のドメインを有していた。現在までのところ、ファージ ETA のライシンのみが、セラチア菌ファージの中で溶菌酵素の活性ドメインを有する唯一のものであるため、この Eta_0047 を用いて、予定していた融合遺伝子の構築を行なうことにした。

(3) Eta_0047 にコードされるタンパク質の C 末端側に、ファージ Morita で予想されているグラム陰性菌外膜の透過に関与すると予想される溶菌酵素の C 末端 108 アミノ酸残基を融合し、更に Co-セファロースカラムによる 1 段階精製を行なうため C 末端に 6 個

の His 残基を融合させたタンパク質をコードする融合遺伝子を作製した。

同時に、ファージ Morita の溶菌酵素アミノ酸残基 258 個の C 末端側に 6 個の His 残基を融合させた遺伝子を作製した。

今後、融合溶菌酵素およびファージ Morita 由来溶菌酵素の比較検討を行ない、本融合酵素の溶菌活性および宿主特異的溶菌活性について検討する予定である。

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 10 件)

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Satoh M, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S: Synergistic bacteriolysis by bacteriophage EF24C endolysin ORF9 and lantibiotic nisin and its application to pulsed-field gel electrophoretic analysis of *Enterococcus faecalis*. *Annals of Microbiology*. 63(3):1209-1211. 2013. (査読有)

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Kato S, Inoue T, Ujihara T, Ohara N, Daibata M, Matsuzaki S: Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against *Staphylococcus aureus* infections using a silkworm larval infection model. *FEMS Microbiol Lett*. 347(1):52-60. 2013. (査読有)

Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, Gamoh K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S: Characterization of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. *Appl. Environ. Microbiol*. 79(10):3176-84. 2013. (査読有)

Fukuda K, Ishida W, Uchiyama J, Rashel M, Kato S, Morita T, Muraoka A, Sumi T, Matsuzaki S, Daibata M, Fukushima A; *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration. *PLoS One*. 7(10):e47742. 2012. (査読有)

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 members of the bacteriophage subfamily *Spounavirinae*. *Arch Virol*. 157(8):1587-92. 2012. (査読有)

Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S: Complete genome sequences of two *Helicobacter pylori* bacteriophages isolated from Japanese patients. *J Virol*. 86(20):11400-1. 2012. (査読有)

Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Matsuzaki S, Daibata M: Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. *Arch Virol*. 157(4):733-8. 2012. (査読有)

Uchiyama J, Takemura I, Satoh M, Kato S, Ujihara T, Akechi K, Matsuzaki S, Daibata M: Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage EF24C with a spontaneous point mutation. *PLoS One*. 6(10):e26648, 2011. (査読有)

内山淳平、内山(竹村)伊代、渡辺茂、大畑雅典、松崎茂展: バクテリオファージ尾部吸着分子を利用した細菌検出法。バイオインダストリー 30(2)47-53. 2013. (査読無)

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. (査読無)

[学会発表](計 16 件)

Matsuzaki S, Uchiyama J, Takeuchi H, Takemura-Uchiyama I, Sakaguchi Y, Ujihara T, Daibata M. Estimation of *Helicobacter pylori* phage ecology. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日・タワーホール船堀(東京)

宮田怜奈、内山淳平、山口琴絵、重久立、内山伊代、氏原隆子、大畑雅典、松崎茂展. 緑膿菌ファージ KPP22 吸着能変異ファージの解析. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日・タワーホール船堀(東京)

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Sakaguchi Y, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Phage therapy experiment against staphylococcal lung-derived septic mouse model. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日・タワーホール船堀(東京)

松崎茂展、内山淳平、竹内啓晃、内山(竹村)伊代、氏原隆子、大畑雅典. *Helicobacter pylori* バクテリオファージ KHP30 およびその遊離宿主菌株の解析. 第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2013 年 10 月 12~13 日・広島国際大学(広島県呉市)

内山淳平、内山伊代、宮田怜奈、山口琴絵、重久立、氏原隆子、大畑雅典、松崎茂展. 黄色ブドウ球菌バクテリオファージ尾部吸着タンパク質と細菌側レセプターの同定. 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2012 年 10 月 20~21 日・徳島大学(徳島)

内山淳平、竹村伊代、氏原隆子、松崎茂展、大畑雅典. 難治性黄色ブドウ球菌感染症に対するバクテリオファージ療法

の開発：治療用ファージバンクの構築，第 86 回日本感染症学会総会，2012 年 4 月 25～26 日．長崎ブリックホール他（長崎）

荒木まり子，高杉尚志，三浦紀子，松下憲司，藤枝幹也，脇口 宏，中尾紀恵，河本浩二，恵谷ゆり，位田 忍：胆汁うっ滞が遷延し肝生検で肝内胆管減少症と診断された超低出生体重児の 1 例．第 39 回日本小児栄養消化器肝臓学会，2012 年 7 月 14～15 日 梅田スカイビルタワーウエスト（大阪）

松下憲司，三浦紀子，細川卓利，脇口 宏，深谷孝夫：高度な高ビリルビン血症を呈さなかったが後に核黄疸と診断された極低出生体重児の 1 例（ワークショップ「古くて新しい問題、核黄疸 - UB（アンバウンドビリルビン）を中心に」）．第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会，2012 年 7 月 8～10 日 大宮ソニックシティ（埼玉）

内山淳平，竹村伊代，氏原隆子，松崎茂展，大畑雅典．ファージリガンド分子を利用した細菌検査法の開発，第 86 回日本感染症学会総会，2012 年 4 月 25～26 日．長崎ブリックホール他（長崎）

大石 拓，高杉尚志，三浦紀子，荒木まり子，満田直美，佐藤哲也，松下憲司，久川浩章，藤枝幹也，脇口 宏：X-linked Myotubular myopathy の一例．第 115 回日本小児科学会，2012 年 4 月 20～22 日 福岡国際会議場等（福岡）

Uchiyama J, Takemura I, Ujihara T, Matsuzaki S, Daibata M. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C with a point mutation. 第 85 回日本細菌学会総会，2012 年 3 月 27 日～29 日 長崎ブリックホール他（長崎）

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．角膜カンファランス 2012 年 2 月 23～25 日．ホテルニューオータニ（東京）

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），2012 年 2 月 4～5 日 岡山大学（岡山）

満田直美，細川卓利，荒木まり子，松下憲司，高杉尚志，藤枝幹也，脇口 宏：Young-Simpson 症候群が疑われる 1 例：第 53 回日本小児神経学会 2011 年 5 月 26～28 日 パシフィコ横浜（横浜）
松下憲司，荒木まり子，高杉尚志，山本雅

樹，大石 拓，藤枝幹也，脇口 宏：多血症、DIC、消化管出血後に消化管アレルギー（下部消化器症状型）を合併した双胎第 1 子例．第 23 回 四国小児アレルギー研究会，2011 年 6 月 18 日～19 日 高知城ホール（高知）

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

〔図書〕(計 1 件)

Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, and Daibata M: Chapter 10. Phage therapy: experiments using animal infection models. Phage Therapy. Current Research and Applications. Editors: Jan Borysowski, Ryszard Międzybrodzki, Andrzej Górski. Caister Academic Press.. 2014. 総ページ数 378

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：黄色ブドウ球菌を検出する方法、黄色ブドウ球菌測定用メンブレン及び黄色ブドウ球菌測定用キット

発明者：内山淳平、内山伊代、花木秀明、松井秀仁、大畑雅典、松崎茂展
権利者：国立大学法人高知大学
学校法人北里研究所

種類：特許

番号：特願 2014-046922

出願年月日：平成 26 年 3 月 10 日

国内外の別：国内

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：大畑雅典、松崎茂展 内山淳平、竹村伊代、

権利者：国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：特願 2012-160613

出願年月日：平成 24 年 7 月 19 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 憲司 (MATSUSHITA, Kenshi)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：20332835

(2) 研究分担者

松崎 茂展 (MATSUZAKI, Shigenobu)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：00190439

大畑 雅典(DAIBATA,Masanori)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：50263976