

野外からの新規バクテリオファージの探索

Search for novel bacteriophage from the field

熱海 彩帆^{1,2*}, 二上 麻央^{1,2*}, 千葉 美智雄^{2*}
 ATAMI Saho^{1,2*}, NIKAMI Mahiro^{1,2*}, CHIBA Michio^{2*}

*Contributed equally

東北大学 探求型「科学者の卵養成講座」¹, 宮城県仙台第三高等学校²

EGGS, Tohoku University¹, Miyagi Prefecture Sendai Daisan High School²

Corresponding Author's e-mail: chiba-mi476@gs.myswan.ed.jp

(Received: 4 April 2021; Accepted: 2 June 2021; Released: 28 June 2021)

[要約]

バクテリオファージとは細菌に感染するウイルスである。産業におけるファージ感染の事例としては、納豆の製造過程で野外のイネなどからファージが混入し、納豆菌に感染して、納豆がファージに汚染されてしまうという事例がある。この事例をもとにして、ファージを採取する装置であるファージトラップを製作し、野外のイネから新規バクテリオファージを探索することを目標として研究を行った。野外のイネから採取したファージは、*Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas lactis* の2種類の細菌を感染宿主とし、*P. lactis* に感染するファージの保存株 *P. lactis* ファージ (HU1) とは感染性が異なっていた。さらに *P. veronii* に感染するファージの報告例が現時点ではないため、新規バクテリオファージである可能性が高い。また、*P. veronii* は環境中の有害物質を分解可能な、バイオレメディエーションへの応用が期待されている細菌である。このような有用菌を溶菌させるファージを発見できたことは本菌を有用菌として活用する際の制御策や保護の観点から産業において大きな意義がある。

[キーワード] バクテリオファージ, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas lactis*, 宿主特異性, イネ

1. はじめに

バクテリオファージとは細菌に感染するウイルスの総称であり、特定の種の細菌（宿主）のみに感染する性質である宿主特異性を持つ。例えば、納豆菌に感染するファージとしてはφNIT 1 が代表的である。

ファージは感染した宿主細菌の遺伝子複製・タンパク質合成機構を利用して細菌内で増殖し、細胞を破壊してほかの細菌への感染を繰り返す「溶菌」を行う（図1）。

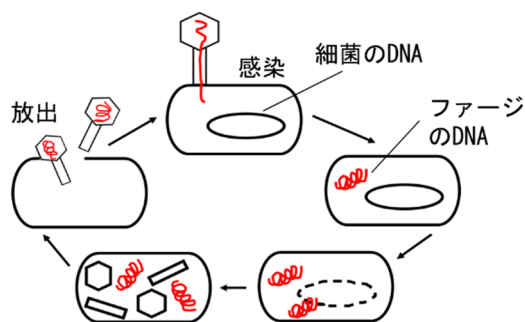


図1 ファージの溶菌

ファージは宿主に吸着して感染し、自身のDNAを細菌内に注入して増殖し、細胞を破壊して外界へと放出される。

近年ではファージは分子生物学分野における遺伝子資源として繁用されるほか、宿主特異性を応用した細菌感染症の治療法であるファージセラピーや食品の製造過程における細菌の制御に応用されるなど非常に有用な生物物

質として注目されている。しかし、宿主特異性や形態、遺伝情報が未解明のファージは未だ多く、今後のさらなる産業応用が期待される研究資源である。一方で、ある種のファージは発酵食品に用いられる細菌に感染し、食品の発酵不良を引き起こすことがある。このように、産業に利害得失をもたらすファージの多様性を知ることは産業において大きな意義がある。

ここで、産業におけるファージ感染の事例として、稲刈りを終えた人が納豆工場に入ると衣服などに付着していたファージが納豆菌に感染し、糸を引かない納豆ができるという事例がある^{1) 2)}。この事例より私たちは野外のイネにはファージが存在する可能性があると考え、ファージを採取する装置を製作して野外のイネから新規のバクテリオファージを探索することを目標として本研究を行った。

2. 実験方法

まず、野外のイネからファージを採取するための装置であるファージトラップを製作した。これは、イネを浸した約30 Lの蒸留水を納豆200 gに通すことで、イネに付着していたファージを納豆の粘りの成分であるγ-ポリグルタミン酸に吸着させて採集することを目的としている（図2）。

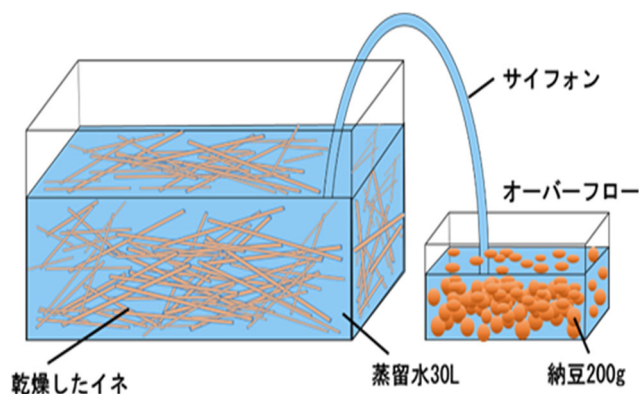


図2 ファージトラップ

蒸留水の流し込みはサイフォンを用いて行い、流し込んだ水はオーバーフローで溢れさせる。また、蒸留水を納豆に流し込むことで蒸留水 30 L から納豆 200 g に規模が縮小され、ファージを採取する効率が格段に上がる。

ファージトラップを用いて得た納豆を 25 度で 24 時間培養し、そこから納豆の液を採取した。採取した納豆の液を遠心分離機にかけ、その上清を 0.2 μm のフィルターに通すと、不純物や細菌は除去されるが、ウイルス等の小さな粒子はフィルターを通過した濾液に含まれる。このファージが存在する可能性のある濾液を「トラップ液」とした(図3)。

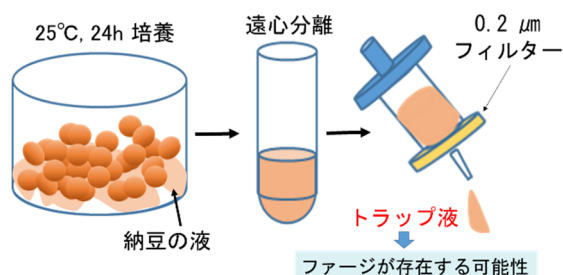


図3 トラップ液の採取

次にファージトラップに用いたものと同じ製品納豆からコロニーの形状より3種の菌株N1～N3を単離し、このN1～N3とトラップ液を用いて溶菌活性を調べた。溶菌活性の観察はクロスストリーク法で行った。寒天培地上で、垂直方向に3種の細菌、水平方向に納豆菌に感染するファージである ϕ NIT1(コントロール)とトラップ液を引いたものを25度で24時間培養した。溶菌活性の観察ができた場合には、トラップ液内に存在する物質がファージであるかを確認した。ファージが存在するか否かはファージが細菌を溶菌した際にできるプラークの有無によって判断できる(図4)。

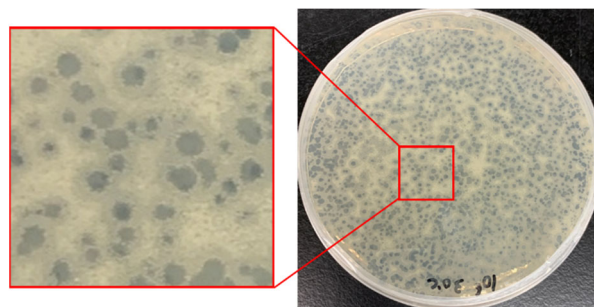


図4 ϕ NIT1が納豆菌を溶菌した際にできたプラークファージは1つの細菌に感染した後、周りの細菌に感染を繰り返すため、溶菌が同心円状に広がる。

そこで、溶菌活性が観察されたトラップ液内にファージが存在することを証明するために二重平板法³⁾を用いて、プラーク形成実験を行った。この方法では、0.5%低融点アガロース入りLB培地5mlに、 $10^6 \sim 10^{10}$ 倍に希釈したトラップ液とファージの宿主細菌をそれぞれ100 μl ずつ入れたものを、1.5%寒天入りLB培地に流し込んで重層し、25度で24時間培養した。(図5)

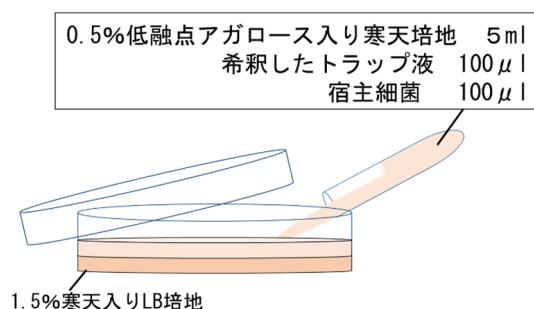


図5 二重平板法によるファージのプラークの観察

また、プラークが形成された場合、トラップ液内に存在するファージの個数を調べるために、タイター(pfu/ml, 1 mlあたりの溶菌活性を持つファージの個数)の測定を行った。タイターはプレートに形成されたプラークの数 $\times$ 希釈倍数 $\div$ ファージ希釈液の容量で求めることができる³⁾。

次に、採取したファージの感染宿主を特定するため、N1～N3の16S rRNA遺伝子領域の塩基配列を決定した。まず、菌体からDNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)により抽出したDNAをテンプレートとして、16SrRNAユニバーサルプライマー⁴⁾(forward 27F: AGAGT TTGAT C(A/C)TGG CTCAG, reverse 907R: CCGTC AATTC (A/C)TTT(A/G) AGTTT)を用いてPCRを行った。PCR反応にはPrimeSTAR HS DNA Polymerase (TAKARA BIO)を使用し、反応条件は製品のプロトコルに従った。増幅後のPCR産物は1.0%アガロースゲル電気泳動により分離し、泳動後のゲルから切り出してQIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いて精製した。精製したPCR産物の塩

基配列は、FASMAC 社の受託 DNA シーケンス解析サービス(3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystem)を利用して決定した。決定した 16SrRNA 遺伝子領域の塩基配列について BLAST(NCBI)の類似配列検索により宿主細菌 N1~N3 を同定した。その後、宿主と近縁である細菌、またその近縁の細菌に感染するファージの保存株を NBRC より分譲を受けた。また、N1~N3 とその近縁種の細菌の分子系統樹を、ソフトウェア MEGAX を用いて近隣結合法により作製した⁵⁾。作成した分子系統樹をもとに、N1~N3 とその近縁種を用いて採取したファージの詳しい宿主域を調べるとともに、保存株のファージと宿主特異性の比較を行った。実験はクロスストリーク法で行った。

3. 結果と考察

まず、クロスストリーク法ではトラップ液は N1 に対して溶菌活性を示した。また、 ϕ NIT1 は N3 に対して溶菌活性を示した(図 6)。よって、トラップ液内には溶菌活性の由来となる何らかの物質が含まれることが分かった。また、 ϕ NIT1 は納豆菌に感染するファージであるため、溶菌活性がファージ由来であった場合、納豆菌とは異なる細菌に感染するファージを採取できた可能性が高い。

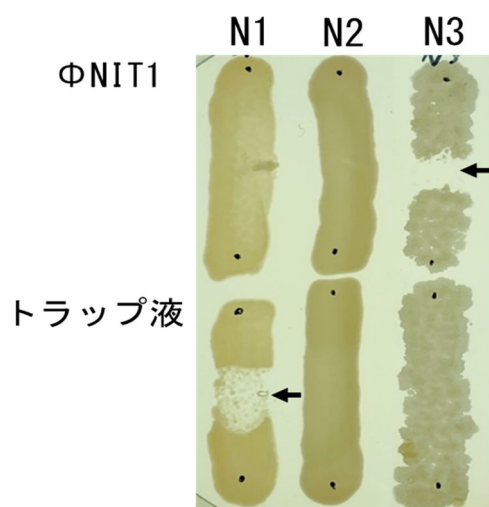


図 6 クロスストリーク

矢印: ファージが細菌に感染し溶菌を起こした部分

次に、トラップ液と細菌 N1 を用いたプラーク形成実験では培養後にすべてのプレートでプラークが確認され、トラップ液内にファージが存在することを証明できた(図 7)。

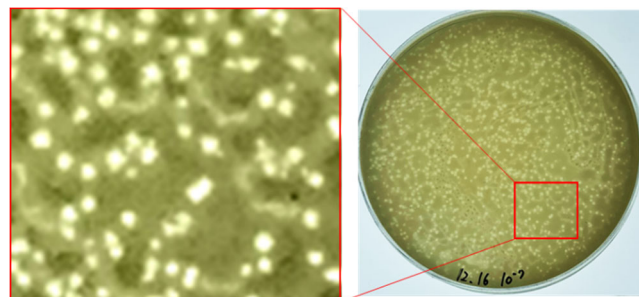


図 7 トラップ液のプラーク

10^7 倍希釈したトラップ液を用いたときのプラーク(白色)

また、タイターは 12×10^{10} pfu/ml であり、トラップ液 1 ml あたりに約 1200 億個のファージが存在することが分かった。

そして細菌の分子系統解析の結果、N1 は *Pseudomonas veronii*⁶⁾、N2 は *Pseudomonas putida*、N3 は *Bacillus subtilis* であることがわかった。この結果より、トラップ液に存在するファージは *P. veronii* を宿主とするファージであることが分かった。

そこで、*P. veronii* とその近縁である細菌 *Pseudomonas lactis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas putida* の計 4 種の細菌について分子系統樹を作成した。外群として納豆菌(枯草菌) *Bacillus subtilis* を用いた(図 8)。

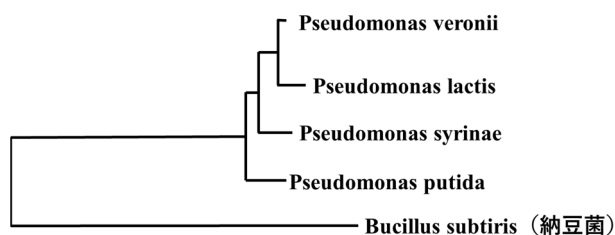


図 8 *P. veronii* の系統樹

この 4 種の細菌と、採取したファージ、*P. veronii* に最も近縁な *P. lactis* に感染する *P. lactis* ファージ(HU1)⁷⁾⁸⁾を用いて、クロスストリークを行った。HU1 は弘前大学 柏木研究室のもと牛の生乳から単離され、2020 年に全ゲノム解析が完了した新規ファージであり、現時点では、*P. lactis* に感染する唯一のファージである。

実験の結果、採取したファージは *P. veronii*, *P. lactis* に感染し、HU1 は *P. lactis* のみに感染することが分かった(図 9)。

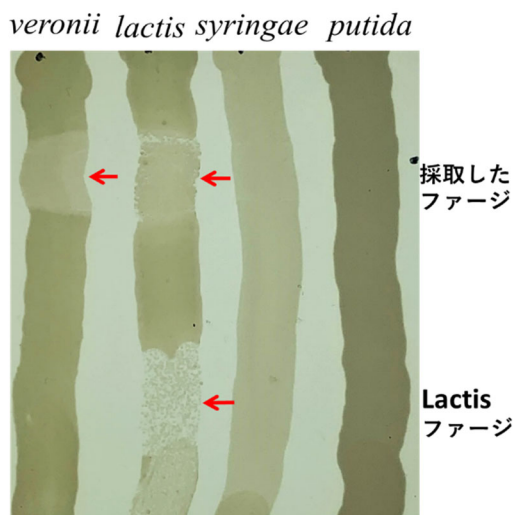


図9 近縁種とのクロスストリーク
矢印: ファージの感染による溶菌

この結果より、今回採取したファージは *P. lactis* に感染する唯一のファージである HU1 と異なるファージであることが分かった。また、*P. veronii* に感染するファージについての報告例は未だに無く、今回採取したファージは *P. veronii* に感染する新規のバクテリオファージである可能性が非常に高い。

4. 結論

今回の実験で、自作したファージトラップを用いて、野外のイネからファージを採取することに成功した。そして、採取したファージは *P. veronii*, *P. lactis* に感染するファージであることが分かった。さらに、*P. lactis* に感染する唯一のファージである HU1 と異なるファージであり、*P. veronii* に感染するファージの報告が現時点では無いことから、*P. veronii* に感染する新規バクテリオファージである可能性が非常に高い。

また、採取したファージが感染する *P. veronii*, *P. lactis* はどちらも産業への利用が期待されている有用菌である。特に *P. veronii* は環境汚染物質であるトルエンやマラカイトグリーンを分解する細菌として報告されており、細菌などの微生物を用いて汚染された環境を浄化するバイオレメディエーションへの利用が注目されている^{9) 10)}。このような有用菌に感染するファージの発見は、有用菌の保護の観点から産業上有益である。一方で、バイオレメディエーションの課題として、利用微生物の環境浄化後の過剰な増殖により、生態系に影響を及ぼすことが懸念されている。そこで、*P. veronii* を将来的に産業に応用した際、今回採取した *P. veronii* に感染するファージは *P. veronii* による環境浄化後の過剰な増殖を抑え、その制御の役割を担うことが期待される。

今後は、採取したファージの電子顕微鏡を用いた形態観察を行いたい。現在、採取したファージの DNA を抽出し (図 10)、シーケンス解析によって、一部の塩基配列の特定が完了している。今後はさらに塩基配列の特定を進めていき、*P. lactis* ファージの DNA との比較を行うことで今回採取したファージが新規バクテリオファージであることを証明していきたい。

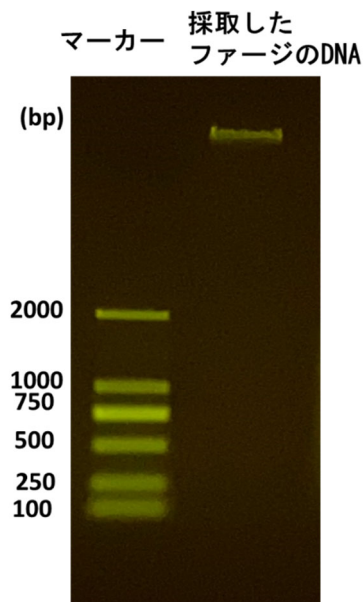


図10 採取したファージの DNA の電気泳動

謝辞

本研究を行うにあたり、東北大学大学院農学研究科 金子淳先生より ϕ NIT1 を分与いただくとともに、バクテリオファージの取扱いを指導していただきました。

また、本研究は東北大学 探求型「科学者の卵養成講座 (JST グローバルサイエンスキャンパス)」の支援のもとで実施され、メンターの東北大学大学院農学研究科 武田慶胤氏、農学部 土屋果織氏に実験方針を指導していただきました。心より感謝いたします。

引用及び参考文献

- 1) 木村啓太郎 (2012) 納豆研究の新展開～納豆菌とファージの共進化から探る～. 生物工学会誌 第90巻 (第6号), 315-319
- 2) 木村啓太郎 (2015) 納豆と微生物. モダンメディア 第61巻 (第11号), 338-344
- 3) 永井利郎・山崎福容 (2019) バクテリオファージの取扱法. 微生物遺伝資源利用マニュアル(42)
- 4) Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic, John Wiley and Sons, New York, 115-175.

- 5) Barry G. Hall, (2013) Molecular Biology and Evolution. 30(5):1229–1235
- 6) Montes, C., Altimira, F., Canchignia, H. *et al.* (2016). A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Stand in Genomic Sciences* **11**,76
- 7) Tanaka C, Takeuchi H, Yamada K, et al. (2018) A lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk. *Appl Environ Microbiol*,84: e00111-18.
- 8) Nakayama T, Tanaka C, Toba T, *et al.* (2020) Complete genomic sequence of *Pseudomonas lactis* bacteriophage HU1 isolated from raw cow's milk. *Arch Virol*,**165**, 215–217
- 9) de Lima-Morales D, et al. (2013). Draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* strain 1YdBTEX2. *Genome Announc*,1(3): e00258-13.
- 10) Song, J., Han, G., Wang, Y. *et al.* (2011) Pathway and kinetics of malachite green biodegradation by *Pseudomonas veronii*. *Ecotoxicology* **20**, 438–4