

通性嫌気性グラム陰性細菌である *Escherichia* に感染するファージは、試料採取 3 日目の汚泥に数千～数万/mL の濃度で検出された。大腸菌はヒト及び多数の動物回腸下部と結腸全体に生息し、ヒト糞便中での菌数は  $10^8 \sim 9$  CFU/g と考えられている。したがって、今回検出された大腸菌ファージはこれらヒト由来大腸菌が浄化槽汚泥中に多数存在することを示すものである。*Pseudomonas* は偏性好気性グラム陰性桿菌であり、土壌、淡水、海水、など広く自然界に存在し、動植物の病気の原因となる。*P. aeruginosa* は緑膿菌として知られ、傷に寄生して産生する色素（ピオシアニン）のために膿汁が暗緑色を呈する。かなり常在的な菌である一方、抗生物質に比較的抵抗性であるため、院内感染や患者の抵抗力の低下につれて致命的な症状をもたらすことが報告されている。今回の実験により、浄化槽汚泥中にも比較的高濃度で *P. aeruginosa* に感染するファージが存在することが確認された。なぜ、浄化槽汚泥中にこれら *P. aeruginosa* 感染ファージが多数存在するかの原因は明確でない。今後 *P. aeruginosa* ファージの宿主域を解析することにより、ファージと宿主の直接の関係を調べる必要がある。

*B. cereus* は土壌、下水、粉塵、牛乳、植物など自然界に広く分布しているグラム陽性芽胞形成桿菌である。日本では毎年 4～6 件、本菌によるとみられる食中毒が発生している。一般に本菌による食中毒の原因食品中には *B. cereus* 菌が  $10^6 \sim 8$  CFU/g 認められる。今回の分析では *B. cereus* 特異的ファージが数個～数十個/mL の頻度で検出された。

*Micrococcus* と *Staphylococcus* はともにグラム陽性球菌であり、医学細菌学上重要である。特にブドウ球菌として知られる *Staphylococcus* は食中毒の原因細菌であり、その中でも *S. aureus* (黄色ブドウ球菌) は最も病原性が強く、多くの化膿性疾患、肺炎、毒素ショック症候群の原因病原体である。今回の分析では *S. epidermidis* (表皮ブドウ球菌) に感染するファージが数個/mL の頻度で検出された。表皮ブドウ球菌は、近年日和見感染の起炎菌として分離される頻度が増している。

今回検出された各種ファージは濃縮槽汚泥と貯留槽汚泥ではその存在形態がだいぶ異なっていた。濃縮槽汚泥に存在するファージのほとんどは固形懸濁物の中に見られ、貯留槽汚泥中のファージは浮遊状態で存在していた。各汚泥を顕微鏡で観察すると、濃縮槽汚泥には多くのフロックが存在していた (図 6-1 A, B)。おそらくこれらフロックに吸着された形でファージが存在しているものと考えられた。一方、貯留槽汚泥には濃縮槽で見られたようなフロックは存在せず、主に浮遊状態の細菌から構成されていた (図 6-1 C, D)。また貯留槽のファージは遠心上清から検出されたことから、ファージは単独で浮遊状態で存在していることが示唆された。

両汚泥を遮光・嫌気下、室温でさらに 8 日間 (試料採取 11 日後) 放置した際の各宿主に対するファージ濃度を解析した結果が表 6-2 である。濃縮槽汚泥のファージ濃度は大腸菌ファージ、シュードモナスファージ共に激減していた。顕微鏡観察により、濃縮槽汚泥にはフロックに混じり多くの原生動物の存在が確認された。これら原生動物は微生物叢の

ポピュレーションダイナミクスに深く関わっていることが知られおり、ファージの宿主となる大腸菌及びシュードモナスが原生動物により捕食され、結果として両ファージの濃度が減少したものと考えられる。このことは、濃縮槽汚泥を遮光・嫌気下で放置することにより、腸内細菌である大腸菌や緑膿菌などの病原細菌を減らすことが出来ることを示唆している。一方、貯留槽汚泥のファージ濃度は試料採取3日後と11日後では大きな違いが見られなかった。貯留槽汚泥にはフロックや原生動物はあまり存在していないことが顕微鏡観察により明らかとなっている。したがって、捕食者の少ない貯留槽汚泥内には、大腸菌や緑膿菌などが比較的安定に存在できることを示している。

### 6. 3 バチルスファージからの新規溶菌酵素の探索

一般にグラム陽性細菌はグラム陰性細菌より厚い細胞壁（ペプチドグリカン層）を有する。したがって、バチルスに感染するファージはグラム陰性細菌に感染するファージよりも強力な溶菌酵素を保有している可能性がある。そこで、バチルスを宿主とするファージから溶菌酵素をコードする遺伝子のクローニングを行った。活性汚泥から得られたファージの純化を3度行った後、ファージDNAをグリセロール濃度勾配遠心法により分離した。分離したファージDNAは *Hin* dIII 制限酵素により部分的切断を行い、1,000~3,000 bp 相当のDNA断片を pUC118 大腸菌ベクターへクローニングし、それを用い大腸菌 JM109 の形質転換を行った。形質転換体コロニーを寒天プレート上でクロロホルム蒸気により溶菌し、その上へ宿主菌を含む 0.4 % 水アガロースを重層した。クローニングした遺伝子断片に溶菌酵素をコードする領域が含まれている場合には、溶菌コロニー周辺で宿主菌の増殖が阻害されるため、透明帯が形成される。*B. amyloliquefaciens* の遺伝子断片を含むコロニーから透明帯が得られた。そこでこのコロニーのレプリカを用い、プラスミドの分離精製及び DNA シーケンスを行った（表 6-3）。

表 6 - 3 溶菌酵素の遺伝子配列

1	AAGCTTACGGATTTAAAGATAAATGGGAAGCACAACAAGTTGCCGCAAAGGTTGGCGGACA	60
61	AGTTGTCGTTAGAACAACCAGTTTCAAGATCGTTTAACTCTTAACACTCTCTTAACACGC	120
121	AAGACCTATCAAATAAACCAAAATGAAAAGGATGATTAATATGGAAAACACAAACATCG	180
	M E N T N I V	
181	TAAAGGCTACTTTTGACACAGAACTCTTGAAGGACAAATTTAAATCTTTAATGCTCAAA	240
	K A T F D T E T L E G Q I K I F N A Q T	
241	CAGGCGGCGGACAGTCTTTTAAAACCTTCCAGATGGAACAATTATAGAAGCTAACGCCA	300
	G G G Q S F K N L P D G T I I E A N A I	
301	TTGCCCAATATAAGCAAGTGCCGATACATACGGGGACGCTAAGGAAGAGACAGTTACTA	360
	A Q Y K Q V S D T Y G D A K E E T V T T	
361	CTATTTTTCGACTGACGGTTTGTATATTCCGCTATCTCTAAAACAGTAGCAGAAGCCG	420
	I F A T D G L L Y S A I S K T V A E A A	
421	CATCTGACTTGATTGACCTTGTGACTCGGCATAAGCTTGAGACGTTTAAAGTTAAAGTGG	480
	S D L I D L V T R H K L E T F K V K V V	
481	TTCAAGGAACATCTAGTAAAGGTAACGTATTCTTTAGCTTACAACATCCCTATAAACAG	540
	Q G T S S K G N V F F S L Q L S L *	
541	GAGGTTTAAATATAGAAGCTT	561

遺伝子配列を基に相同性解析を行ったところ、*Listeria innocua* ファージがコードする N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase と 42% の相同性が認められた。シーケンスの結果からタンパク質の読み枠(ORF)を PCR 法により増幅し、発現ベクター pUC118 及び pET26b(+) にクローニングした。それぞれの発現プラスミドを pUC118/lys 及び pET26b/lys と命名した。pET26b(+) は T7 プロモーターとクローニングサイトの上流に大腸菌外膜タンパク質の一つである pelB のシグナル配列を有する。したがって、発現されるタンパク質をペリプラズム空間へ移送することができる。pUC118/lys により大腸菌 JM109 を、pET26b/lys により大腸菌 BL21(DE3)pLysS をそれぞれ形質転換し、M9G 培地を用い培養した。形質転換体大腸菌 BL21(DE3)pLysS の培養液に IPTG (1mM) を添加することにより、タンパク質の発現を誘導し、IPTG 添加後 1,2,3,4 時間後のタンパク質産生量を SDS-PAGE で解析した結果が図 6-2 である。約 13kDa の大きさを有するタンパク質の産生が見られ、その量は培養時間と共に増加した。

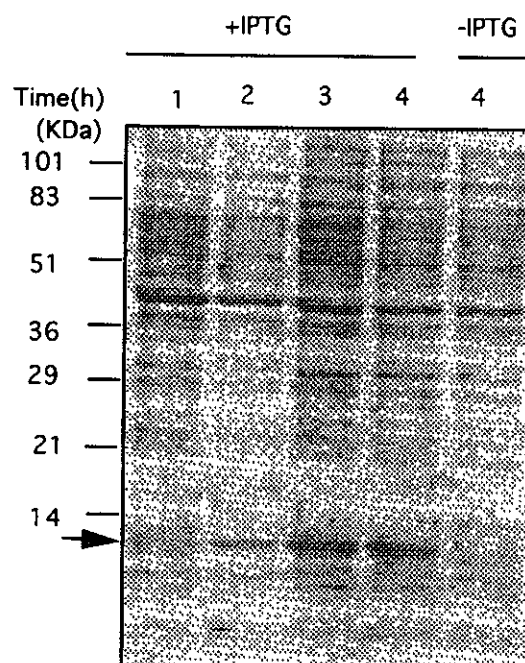


図 6 - 2 溶菌酵素の大腸菌内発現

次に、タンパクの発現を誘導した際の増殖特性の変化を 600nm の波長における減光度 ( $OD_{600}$ )により評価した (図 6 - 3)。pUC118/lys で形質転換した JM109 は IPTG 添加後も加えなかった対照と同じ増殖特性を示した (図 6 - 3 A)。また、IPTG 添加後に菌体を回収し、SDS-PAGE により発現タンパクを検出したところ、予想される位置にタンパクが確認でき、その量は誘導後の培養時間と共に増加した。このことから溶菌酵素の細胞質内発現は大腸菌の増殖を阻害しないと考えられた。溶菌酵素を発現している JM109 にクロロホルムを加えると (図 6 - 3 B, □)、細胞膜の破壊と溶菌酵素による効果が相乗的に働き、急激な濁度の減少が観察された。pET26b/lys の発現を BL21(DE3)pLysS で行うと、IPTG 添加直後に大腸菌の増殖が阻害された (図 6 - 3 C, □)。しかしその後も緩やかな濁度の上昇が見られたことから、溶菌を誘導するまでには至らなかったと考えられる。また、クロロホルムを加えることにより、速やかな溶菌が観察された (図 6 - 3 D, □)。

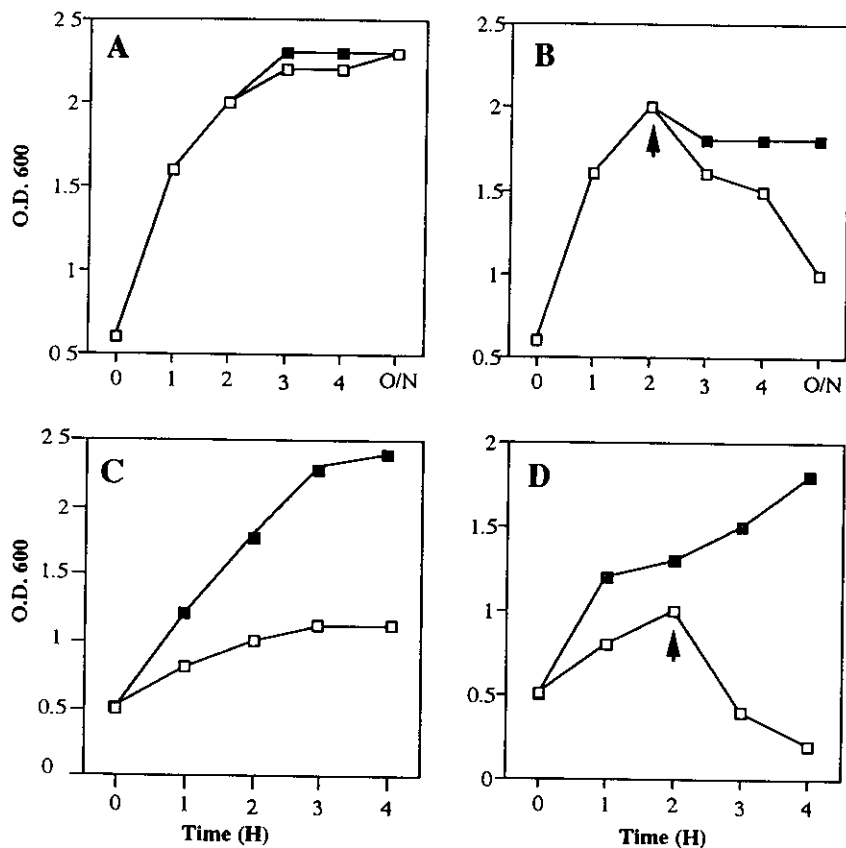


図 6 - 3 溶菌特性の解析

A,B: pUC118/lysのJM109内発現, C,D: pET26b/lysのBL21(DE3)pLysS内発現.  
 ■: IPTGによる誘導無し, □: IPTGによる誘導有り (T=0においてIPTG-1mM添加).  
 ▲: クロロホルムの添加.

精製した溶菌酵素が細菌の増殖に対する影響を評価する目的で、クローニングした溶菌酵素をコードする遺伝子を pET21(b)へ再クローニングした。このベクターは発現タンパク質の C-末端にヒスチジン 6 分子が付加され、発現タンパク質をニッケルキレートカラムにより分離精製することが可能となる。構築した発現プラスミドにより大腸菌を形質転換し、超音波で破碎後の溶菌液をニッケルキレートカラムで分離精製した際の各画分を 15%SDS-PAGE で検出した結果を図 6 - 4 に示す。溶出画分に目的タンパク質が濃縮されたことが示された。この溶出液を大腸菌及び本来の宿主であるバチルスに対し、培養液量の 10%相当を添加し、その増殖特性の変化を示したのが図 6 - 5 である。溶菌酵素を添加することにより、各菌体が即座に溶菌することはなかったが、両者ともにその生育が阻害されたことが示された。特に、グラム陽性のバチルスに対する抗菌活性が強く示された。

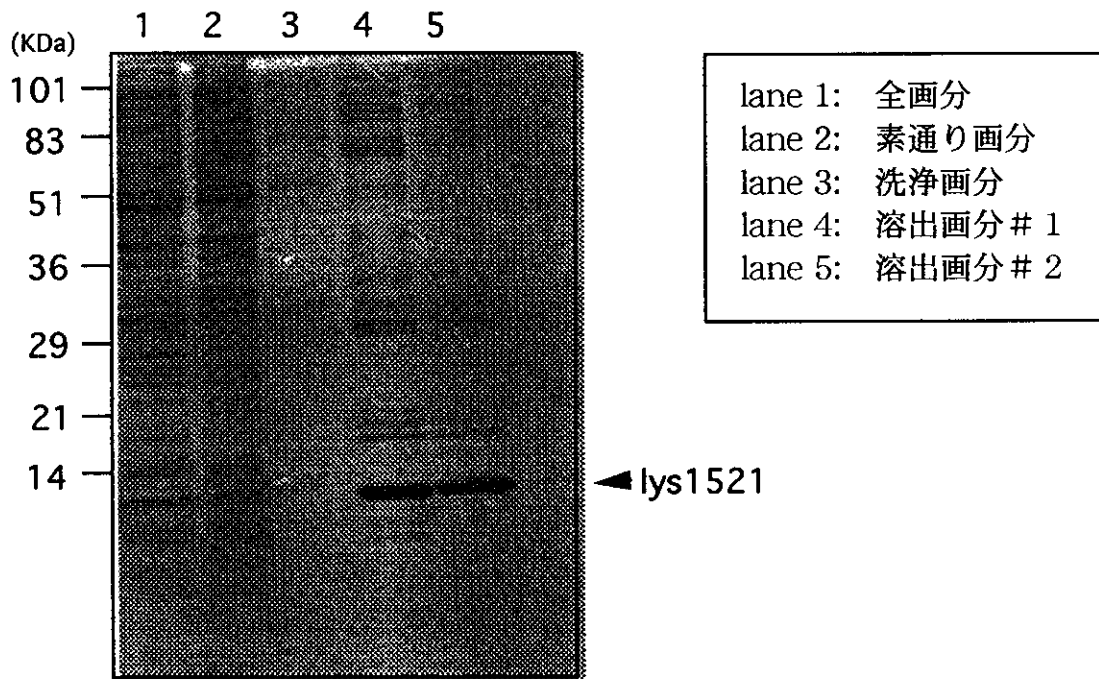


図 6 - 4 溶菌酵素の精製

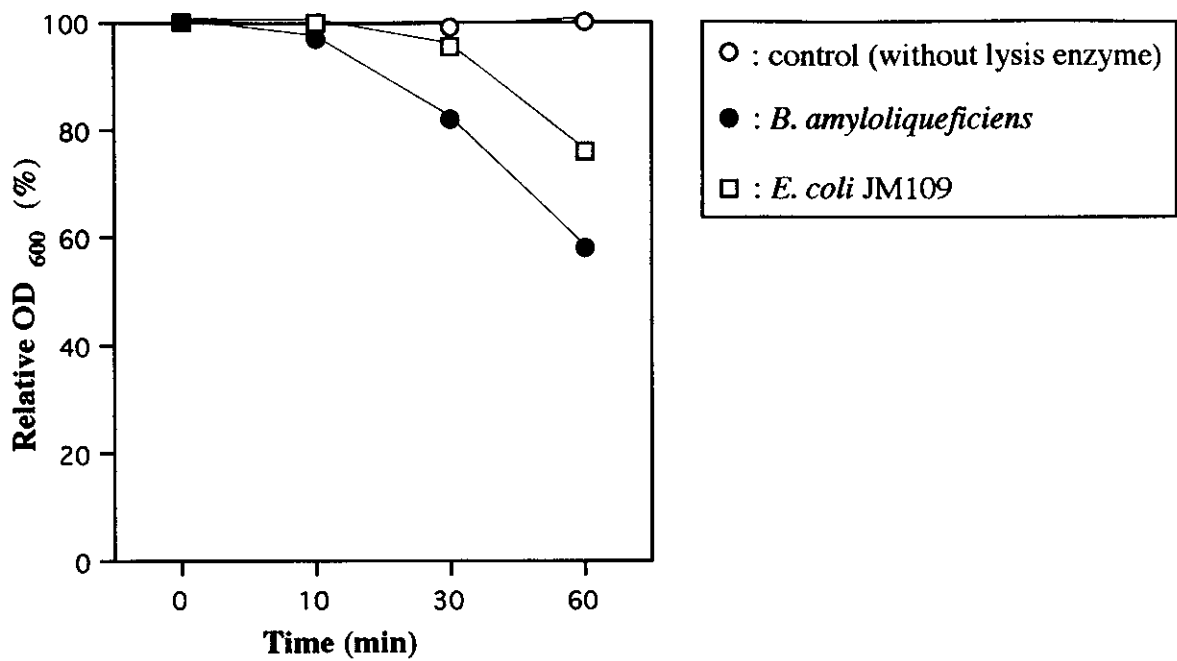


図 6 - 5 溶菌酵素添加による増殖特性の変化

#### 6. 4 今後の予定

浄化槽汚泥中には大腸菌、シュードモナスなどに感染するファージが高濃度に存在することが確認できた。一方、医学細菌学上重要である *Micrococcus* と *Staphylococcus* に感染するファージは多く存在しないことが示された。通年にわたる分析を行うことにより、特に食中毒が発生する夏期におけるこれら病原菌特異的ファージの出現を調べる予定である。

濃縮槽汚泥と貯留槽汚泥ではヒト由来大腸菌に感染するファージの存在形態及びその消長に大きな差異が認められた。つまり、濃縮槽汚泥のファージはその多くが浮遊固形物に吸着された状態で存在するのに対し、貯留槽汚泥に存在するファージは遊離状態で存在していた。また、嫌気状態で8日間放置することに濃縮槽汚泥のファージ濃度は激減したことから、ヒト由来細菌もその間にほとんど消失していることが示された。一方、貯留槽汚泥中のファージ濃度は同じ放置期間にほとんど変化が認められなかった。今後、放置期間の環境を変えることによりファージ濃度の変化を解析し、ヒト由来細菌濃度を減らすための条件検討を行う予定である。

新規溶菌酵素の探索に関しては、特に病原菌特異的ファージからの探索を進め、より抗菌活性の高い酵素の探索を行う予定である。

[発表論文]

ANTHONY MUYOMBWE, YASUNORI TANJI, HAJIME UNNO, Cloning and Expression of a Gene Encoding the Lytic Functions of *Bacillus amyloliqueficiens* Phage: Evidence of an Auxiliary Lysis, submitted