

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  
プログラム・要旨

日 時： 平成 22 年 9 月 9 日（木）～ 9 月 10 日（金）

場 所： 大阪大学蛋白質研究所 1 階講堂

# 講演プログラム

第1日目 9月9日(木) 午後1時～

13:00-14:35 座長：松崎茂展（高知大・医）

挨拶 長谷俊治（大阪大・蛋白研所長）

ファージ研究の最近の動向 有坂文雄（東工大院・生命理工）

C型とD型ボツリヌス毒素を支配するバクテリオファージのゲノム解析

阪口義彦（IR推進機構）

黄色ブドウ球菌の病原性獲得に関わるファージ：二成分性毒素遺伝子を伝播するファージ群

金子 淳（東北大院・農）

黄色ブドウ球菌の病原性獲得に関わるファージ：表皮剥脱毒素遺伝子を伝播するファージ

菅井基行（広島大院・医歯薬）

—休憩—

14:45 - 16:00 座長：稲垣 穰（三重大院・生物資源学）

*Bacillus thuringiensis* におけるプロファージ転移性因子の挙動解析

神田康三（佐賀大・農）

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

内山淳平、松崎茂展、大畑雅典（高知大・医）

魚類のファージ療法における実践的課題 中井敏博、河東康彦（広島大院・生物圏科学）

—休憩—

16:15 - 17:45 Chairman : Prof. Fumio Arisaka (Tokyo Institute of Technology)

Joint session with International Science and Technology Center (ISTC)

Selection and purity of the phages used in therapeutic mixtures.

Dr. Konstantin MIROSHNIKOV (Lab. of Molecular Bioengineering,  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia)

Usage of live bacterial viruses for therapy and prophylaxis - some questions.

Prof. Victor KRYLOV (State Institute for Genetics and Selection of Industrial  
Microorganisms, Moscow, Russia)

International Science and Technology Center (ISTC) 活動の紹介

横山宣彦 (ISTC)

18:00 - 懇親会

第2日目 9月10日(金) 9時～

9:00 - 10:15 座長：中井敏博(広島大院・生物圏科学)

牛乳房炎ファージセラピーに向けた取り組み 丹治保典(東工大院・生命理工)

下水処理微生物生態系とバクテリオファージ 佐藤弘泰(東京大院・新領域)

水圏環境のウイルス・ファージ研究の現状と将来展望

長崎慶三、外丸裕司(水研セ・瀬水研)、吉田天士(京都大院・農)

10:15 - 11:05 座長：武田茂樹(群馬大院・工)

大腸菌リポ多糖の荷電置換基の多型解析とファージタンパク質による認識

小島久毅、内田智子、稲垣 穰(三重大院・生物資源学)

バクテリオファージ Q $\beta$  の感染プロセス 塚田幸治(大阪大院・工)

11:05 - 12:50 ポスター発表/昼食

12:50 - 13:20 総会 司会：神田康三(佐賀大・農)

13:20 - 14:10 座長：米崎哲朗(大阪大院・理)

ファージ提示法による機能性抗体とペプチドのデザイン 伊東祐二(鹿児島大院・理工)

T4 ファージ尾部基盤ウェッジの逐次的分子集合の機構 金丸周司(東工大院・生命理工)

14:10 - 15:10 座長：伊東祐二(鹿児島大院・理工)

P2 ファージテイルスパイクタンパク質 gpV の解析 武田茂樹(群馬大院・工)

トキシンーアンチトキシンと T4 ファージ 大塚裕一、米崎哲朗(大阪大院・理)

終わりの挨拶 松崎茂展(高知大・医)

## ポスター発表プログラム

9月10日(金) 11:05~12:00

1. HPLCを用いるリポ多糖の多型分析と $\phi$ X174スパイクタンパク質との親和性の個別評価  
内田智子、小島久毅、稲垣 穰 (三重大学生物資源学研究科 生理活性化学研究室)
2. レセプター糖鎖固定化センサーチップを用いた $\phi$ X174スパイクGタンパク質の相互作用解析  
南平麻衣、大江健介、稲垣 穰 (三重大学生物資源学研究科 生理活性化学研究科)
3. バクテリオファージのアガロースゲル内の拡散  
胡 駿、宮永一彦、丹治保典 (東工大院・生命理工)
4. 牛乳房炎由来 *Staphylococcus aureus* とその特異的ファージの相互作用におけるイオン強度の影響  
栗本 実希、谷 夏織、宮永一彦、丹治保典 (東工大院・生命理工)
5. 大腸菌 O157 感染性ファージの宿主特異性に関する解析  
森川真年、宮永一彦、丹治保典 (東工大院・生命理工)
6. T4系バクテリオファージの大腸菌 O157 認識に関わる解析  
浅川宏章、森川真年、宮永一彦、丹治保典 (東工大院・生命理工)
7. 畜産環境からのサルモネラ溶菌性バクテリオファージの分離とコンポスト中のサルモネラ殺滅への利用  
小川寛司、小田和賢一、中井裕 (東北大学大学院農学研究科)
8. ファージの魚体内への侵入性  
河東康彦、中井敏博 (広島大院)
9. バクテリオファージを用いた *Vibrio vulnificus* の病原因子解明と新規治療法の開発  
松本浩一<sup>1</sup>、田代千夏<sup>2</sup>、横地奈菜<sup>2</sup>、神田康三<sup>2</sup> (<sup>1</sup>佐賀大学医学部附属病院麻酔科蘇生科、<sup>2</sup>佐賀大学農学部生命機能科学科生命化学講座 応用微生物学研究室)
10. Panton-Valentine Leukocidin 変換ファージ  $\phi$ SLT における黄色ブドウ球菌細胞表面リポテイコ酸認識尾部タンパク質の同定  
若林 由佳梨<sup>1</sup>、成田 - 山田 佐知子<sup>1</sup>、神尾 好是<sup>2</sup>、金子 淳<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成、<sup>2</sup>東北学院大・環境防災工学研究所)
11. 納豆菌ファージ PM1 の特性  
梅根健一、白石淳 (福岡女子大学・人間環境学部)
12. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* に感染するファージの解析  
○玉腰雅忠<sup>1,2</sup>、杉澤幹起<sup>1</sup>、山岸明彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東薬大・生命、<sup>2</sup>理研・播磨研)
13. DNA増幅・RFLP法による活性汚泥上清水中バクテリオファージプロファイリング  
佐藤弘泰、楊 賀、陳靈佳、味埜俊 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)
14. 新規黄色ブドウ球菌バクテリオファージ S6 の解析  
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 (高知大医学部微生物学)
15. 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  
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 (高知大学医学部微生物学)
16. T4 関連ファージグループにおけるセラチアファージ KSP90 の系統学的位置  
<sup>1</sup>松下憲司、<sup>2</sup>内山淳平、<sup>2</sup>氏原隆子、<sup>2</sup>松崎茂展、<sup>2</sup>村上雅尚、<sup>2</sup>今城雅之、<sup>2</sup>大畑雅典  
(<sup>1</sup>高知大学医学部小児思春期医学、<sup>2</sup>微生物学)

# Lecture program

Thursday, September 9

13:00-14:35

Opening speech. Toshiharu Hase (the Director, Institute for Protein Research, Osaka University)

Recent trend in phage research. Fumio Arisaka (Tokyo Institute of Technology)

The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxin-converting phage, and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Yoshihiko Sakaguchi (Interdisciplinary Research Organization, University of Miyazaki, Japan)

Bacteriophage of *Staphylococcus aureus* relevant to acquisition of virulence factors: two-component toxin-converting phages. Jun Kaneko (Department of Microbial Biotechnology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

Bacteriophage of *Staphylococcus aureus* relevant to acquisition of virulence factors: exfoliative toxin A-converting phages. Motoyuki Sugai (Department of Bacteriology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences)

-Coffee break-

14:45 - 16:00

Characterization of the transposable element jumped into prophage in *Bacillus thuringiensis*.

Kohzo Kanda (Inst. Applied Microbiology, Dept. Applied Biochemistry & Food Science, Fac. Agriculture, Saga University)

Development of phage therapy and novel phage-mediated detection methods for pathogenic bacteria: Approach in Kochi University. Jumpei Uchiyama, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata (Kochi Medical School)

Phage therapy of bacterial infections in aquaculture: subjects in the practice.

Toshihiro Nakai, Yasuhiko Kawato (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

-Coffee break-

16:15 - 17:45 Joint session with International Science and Technology Center (ISTC)

Chairman : Prof. Fumio Arisaka (Tokyo Institute of Technology)

Selection and purity of the phages used in therapeutic mixtures. Dr. Konstantin MIROSHNIKOV (Lab. of Molecular Bioengineering, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia)

Usage of live bacterial viruses for therapy and prophylaxis - some questions.

Prof. Victor KRYLOV (State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia)

Introduction of the International Science and Technology Center (ISTC) activities.

Norihiko Yokoyama (ISTC)

18:00- Banquet

## Friday, September 10

9:00-11:05

A trial for phage therapy of bovine mastitis. Yasunori Tanji (Graduate Sch. of Biosci & Bioeng, Tokyo Institute of Technology)

Bacteriophages and microbial ecosystems in wastewater treatment processes.

Hiroyasu Satoh (Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

Forefront and future view of researches on viruses and phages in aquatic environment

Keizo Nagasaki<sup>1</sup>, Yuji Tomaru<sup>1</sup>, Takashi Yoshida<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Fisheries Research Agency, <sup>2</sup>Kyoto University)

Analysis of the diversity of charged substituents on the LPS of *E. coli* C and their contribution to the affinity of spike protein of bacteriophage  $\phi$ X174. Hisaki Kojima, Satoko Uchida, Minoru Inagaki (Laboratory of Biofunctional Chemistry, Department of Life Science, Faculty of Bioresources, Mie University)

Infection cycle of the bacteriophage Q  $\beta$ . Koji Tsukada (Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University)

11:05-12:00 Poster presentation

13:20-15:05

Molecular designs of functional antibodies and peptides by phage display. Yuji Ito (Department of Chemistry and Bioscience Graduate School of Science and Engineering Kagoshima University)

Sequential assembly of the baseplate wedges of bacteriophage T4 in vitro.

Shuji Kanamaru (Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology)

Structural and functional analysis of a P2 phage tail spike protein, gpV. Shigeki Takeda (Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering, Gunma University)

Toxin-Antitoxin system and T4 phage. Yuichi Otsuka and Tetsuro Yonesaki (Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University)

Closing speech. Shigenobu Matsuzaki (Kochi Medical School)

## Poster presentation program

Friday, September 10, 11:05-12:00

1. Analysis of diverse species in the lipopolysaccharide and their individual affinities to spike proteins of  $\phi$ X174 using ion-exchange HPLC/fluorescent derivatization. Satoko Uchida, Hisaki Kojima, Minoru Inagaki (Laboratory of Biofunctional Chemistry, Department of Life Science, Faculty of Bioresources, Mie University)
2. Interaction analysis of spike G protein of  $\phi$ X174 by Surface Plasmon Resonance using receptor oligosaccharide immobilized sensorchip. Mai Nampei, Kensuke Ohe, Minoru Inagaki (Laboratory of Biofunctional Chemistry, Department of Life Science, Faculty of Bioresources, Mie University)
3. Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane. Jun Hu, Kazuhiko Miyanaga, Yasunori Tanji (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)
4. Influence of ionic strength on *Staphylococcus aureus* – phage interaction. Miki Kurimoto, Kaori Tani, Kazuhiko Miyanaga, Yasunori Tanji (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)
5. Characterization of host cell recognition of *Escherichia coli* O157:H7 specific bacteriophage. Masatoshi Morikawa, Miyanaga, Yasunori Tanji (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)
6. Host cell recognition of *Escherichia coli* O157:H7 specific T4-type bacteriophage. Hiroaki Asakawa, Masatoshi Morikawa, Miyanaga, Yasunori Tanji (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)
7. Utilization of bacteriophages isolated from animal production environment for biological control of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in compost. Hiroshi Ogawa, Kenichi Otawa, Yutaka Nakai (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)
8. Transport of phage into fish via the intestine. Yasuhiko Kawato, Toshihiro Nakai (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)
9. Utilization of bacteriophage to clarify the pathogenicity of *Vibrio vulnificus*, and develop a new treatment for *Vibrio vulnificus* infection. Kouichi Matsumoto<sup>1</sup>, Chinatsu Tashiro<sup>2</sup>, Nana Yokochi<sup>2</sup>, Kohzo Kanda<sup>2</sup> (Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Saga University Hospital Laboratory of Applied Microbiology, Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Saga University)
10. Identification of tail-tip protein in a phage  $\phi$  SLT carrying Panton- Valentine leukocidin genes acting as an adhesion protein to a poly (glycerophosphate) chain of lipoteichoic acid on the cell surface of *Staphylococcus aureus*. Yukari Wakabayashi<sup>1</sup>, Sachiko Narita-Yamada<sup>1</sup>, Yoshiyuki Kamio<sup>2</sup>, and Jun Kaneko<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Microbial Biotechnology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, <sup>2</sup>Tohoku Gakuin University)
11. Characteristics of *Bacillus subtilis* (*natto*) bacteriophage PM1. Kenichi Umene, Atsushi Shiraishi (Faculty of Human Environmental Science, Fukuoka Woman's University)
12. Characterization of the bacteriophages  $\phi$ TMA and  $\phi$ YS40 of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. Masatada Tamakoshi<sup>1,2</sup>, Motoki Sugisawa<sup>1</sup> and Akihiko Yamagishi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Biol., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., <sup>2</sup>RIKEN SPring-8 Center, Harima Institute)

13. Profiling of bacteriophages in supernatant of activated sludge by DNA amplification and RFLP.  
Hiroyasu Satoh, He Yang, Lin Chia Tan, Takashi Mino (Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)
14. Analysis on a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage S6. Jumpei Uchiyama, Iyo Takemura, Takako Ujihara, Masanao Murakami, Masayuki Imajo, Masanori Daibata (Department of Microbiology and Infection, Faculty of Medicine, Kochi University)
15. Comparative genomic analysis of *Staphylococcus aureus* phage S13' and S24-1, and characterization of their adsorption proteins. Iyo Takemura, Jumpei Uchiyama, Takako Ujihara, Masanao Murakami, Masayuki Imajo, Masanori Daibata (Department of Microbiology and Infection, Faculty of Medicine, Kochi University)
16. Phylogenetic position of *Serratia marcescens* phage KSP90 in T4-related phage group.  
Kenshi Matsusita<sup>1</sup>, Jumpei Uchiyama<sup>2</sup>, Takako Ujihara<sup>2</sup>, Masanao Murakami<sup>2</sup>, Masayuki Imajo<sup>2</sup>, Masanori Daibata<sup>2</sup> (Department of <sup>1</sup>Pediatrics, <sup>2</sup>Microbiology and Infection, Faculty of Medicine, Kochi University)



## Joint session with International Science and Technology Center (ISTC)

### Selection and purity of the phages used in therapeutic mixtures

Konstantin A. Miroshnikov

Laboratory of Molecular Bioengineering, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Moscow, Russia

In the second half of 1990-s the dramatic growth of antibiotic-resistant strains of pathogenic bacteria has stimulated an interest to alternative antimicrobial applications. One of such strategies is phage therapy – an employment of natural bacterial viruses (bacteriophages) for treatment and control of bacterial infections. In former Soviet Union and Eastern Europe this concept was never cancelled, and therapeutic phage cocktails are still in industrial production.

However the scientific community has formulated modern genetic, molecular biologic and immunologic requirements for phages that may be used for treatment of patients. Industrial phage cocktails are selected mostly empirically, and an information about their content is not sufficient for drug certification anywhere except former Soviet Republics.

Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa* – the temperate pathogen causing severe clinical infections – are well studied, and may be divided into several groups in the context of their applicability for therapeutic use. In collaboration with “Mikrogen” company, the producer of clinical phage cocktails we have designed the PCR-based test. This test enables industrial scientists to determine rapidly and reliably, if the newly isolated phage is suitable to be included to the therapeutic mixture for treatment of *P.aeruginosa* infections.

Also the purity of currently used phage mixtures causes many questions. The sterilized cell lysate may contain soluble bacterial peptidoglycans that cause immune response and inflammation. Therefore a design of fast and inexpensive method of purification of phage lysates is essential. We offer two chromatographic methods that showed to be universal for *P.aeruginosa* bacteriophages and provide endotoxin purity <150 EU/ml.

## Usage of live bacterial viruses for therapy and prophylaxis - some questions

Victor Krylov

Laboratory for bacteriophage genetics, Federal Scientific Center GosNIIgenetika.

Multi drug resistant bacterial pathogens have arisen as a result of uncontrolled usage of antibiotics. In the report there will be considered some questions related with use of live phage therapy (LPT) which, as it is supposed, is able to substitute antibiotics in fight against of such multi drug resistant pathogens. Author considers the possibility that uncontrolled use of therapeutic bacteriophages can become a source of new problems. Thus there will be discussed some conditions for safe use phages in therapy, as different possible approaches in applying of LPT.

Use of phages in therapy is considered as effective against such infections as acute intestinal diseases caused with different pathogens, postoperational and burn nosocomial infections with *P.aeruginosa*, *S.aureus* (including MRSA), *A.baumannii*. The description of several multivalent phage preparations now in use to prevent epidemics of intestinal or purulent infections is given.

LPT and antibiotic therapy have some great differences. First of all, it is necessary to take into attention the regional character of LPT. Furthermore, organization of LPT requires some compulsory measures. Accumulation of large collections of well studied phages as permanent interaction between physicians and clinical laboratory in hospital conditions are obligatory conditions. Phage resistant mutants are quite frequent ones and monitoring of sensitivity of pathogens to used sets of phages and constant adaptation of the compositions to changes in spectrum of regional pathogens are necessary.

Some scientists consider phages as a cheap and effective way for decontaminations of food staff (meat, broilers, eggs), to cure animals in field conditions and in conditions of industrial production of bird meat, to decontaminate wells, hospital wards, operational rooms etc. But it is necessary to understand that such use can lead to distribution of phage resistant pathogens, facilitate the expansion of such infections and increase the number of symptomless carriers. Phages are very important participants of bacterial evolution, and there is a sense to avoid the use of phages in open systems as disinfectants.

As a consequence of wide use of LPT the appearance of multi phage resistant pathogens is inevitable. Thus, it will be extremely desirable to study beforehand the conditions leading to arising of such multi phage resistant bacteria and their features, their role in arising of new commensals to exclude their potential danger for humans.

In the end of the report there will be presented information on studies of *P.aeruginosa* phages in our laboratory having some relation to LPT, including: 1) Use of formal scheme of phage adsorptional receptors; 2) Demonstration of pseudolysogenic state in cells, infected with phages of phiKZ genus in dependance of the multiplicity of infection. The phiKZ-like phages are included in real LPT mixtures now and pseudolysogeny may be precondition for horizontal gene transfer; 3) Preliminary results of studies of two newly isolated phages with different levels of relatedness with phage D3, their mutants and recombinants.

## 講演要旨 (Lecture summary)

### C型とD型ボツリヌス毒素を支配するバクテリオファージのゲノム解析

阪口義彦 (宮崎大・IR 推進機構)

C型ボツリヌス菌の神経毒素およびC3酵素産生性がバクテリオファージによって支配されていることは、古くから知られている。C型毒素変換ファージは、典型的な毒素変換ファージの1つである。本ファージの性状については、ほとんど明らかとされていなかったが、C型毒素変換ファージ(c-st)のゲノム解析を行うことで、様々な特徴が明らかとなった。最も特徴的なことは、溶原株において、本ファージゲノムが環状プラスミドとして存在することであった。

### 黄色ブドウ球菌の病原性獲得に関わるファージ：二成分性毒素遺伝子を伝播するファージ群

金子 淳 (東北大院農・生物産業創成)

我々は1997年に黄色ブドウ球菌の Panton-Valentine 型白血球崩壊毒素 (ロイコシジン) 遺伝子がプロファージ上に存在することを発見し、黄色ブドウ球菌のファージとして初めてそのゲノムを解析して以来、本毒素の水平伝播に複数のファージが関与することを明らかにしてきた。今回は PVLファージのゲノム構造と宿主認識タンパク質の解析、並びに近年注目されている新興 MRSAと本毒素の関連について解説する。

### 黄色ブドウ球菌の病原性獲得に関わるファージ：表皮剥脱毒素遺伝子を伝播するファージ

菅井基行 (広島大院・医歯薬)

黄色ブドウ球菌はヒトに化膿症を引き起こす代表的な病原細菌で、新生児～小児に伝染性膿痂疹、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群をおこす。これらの疾患の主徴は黄ブ菌が産生する表皮デスモゾーム特異的プロテアーゼ (表皮剥脱毒素) による皮膚の水疱形成・剥脱である。毒素遺伝子 *eta* はファージ上にコードされ、我が国では系統解析から3種の *eta* converting phage が見いだされている。本セミナーでは *eta* converting phage を保有する MRSA の出現について紹介する。

-----メモ-----

## *Bacillus thuringiensis* におけるプロファージ転移性因子の挙動解析

神田康三 (佐賀大・農)

溶原菌 *B. thuringiensis* subsp. *tolwarthi* においてトランスポゼース (IS116/110/902) 遺伝子と推定 230 アミノ酸をコードする未知の ORF からなる転移領域が見出された。この領域は紫外線照射によるファージ誘発時に温度感受性的にプロファージ上に転移することが判明し、その転移は未知 ORF の転写発現により制御されていることが明らかとなった。また、今回の結果は宿主染色体上の遺伝子が能動的にプロファージへ転移し、他の菌株へ伝播して行く事の可能性を強く示唆した。

## 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

内山淳平、松崎茂展、大畑雅典 (高知大・医)

21 世紀に入り薬剤耐性菌の蔓延が増々重要な社会問題となっている。そのため各種の抗生物質非依存的な細菌感染症制御法の探索が行われており、その可能性の一つとしてファージ療法 (ファージの溶菌・宿主特異性を利用した治療法) が注目されている。これまで我々は、各種細菌感染症に対するファージ療法の研究開発を行ってきた。本発表では、本学で行なっているファージ療法研究およびファージを利用した細菌検査法に関する研究を紹介する。

## 魚類のファージ療法における実践的課題

中井敏博、河東康彦 (広島大院・生物圏科学)

細菌感染症に対するファージ療法が再評価されるようになってからすでに 30 年が経過したが、本療法の医学および種々の産業分野への応用は遅々として進んでいない。本講演では、水産増養殖においてファージ療法の実用化を目指しておこなってきたこれまでの研究を紹介し、今後に残された研究課題を整理する。山積する課題の中でも、種々の様相を呈する病気の現場において本療法の有効性を精査することが最重要となろう。

-----メモ-----

## 牛乳房炎ファージセラピーに向けた取り組み

丹治保典 (東工大院・生命理工)

乳房炎罹患牛から *S. aureus* をスクリーニングした。さらに、それらを用い、*S. aureus* 感染性ファージをスクリーニングした。その中で  $\phi$ SA012,  $\phi$ SA039 ファージは *Myoviridae* に属していた。*S. aureus* 培養液に両ファージの混合液(ファージカクテル)を添加したところ、70 時間以上の培養においても耐性菌は出現しなかった。マウス乳房に *S. aureus* と  $\phi$ SA039 を同時に接種したところ、乳腺の炎症もなく、*S. aureus* の増殖を抑制した。

## 下水処理微生物生態系とバクテリオファージ

佐藤弘泰 (東京大院・新領域)

多くの下水処理場では活性汚泥法を用いて下水を処理している。活性汚泥とはさまざまな野生の細菌や原生動物がつくる集塊であり、反応槽内では微生物の濃度は  $10^9$  個/mL 程度になる。種々の微生物が織りなす生態系にはバクテリオファージも存在し、その濃度は微生物細胞数とほぼ同じほどである。ファージ研究の対象としての活性汚泥の特徴について紹介するとともに、活性汚泥中のバクテリオファージの挙動に関するこれまでの知見を紹介する。

## 水圏環境のウイルス・ファージ研究の現状と将来展望

長崎慶三<sup>1</sup>、外丸裕司<sup>1</sup>、吉田天士<sup>2</sup> (<sup>1</sup>水研セ・瀬水研, <sup>2</sup>京大院・農)

湖沼および沿岸海域における浮遊ウイルス様粒子密度は  $10^7 \sim 10^8$  粒子/ml にも達し、ウイルス・ファージに対する生態学的視点からの興味が急速に高まっている。我々は、ウイルス・ファージ感染が、赤潮・アオコといった異常増殖した植物プランクトンの消滅に関与している可能性を指摘してきた。今回はアオコ感染性ファージを中心に水圏ウイルス研究の現状を紹介するとともに、赤潮・アオコ制御へのウイルス利用の可能性について論じたい。

-----メモ-----

## 大腸菌リポ多糖の荷電置換基の多型解析とファージタンパク質による認識

小島久毅、内田智子、稲垣 穰 (三重大院・生物資源学)

大腸菌 C 株のリポ多糖には、荷電置換基が様々に結合した多様な成分が含まれ、リン酸、エタノールアミン、KDO が平均すると 5.6, 0.8, 2.1 残基含まれることを質量分析で明らかにした。つぎに、それら成分を混合物のまま、 $\phi$  X174 ファージのスパイク G タンパク質と混和した後、遊離の糖鎖を遠心限外ろ過で分離し、HPLC で定量した結果、それぞれの成分とスパイクタンパク質の親和性を個々に評価することに成功した。

## バクテリオファージ Q $\beta$ の感染プロセス

塚田幸治 (大阪大院・工)

感染は異なる生物が相互作用することで進行する多段階のプロセスを経て達成される異種生物間の生物反応システムであり、生態系の保全や医療技術の開発のためには定量的に理解することが必要である。今回、われわれの定量的ファージ感染実験で明らかとなった Q $\beta$  ファージの各感染プロセスとその温度依存性、および大量の非感染性ファージ粒子の存在について紹介し、RNA ファージの生き残り戦略について討論したい。

## ファージ提示法による機能性抗体とペプチドのデザイン

伊東祐二 (鹿児島大院)

我々は、M13 と T7 ファージによるファージディスプレイ技術を使って構築した抗体とペプチドのライブラリから、種々の生理活性を有する分子のデザインを行ってきた。本発表では、ガン細胞に細胞死誘導を行う単鎖 Fv 抗体とヒト IgG、IgA に特異的に結合するペプチドの単離研究を中心に、2 種のファージの提示系の違いによる提示分子 (ヒト単鎖 Fv 抗体) の物性変化と提示分子の機能性向上を目指した改良についても報告する。

-----メモ-----

## T4 ファージ尾部基盤ウェッジの逐次的分子集合の機構

金丸周司（東工大院）

T4 ファージの尾部基盤ウェッジは gp11, gp10, gp7, gp8, gp6, gp53 and gp25 (gp: gene product)から構成され、感染時に重要な大きな構造変化を起こす。これら、ウェッジ蛋白質の分子集合過程は、上記の順番で蛋白質相互作用によって厳密に制御されている。本研究では、ウェッジ蛋白質を別々に発現した大腸菌破砕液を混合することにより、試験管内におけるウェッジ蛋白質の逐次的集合過程を解析し、ウェッジの再構成に成功した。

## P2 ファージテイルスパイクタンパク質 gpV の解析

武田茂樹（群馬大院）

P2 ファージ多様な菌に感染することができる機構を備えていると考えられ、その広い宿主認識機構は興味深い。我々は、感染に重要な P2 ファージのテイルスパイクであると報告されている gpV について解析を行った。組換え体として精製した gpV は三量体であり、N 末端側のドメインと C 末端側のドメインでは安定性が大きく異なることが分かった。また、C 端側ドメインは大腸菌菌体膜に結合することが確認できた。結晶解析によって C 端側ドメインは鉄やカルシウムイオンを結合しており、大きな疎水性クラスターをもつことが明らかになった。

## トキシン-アンチトキシンと T4 ファージ

大塚裕一、米崎哲朗（大阪大院）

原核生物にはプログラム細胞死の一つである Toxin-Antitoxin (TA) システムが広く保存されており、現在までに TA をコードする遺伝子が多数報告されている。我々は T4 ファージ感染により活性化される TA を大腸菌 K-12 株染色体上と腸管出血性大腸菌 O157 が持つプラスミド上で発見した。本研究ではファージ感染による Toxin 活性化機構とそれに対するファージの防御について報告する。

-----メモ-----

## ポスター発表要旨 (Poster presentation summary)

### 1. HPLC を用いるリポ多糖の多型分析と $\phi$ X174 スパイクタンパク質との親和性の個別評価

内田智子、小島久毅、稲垣 穰  
(三重大学生物資源学研究所 生理活性化学研究室)

大腸菌 C 株リポ多糖の糖鎖部分をイオン交換 HPLC/ポストカラム蛍光発色法により分析した結果、PS はリン酸 (P) およびエタノールアミン (EtN) の多型による 8 成分、deON は 2 成分に分離することができた。つぎに、糖鎖を多成分の混合物のままタンパク質と混合し、遠心限外ろ過により取り出した遊離の糖鎖を定量した結果、タンパク質濃度依存的に信号強度が減少し、各成分との親和性を個別に評価することに成功した。

### 2. レセプター糖鎖固定化センサーチップを用いた $\phi$ X174 スパイク G タンパク質の相互作用解析

南平麻衣、大江健介、稲垣 穰  
(三重大学生物資源学研究所 生理活性化学研究室)

リポ多糖誘導体に存在するアミノ基を利用したアミンカップリングにより、レセプター糖鎖を固定化したセンサーチップを調製した。そこに溶液中では主に単量体であるスパイク G タンパク質を供したところ、良好なセンサーグラムが得られ、解離定数  $K_d$  は  $5.63 \times 10^{-7}(\text{M})$  と算出された。つぎに 5 量体である G タンパク質を供したところ、大きなレスポンスが得られ、その結果、多量体を保った状態での相互作用の検出に成功した。

### 3. バクテリオファージのアガロースゲル内の拡散

胡 駿、宮永一彦、丹治保典  
(東工大院・生命理工)

A simple two-chamber diffusion method was developed to study the diffusion properties of bacteriophages (phages). The apparent diffusion coefficients ( $D_{app}$ ) of Myoviridae phage T4 and filamentous phage  $\phi$ NEL were investigated, and the diffusion of the phages was found to be much slower than the diffusion of three antibiotics, ciprofloxacin, penicillin G, and tetracycline.  $D_{app}$  of T4 and  $\phi$ NEL in water through filter paper were calculated to be  $2.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  and  $6.8 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  respectively, and  $D_{app}$  of  $\phi$ NEL through agarose gel membrane, an artificial biofilm, was also calculated to be smaller than that of T4. In addition,  $D_{app}$  of phages through agarose gel was dependent on agarose concentration due to the similar size of phage and agarose gel mesh. We concluded that  $D_{app}$  of phages through an artificial biofilm is dependent on both phage morphology and biofilm density, and suggest the use of this method to study diffusion properties through real biofilm.



#### 4. 牛乳房炎由来 *Staphylococcus aureus* とその特異的ファージの相互作用 におけるイオン強度の影響

栗本実希、谷 夏織、宮永一彦、丹治保典  
(東工大院・生命理工)

本研究では牛乳房炎起因細菌である *Staphylococcus aureus* をファージで制御（ファージセラピー）することを最終目的に、乳房炎罹患乳牛から *S. aureus* のスクリーニング、乳房炎起因 *S. aureus* を用いたファージのスクリーニング、及び *S. aureus* 間の静電的相互作用や、*S. aureus* とファージの相互作用をイオン強度の差に着目して解析した。これらの実験により、イオン強度の変化が *S. aureus* 間の凝集体形成や、ファージの *S. aureus* に対する溶菌能力に影響を与えるということが示された

#### 5. 大腸菌 O157 感染性ファージの宿主特異性に関する解析

森川真年、宮永一彦、丹治保典  
(東工大院・生命理工)

本研究では、ファージによる病原菌の制御の実現を目的に、大腸菌 O157 に感染性を示す T2 系ファージの宿主認識部位 (gp38) の解析を行った。gp38 アミノ酸配列決定および外膜タンパク改変株による感染性試験により、大腸菌 O157 感染性ファージと非感染性ファージの gp38 アミノ酸配列の間で 5 つの非保存領域が見出され、これらの領域が大腸菌 O157 の外膜タンパク OmpC の認識に関与することが示唆された

#### 6. T4 系バクテリオファージの大腸菌 O157 認識に関わる解析

浅川宏章、森川真年、宮永一彦、丹治保典  
(東工大院・生命理工)

下水流入水から単離された大腸菌ファージ PE151 は病原性大腸菌 *E. coli* O157:H7 に感染する。PE151 の尾繊維の先端を発現する遺伝子のシーケンスと非病原性大腸菌 *E. coli* O157:H7[ATCC43888]認識に関わる性質解析を行った。その結果、PE151 の尾繊維の先端は T4 ファージと相同性があった。*E. coli* O157:H7[ATCC43888]への吸着、溶菌能力は低いことが明らかになった。またレセプターは OmpC であることが示唆された。今後、PE151 の *E. coli* O157:H7 への感染性を高めることでファージセラピーへの応用が期待される

-----メモ-----

## 7. 畜産環境からのサルモネラ溶菌性バクテリオファージの分離と コンポスト中のサルモネラ殺滅への利用

小川寛司、小田和賢一、中井裕  
(東北大学大学院農学研究科)

サルモネラは主に急性胃腸炎を引き起こす食中毒菌である。国内の製品コンポストからの検出報告があり、農産物の安全性および公衆衛生上の観点から、安価かつ効果的なコンポスト中のサルモネラの殺滅法確立が必要である。本研究では、Typhimurium 血清型株に溶菌性を示すファージを畜産廃水および糞便から分離した。さらに分離ファージ株にて滅菌コンポストに接種したサルモネラの増殖を抑制可能なことを確認した。

## 8. ファージの魚体内への侵入性

河東康彦、中井敏博  
(広島大院)

魚類の細菌感染症に対するファージ療法では、ファージを餌に混ぜて経口的に投与方法（経口法）により治療効果が認められる。これは、経口的に投与されたファージが、消化管から魚体内に侵入したことを示唆する。本研究では、魚の腸管に肛門からファージを注入して、その後のファージの動態（腸管、腎臓、血液）を調べた。

## 9. バクテリオファージを用いた *Vibrio vulnificus* の病原因子解明と 新規治療法の開発

松本浩一<sup>1</sup>、田代千夏<sup>2</sup>、横地奈菜<sup>2</sup>、神田康三<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>佐賀大学医学部附属病院麻酔科蘇生科、<sup>2</sup>佐賀大学農学部生命機能科学科  
生命化学講座 応用微生物学研究室)

*Vibrio vulnificus* は、肝機能障害などの基礎疾患を有する患者に感染して、壊死性筋膜炎および敗血症を引き起こす通性嫌気性グラム陰性菌である。我々は現在、本菌の病原因子の解明と、新たな治療法の開発を目指して研究を行っている。今回は、テンプレートファージを用いた溶原株と宿主株の比較による病原因子の解明と、ビルレントファージを用いたファージセラピーモデル作製の取り組みについて紹介する。

-----メモ-----

## 10. Panton-Valentine Leukocidin 変換ファージ $\phi$ SLT における黄色ブドウ球菌細胞表層リポペプチド認識尾部タンパク質の同定

若林 由佳梨<sup>1</sup>、成田 - 山田 佐知子<sup>1</sup>、神尾 好是<sup>2</sup>、○金子 淳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成、<sup>2</sup>東北学院大・環境防災工学研究所)

黄色ブドウ球菌のPVL保有ファージ $\phi$ SLTは、溶原化によりPVL非産生株を産生株に変換する。我々は $\phi$ SLT ゲノム上に見出した推定尾部タンパク質 ORF636 に注目し、 $\phi$ SLT 粒子における位置及びの宿主認識機構との関わりを解析した。ORF636は $\phi$ SLT の尾部先端に位置し、黄色ブドウ球菌のLTAと特異的に相互作用することから、本ファージの宿主黄色ブドウ球菌の認識に関与することを明らかにした。

## 11. 納豆菌ファージPM1の特性

梅根健一、白石淳 (福岡女子大学・人間環境学部)

大豆に納豆菌(枯草菌に分類)が作用し納豆を生じる。納豆産生を阻害する因子として分離された、納豆菌ファージPM1は、粒子の形態から siphoviridae に分類され、circular permutation の約50kbpの2本鎖DNAをゲノムとした。納豆産生阻害の発生時及び土壌から分離された、他の納豆菌ファージ10株のうち8株はPM1と相同性を有し、PM1は納豆菌ファージの代表的なものの一つであった。

## 12. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* に感染するファージの解析

○玉腰雅忠<sup>1,2</sup>、杉澤幹起<sup>1</sup>、山岸明彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東薬大・生命、<sup>2</sup>理研・播磨研)

$\phi$ YS40 と  $\phi$ TMA は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* に感染する。ゲノム配列解析の結果は152 kbの環状ゲノムを示唆したが、パルスフィールドゲル電気泳動では200 kbを超える線状DNAであることがわかった。また好熱菌の変異株の解析により、これらのファージの感染が宿主の線毛依存であることを見出した。線毛とテイルファイバーの構造蛋白質の比較により両者の相互作用についても議論する。

-----メモ-----

### 13. DNA増幅・RFLP法による活性汚泥上清水中バクテリオファージ プロファイリング

佐藤弘泰、楊 賀、陳靈佳、味埜俊（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

活性汚泥上清中のバクテリオファージ群集構造を比較するための方法として、Phi29 DNA polymerase を用いてファージ DNA を増幅し、その後に制限酵素切断多型を調べる方法を開発した。増幅ではネガコンも増えるという問題があったものの、試料については再現性をもった結果を得ることができた。また、試料間の違い、あるいは活性汚泥プロセスの運転に伴う経時的な変化を見ることができた。本手法は微量の試料で行うことができるのが特徴である

### 14. 新規黄色ブドウ球菌バクテリオファージ S 6 の解析

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（高知大医学部微生物学）

黄色ブドウ球菌ファージの研究は、ファージタイピングより開始され約 60 年もの歴史を有する。黄色ブドウ球菌のファージは、形態学的、遺伝学的に比較的均一なものが分離され、またその長い歴史ゆえにその分類も明瞭である。しかしながら、我々は、高知県下水処理場流入水より黄色ブドウ球菌に感染する新規巨大ファージ S 6 を分離した。本研究では、現在報告される黄色ブドウ球菌大型ファージ K との比較を行い、ゲノム解析や系統解析の結果に関して議論する。

-----メモ-----

## 15. 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

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（高知大学医学部微生物学）

最近、我々は、抗体の代替として吸着尾部タンパク質の利用する黄色ブドウ球菌検出系に注目している。これまで黄色ブドウ球菌ファージの尾部吸着タンパク質の解析は殆ど行われていない。それゆえ、本研究では、吸着タンパク質予測を目的とし、独自に分離した黄色ブドウ球菌ファージ S13'、及び、S24-1 の比較ゲノム解析を行い、尾部吸着タンパク質を予測した。尾部吸着タンパク質を作製し、基礎的解析を行なった結果を示す。

## 16. T4 関連ファージグループにおけるセラチアファージ KSP90 の系統学的位置

松下憲司<sup>1</sup>、内山淳平<sup>2</sup>、氏原隆子<sup>2</sup>、松崎茂展<sup>2</sup>、村上雅尚<sup>2</sup>、今城雅之<sup>2</sup>、大畑雅典<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>高知大学医学部小児思春期医学、<sup>2</sup>微生物学)

我々が分離した腸内細菌科のセラチア (*Serratia marcescens*) に感染するファージ KSP90 は、伸長した頭部ではなく正二十面体の頭部を保有するものの、ビリオン蛋白質遺伝子群の解析により、T4 関連ファージグループに属すると予想された。現在、T4 関連ファージは、頭部形態が T4 と異なるものも多数報告されており、かつ宿主もシアノバクテリア門にまで広がっている。本報告では、KSP90 の T4 関連グループにおける系統学的位置を検討する。

-----メモ-----