

技術解説

醤油乳酸菌に感染するバクテリオファージの  
レセプターに関する研究 (2)

脇中琢良<sup>1</sup>, 松谷峰之介<sup>2</sup>, 渡部潤<sup>3</sup>, 茂木喜信<sup>1</sup>, 徳岡昌文<sup>4</sup>, 大西章博<sup>4</sup>  
(ヤマサ醤油株式会社・製造本部<sup>1</sup>, 東京農業大学・生物資源ゲノム解析センター<sup>2</sup>,  
福島大学・農学群食農学類<sup>3</sup>, 東京農業大学・応用生物科学部醸造科学科<sup>4</sup>)

Studies on the binding receptors for bacteriophages  
that infect *Tetragenococcus halophilus* (2)

Takura Wakinaka<sup>1</sup>, Minenosuke Matsutani<sup>2</sup>, Jun Watanabe<sup>3</sup>, Yoshinobu Mogi<sup>1</sup>,  
Masafumi Tokuoka<sup>4</sup>, and Akihiro Ohnishi<sup>4</sup>  
(Manufacturing Division, Yamasa Corporation<sup>1</sup>; NODAI Genome Research Center,  
Tokyo University of Agriculture<sup>2</sup>; Faculty of Food and Agricultural Sciences,  
Fukushima University<sup>3</sup>; Department of Fermentation Science, Faculty of Applied  
Biosciences, Tokyo University of Agriculture<sup>4</sup>)

要旨

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* のバクテリオファージ感受性を決定する、莢膜の合成に関与する遺伝子群を同定した。莢膜はファージの結合レセプターとして、またはファージの結合阻害因子として機能することが示唆された。

緒言

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* は、醤油諸味で乳酸発酵を担う好塩性の乳酸菌である。*T. halophilus* に感染するバクテリオファージ (以下ファージ) は、*T. halophilus* を溶菌させて乳酸発酵を阻害するため、醸造上問題となる<sup>1)</sup>。*T. halophilus* のファージは宿主範囲が狭く、ほとんど菌株特異的に感染すると報告されてきたが、その要因は明らかでなかった。前報において筆者らは、ファージ phiWJ7 が *T. halophilus* へ結合するためのレセプターとしてタイコ酸を利用していることを明らかにし、特定の構造のタイコ酸を有するかどうか宿主のファージ感受性を決定する一

因となっていることを示した<sup>2)</sup>。しかし、構造的多様性がそれほど高くないタイコ酸の違いだけでファージ感受性の違いを十分に説明することは難しく、別の要因が存在するであろうと推測していた。

タイコ酸とペプチドグリカン は細胞壁を構成する成分で、ファージのレセプターとなることが知られているが、乳酸菌の細胞壁とその周辺には他にも様々な多糖が存在する。莢膜多糖 (capsular polysaccharide: CPS) もその一つで、ペプチドグリカンに共有結合し、菌の周囲に莢膜と呼ばれる層を形成する。多くの場合、CPS は Wzx/Wzy 依存的経路を介して合成される<sup>3)</sup>。この経路では、菌体内で合成されたオリゴ糖鎖が、フリッパーゼ Wzx によって菌体外へ移送され、ポリメラーゼ Wzy がオリゴ糖鎖を重合し糖鎖を伸長させる。完成した糖鎖は、最終的にペプチドグリカンに転移される。cap または cps と呼ばれる CPS 合成遺伝子クラスターは、多くのグラム陽性菌に存在する<sup>4, 5)</sup>。CPS の糖鎖構造は菌種および菌株ごとに

異なり多様性に富んでいるが、*cap/cps*遺伝子クラスターは属を超えてもある程度類似性がある。*Streptococcus pneumoniae*では、*cps*遺伝子クラスターの5'末端側に*cpsABCD*という4遺伝子が保存されている<sup>6)</sup>。*cpsABCD*の下流領域には、糖転移酵素、アシル基・ピルビル基等の転移酵素、糖ヌクレオチド合成酵素、フリッパーゼWzx、ポリメラーゼWzy等をコードする遺伝子が存在する。*cpsABCD*の下流にあるこれらの遺伝子は菌株間で違いがあり、それによってCPSの糖鎖構造に多様性が生み出される。*S. pneumoniae*以外のグラム陽性菌でも、*cap/cps*遺伝子クラスターには*cpsABCD*と相同な遺伝子が含まれることが多い。

本研究では、*T. halophilus*のファージ感受性を決定する因子として、CPS合成に関与する*cps*遺伝子群を見出した。*T. halophilus*に感染するファージの宿主範囲が狭い理由は30年間不明であったが、本研究はそのメカニズムの解明に大きく貢献するものである。

## 実験方法

### 1. 菌株、培地および培養条件

本研究で主として使用した乳酸菌、ファージを表1に示す。培地はMRS-10またはLA13培地<sup>7)</sup>

を使用した。MRS-10は、10%NaClを添加したMRSプロス (Difco) である。寒天培地の寒天濃度は1.5%とした。液体培地は振盪せずに静置し、寒天培地はアネロパック (三菱ガス化学) を使用し嫌氣的に培養した。培養温度は30℃で、特に記載がない場合は5日間培養した。

### 2. ファージの取り扱いとファージ耐性変異株の取得

ファージを用いた実験操作手法は、前報に記載した通りである<sup>2)</sup>。培地はLA13寒天培地を用い、プラーク形成には3日間培養した。

ファージ粒子の酵素活性を評価する際は、殺菌ランプGL-15 (パナソニック) で50 mmの距離から10分間UV照射し、ファージの感染性を失わせた。

### 3. ゲノム解析

*T. halophilus*のゲノムDNA抽出とシーケンス解析は、前報に記載した通り実施した<sup>2)</sup>。

変異株の変異箇所は、公開済みの*T. halophilus* YA5, YG2のゲノム配列<sup>8)</sup> をリファレンス配列として、変異株のリードをマッピングすることで特定した。

CPS合成遺伝子を含む領域の変異を確認するた

表1 使用した菌株

| 株名                           | 説明                       | 分離源                     |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 乳酸菌 ( <i>T. halophilus</i> ) |                          |                         |
| YA5                          | phiYA5 に感受性              | 醤油諸味より分離 <sup>14)</sup> |
| YA5_pyruvylTrfase::IS        | YA5 に由来する phiYA5_2 耐性変異株 | 本研究で作出                  |
| YG2                          | phiYG2_4 に感受性            | 醤油諸味より分離 <sup>21)</sup> |
| YG2_pgm::IS                  | YG2 に由来する phiYG2_4 耐性変異株 | 本研究で作出                  |
| YG2_wzy::IS                  | YG2 に由来する phiYG2_4 耐性変異株 | 本研究で作出                  |
| YG2_acylTrfase::IS           | YG2 に由来する phiYG2_4 耐性変異株 | 本研究で作出                  |
| バクテリオファージ                    |                          |                         |
| phiYA5_2                     | YA5 に感染する                | 醤油諸味より分離                |
| phiYG2_4                     | YG2 に感染する                | 醤油諸味より分離                |

めには, プライマーセットYA5\_22620とYA5\_22670, YA5\_22670-2とYA5\_22740, YA5\_22740-2とYA5\_22800, YA5\_22800-2とYA5\_22880, YA5\_22670-2とYG2\_06590, YG2\_06590-2とYG2\_06630, YG2\_16110とYG2\_16130 (表2) を使用し, KOD FX Neo (東洋紡) を用いたPCRでDNAを増幅した。PCR産物は0.9%アガロースゲルで分離し, Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) を用いて精製, 必要に応じて外注分析によりシーケンス解析を実施した (Fasmac/Eurofins Genomics)。

#### 4. CPSの抽出と分析

CPSの分析は, Haらの方法に従い実施した<sup>9)</sup>。簡単に述べると, MRS-10で定常期まで増殖させた菌体を遠心分離 (8,000×g, 5分) で回収し, ペレット (0.2 g) をリン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.0) で洗浄して, リゾチームを含むリン酸ナトリウム緩衝液に懸濁した。37°Cで24時間静置後, 遠心分離で上清を回収し, DNase, RNase, Proteinase Kで処理した。上清にエタノールを30% (v/v) 濃度で加え, 4°Cで2時間冷

却して沈殿を除去した。最終的にエタノール濃度を80%に調整し, 遠心分離で沈殿を回収し, CPSとして凍結乾燥した。CPSの定量には, フェノール硫酸法を用いた。乾燥ペレットを水600 μLに再懸濁し, 5% フェノール300 μLを加え, 95% 硫酸1.5 mLを混合し, 室温で10分間発色させた。490 nmの吸光度を測定し, グルコースによる検量線に基づいてCPS濃度を計算した。

透過型電子顕微鏡観察には, MRS-10で培養した菌体を, 2%グルタルアルデヒドを含むカコジル酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) 中で固定し, 0.8% スクロースを含む2%四酸化オスミウムで染色した。次いで, エタノール溶液を用いて段階的に脱水し, Epon 812に包埋した。超薄切片を調製し, 2%酢酸ウラニルおよび鉛で染色した。電子顕微鏡観察は, 花市電子顕微鏡技術研究所にてH-7600 (日立製作所) を使用し実施した。

#### 5. ファージ結合アッセイ

菌体へのファージの結合は, Baptistaらの方法に従い評価した<sup>10)</sup>。菌体をLA13培地でODが0.5になるまで増殖させ, 60°Cで30分間加熱して殺菌した。殺菌した菌体をファージと混合し, 30°Cで2時間インキュベートした。対照区として菌体を含まないLA13を用意した。菌体とファージの混合物を遠心分離 (6,000×g, 5分) し, 上清中の遊離ファージ数を, プラークアッセイにより求めた。

統計解析にはR (バージョン3.6.0; www.r-project.org) を使用し, 一元配置分散分析とTukey法による事後検定によってデータを評価した。

### 結果と考察

#### 1. ファージ耐性変異株の取得とcps遺伝子群の同定

ファージphiYA5\_2に感受性の*T. halophilus* YA5から, ファージ耐性変異株を得てゲノム解析を実施した結果, ピルビル基転移酵素をコードするORFに挿入配列 (insertion sequence: IS) IS*Teha3*の転位が見出された (図1A)。

YA5と別にYG2を親株として, ファージ

表2 プライマー配列

| プライマー名      | 配列 (5'→3')                 |
|-------------|----------------------------|
| YA5_22620   | TCGCGTTGGTAACGCAG          |
| YA5_22670   | GTGCGCATCCGAAGC            |
| YA5_22670-2 | AAACAGCGCAAGAAATGGTAG      |
| YA5_22740   | TTTAATTGAACTGCATTACGTACCC  |
| YA5_22740-2 | TCTGTTGTAGATGAAGTCGAGGG    |
| YA5_22800   | CCCACTCCGAATCTTCTCC        |
| YA5_22800-2 | TCGACAGTTCCGGTTGG          |
| YA5_22880   | TCAGCATGGCGGGG             |
| YG2_06590   | AATGAATGGTACTAACAACCTCTCGG |
| YG2_06590-2 | GGAATTCCGACGCG             |
| YG2_06630   | CAAAGGTAACAGCTTTTAGGGATG   |
| YG2_16110   | CCAGTACGATTTTCAAACGAGTC    |
| YG2_16130   | GGTACACTCGCTCGCTCC         |

phiYG2\_4に耐性のある変異株を得てゲノム解析を実施した結果、 $\alpha$ -ホスホグルコムターゼをコードするORFにISTeha3の転移が見出された(図1B)。

YA5の変異株でISの転移があった遺伝子(ピルビル基転移酵素)の上流には、*Enterococcus faecium*のcpsACDBに相同な遺伝子が存在した(図1A)。*E. faecium*でCPS合成に関与するcps遺伝子クラスターには、cpsACDBとcpsAに隣接する未命名遺伝子が含まれる。*E. faecium*ではこれら5遺伝子はよく保存されており、その下流に株間で非相同な遺伝子群が存在する<sup>11)</sup>。YA5とYG2のcps遺伝子クラスターを比較すると、cpsACDBを含む5遺伝子は共通で、その下流に株間で異なるさまざまな糖転移酵素や糖ヌクレオチド合成酵素、フリッパーゼWzx, ポリメラーゼWzyなどが存在した(図1A)。YA5とYG2が異なるcps遺伝子群を有していることは、CPSの糖鎖構造が互いに異なることを示唆している。YA5のピルビル基転移酵素は、糖鎖の修飾酵素の1つであると推

定され、その変異はCPSの構造・発現に影響を与えた可能性が考えられた。

YG2の変異株でISの転移があった遺伝子( $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ)は、cpsACDBを含む遺伝子クラスターとは別の箇所に存在したものの、 $\alpha$ -ホスホグルコムターゼは、CPS合成のための糖転移酵素の基質となるUDP-グルコースやUDP-グルクロン酸などの生成に寄与する<sup>12)</sup>。

これらの結果から、*T. halophilus*のCPSがファージとの相互作用に関与しているという仮説が立てられた。

## 2. ファージ耐性株の追加取得と変異箇所の特定

*T. halophilus*の形質転換技術は確立されておらず、遺伝子機能を分析するために一般的な、遺伝子破壊と相補実験を実施することはできない<sup>13)</sup>。しかし、*T. halophilus*のゲノム内では、ISTeha3, ISTeha4, ISTeha5などのISが非常に活発に転移しており、IS転移はPCRによって容易に検出できることが分かっている<sup>13, 14)</sup>。ゲノム解

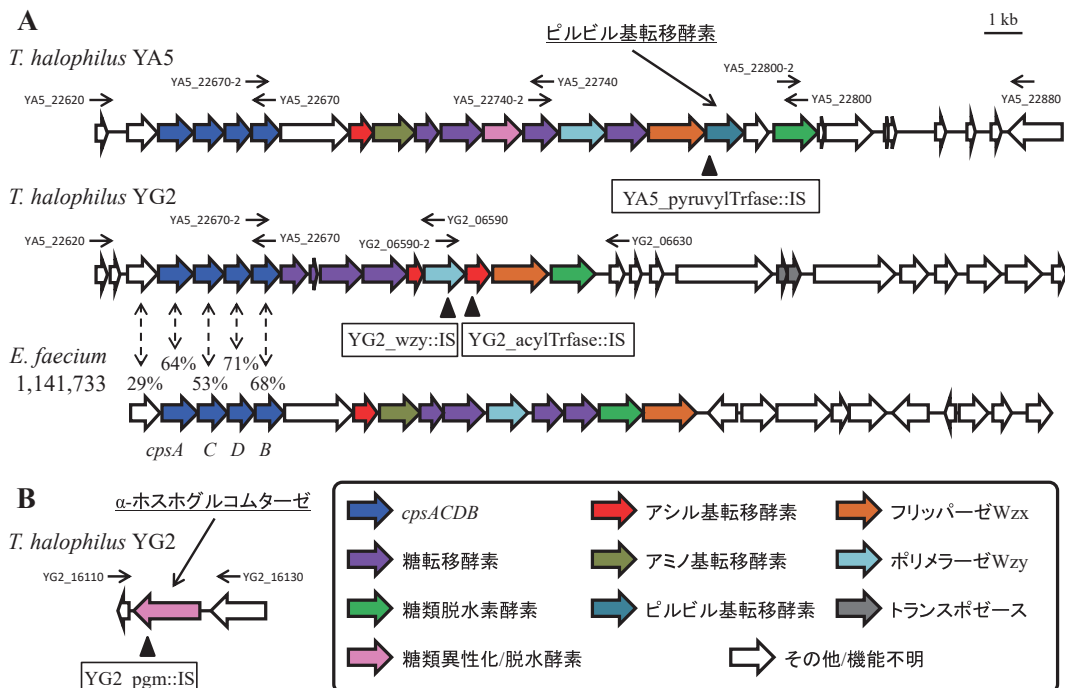


図1 *T. halophilus*のCPS合成遺伝子の模式図。ORFの上の黒い矢印は、プライマーの設計位置を表す。各変異株でISが挿入された位置は、ORFの下の黒い三角形で示す。(A) *T. halophilus* YA5, YG2, および*E. faecium* 1,141,733におけるcps遺伝子クラスターの比較。パーセンテージは、アミノ酸配列の相同性を示す。(B) YG2における $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ遺伝子。

析した変異株がファージ耐性を得た原因が, CPSの欠失や構造変化であるならば, 追加でファージ耐性変異株を取得すれば, CPS合成遺伝子がISによって破壊された変異株が容易に見つけられると期待された。

そこで, YA5を親株として追加で31株のphiYA5\_2耐性変異株を取得し, 図1および表2に示すプライマーを使用してCPS合成遺伝子を含む領域をPCR増幅したところ, 16株でISの転移が示唆される結果が得られた。DNAシーケンス解析の結果, これら16株ではいずれも, 先に取得した変異株と同じく, ピルビル基転移酵素遺伝子にISが転位していることが明らかになった(データ示さず)。

一方, YG2を親株として追加で約700株のphiYG2\_4耐性株を取得し, CPS合成遺伝子を含む領域を増幅したところ, 41株で $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ遺伝子へのIS転移が見出された。更に, 1株はポリメラーゼwzy遺伝子にISが転移しており, 6株はアシル基転移酵素遺伝子にISが転移していた(いずれもデータ示さず)。YA5, YG2いずれの株からも, 追加でCPS合成遺伝子の変異株

取得に成功したことは, *T. halophilus*のCPSがファージとの相互作用に関与していることを強く示唆している。YG2の $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ遺伝子へ転移したISには, ISTeha7とISTeha8という新規ISも含まれていた(詳細は文献15を参照されたい)。

細菌のCPSの構造は非常に多様性に富んでおり, *S. pneumoniae*ではCPS構造の差異に由来する100以上の血清型が知られている<sup>16)</sup>。*T. halophilus*でも, YA5, YG2および全ゲノムが公開されている6株のcps遺伝子群の配列を比較したところ, cpsACDBの下流に存在する遺伝子群は株ごとに異なっていた(図2)。cps遺伝子群の違いがファージ感受性の違いに結び付けられるのであれば, *T. halophilus*に感染するファージの宿主範囲の狭さは, これによってかなりの部分を理解できる可能性がある。

CPSがファージ感受性の変化に寄与する理由を調べるため, YA5のピルビル基転移酵素, YG2の $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ, ポリメラーゼWzy, アシル基転移酵素をコードする遺伝子の変異株をそれぞれ1株ずつ選び, これら4株を更に詳しく

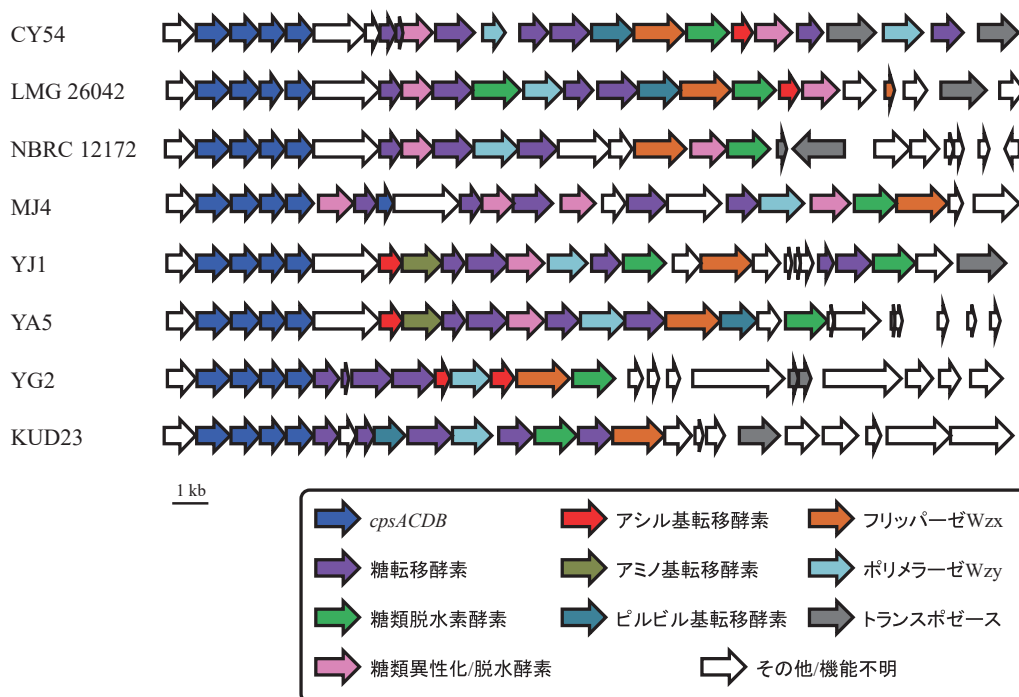


図2 8株の*T. halophilus*におけるcps遺伝子群の比較。

分析することとした。以下、これらの変異株をそれぞれYA5\_pyruvylTrfase::IS, YG2\_pgm::IS, YG2\_wzy::IS, YG2\_acylTrfase::ISと記述する(図1, 表1)。

### 3. CPSの分析

変異株のCPS生産量を評価するため、CPSを含む菌体外多糖を粗抽出し、フェノール硫酸法で定量した(図3AB)。YA5\_pyruvylTrfase::ISは、親株YA5と同等以上の糖が検出されたため、CPSを欠損することなく構造変化を起こしたと推測された。YG2の変異株3株は、親株YG2より検出された糖が少なかった。 $\alpha$ -ホスホグルコムターゼはCPS合成の基質を用意する役割があり、ポリメラーゼWzyは糖鎖を重合するので、いずれもCPS合成に不可欠であると考えられ、YG2\_pgm::ISおよびYG2\_wzy::ISは、CPSを完全に欠損したと思われる。一方、アシル基転移酵素は糖鎖の修飾に関与するがCPS合成に必須ではなく、YG2\_acylTrfase::ISで検出された糖はYG2\_pgm::ISとYG2\_wzy::ISをやや上回っていたことから、

YG2\_acylTrfase::ISは、CPSを完全には欠損していない可能性が考えられた。

YG2とその変異株を、透過型電子顕微鏡で観察した(図3C)。YG2の菌体外には、長いものでは400 nmを超える糸状の構造物が観察された一方で、3株の変異株ではそのような構造は観察されなかった。このことは、*T. halophilus*のcps遺伝子群が、糸状構造物として観察された莢膜の生産に関与していることを示している。YG2\_acylTrfase::ISでは、微量の莢膜が観察されることを期待していたが、顕微鏡で確認できるほど十分なCPS量がなかったと思われる。YG2の糸状構造もほやけている個所があるため、はっきり観察された糸はCPSの一部にすぎず、細胞の周りで糸が見えていない場所にもCPSが層を形成していると考えられる。特に太い糸は、試料の固定あるいは染色の際に、CPSが凝集することで形成された可能性もある。YG2\_pgm::ISの細胞壁の厚さが減少しているのは、おそらく $\alpha$ -ホスホグルコムターゼがCPSだけではなく、タイコ酸やリポタイコ酸など他の細胞表層多糖類の合成にも寄与する

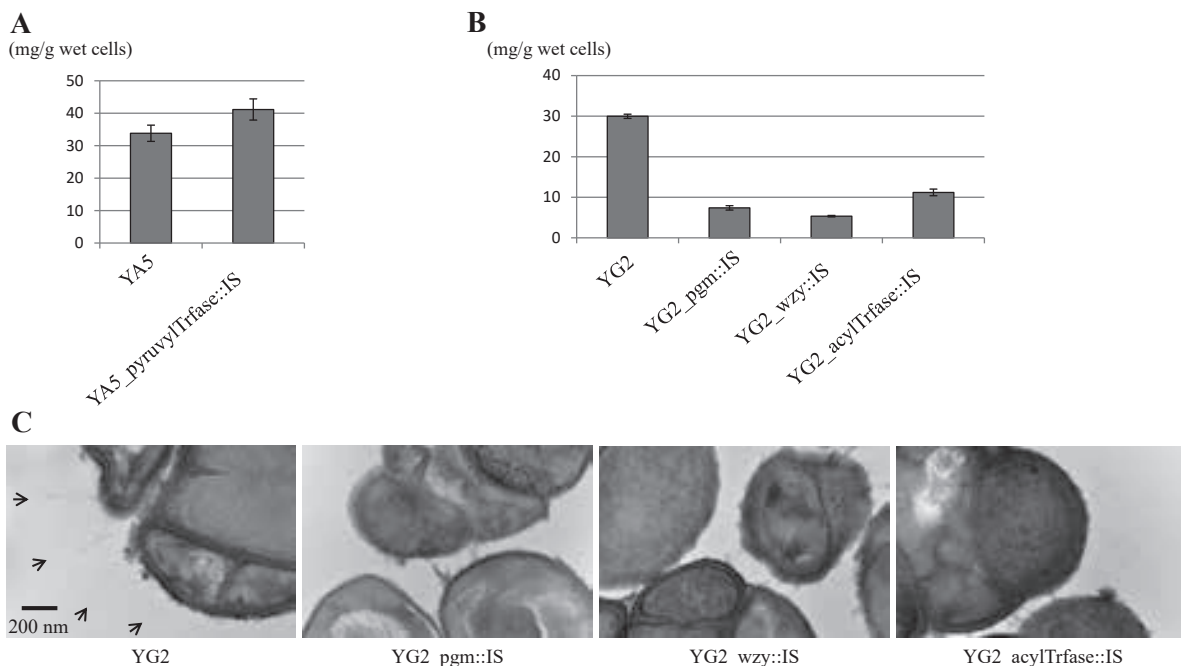


図3 *T. halophilus*の菌体外多糖の分析。(A) YA5およびその変異株の菌体外多糖の定量。各データとエラーバーは、三連で測定した結果の平均値±標準偏差を示している(Bも同じ)。(B) YG2およびその変異株の菌体外多糖の定量。(C) 透過型電子顕微鏡で観察したYG2およびその変異株の細胞形態。矢印は、YG2の菌体外にある糸状構造を示している。

ためであろう<sup>17)</sup>。

莢膜の形態的特徴は種によって異なり, 例えば *Staphylococcus aureus* は, 墨汁染色すれば光学顕微鏡で観察可能なほど厚い莢膜を作る<sup>18)</sup>。一方で *E. faecium* の莢膜は, 透過型電子顕微鏡を用いても免疫染色しないと観察できない<sup>19)</sup>。 *T. halophilus* の莢膜は, 透過型電子顕微鏡で糸状構造物として観察された。同様の構造物は以前, 植木らによっても観察され, この糸状構造物が細胞塊形成に関与しているとも推測されていた<sup>20)</sup>。しかし, YG2は娘細胞の分離に必要な細胞壁分解酵素が欠損しているために細胞塊を形成することが分かっており<sup>21)</sup>, CPSを欠損し糸状構造物を失った変異株も, 親株と同様に細胞塊を形成したため (データ示さず), 少なくともこの株においては, 細胞外の糸状構造物と細胞塊形成性に関連はない。

#### 4. 変異株のファージ感受性

phiYA5\_2とphiYG2\_4に対する変異株のファージ感受性をスポットアッセイで調べた (図4A)。YA5\_pyruvylTrfase::ISがphiYA5\_2に感染しなかったのは想定通りであったが, YG2の変異株3株がphiYA5\_2に感染したのは驚きの結果であった。phiYG2\_4に対しては, YG2\_pgm::ISとYG2\_wzy::ISは非感受性になっていたが, YG2\_acylTrfase::ISはphiYG2\_4耐性株として取得したにもかかわらず, 感受性のままであった。

phiYG2\_4耐性を確認するために, YG2とその変異株の培養液を希釈し, phiYG2\_4とともに寒天培地上にスポットした (図4B)。YG2\_pgm::ISとYG2\_wzy::ISは, phiYG2\_4の影響を全く受けなかったが, YG2\_acylTrfase::ISはやや生育を阻害された。一方で親株YG2はphiYG2\_4によってさらに顕著に生育を阻害されたため, YG2\_acylTrfase::ISはphiYG2\_4に対し感受性はある

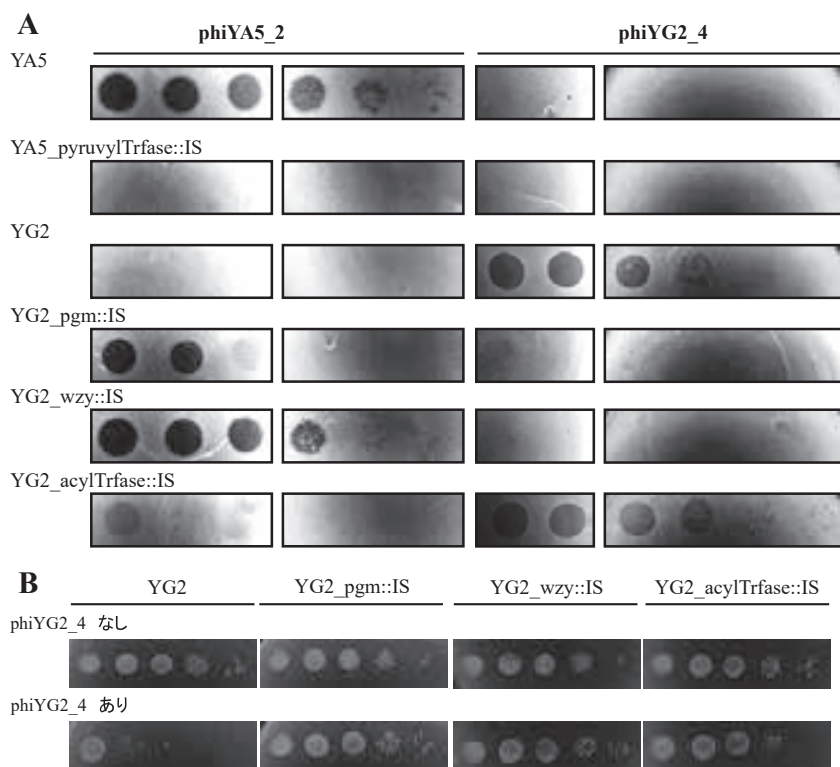


図4 YA5, YG2およびそれらの変異株のファージ感受性。(A) phiYA5\_2およびphiYG2\_4によるスポットアッセイ。各ファージを左から右に10倍ずつ希釈し, 左上に示した各宿主株に対してスポットした。(B) phiYG2\_4の有無によるYG2とその変異株の生育の違い。各株の培養液を左から右に10倍ずつ希釈し, 寒天培地上にスポットした。phiYG2\_4ありのプレートには, 予め $10^6$  pfu超のphiYG2\_4を塗布した。

ものの、親株と比べれば耐性を得たと結論付けられた。

YG2から41株の $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ変異株を取得する間、アシル基転移酵素の変異株は6株しか取得されなかった理由は、アシル基転移酵素が変異しても完全にはphiYG2\_4耐性にならないためであろう。ポリメラーゼWzyの変異株がわずかに1株しか取得されなかったのは、YG2\_wzy::ISの生育速度が親株より遅かったことから理解できる(データ示さず)。生育遅延は、Wzyが変異すると糖鎖の合成中間体が蓄積し、ペプチドグリカン合成にも必要な脂質担体が枯渇するためと考えられる<sup>22, 23)</sup>。

## 5. ファージ結合アッセイ

CPSは、ファージが結合するレセプターとなったり、逆にファージの結合を阻害するための障壁として機能したりする<sup>24)</sup>。したがって、本研究で得た変異株も、ファージによる結合性が何らかの影響を受けていると推測し、ファージ結合アッセイを実施した。ファージを菌体と混合して、菌体に結合したファージを遠心分離で除去し、上清の遊離ファージ数からファージの菌体に対する結合を評価した。

phiYA5\_2は、YA5、YG2\_pgm::IS、YG2\_wzy::ISに結合し(図5A)、プラーク形成アッセイ

の結果(図4A)と一致した。phiYA5\_2にとってはCPSは宿主への結合を阻害する障壁であり、YG2\_pgm::ISとYG2\_wzy::ISのようなCPS欠損株には結合できる。そう考えると、YA5由来のphiYA5\_2耐性株の変異がピルビル基転移酵素に集中していたことも理解できる。ピルビル基転移酵素は糖鎖の修飾酵素なので、欠損しても構造変化に留まるが(図3A)、その上流にはフリッパーゼWzxがあり(図1A)、Wzxより上流に変異が生じればCPSの発現そのものが低下して、phiYA5\_2に対し耐性を得られないと考えられるためである。phiYA5\_2がYG2の変異株に結合することから、YG2もphiYA5\_2のレセプターを有しており、CPSはそのレセプターを覆ってファージの接近を物理的に阻害していると推定される。phiYA5\_2は、YA5のCPSだけは特異的に突破し、レセプターに接近できる(次項を参照されたい)。

phiYG2\_4による結合アッセイでは、YG2へ結合する一方、変異株3株に対しては結合しなかった(図5B)。CPSがphiYG2\_4による結合に必要な事実であるという事は、YG2のCPSがphiYG2\_4のレセプターであることを示唆している。この結果は、phiYG2\_4に対する耐性と一致している(図4B)。

YG2\_acylTrfase::ISはCPSの発現量低下と構造変化を生じていると推測していたことから、おそらく、YG2\_acylTrfase::ISに対してはCPSを

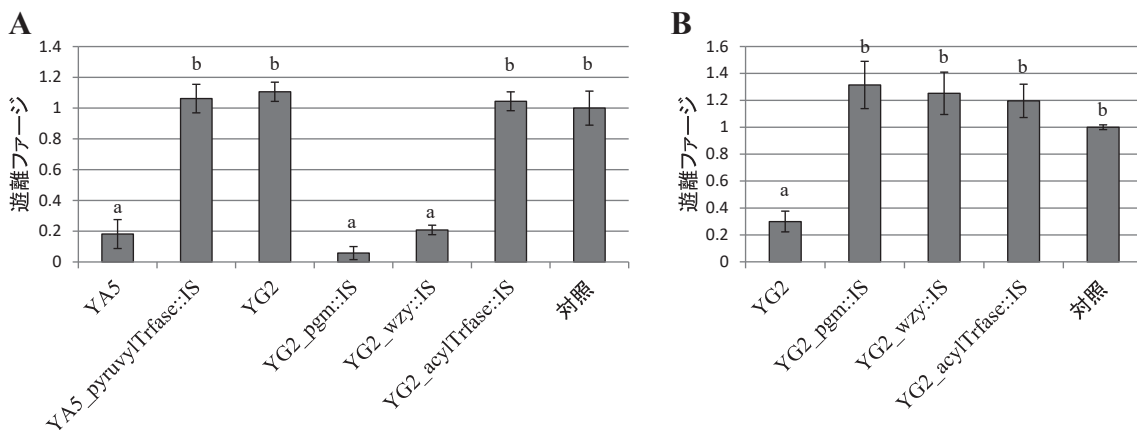


図5 ファージの結合アッセイ。遠心分離後の上清の遊離ファージ数は、菌体を加えない対照区の遊離ファージ数に対する比として表している。各データとエラーバーは、三連実験の平均値±標準偏差を示した。異なるアルファベットが付された株間には、Tukey法による検定で5%水準の有意差がある。(A) phiYA5\_2による結合アッセイ。(B) phiYG2\_4による結合アッセイ。



レセプターとするphiYG2\_4の結合効率が低下しており, それによって耐性が付与されたと思われる。液中で実施した結合アッセイではYG2\_acylTrfase::ISに対するphiYG2\_4の結合は検出できなかったが, 寒天培地上で宿主とファージが密集している場合には, 感染可能だった (図4A)。吸着効率が低下しているにもかかわらず, phiYG2\_4のYG2\_acylTrfase::ISに対するプラークが, YG2に対するのと同様, 非常に明瞭で数も同等であった理由は, 莢膜をレセプターとするファージであっても, 莢膜が薄い株に対する方が感染しやすいことから理解できるかもしれない<sup>24)</sup>。

グラム陽性菌のファージでCPSをレセプターとして利用すると報告されているのは, *Clostridium perfringens*のファージCPS1のみである<sup>9)</sup>。筆者らの知る限り, 乳酸菌に感染するファージがCPSをレセプターとする例は, 本研究が初めての報告となる。

## 6. ファージ粒子の酵素活性

前項で述べた通り, CPSはphiYA5\_2によるレセプターへの結合を阻害すると考えられるが, YA5はCPSを有するにもかかわらずphiYA5\_2に感受性がある。CPSはファージに対する物理的障壁として機能し, それに対してファージはデポリメラーゼと呼ばれるCPSを分解する酵素を有することが, 特にグラム陰性菌のファージにおいて報告されている<sup>25)</sup>。そこで, phiYA5\_2にUV照射し, ファージ粒子の酵素活性を残しつつ, 感染性を失わせた<sup>26)</sup>。このUV照射したphiYA5\_2を乳酸菌にスポットしたところ, プラークは形成しなかったが, YA5, YG2\_pgm::IS, YG2\_wzy::ISに対して溶菌作用を示した (図6A)。このことから, phiYA5\_2の粒子が, 何らかの細胞成分を分解する活性を持っていることは明らかである。この結果はphiYA5\_2の結合アッセイの結果とよく一致しており (図5A), ファージ粒子が持つ酵素による細胞成分の分解が, ファージのレセプターに対する結合に必要であることを示唆している (あるいはその逆かもしれない)。溶菌作用はYA5に対

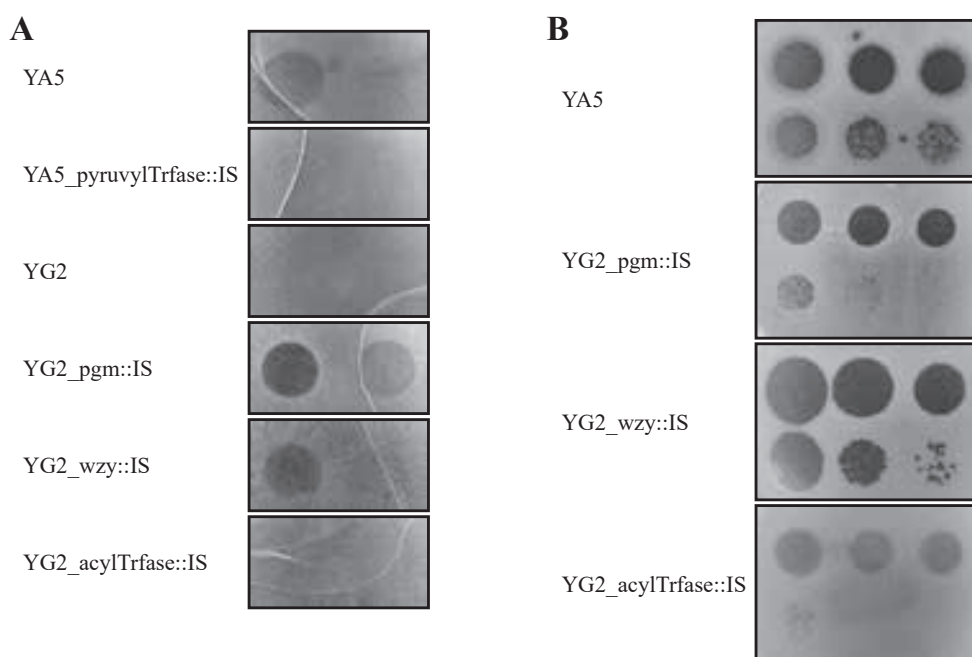


図6 phiYA5\_2の酵素活性。(A)phiYA5\_2をUVで不活化し, 各菌株に対しスポットした。左のスポットには, UV照射前で $1.9 \times 10^7$  pfuのファージが含まれており, 右のスポットはそれを10倍に希釈したものである。(B) phiYA5\_2のプラークを, 寒天培地の後ろから光を当てて観察した。スポットしたファージは, 左上から右下に向かって10倍ずつ希釈した。

してだけでなく、YG2のCPS欠損変異株に対しても発揮されたため、この作用は、CPSではなくペプチドグリカンの分解によってもたらされたと推測した。細胞壁を分解するファージが多数結合すると、細菌は即座に溶菌する<sup>27)</sup>。phiYA5\_2と同属のファージがペプチドグリカン分解酵素を有するであろうことは、以前にも指摘した<sup>13)</sup>。

CPSを分解するデポリメラーゼを持つファージの典型的な特徴として、プラークの周囲にハローを形成することが知られている<sup>25)</sup>。これは、宿主に感染する前に宿主のCPSを分解するためである。phiYA5\_2のプラークを注意深く観察すると、YA5のプラークの周りにハローが確認された(図6B)。phiYA5\_2はYG2\_pgm::IS, YG2\_wzy::IS, YG2\_acylTrfase::ISに対してもプラークを形成するものの、これらの株ではプラーク周囲にハローは認められなかった。このことは、phiYA5\_2がYA5のCPSを分解するデポリメラーゼを有することを示唆している。

つまり、UV処理したphiYA5\_2によるYG2\_pgm::ISとYG2\_wzy::ISの溶菌はペプチドグリカン分解酵素単独で起こされたのに対し、YA5の溶菌は、CPSデポリメラーゼとペプチドグリカン分解酵素によって相乗的に起こされたと考えられる。ファージのデポリメラーゼは特定の構造のCPSのみを分解可能なため、CPS構造の多様性はファージの宿主範囲の狭さを生み出す。ただし、CPSデポリメラーゼについてはグラム陰性菌に感染するファージでよく研究されているものの、グラム陽性菌のファージではあまり報告がない<sup>28)</sup>。

YG2には感染しないにもかかわらず、YG2のCPS欠損変異株には感染するファージは、phiYA5\_2以外にも複数確認できており(データ示さず)、CPSが物理的障壁として機能するのはphiYA5\_2に対する特殊な現象ではなく、*T. halophilus*に感染するファージにおいては一般的な現象であると考えなければならない。

以上に述べた通り、*T. halophilus*のCPSはファージの結合レセプターとして、またはファージの結合阻害因子として機能し、菌株ごとの

ファージ感受性の違いは、CPS構造の多様性に起因することが示唆された。ファージのレセプター認識タンパク質やデポリメラーゼが、特定の構造のCPSを認識することで、ファージは特定の宿主に感染する。*T. halophilus*のファージ感受性の差異に直結する遺伝子を明らかにした本研究は、醤油醸造においてファージ感染を防ぐ対策法の確立に貢献しようという点で産業上有用であるのみならず、グラム陽性菌においてCPSが宿主範囲を規定しているメカニズムを示唆した点で学術的にも重要な報告である。本研究が今後のファージ研究の更なる発展に寄与することを期待する。

本報は2023年10月19日に開催された日本醤油技術センター第91回醤油研究発表会(新潟大会)において発表した内容に一部加筆したものである。なお本研究は本誌に先立ち*Microbiology Spectrum*誌に掲載されている。著作権はアメリカ微生物学会が保持しており、文献15から本文と図表の一部を改変・転載している。本論文を引用する際は文献15を引用する必要がある(Copyright © American Society for Microbiology, *Microbiol Spectr* 11:e00385-23, 2023)。

## 要 約

1. *Tetragenococcus halophilus*の莢膜多糖の合成に寄与する*cps*遺伝子群を特定した。
2. *cps*遺伝子の変異はファージ感受性の変化をもたらした。
3. phiYG2\_4は、莢膜欠損変異株には結合せず、莢膜をレセプターとして利用していることが示唆された。
4. phiYA5\_2に対しては莢膜が物理的障壁となっており、phiYA5\_2はYA5の莢膜を分解することで宿主に接近することが示唆された。
5. *T. halophilus*に感染するファージの宿主範囲の狭さは、莢膜多糖の構造的多様性によって生み出されるところが大きいと考えられる。

参 考 文 献

- 1) K. Uchida & C. Kanbe : *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**, 429 (1993)
- 2) 脇中琢良ら : 本誌, **49**, 85 (2023)
- 3) ST Islam & JS. Lam : *Can. J. Microbiol.* **60**, 697 (2014)
- 4) AJ. Standish & R. Morona : *Antioxid. Redox. Signal.* **20**, 2274 (2014)
- 5) AA. Zeidan et al. : *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, S168 (2017)
- 6) SD. Bentley et al. : *PLoS Genet.* **2**, e31 (2006)
- 7) T. Wakinaka et al. : *Int. J. Food Microbiol.* **292**, 137 (2019)
- 8) M. Matsutani et al. : *Front. microbiol.* **12**, 1605 (2021)
- 9) E. Ha et al. : *Viruses* **11**, 1002 (2019)
- 10) C. Baptista et al. : *J. Bacteriol.* **190**, 4989 (2008)
- 11) KL. Palmer et al. : *MBio* **3**, e00318-11 (2012)
- 12) C. Gilbert et al. : *Infect. Immun.* **68**, 3251 (2000)
- 13) T. Wakinaka et al. : *Microbiol. Spectr.* **10**, e00336-22 (2022)
- 14) T. Wakinaka & J. Watanabe : *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e00208-19 (2019)
- 15) T. Wakinaka et al. : *Microbiol. Spectr.* **11**, e00385-23 (2023)
- 16) J. Sempere et al. : *Sci. Rep.* **12**, 1 (2022)
- 17) V. Lazarevic et al. : *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 39 (2005)
- 18) TJ. Foster : *Vaccine* **9**, 221 (1991)
- 19) J. Huebner et al. : *Infect. Immun.* **67**, 1213 (1999)
- 20) 植木達朗ら : 本誌, **28**, 105 (2002)
- 21) D. Shirakawa et al. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1724 (2020)
- 22) D. Liu et al. : *J. Bacteriol.* **178**, 2102 (1996)
- 23) EWC. Sewell & ED. Brown : *J. Antibiot.* **67**, 43 (2014)
- 24) S. Pelkonen et al. : *J. Bacteriol.* **174**, 7757 (1992)
- 25) A. Latka et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 3103 (2017)
- 26) A. Cornelissen et al. : *PLoS One* **6**, e18597 (2011)
- 27) M. Delbrück : *J. Gen. Physiol.* **23**, 643 (1940) 36
- 28) Y. Shen & MJ. Loessner : *Curr. Opin. Biotechnol.* **68**, 166 (2021)