

ボツリヌスC型とD型神経毒素を支配するバクテリオファージの遺伝子解析と溶原化の分子機構

阪口義彦^{a*}, 林 哲也^{b,c}, 黒川 顕^d, 中山恵介^c, 大島健志郎^e, 藤永由佳子^f,
大西 真^g, 大坪栄一^h, 服部正平^e, 小熊恵二^a

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病原細菌学,

^b宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 生命科学部門生命環境科学分野, ^c宮崎大学医学部医学科 感染症学,

^d奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 比較ゲノム, ^e北里大学生命科学研究科,

^f大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター, ^g国立感染症研究所 細菌第一部,

^h東京大学分子細胞生物学研究所 分子情報・制御

キーワード：バクテリオファージ, ボツリヌス毒素, 挿入配列, プラスミド, プロファージ

はじめに

ボツリヌス菌は強力な神経毒素を産生し、ヒトや家畜に強力な致死作用を示す¹⁾。本毒素は無毒成分と結合しているため、胃液や腸液に強く、毒素型中毒を引き起こす²⁾。毒素はその抗原性の違いによりA～G型に分類されるが、その生化学的性状からはI～IV群に分類されている。これらの型の中で、毒素遺伝子はC型とD型菌においてのみ宿主特異性バクテリオファージのゲノム上に存在している³⁻⁷⁾。また、これらのファージ上にはC3酵素遺伝子も存在する⁸⁾。飯田らおよび小熊らは、C型およびD型菌毒素産生株であるC-Stockholm (C-ST), C-468, D-1873より得たファージをそれぞれ c-st, c-468, d-1873 ファージと名付け、これらのファージを、同じ有毒株からアクリジンオレンジ処理により得られた無毒株である

(C)-AO2, (C)-468NT, (D)-139, (D)-151にそれぞれ感染させると、無毒株は毒素産生株へと変換される、ファージ変換であることを認めた^{3,4)}。毒素産生能は特定のファージと無毒株においてのみ認められるが、無毒株の中には感染するファージの種類により、C型またはD型に変換された。これらのファージにおいて、その形態はよく似ているが、抗原性が異なっていることから、3つのグループに分類された。(グループI：c-st と c-468, グループII：d-1873, グループIII：d-4947)⁹⁾。

他方、菌体内に挿入された毒素遺伝子は、毒素変換菌を抗ファージ血清またはアクリジンオレンジの含む培地で、容易に毒素産生性が消失したことから、毒素遺伝子が宿主染色体に完全に溶原化されていない、“pseudolysogeny”であると結論された^{5,6,10)}。今回、我々はC型毒素変換ファージ(c-st ファージ)の全ゲノム塩基配列の決定を行い、本ファージゲノムの様々な特徴を明らかにしたのでここに報告する。

平成18年10月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7158 FAX：086-235-7162

E-mail：ysakaguc@md.okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆



阪口 義彦

平成11年、徳島文理大学大学院薬学研究科修士課程を卒業後、4月より岡山大学大学院医学研究科博士課程に入学。小熊恵二教授の指導の下、ボツリヌス毒素遺伝子を伝達するバクテリオファージの研究を行う。平成12年1月～12月には、信州大学医学部に国内留学し、林哲也教授の指導の下、本ファージの全ゲノム塩基配列の決定を行った。その後、岡山大学にもどり、本ファージの様々な特徴を明らかにし、Proc. Natl. Acad. Sci. USA に発表した。平成17年、医学博士の学位を取得し、4月より岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学の助手となる。

c-st ファージゲノムの特徴

c-st ファージの全塩基配列は185,682bpの線状2本鎖DNAで、ゲノムの両末端には404bpのterminal direct repeat (TDR)が存在した。GC含量は26.2%と宿主ゲノムおよび近縁のクロストリジウム属細菌に類似していた¹¹⁻¹³。本ファージゲノム上にはC型神経毒素, hemagglutinin (HA), non-toxic non-HA (NTNH), botR, C3 exoenzymeを含む198個のタンパク質コード領域 (ORF) が同定されたが, tRNA 遺伝子は存在していなかった(図1)。また, *Bacillus subtilis* のSP β ファージゲノムのORFと有意な相同性を示すORFが多数存在し, その並びも保存されていることか

ら, c-st はSP β 類縁のファージであることが示唆された¹⁴。

Insertion sequence (IS) element

c-st ファージゲノム上には新しいタイプのISとその残骸が多数存在し, c-st ゲノムでは全体の約10%を占めていた。全部で12コピーのISが存在し, 7つに分類できたが, 互いに類似性があった。このうちの4種類 (ISCbt 1-4) については, ISとしての構造を確定することができたが, いずれも明らかなinverted repeatを持たず, 特定の配列を特異的に認識して転移するタイプであった。これらの全てのISは, 末端にinverted repeatを持たないIS 200/605ファミリーに

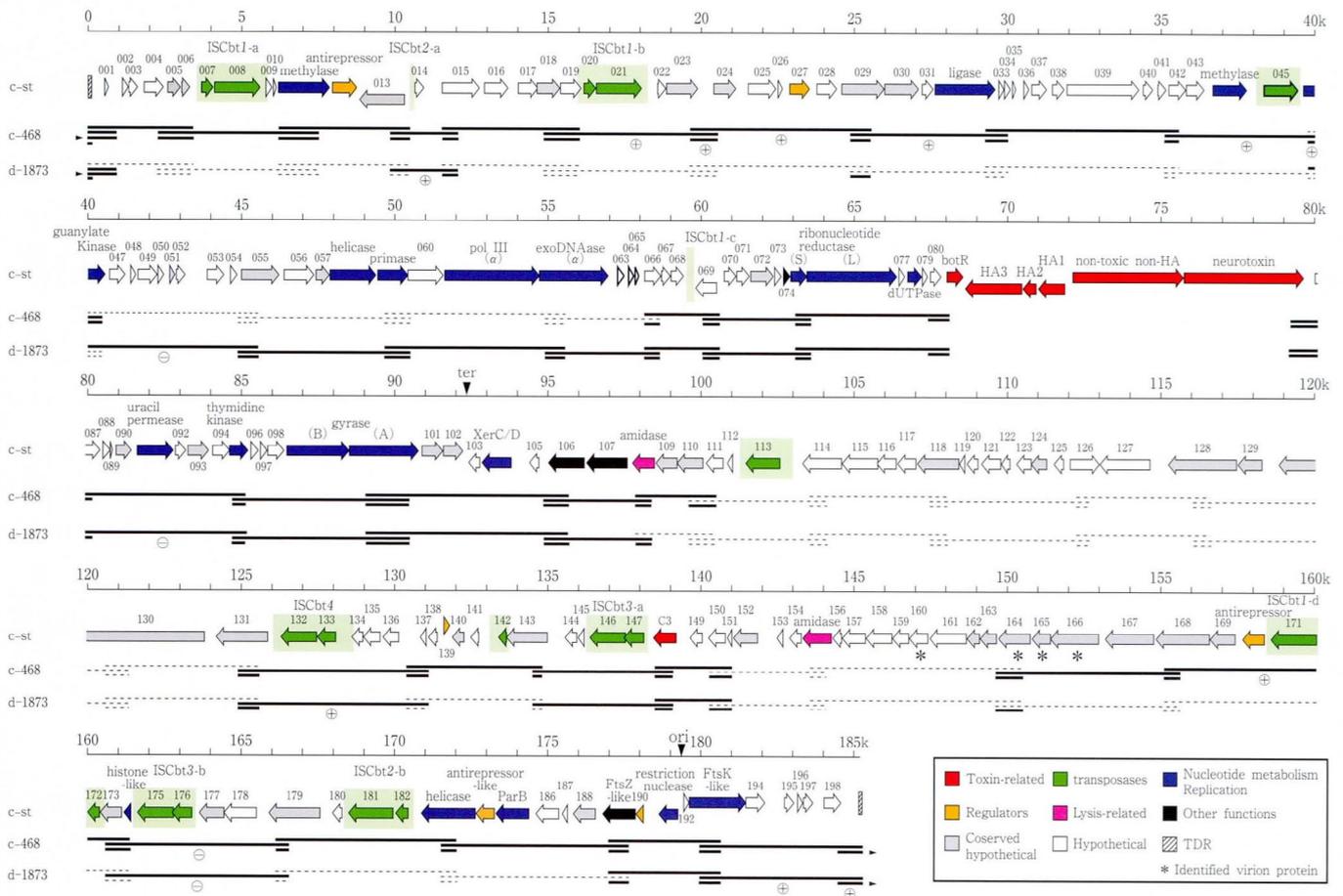


図1 c-st ファージゲノムの genome organization とC型とD型ファージのPCR スキャニング解析

c-st ファージゲノム上の矢印は確定した open reading frame (ORF) を, box 上または下の番号は ORF 番号を示している。線の上または下に示している ORF は, それぞれ左から右, 右から左に転写される方向である。推定した機能から, ORF は8つのグループに分類し, 同じグループのORFは同じ色で示している。斜線で示した box は403 bp の TDR で, 緑色の box は IS element である。また, 推定した replication origin (ori) と terminus (ter) の位置も示した。星印は c-st ファージタンパク質のN末端解析により決定した4つの構造タンパク質である。c-468, d-1873 ファージのPCR スキャニング解析の結果はORF mapの下に示した。実線はPCR産物が得られた部分, 破線は得られなかった部分である。(+)はc-st ファージより大きなPCR産物が, (-)は小さいPCR産物が得られたことを示す。

属する新規の IS element であるため，必ずしも末端が同定できなかった¹⁵⁾。

Pseudolysogeny

C 型と D 型菌は C 型または D 型ファージにより溶原化されているが，容易に消失する．この現象の理由としては，幾つか考えられているが，まだ証明されていない．今回，我々は c-st ファージゲノムは宿主内に挿入された後，細胞質にプラスミド様に環状化して存在することを明らかにした．

c-st ファージゲノム構造の全体的な特徴をみると，ゲノム両末端付近から中央部へと向かう ORF の方向性とこれに対応した GC スキューから，本ファージゲノムは細菌染色体と同じ構造を示すと推察された．このような特徴から，c-st ファージが感染した際には，両末端に存在する TDR 間での組換えにより環状化した後，複製している可能性が示唆された．まず，c-st ファージゲノムが宿主内で環状化することを確かめるため，特異的な 2 つのプライマー対，1f と 1r および 2f と 2r を用いて PCR を行った (図 2)．c-st ファージが感染している C-ST 株と溶原株では 3.8kb と 2.3kb のバンドが得られたが，感染していない宿主，indicator strain，(C)-AO2 では PCR 産物が検出されなかった (図 2 B)．さらに，得られたそれぞれの

PCR 産物の塩基配列を決定すると，ファージゲノムは両末端の反復配列を介した組み換えにより，環状化していることが示唆された．

溶原化しているファージの末端領域の構造をさらに確認するため，サザンブロット解析を行った．それぞれの DNA を *Aat* II と *Sal* I で double-digestion し，ファージ末端領域にハイブリダイズする P1，P2，P3 の 3 種類のプローブを用いてサザンブロット解析を行った (図 2 C)．P1 を用いた場合，c-st ファージは 1 kb の位置にシグナルが検出されたが，C-ST 株と溶原株は 2.7kb の位置にシグナルが検出された．P3 を用いた場合，c-st ファージは 1.9kb，C-ST 株と溶原株は 2.7kb の位置にシグナルが検出された．P2 を用いた場合は，C-ST 株と溶原株は 2.7kb の位置に 1 つのシグナルが検出されるのに対して，c-st ファージでは，1kb と 1.9kb の 2 つのシグナルが検出された．これらの結果，c-st ファージゲノムはファージ粒子内では両末端に反復配列をもった線状構造をとるのに対して，溶原菌内ではこの両末端の反復配列が 1 つになった環状化 DNA 分子として存在することが示唆された．

さらに，溶原菌内に存在する c-st ファージ DNA が宿主染色体に組込まれているのか，あるいは染色体とは独立した DNA 分子として存在するのか，を明らか

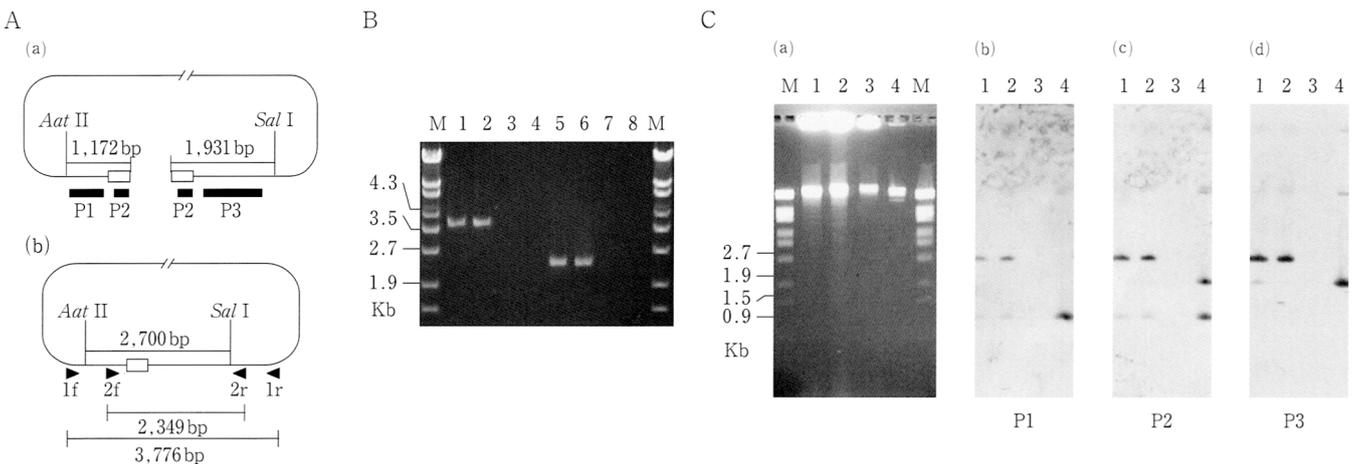


図 2 溶原株とファージ粒子内での c-st ファージのゲノム構造

A : c-st ファージゲノムの線状 (a) と環状 (b) 構造でのプローブ (a) と PCR プライマー (b) の位置。
 B : 2 つのプライマー対，1f と 1r (レーン 1 ~ 4) または 2f と 2r (レーン 5 ~ 8) を用いた PCR 解析。
 C-ST，溶原株，(C)-AO2，c-st ファージ粒子から DNA を精製し，実験に用いた．レーン M ; DNA サイズマーカー，レーン 1 と 5 ; C-ST，レーン 2 と 6 ; 溶原株，レーン 3 と 7 ; (C)-AO2，レーン 4 と 8 ; c-st ファージ粒子。
 C : サザンブロットハイブリダイゼーション。
 それぞれの DNA を *Aat* II と *Sal* I で消化し，1% アガロースゲルで分離した．プローブ P1 (b)，P2 (c)，P3 (d) を用いてサザンブロット解析を行った．レーン M とレーン 1 ~ 4 は B の標品と同様である．

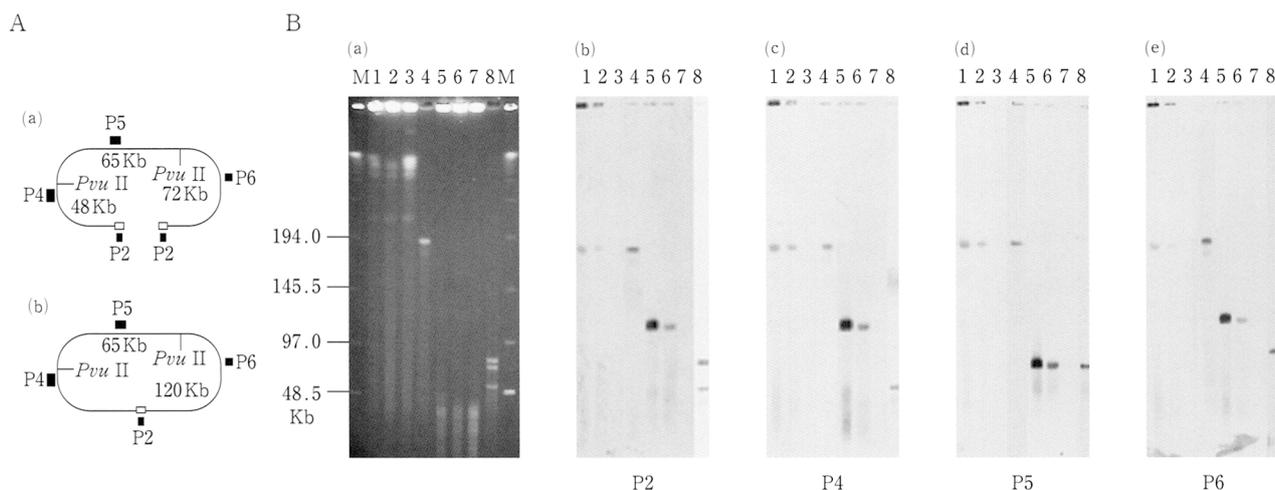


図3 溶原株とファージ粒子内での c-st ファージ DNA のサザンブロット解析
 A ; c-st ファージゲノムの線状(a)と環状(b)構造での *Pvu* II 部位とプローブの位置.
 B ; サザンブロットハイブリダイゼーション.

C-ST, 溶原株, (C)-AO2, c-st ファージ粒子のそれぞれの DNA を *Apa* I (レーン 1~4) または *Pvu* II (レーン 5~8) で消化し, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) により分離した (a), プローブ P2 (b), P4 (c), P5 (d), P6 (e) を用いて, サザンブロット解析を行った. レーン M ; DNA サイズマーカー, レーン 1 と 5 ; C-ST, レーン 2 と 6 ; 溶原株, レーン 3 と 7 ; (C)-AO2, レーン 4 と 8 ; c-st ファージ粒子.

にするために, genomic DNA の PFGE とサザンブロット解析により検討した. それぞれの DNA を *Apa* I または *Pvu* II で消化し, 4つのプローブ (P2, P4, P5, P6) を用いてサザンブロット解析を行った (図3). c-st ファージゲノム上には, *Apa* I 部位は存在していないが, *Pvu* II 部位は2カ所存在する. *Apa* I で消化した DNA を解析した場合には, いずれのプローブを使った場合も, 溶原株から得られるシグナルは, 完全な c-st ファージ DNA と同じサイズのものが検出された. 一方, *Pvu* II 消化においては, プローブ 2 の場合, c-st ファージでは 48kb と 72kb の2つのシグナルが認められたが, 溶原株では 120kb のシグナルが得られた. これはそのサイズから, 環状のファージ DNA に由来すると考えられた. 同様の結果は, P4 と P6 においても得られ, 環状のファージ DNA に由来するシグナルが得られた. これに対して, P5 の場合, 溶原株においても c-st ファージと同様に 65kb のシグナルのみが検出された. これらの結果は, c-st ファージ DNA は宿主の染色体に組込まれず, 染色体とは独立した環状 DNA として存在していることを示しており, ゲノムの構造的な特徴から予測された結果と一致した.

C型とD型ファージのゲノム構造の比較

C型とD型ファージのゲノム構造を c-st と比較す

るため, c-st のゲノム配列を基に全体の PCR スキャンニング解析を行ったところ, 全体的には非常にバリエーションがあったが, C型とD型毒素遺伝子と C3 exoenzyme の上流および下流領域, DNA 複製に関与する遺伝子, ori と ter の領域, TDR においては非常によく保存されていた (図1). さらに, d-1873の毒素遺伝子の上流と下流の 5 kb の配列決定を行ったところ, 小さい遺伝子が欠損していたが, 配列レベルではC型とD型は同じであった. したがって, C型とD型ファージは互いに良く似たファージである可能性が高いと考えられた.

おわりに

今回,我々は c-st ファージのゲノム解析を行った結果, 本ファージの様々な特徴が明らかとなった. 最も興味深いことは, 本ファージ DNA が宿主染色体に組込まれず, 宿主内で両末端での組換えにより環状化して存在していることである. このことから, 小熊らが以前から “pseudolysogeny” と推察してきた結果と一致し, 容易に毒素産生性が消失する理由が解消された.

謝 辞

本稿作成にあたり, 研究を支援して頂いた日本学術誌振興会の未来開拓研究事業に深く感謝致します.

文 献

- 1) Gill DM : Bacterial toxins : a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* (1982) **46**, 86-94.
- 2) Oguma K, Inoue K, Fujinaga Y, Yokota K, Watanabe T, Ohyama T, Takeshi K and Inoue K : Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *J Toxicol* (1999) **18**, 17-34.
- 3) Inoue K and Iida H : Conversion of toxigenicity in *Clostridium botulinum* type C. *Jpn J Microbiol* (1970) **14**, 87-89.
- 4) Inoue K and Iida H : Phage-conversion of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D. *Jpn J Med Sci Biol* (1971) **24**, 53-56.
- 5) Eklund MW, Poysky FT, Reed SM and Smith CA : Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. *Science* (1971) **172**, 480-482.
- 6) Eklund MW, Poysky FT and Reed SM : Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type D. *Nat New Biol* (1972) **235**, 16-17.
- 7) Oguma K, Iida H and Inoue K : Bacteriophage and toxigenicity in *Clostridium botulinum* : an additional evidence for phage conversion. *Jpn J Microbiol* (1973) **17**, 425-426.
- 8) Hauser D, Gibert M, Eklund MW, Boquet P and Popoff MR : Comparative analysis of C3 and botulin neurotoxin genes and their environment in *Clostridium botulinum* types C and D. *J Bacteriol* (1993) **175**, 7260-7268.
- 9) Oguma K, Iida H, Shiozaki M and Inoue K : Antigenicity of converting phages obtained from *Clostridium botulinum* types C and D. *Infect Immun* (1976) **13**, 855-860.
- 10) Oguma K : The stability of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D. *J Gen Microbiol* (1976) **92**, 67-75.
- 11) Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV and Smith DR : Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* (2001) **183**, 4823-4838.
- 12) Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S and Hayashi H : Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) **99**, 996-1001.
- 13) Bruggemann H, Baumer S, Fricke WF, Wiezer A, Liesegang H, Decker I, Herzberg C, Martinez-Arias R, Merkl R, Henne A and Gottschalk G : The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) **100**, 1316-1321.
- 14) Lazarevic V, Dusterhoft A, Soldo B, Hilbert H, Mauel C and Karamata D : Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP β c2. *Microbiology* (1999) **145**, 1055-1067.
- 15) Chandler M and Mahillon J : IS200 and the IS605 complex ; in *Mobile DNA II*, Craig NL, Craigie R, Gellert M and Lambowitz AM eds, *Am Soc Microbiol*, Washington DC (2002) pp 305-366.